

FLAVIANA ANTUNES SOUSA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS QUANTITATIVOS E
QUALITATIVOS DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA NO LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

T

S725a
2022

Sousa, Flaviana Antunes, 1993-

Avaliação de métodos colorimétricos quantitativos e qualitativos da enzima fosfatase alcalina no leite / Flaviana Antunes Sousa. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (67 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.674>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leite - Microbiologia. 2. Fosfatase alcalina.
3. Colorimetria - Análise. 4. Leite - Pasteurização. I. Yamatogi, Ricardo Seiti, 1981-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 637.1277

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

FLAVIANA ANTUNES SOUSA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS QUANTITATIVOS E
QUALITATIVOS DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA NO LEITE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 10 de agosto de 2022.

Assentimento:



Flaviana Antunes Sousa
Autora



Ricardo Seiti Yamatogi
Orientador

Dedico este trabalho aos meus queridos avós paternos Filomena e Sílvio (*in memoriam*), fontes de bondade e carinho. Aos meus avós maternos Deusdeta e Antônio exemplos de amor e força.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser ABA PAI, meu refúgio e fortaleza.

Aos meus pais Iremar e Fábio, por me ensinarem agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

Aos meus irmãos Jean Pierre e Flávio por todo carinho e proteção.

Ao Cláudio Junior, namorado sempre companheiro e amoroso e sua família pelo apoio, paciência e incentivo em especial a Elisângela, que nunca mediu esforços para ajudar realizar os meus sonhos.

Aos meus sobrinhos Pedro, Lis e Arthur que trouxeram para minha vida alegria e esperança de dias melhores.

Ao meu orientador, Professor Ricardo, pela atenção, estímulo e oportunidade. Um ser humano incrível, coração nobre dedicado à arte de ensinar.

Ao Professor Nero por todos os ensinamentos transmitidos e pela contribuição no meu processo de aprendizado.

Ao professor Fábio, pela presteza em enriquecer o meu trabalho através do seu conhecimento.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Medicina Veterinária, pelo ambiente criativo e apoio acadêmico principalmente da Rosi, funcionária exemplar e competente.

Ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – INSPOA pelo auxílio neste projeto.

Ao Laboratório do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) e grupo INOVALEITE por toda integração e colaboração em especial ao professor Antônio Fernandes pela confiança.

Aos funcionários do DVT, Estábulo da UFV e Laticínio Escola (FUNARBE) pela ajuda prestada. Em especial a Wallace, Dagoberto, Luís, Divino, Batalha, Alex, Paula e Nívea.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e incentivo à pesquisa.

Aos companheiros de laboratório pela intensa e feliz convivência. Por tantas trocas de ideias e lanchinhos!

Aos estagiários pelo interesse, dedicação e amizade em especial, a Rita que acompanhou ativamente todo o trabalho.

Aos amigos, pelos conselhos, risadas ou pela simples presença. Em especial, Nayla que se tornou um irmã, parceria forte que me motiva diariamente a acreditar no meu potencial.

A Tâmara, Noelba, Sandra, Rita, Sara e Iasmyn que auxiliaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*Não fui eu que ordenei a você? **Seja forte e corajoso!** Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".*

(Josué 1:9)

RESUMO

SOUSA, Flaviana Antunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Avaliação de métodos colorimétricos quantitativos e qualitativos da enzima fosfatase alcalina no leite.** Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

O leite é um dos alimentos do ponto de vista nutricional mais completo, sendo um importante substrato para microrganismos, tornando-o altamente perecível. Dessa forma, a pasteurização é imprescindível para eliminar patógenos que possam contaminar o leite além de comprometer a segurança alimentar. O controle deste tratamento térmico é baseado na mensuração de duas enzimas naturalmente encontradas no leite cru: fosfatase alcalina e peroxidase. Este trabalho teve como objetivo a comparação dos métodos de detecção da fosfatase alcalina no leite pasteurizado frente a aplicabilidade e sensibilidade dos procedimentos. Foram realizadas quatro etapas de desenvolvimento metodológico, dentre elas a comparação dos métodos de detecção, processos de pasteurização, período de reativação enzimática e limiar de detecção. Utilizou-se amostras de leite cru, pasteurizado e ultrapasteurizado (UHT). Nestas amostras realizaram-se seis diferentes testes para cada uma delas. Para avaliar o comportamento da enzima fosfatase alcalina utilizaram análises colorimétricas qualitativas e quantitativas, além de ressaltar o desempenho dos métodos em variações do binômio tempo e temperatura. As análises colorimétricas qualitativas, apresentam de leituras de interpretações subjetivas com propensão ao erro. Sendo assim, os resultados são indicativos da necessidade da validação de uma metodologia oficial brasileira (MAPA) aplicável na rotina que seja rápida, segura, eficaz e com baixo limiar de detecção quantitativa referente a atividade da fosfatase alcalina residual em leites.

Palavras-chave: Tratamento térmico. Análises colorimétricas. Limiar de detecção. Reativação enzimática

ABSTRACT

SOUSA, Flaviana Antunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Evaluation of quantitative and qualitative colorimetric methods of alkaline phosphatase enzyme in milk.** Adviser: Ricardo Seit Yamatogi.

Milk is one of the most complete nutritional foods, being an important substrate for microorganisms, making it highly perishable. Thus, pasteurization is essential to eliminate pathogens that can contaminate milk in addition to compromising food security. The control of this heat treatment is based on the measurement of two enzymes naturally found in raw milk: alkaline phosphatase and peroxidase. This study aimed to compare the methods of detection of alkaline phosphatase in pasteurized milk in terms of the applicability and sensitivity of the procedures. Four stages of methodological development were performed, including the comparison of detection methods, pasteurization processes, enzymatic reactivation period and detection threshold. Samples of raw, pasteurized and ultra-pasteurized (UHT) milk were used. In these samples, six different tests were performed for each one of them. To evaluate the behavior of the alkaline phosphatase enzyme, qualitative and quantitative colorimetric analyzes were used, in addition to highlighting the performance of the methods in variations of the binomial time and temperature. Qualitative colorimetric analyzes show subjective interpretations of readings with propensity to error. Thus, the results are indicative of the need for validation of a Brazilian methodology applicable in routine that is fast, safe, effective and with a low threshold of quantitative detection regarding residual alkaline phosphatase activity in milk.

Keywords: Heat treatment. Colorimetric analyzes. Detection threshold. Enzymatic reactivation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Diluições realizadas para identificar o limiar de detecção dos métodos qualitativos	52
Tabela 2 Resultados da detecção da enzima fosfatase alcalina, tempo gasto de execução e valor médio dos insumos utilizados pelos métodos qualitativos do MAPA, Rutergs e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelos métodos quantitativos Sharer rápido visual, Sharer Espectrofotometria modificada e Cornell	53
Tabela 3 Detecção da enzima fosfatase alcalina em amostras de leite sob pasteurização lenta pelos métodos qualitativos do MAPA, Rutergs e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelos métodos quantitativos Sharer rápido visual, Sharer Espectrofotometria modificada e Cornell	53
Tabela 4 Detecção da enzima fosfatase alcalina em amostras de leite sob pasteurização rápida pelos métodos qualitativos do MAPA, Rutergs e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelos métodos quantitativos Sharer rápido visual, Sharer Espectrofotometria modificada e Cornell	54
Tabela 5 Verificação da reativação da enzima fosfatase alcalina em amostras de leite pasteurizados e UHT pelos métodos qualitativos do MAPA, Rutergs e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelo método quantitativos de Cornell durante o período de 30 dias	55
Tabela 6 - Limiar de detecção utilizando como padrão o teste quantitativo de Cornell ($\mu\text{c/ mL}$)	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Visão geral dos diferentes métodos analíticos utilizados para determinação da atividade da Fosfatase Alcalina em produtos lácteos.....	32
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABLV - Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida
AgNPs - nanopartículas metálicas de prata
AOAC - International (Association of Official Agricultural Chemists)
APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AuNPs - nanopartículas metálicas de ouro
BPA - Boas Práticas Agrícolas
BPF – Boas Práticas de Fabricação
BPH - Boas Práticas de Higiene
CCS -Contagem de Células Somáticas
CPP - Contagem Padrão em Placas
CQC - 2,6 dicloroquinonacloroimida
CuSO₄ - Sulfato de cobre
DIC - Colorimetria de imagem digital
DIEESE- Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
EPAS – Enzymatic Photo-activated system
FDA - Entidade Americana - Food and Drug Administration
HTST - (High Temperature and Short Time) ou pasteurização rápida
IN - Instrução Normativa
InsPOA - Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
LHT - (Low Holding Temperature) ou pasteurização lenta
MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Mg - Magnésio
N/C – Não consta
NaCl - Cloreto de Sódio
NM- Nanômetros
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCC - pontos críticos de controle
PHA- Programa de Higienização Ambiental
PPHO - Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
SH - Grupos sulfidríla

UFC/ML - Unidade Formadora de Colónias

UHT – (Ultra High Temperature) ou Ultra alta temperatura/ Ultra pasteurização

Zn - Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	144
CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica.....	166
1. Aspectos composicionais do leite	177
2. Panorama da produção de leite	188
3. Qualidade no setor lácteo	200
4. Tratamento térmico.....	233
5. Enzimas importantes na pasteurização	255
5.1 Fosfatase Alcalina	255
5.2 Peroxidase	266
6. Inativação e Reativação da Fosfatase Alcalina	277
7. Sistemas de detecção da Fosfatase Alcalina	288
7.1 Métodos analíticos para determinação da atividade da Fosfatase Alcalina em produtos lácteos	311
Objetivo Geral.....	422
Objetivos Específicos	422
ABSTRACT.....	455
1. INTRODUÇÃO.....	466
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	466
2.1 Padronização das técnicas oficiais e rápido comercial em laboratório para verificação da atividade da fosfatase alcalina.....	466
2.2 Detecção da fosfatase alcalina em amostras de leite sob tratamentos térmicos diferentes	500
2.2.1 Pasteurização Lenta.....	500
2.2.2 Pasteurização Rápida	511
2.3 Verificação da reativação enzimática da fosfatase alcalina no leite.....	511
2.4 Limiar de detecção da fosfatase alcalina para os testes qualitativos	511
3. RESULTADOS.....	533
4. DISCUSSÃO	577
5. CONCLUSÃO	622
REFERÊNCIAS.....	644

INTRODUÇÃO GERAL

No contexto histórico industrial dos laticínios no Brasil, tem-se o leite de vaca como o produto mais utilizado assim como os seus derivados, por constituírem um grupo de alimentos de grande valor nutricional, uma vez que são fontes consideráveis de proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais e nutrientes que são essenciais ao bom funcionamento do corpo (SCIENCE, 1964)(MUNIZ, 2013; NOGUEIRA et al., 2018).

No leite existe inúmeras enzimas, como referenciais as lipases, proteases, catalases, peroxidases, oxidases e fosfatases. A fosfatase alcalina possui papel fundamental para garantir a estabilidade e qualidade do leite, além de ser indicativo da eficiência dos tratamentos térmicos realizados (FERREIRA, 2020). O tratamento térmico de pasteurização aplicado ao leite têm o objetivo de evitar danos à saúde pública, uma vez que realizado por meio do binômio tempo e temperatura exigido, consegue eliminar microrganismos deteriorantes e patogênicos presentes no leite, não interferindo na qualidade nutricional do produto(GABRIEL, 2016).

Segundo Castanheira (2012) a enzima fosfatase alcalina é amplamente utilizada para verificar a eficiência da pasteurização, pois indica se o processo térmico atingiu a temperatura adequada e se o leite pasteurizado foi contaminado novamente pelo leite cru. A maior parte dessa enzima se encontra associada à membrana dos glóbulos de gordura do leite cru, e a sua concentração no leite varia de acordo com a espécie, estação do ano, período de lactação, idade e estado de saúde do animal (HILAL, 2018).

No Brasil, o teste oficial para determinação da fosfatase alcalina baseia-se em uma reação colorimétrica, proveniente da interação entre compostos fenólicos resultantes da degradação enzimática com um substrato específico (BRASIL, 2011). No entanto, esse método é oneroso, apresenta baixa especificidade ao comparar as tonalidades da reação, pode ocorrer contaminações devido a presença do fenol livre nas vidrarias utilizadas e instabilidade dos reagentes que compromete os resultados.

Assim, esta pesquisa tem por objetivo, comparar e verificar a eficácia e aplicabilidade dos métodos de detecção da enzima fosfatase alcalina no leite para comprovar a eficiência do processo de pasteurização. Visto as exigências constantes das legislações e do mercado consumidor pela melhoria da qualidade no setor lácteo, torna-se importante investir no desenvolvimento e validação de métodos mais

sensíveis, específicos e de baixo custo que contribuam na detecção da fosfatase alcalina no leite pasteurizado, a fim de evitar possíveis perdas de produtividade e possibilitar a segurança alimentar com foco em saúde pública.

CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica

Flaviana Antunes Sousa

1. Aspectos composicionais do leite

De acordo com a legislação vigente, entende-se por leite como produto proveniente da ordenha completa e ininterrupta, realizada em condições de higiene, em vacas sadias, alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie a qual proceda (BRASIL, 2017). Em relação ao aspecto e cor, o leite é um líquido branco, opalescente e homogêneo, possuindo sabor e odor característicos (BRASIL, 2011).

O leite é produzido na glândula mamária, a partir do metabolismo de células especializadas ou da passagem direta de alguns elementos do sangue. A composição principal é baseada em média por 87% de água, 13% de componentes sólidos, divididos entre 4% a 5% de carboidratos, 3% de proteínas, 3% a 4% de lipídeos, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (HAUG; HOSTMARK; HARSTAD, 2007). De acordo com Pereira (2014), possui naturalmente imunoglobulinas, citocinas, nucleotídeos, peptídeos, poliaminas, enzimas e outros peptídeos bioativos que apresentam interessantes efeitos à saúde.

A água é o elemento de maior volume e influi consideravelmente na densidade do leite. A lactose é o carboidrato de grande importância no leite, tendo outros em menores quantidades, tais como monossacarídeos (glicose e galactose), oligossacarídeos e grupos glicosilados ligados à proteínas e aos lipídeos. As proteínas são valiosas em termos de sua importância na nutrição humana. São complexos orgânicos de grande peso molecular, compostas por cadeias de aminoácidos em sua maioria essenciais (PEIXOTO et al., 2022).

De acordo com FIEMG E FEAM (2015), a principal proteína do leite é a caseína, sendo encontrada na forma coloidal e corresponde a 78% da fração proteica total, o restante dessa fração é composto por albuminas e globulinas, representando 18% e 4%, respectivamente. Dessa forma, quanto maior o percentual de caseína no leite, maior o rendimento na fabricação de queijos, já que é a partir dessa proteína que se obtém o produto (FIEMG;FEAM, 2015).

Os lipídeos fornecem aproximadamente duas vezes mais energia que os carboidratos. Nisso, o leite é considerado uma emulsão de gordura em água, e a interligação entre esses dois componentes possui origem em forma de glóbulo, com núcleo e membrana. Por ser menos densa que a água, flutua quando o leite está em repouso, constituindo-se em grande parte, o que comumente se denomina nata ou

creme. No leite de vaca, mais de 90% da gordura é formada por triglicérides, constituídos de glicerol esterificado por ácidos graxos (BAUMAN; GRIINARI, 2003).

Os minerais atuam na formação do esqueleto e no equilíbrio de funções orgânicas. Os principais são cálcio, magnésio, potássio e sódio; cloro e citratos, distribuídos entre a fase solúvel e coloidal e suas interações com as proteínas têm consequências importantes para a estabilidade do leite e seus derivados (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). As vitaminas do leite são oriundas da absorção da alimentação animal ou do metabolismo ruminal. São as lipossolúveis: A (como precursora do bcaroteno), D, E, K e hidrossolúveis: C, B1, B2, B6, B12, ácido pantotênico, niacina, biotina e ácido fólico (JENSEN, 1996).

Para Silva (2017), além das propriedades físico-químicas e funcionais, os constituintes naturais do leite são influenciados por outros fatores como, espécie, genética, estágio de lactação, estação do ano, dieta oferecida, estado fisiológico, geografia, manejo de ordenha e sanidade.

A composição do leite é importante para os produtores rurais, consumidores e processamento industrial. Para as indústrias, a concentração adequada dos constituintes é fator crucial para o melhor aproveitamento do processamento de derivados lácteos, correlacionada com rendimento industrial e lucratividade. Quanto aos consumidores, o leite que se apresenta dentro dos padrões normais de concentração de constituintes, também contém propriedades nutricionais satisfatórias. De modo semelhante, os produtores se beneficiam em produzir leite com teores de sólidos totais dentro da normalidade, uma vez que diversas indústrias e cooperativas adotam programas de remuneração por qualidade como sistema de premiação para estimular melhores índices (NERO; DA CRUZ; BERSOT, 2017).

2. Panorama da produção de leite

De acordo com Sorio (2018), a produção de leite, comercial e/ou para subsistência, se distribui entre diversas espécies, porém o leite de vaca representa mais de 83% da produção mundial. Segundo a Embrapa (2021), no ano de 2020 a produção mundial de leite consolidou 532,3 milhões de toneladas, com aumento de 1,5% frente a 2019 (524,3 milhões de toneladas).

Nesta conjuntura, o Brasil ocupa a terceira posição no *ranking* mundial de produção de leite, atrás dos Estados Unidos, Índia, China e Rússia, com produtividade

em torno de 35 bilhões de litros por ano (BRASIL, 2022) e crescimento médio anual de 3,7%, esse número inclui o leite cru e os produtos lácteos oriundos de cerca de 1,1 milhão de propriedades leiteiras, conforme os dados da ABLV – Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV, 2019). O país passou por significativas transformações nas últimas décadas acompanhado de intensa modernização tecnológica, que corroborou para aumentos expressivos de geração de emprego, renda, produtividade e consumo aparente per capita em torno de 166,4 litros/hab/ano (CONAB, 2021).

O Estado de Minas Gerais encontra-se como o maior produtor de leite do Brasil, com 6,509 bilhões de litros, sendo responsável por mais de um quarto do volume nacional com incremento de 224 milhões de litros, esse percentual se dá em razão da extensão geográfica bastante diversificada, tendo fatores climáticos e ambientais como contribuintes para o perfil de região produtora de leite (EMBRAPA, 2020).

Segundo Jamas et al., (2018) os lácteos estão presentes na alimentação de cerca de 80% da população, contribuindo com 5% da energia, 10% da proteína e 9% da gordura consumida em nível global, sendo considerados como valiosos *commodities* agrícola no mundo.

A atividade leiteira gera emprego e renda além de possuir um enorme potencial a ser explorado, sendo exemplo disso, a tímida participação do Brasil no mercado exportador, onde apenas 1% da produção é exportada, no qual se caracteriza como importador líquido de lácteos (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020). O consumo de lácteos estimula a cadeia leiteira em países em desenvolvimento como o Brasil, porém em 2020 o cenário do mercado leiteiro acabou sendo desajustado pela pandemia causada por coronavírus (COVID-19), fator que desencadeou reflexos negativos sobre a renda, o consumo e a atuação de diversos pequenos laticínios (EMBRAPA, 2020).

Sendo produto essencial da cesta básica, o leite e seu alto custo impactam a vida de muitos brasileiros. De acordo com dados da Pesquisa Nacional da Cesta Básica de Alimentos do DIEESE (Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos), no fim do primeiro semestre do ano de 2022, consta que o leite integral e a manteiga registraram aumento de preços em 17 cidades brasileiras (DIEESE, 2022). Para a Embrapa (2022) com relação ao leite UHT, as maiores variações acumuladas foram registradas em Belo Horizonte com (48,89%), Florianópolis (46,70%) e Porto Alegre (44,55%).

Ainda de acordo com a Embrapa (2022), a escalada dos preços médios do leite UHT e da manteiga está correlacionada com o período de entressafra e o impacto da estiagem nas pastagens que reduziram a oferta do leite e somada aos elevados custos de produção, com alimentação e medicamentos do gado, fertilizantes e combustíveis, resultaram em acréscimo no preço do produto final. Além desses fatores, há disputa entre as indústrias de laticínios na compra da matéria-prima para a produção dos derivados lácteos, afetados pela guerra Rússia-Ucrânia que impacta a rentabilidade.

Contudo há estudos onde projetam que em 2028 o Brasil estará produzindo entre 43,4 e 48,1 bilhões de litros de leite para atender à população, sendo essa expansão devido às melhorias na gestão das fazendas, produtividade dos animais, menor número de vacas em lactação e incorporação de novas tecnologias (BRASIL, 2019). Para Siqueira (2019), o comportamento do mercado traz exigências rigorosas que positivamente revolucionam o setor lácteo. As indústrias estão se reinventando para atender os padrões de rastreabilidade, processamento, armazenamento e transporte. Segundo os dados do Anuário do Leite, o consumidor está cada vez mais consciente, emergindo novos hábitos, como preocupações com a saúde, bem-estar animal e com o meio ambiente (EMBRAPA, 2019).

3. Qualidade no setor lácteo

O leite é considerado um alimento completo, dessa forma possui naturalmente diversas substâncias e características bioquímicas e físicas, as quais o torna um substrato ideal para a proliferação de microrganismos indesejáveis que, além de causarem deterioração, também podem ser patogênicos, o que designa um risco à saúde pública (JAMAS et al., 2018).

Uma série de fatores podem influenciar a qualidade do leite, variáveis zootécnicas associado ao manejo, nutrição, potencial genético do rebanho, sanidade, ordenha higiênica, beneficiamento, armazenamento, conservação e resfriamento (KOHARA et al., 2019). Segundo Ferreira (2020), a qualidade da matéria prima é um dos maiores obstáculos ao desenvolvimento e fortalecimento do segmento leiteiro e quando esse fator qualidade não é bem atendido, acaba comprometendo a credibilidade da cadeia produtiva, apresentando riscos à saúde dos consumidores. Tal situação é consequência da produção leiteira realizar na sua multiplicidade por

condições precárias, com deficiências nas boas práticas de manejo e beneficiamento (ALVES; DANTAS; GUSMÃO, 2020).

Dessa forma, análises físico-químicas e microbiológicas são de extrema e fundamental importância para a identificação do leite cru, como ausência de microrganismos patogênicos, baixa contagem de células somáticas, ausência de conservantes químicos e de resíduos de antibióticos, pesticidas ou outras drogas que atuam na caracterização de uma matéria prima com boa qualidade (BRITO; DIAS, 1998).

O perfil microbiológico auxilia na identificação higiênico-sanitário e segurança alimentar do produto. Os principais grupos de microrganismos utilizados para determinar o padrão de qualidade do leite, são os aeróbios mesófilos, psicotróficos, coliformes totais e termotolerantes (PEREIRA, 2010). Existem também as bactérias termodúricas que segundo Franco e Landgraf (2003), são capazes de resistir a elevadas temperaturas. Para Marioto et al., (2020) os termodúricos são também determinantes da vida útil do leite pasteurizado, pois, além de produzirem enzimas deteriorantes, são resistentes à pasteurização, passando a compor a microbiota remanescente do leite pasteurizado.

Já a Instrução Normativa N° 76/2018 (BRASIL, 2018) determina a contagem de *Enterobacteriaceae* como critério microbiológico para o leite pasteurizado. No artigo 6º da Normativa 60/2019 corrobora as informações em que os alimentos comercialmente estéreis, incluindo leite e derivados UAT (UHT) devam cumprir os padrões microbiológicos (ANVISA, 2019).

Entende-se que mesmo após a pasteurização, algumas enzimas produzidas pelos microrganismos podem permanecer nos produtos lácteos e continuarão a exercer sua ação de degradação dos componentes do leite. Portanto, todos os esforços devem ser feitos para assegurar que o leite que sai da propriedade seja de alta qualidade (BRITO; DIAS, 1998).

Nesse contexto, a legislação brasileira para leite através do Regulamento Técnico de Qualidade e Identidade do leite cru refrigerado componente da Instrução Normativa 76 de 26 de Novembro de 2018 (BRASIL, 2018) estabelece os padrões físico-químicos do leite bem como os padrões de Contagem Padrão em Placas (CPP) e Contagem de Células Somáticas (CCS) máximas para o leite na propriedade. Em seu artigo 7º ela determina que o leite cru refrigerado de tanque individual ou de uso comunitário deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em

placas de no máximo 300.000 UFC/mL (trezentas mil unidades formadoras de colônia por mililitro) e de Contagem de Células Somáticas de no máximo 500.000 CS/mL (quinhentas mil células por mililitro).

Outra questão importante e determinada pela Instrução Normativa N°77 de 26 de Novembro de 2018, é que o produtor que não atender a média geométrica trimestral de 300.000 UFC/mL não poderá entregar mais o leite para indústria (SANTANA et al., 2021). Sendo assim, de acordo com Rauta et al., (2017), o aumento da demanda leiteira trouxe a necessidade de um controle da qualidade mais operante, sendo controlado a manufatura em seus diversos segmentos, no sentido de fornecer alternativas que ajudem a desenvolver uma melhora na busca por transparência das condições de produção, industrialização e comercialização como a garantia de uma alimento seguro.

Deste modo, a fim de contribuir para o desenvolvimento no setor lácteo, em 1998, foi desenvolvido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) que tem por objetivo o fortalecimento da produtividade láctea baseado na melhoria de padrões de qualidade e no aumento da participação do leite brasileiro no mercado internacional (MILINSKI; VENTURA, 2010).

Com intuito de adequar às exigências mínimas e regulamentar o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), publicou a Instrução Normativa N° 51 - IN 51 (BRASIL, 2002) a qual define e restringe procedimentos técnicos e operacionais de produção, coleta, armazenamento, transporte, classificação, identidade e qualidade do leite tipo A, leite cru refrigerado e leite pasteurizado. Posteriormente, no ano de 2018 as Instruções Normativas N° 76 e 77 que regulamentam a técnica de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, seguindo as tendências mundiais pertinentes à produção e comercialização vigentes desde o mês de junho de 2019 (BRASIL, 2018; FAGNANI, 2019).

Dentre outros requisitos, obriga os estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF) a implantarem as BPF (Boas Práticas de Fabricação) e o APPCC (Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle) na indústria de laticínios, possibilitando um avanço na gestão da qualidade na cadeia de produção (DIPOA, 2003).

Os APPCC são descritos por (BERTI; SANTOS, 2016) como sendo pontos no processo em que é necessária a aplicação de medidas preventivas contra perigos

físicos, químicos e biológicos que possam vir a prejudicar a saúde do consumidor, tornando sua implementação importante para a indústria e facilitando o alcance de certificações.

Conforme Brum (2004), o plano APPCC é um sistema de gestão da qualidade cujos princípios são aceitos e reconhecidos internacionalmente, pela capacidade de melhorar de forma significativa o processo e a qualidade do produto, permitindo identificar, os pontos críticos de controle (PCC), avaliar e controlar os perigos químicos, físicos e microbiológicos de contaminação dos alimentos.

Portanto, com a implementação da gestão da qualidade, baseada em técnicas como: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Boas Práticas de Fabricação (BPF), Boas Práticas de Higiene (BPH), Boas Práticas Agrícolas (BPA), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Programa de Higienização Ambiental (PHA) é possível obter melhorias nos procedimentos operacionais reduzindo perdas, desperdícios, custos e conseqüentemente agregar valor à qualidade do produto final (PASQUALOTTO; GOIS, 2016).

4. Tratamento térmico

No Brasil, os dados referentes a doenças de origem alimentar associadas ao consumo de leite cru e seus derivados, são raros, inconsistentes e há poucos relatos sobre a incidência de patógenos e seu envolvimento em surtos alimentares. Dessa forma, a presença destes microrganismos no leite pode representar um potencial risco à saúde humana, sobretudo quando se considera que em vários locais no mundo existe o hábito do consumo de leite cru (NERO et al., 2004).

Segundo Ribeiro (2021), o tratamento térmico inadequado do leite pode resultar em inúmeros problemas para a saúde pública, uma vez que o consumidor fica exposto a vários microrganismos patogênicos. Diante disso, a pasteurização eficiente garante a segurança alimentar, qualidade, preservação da composição nutricional e sensorial do leite e seus derivados pela inativação de microrganismos.

De modo a intensificar a segurança alimentar, a pasteurização do leite cru foi introduzida no final do século XIX, após as pesquisas de Pasteur sobre fermentação e pasteurização (ALMEIDA, 2006). De acordo com (PELCZAR JUNIOR, et al, 1996) o binômio tempo e temperatura de pasteurização foram obtidos em estudos que eliminasse o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo posteriormente substituído pela

Coxiella burnetii, agente etiológico da febre Q, transmissível pelo leite, podendo sobreviver aquecido a uma temperatura de 61,7 °C durante 30 minutos. Através destas descobertas, foram estabelecidas pela comissão do *Codex Alimentarius*, da Organização Mundial da Saúde as atuais temperaturas de pasteurização, sendo o suficiente para destruir o maior número possível de microrganismos nocivos à saúde (COSTA, 2011; WITTEWER et al., 2021).

Nesse contexto, a pasteurização rápida ou HTST (*High Temperature, Short Time*) - temperatura alta, tempo curto. Esse tipo de pasteurização caracteriza-se pelo aquecimento do leite de 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos, exclusivamente em equipamento de trocador de calor a placas, seguido de resfriamento imediato até a temperatura igual ou inferior a 4°C (BRASIL, 2002). Conforme Instrução Normativa Nº 5 de 14 de fevereiro de 2017, a pasteurização lenta (*low holding temperature* - LHT) é baseada na aplicação do binômio de 62°C a 65°C por 30 minutos. Independentemente do tipo de pasteurização é necessário a refrigeração para manter uma vida de prateleira maior (BRASIL, 2017).

O envase deve ser feito em circuito fechado, e logo após o procedimento térmico equivalente, deve assegurar a fosfatase residual negativa combinado ou não com outros modos físicos ou biológicos que garantam a inocuidade do produto e positivo para peroxidase (DEETH; LEWIS, 2017).

Nesta conjuntura, para verificar o índice da eficácia do tratamento térmico, utiliza-se a mensuração de duas enzimas naturalmente encontradas no leite cru, as quais são: fosfatase alcalina e peroxidase (BRASIL, 2002). A presença da fosfatase alcalina no leite, primeiramente descrita por Graham e Kay como fósforo composto, ou fosfomonoesterase possui pH ótimo de atividade em torno de 9,0, sendo este valor dependente do substrato em que vai atuar (GRAHAM, 1933; LIMA et al., 2021).

Nesse ínterim, a peroxidase é uma enzima que catalisa a transferência de oxigênio de peróxidos, especialmente peróxido de hidrogênio, porém não é inativada pelo método, mas é destruída em temperaturas superiores a 80° C sendo, portanto, utilizada para verificar se ocorreu o superaquecimento durante o tratamento térmico. A HTST inativa a fosfatase e a alta pasteurização (por exemplo, 85 °C por 20 s) inativa a peroxidase (ABRAHAMSEN; NARVHUS, 2022).

Estudos demonstram que a composição dos lácteos pode afetar os testes de fosfatase alcalina. Sendo assim, a enzima encontra-se principalmente associada à membrana dos glóbulos de gordura do leite e seus níveis são dependentes não só do

conteúdo de gordura, mas também da espécie, período de lactação, idade, estado de saúde do animal e estação do ano (AHMAD PUNOO, 2018).

Segundo Netto (2018), apesar de ser inativada após tratamento térmico, a restauração da atividade enzimática pode ocorrer com o tempo, por isso o teste de detecção deve ser realizado logo após o termotratamento e a reativação pode ser evitada se o leite for devidamente resfriado após a pasteurização.

Conhecendo as complexidades dos modernos sistemas de processamento e a crescente exigência regulatória da indústria, o teste de Fosfatase Alcalina é adotado por muitos países como o ensaio padrão para validação rápida do processo de pasteurização do leite. A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) lançou um relatório sobre o uso da enzima para verificar a pasteurização, recomendando a necessidade de mais estudos focados na cinética de inativação enzimática no leite de várias espécies animais (FOOD et al., 2021; MALISSIOVA; ALEXANDRAKI, 2022).

5. Enzimas importantes na pasteurização

De acordo com Antunes (2014), a pasteurização é um procedimento fundamental para a eliminação dos agentes patogênicos do alimento, tornando-o um produto inócuo, alterando o mínimo possível a sua qualidade nutricional, química e sensorial, sendo dessa forma essencial para garantir a segurança microbiológica dos produtos lácteos disponíveis comercialmente. Segundo Franco et al., (2011), é possível verificar se a pasteurização foi conduzida dentro das temperaturas e tempos corretos, através da análise da atividade enzimática das peroxidases e fosfatase alcalina. O controle desse processo é fundamental do ponto de vista da segurança alimentar (LIMA et al., 2021).

5.1 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina é uma fosfomonoesterase que possui pH ótimo de atividade em torno de 9,0, sendo este valor dependente do substrato em que vai atuar, da quantidade desse substrato, e também de fatores composicionais, como presença de moléculas com características tamponantes (MACHADO et al., 2009).

Essa enzima é naturalmente encontrada no leite in natura, porém inativada com o processamento térmico eficiente, dentro dos padrões de tempo e temperatura adequados (EGGER; NICOLAS; PELLEGRINO, 2016).

Segundo Machado et al., (2009), por ser mais resistente ao calor que os microrganismos patogênicos não esporulados geralmente encontrados no leite e por ser sensível aos binômios tempo/temperatura praticados na pasteurização, a atividade de fosfatase alcalina tem sido utilizada principalmente como parâmetro para avaliação do tratamento térmico e para verificação de fraude por adição de leite cru.

Dessa forma em leites pasteurizados, não devem ocorrer atividade enzimática da fosfatase, caso contrário, o processamento térmico pode não ter sido efetuado adequadamente (BRASIL, 2002). A fosfatase alcalina age à temperatura e pH apropriados hidrolisando o p-nitro-fenilfosfato (incolor), formando p-nitrofenol, este composto tem cor amarelada (FRANCO, MANFIO, 2011). A quantidade de cor desenvolvida é proporcional à concentração da enzima (MACHADO et al., 2009).

Giombelli et al., (2011) avaliando a qualidade do leite bovino, a partir de testes físico-químicos e microbiológicos, em amostras de leite pasteurizado produzidos no estado do Paraná, relataram a presença da enzima fosfatase alcalina, o que provavelmente indica uma falha no processo térmico que pode tornar o leite uma possível fonte de contaminação, principalmente por agentes patogênicos.

O estudo da atividade de fosfatase alcalina no leite possui importância fundamental, pois possibilita a verificação da eficácia do tratamento térmico de maneira rápida e confiável (MACHADO et al., 2009).

5.2 Peroxidase

A peroxidase não é inativada pela pasteurização, mas é destruída em temperaturas superiores a 80°C sendo, portanto, utilizada para verificar se ocorreu o superaquecimento durante o tratamento térmico (BRASIL, 2002). A não existência da enzima no leite pasteurizado é indicativo de que o mesmo foi aquecido a mais de 75°C e por mais de 20 segundos, evidenciando falhas no processo de pasteurização (SILVA; SOUSA, et al., 2011).

Dessa forma, a peroxidase reage condensando moléculas de guaiacol, gerando produtos de coloração escura, estes compostos diluídos no leite resultarão

em coloração alaranjada (salmão), caso as amostras não tenham atividade enzimática da peroxidase, o leite permanecerá com coloração branca (FRANCO; MANFIO, 2011).

Franco et al., (2011) avaliaram a qualidade do leite bovino leite cru, leite HTST, leite desnatado (UHT), leite integral (UHT) com o intuito de analisar a acidez e a atividade enzimática da peroxidase e fosfatase baseado no Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal – MAPA. Os pesquisadores comprovaram a eficiência da metodologia brasileira através das análises de amostras processadas termicamente onde demonstraram a ausência da enzima fosfatase alcalina. No entanto, a atividade da peroxidase foi identificada nas amostras de leite (HTST), e ausente nas amostras de leite (UHT), o que corrobora com os resultados da fosfatase alcalina.

6. Inativação e Reativação da Fosfatase Alcalina

A atividade enzimática representa a capacidade catalítica, isto é, a taxa de conversão de um substrato em produto. A inativação térmica da fosfatase alcalina segue a cinética de primeira ordem, e o ponto médio de desnaturação foi obtido a 56°C para um aquecimento de 30 minutos (RICHARDSON; MCFARREN; CAMPBELL, 1964).

A reativação da fosfatase foi reconhecida pela primeira vez por (WRIGHT; TRAMER, 1956) que analisaram que a temperatura ideal para reativação é de 34°C (93°F), embora possa ocorrer em temperaturas baixas como 10°C (50°F) em produtos de pasteurização rápida – HTST após armazenamento (MEGHWAL; PATRA; RAO, 2018).

A fosfatase alcalina também pode ser reativada em muitos produtos lácteos (creme, queijo, etc.); também microorganismos utilizados na fabricação podem produzir fosfatase microbiana a qual é produzida por muitas cepas bacterianas e, em muitos casos, apresenta maior estabilidade térmica do que a fosfatase alcalina bovina (MURTHY; KAYLOR, 1990).

Produtos lácteos com alto teor de gordura são suscetíveis a reativação da fosfatase, diante disso alguns fatores podem interferir como aumento da temperatura de pasteurização e diminuição do tempo de exposição, alta temperatura de estocagem do leite pasteurizado (10 a 34°C), presença de elementos como Magnésio, Zinco e

Cloreto de Sódio. No entanto, a acidez, age inibindo a ativação da fosfatase (WRIGHT; TRAMER, 1956).

Grupos sulfidril (SH) de outras proteínas como por exemplo a β -lactoglobulina, são necessárias para a reativação no leite UHT (STĂNCIUC et al., 2011). Segundo Andrén (2021) como a reativação da enzima resulta em um teste de fosfatase falso positivo, levanta d vidas sobre a confiabilidade do teste para determinar a adequa o da pasteuriza o dos produtos lácteos.

7. Sistemas de detec o da Fosfatase Alcalina

Para Quemelli (2020), existem vários protocolos diferentes para a quantifica o da fosfatase alcalina em produtos lácteos, cada um baseado em diferentes princípios físico-químicos envolvidos na detec o e medi o da atividade enzimática. Quimicamente, a enzima hidrolisa ésteres fosfóricos em ácido fosfórico e álcool, propriedade utilizada para sua determina o qualitativa na prática.

Os ensaios empregados para detectar a atividade enzimática são classificados em 4 tipos: colorimétricos, fluorimétricos, quimioluminescentes e imunoquímicos. Esses métodos foram adotados para uso ao longo de muitos anos, entretanto, apenas os tipos fluorimétrico, quimioluminescente e colorimétrico foram reconhecidos e validados para verifica o de pasteuriza o na indústria de laticínios (PUNOO, 2018). Os testes descritos foram adaptados de *Standard Methods for Examination of Dairy* (MARTH, 1978) e servem para análise de leites e derivados.

Embora alguns desses ensaios tenham mostrado alta sensibilidade, as aplica es para testes em campo são limitadas, especialmente em áreas rurais distantes que não possui recursos laboratoriais, profissionais da área em sua maioria (FOOD et al., 2021). Assim, uma simples portátil ferramenta de detec o de fosfatase descartável e quantitativa   altamente desejada para atender com segurança regiões subdesenvolvidas, como por exemplo o estudo baseado no desenvolvimento de biossensores econ micos, elaborado em papel por técnica de colorimetria por imagem digital (DIC) integrado com smartphone (YU et al., 2015).

A técnica de colorimetria por imagem digital (DIC) integrado com smartphone   capaz de detectar através de uma faixa de fluxo lateral a atividade da fosfatase alcalina utilizando nano partículas metálicas de ouro (AuNPs) capeadas por fosfotirosina (AuNPs@Tyr-p) como um repórter de sinal. A acumula o de AuNPs na

zona de teste resulta em uma cor marrom-púrpura que pode ser claramente observada por olhos nus. As imagens são capturadas por uma câmera de *smartphone* e posteriormente analisadas por um software interativo de alta performance voltado para o cálculo numérico (MATLAB®) programado para monitorar a enzima fosfatase alcalina de forma sensível e quantitativa em leite cru de vaca. A estratégia depende da função de desfosforilação da enzima e reconhecimento específico de anticorpo anti-Tyr-p para Tyr-p. As AuNPs servem como portadora de Tyr-p e repórter de sinal devido ao seu caráter colorimétrico. Os resultados desta técnica destacam o desenvolvimento da faixa de fluxo capaz de detecção portátil em campo além de não apresentar riscos biológicos (YU et al., 2015).

Um outro estudo para detecção da fosfatase alcalina no leite, descreve o desenvolvimento de biossensor miniaturizado, econômico, baseado em papel a olho nu integrado ao *smartphone* através da colorimetria por imagem digital (DIC), o qual é capaz de identificar a enzima em até treze minutos aplicada a uma abordagem quantitativa rápida que permite diferenciar amostras de leite. A fabricação da sonda de biossensor foi caracterizada por DIC, espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de força atômica (AFM). A detecção foi baseada em imunocomplexos entre o sensor-sonda e enzima, que gera um precipitado azul-verde como um sinal analítico, explorando a atividade catalítica da fosfatase alcalina em direção a 5-bromo- 4-cloro 3-indolilpofosfato (BCIP) (MAHATO; CHANDRA, 2019).

A técnica fluorimétrica é rápida e confiável, reconhecida por órgãos de fiscalização em grande parte do mundo, podendo detectar baixos níveis de fosfatase alcalina com quantificações registradas de forma automática, no entanto a utilização do teste é dificultada devido ao elevado preço dos equipamentos e reagentes. Para determinar a quantificação da fosfatase alcalina, utiliza um substrato monoéster ortofosfórico aromático que sob hidrólise perde um radical fosfato e torna-se um composto altamente fluorescente (ROCCO, 1990).

O Comitê Europeu utiliza técnica fluorimétrica para segurança de produtos lácteos, onde estabelece o limite máximo de 350 mU/L para a atividade de fosfatase alcalina residual em leite pasteurizado. Já a entidade americana *Food and Drug Administration* (FDA) determina que este mesmo limite deva ser aplicado a diversos produtos lácteos (MARTINS, 2006).

Outra metodologia também utilizada tem por base o sistema enzimático e biossensores foto ativado (enzymaticphoto-activated system – EPAS) para análise em leite e bebidas lácteas, cujo princípio de detecção é baseado na desfosforilação onde o substrato estável aromático dioxetano-fosfato é hidrolisado a 35°C para produzir um produto foto ativado denominado (quimioluminescência), que é medido e convertido em unidades de enzimas através de um luminômetro ou dispositivo de contagem de fótons (MACHADO et al., 2009).

No Brasil, a técnica mais utilizada para determinação de fosfatase alcalina é colorimétrica baseada na reação entre compostos fenólicos resultantes da degradação enzimática com um substrato específico (fenil fosfato dissódico) adicionado em condições de temperatura e pH ideal (SEIXAS et al., 2014). Porém, a metodologia aprovada oficialmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é uma adaptação do teste rápido Sharer Visual, o qual utiliza a reação do fenol liberado da 2,6 dibromo ou 2,6 dicloroquinonacloroimida produzindo indofenóis azuis que são detectados visualmente, de maneira que interpretação qualitativa do resultado seja realizada de três formas, sendo que no leite cru apresenta coloração azul intensa, leite aquecido mas não pasteurizado obtém coloração azul esmaecido, e leite pasteurizado a coloração cinza. Portanto, a tonalidade do azul vai ficando tanto mais intensa, quanto maior for a deficiência de pasteurização (BRASIL, 2018).

O Scharer espectrofotométrico adaptado é um ensaio oficial da AOAC International (*Association of Official Agricultural Chemists*), o qual dispõe de reações que acontecem similar ao método visual, porém é possível estabelecer a quantificação de fenol produzido pela fosfatase alcalina por análise de absorvância a 650 nm. A absorvância obtida para a amostra deve ser comparada com os padrões para obter a concentração de fenol da amostra (MARSHALL, 1992). Outra técnica colorimétrica citada, o Cornell requer apenas um substrato tampão e concentração de precipitante para todos os produtos lácteos, altamente sensível e preciso, todavia esse ensaio possui interpretação quantitativa (KOSIKOWSKY, 1951). Alguns dos mecanismos baseados na liberação de fenol são apenas modos qualitativos, como por exemplo as fitas colorimétricas, o teste oficial do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e o de Rutergs (CLAWIN-RÄDECKER et al., 2021).

As tiras colorimétricas são impregnadas com o p-nitrofenilfosfato em tampão aminometil-propanol contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), sais de

magnésio e zinco hidrolisado a fim de formar p-nitrofenol e fosfato. Nisso, o nitrofenol formado possui coloração amarela que serve de parâmetro para interpretação (BESSEY; LOWRY; BROCK, 1946).

Estudos colaborativos indicaram que o método de Rutergs é satisfatório como um teste de triagem para estimar a atividade da fosfatase em leite desnatado, leite e creme de leite. O princípio do teste se fundamenta no fato de que a enzima ativa atuará, sob condições de temperatura e pH adequadas a fim de hidrolisar o substrato diciclohexilamina fenolftaleína mono-fosfato, liberando produto da reação fenolftaleína. Essa substância apresenta coloração rosa em pH alcalino com intensidade proporcional à quantidade de enzima ativa no meio, podendo ser comparada visualmente com um padrão preparado com o mesmo leite (KLEYN; YEN, 1970). O procedimento é limitado a leite desnatado, leite e creme light por AOAC International (*Association of Official Agricultural Chemists*), embora não oficial, o método é aplicável a leite com baixo teor de gordura, creme de leite, mistura de sorvete simples, queijo, manteiga e leite concentrado e em pó. Além disso, o método pode ser usado para diferenciar entre fosfatase alcalina residual e reativada (BABSON; GREELEY, 1967).

Embora a espectrofotometria seja uma técnica sensível e precisa, requer instrumentos caros, operadores profissionais, procedimentos complicados de amostragem e limitado para aplicações de inspeção em campo. Estudos com nanopartículas metálicas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) têm sido usados em ensaios colorimétricos para detecção da fosfatase alcalina (SABELA et al., 2017).

Em face do exposto, é notória a importância do desenvolvimento e padronização de ensaios de detecção baseado no padrão ouro, porém com execução mais prática e acessível, com baixo custo e resultados confiáveis, que permita a evolução do setor industrial lácteo em termos de aplicabilidade e contribuição para garantia da segurança alimentar, já que o tratamento térmico conduzido de maneira inadequada incorre em riscos à saúde pública.

7.1 Métodos analíticos para determinação da atividade da Fosfatase Alcalina em produtos lácteos

Quadro 1: Visão geral dos diferentes métodos analíticos utilizados para determinação da atividade da Fosfatase Alcalina em produtos lácteos.

MÉTODO	PRINCÍPIO	(NM)	SUBSTRATO	LIMIAR DE DETECÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS	REFERÊNCIA
FITA	Colorimétrico Qualitativo	N/C	p- nitrofenil-fosfato	Insatisfatório	Facilidade e rapidez na execução, (resultados obtidos em apenas 3 min)	Baixa sensibilidade; interpretação subjetiva.	(SEIXAS et al., 2014)
MAPA	Colorimétrico Qualitativo	N/C	Fenilfosfato dissódico livre	Insatisfatório	No leite bovino o teste é sensível em baixas concentrações de enzima.	Comparação através de cores obtendo resultados subjetivos; Aplicável apenas a leite fluído. Reagentes instáveis e de alto custo.	(BRASIL, 2018) (LIMA,2021) (CASTRO, 2005)
A.O.A.C SHARER VISUAL	Colorimétrico Quantitativo Qualitativo	650 nm	Fenilfosfato dissódico livre	Níveis de 0,1% de leite cru adicionado ao leite pasteurizado; Valor >1 mg fenol mL (positivo)	Menor tempo de execução comparado ao Sharer Espectrofotometria Modificado. Eficiente para detecção da fosfatase em manteiga e creme de leite.	Limitado à triagem preliminar; Necessita de reagentes frescos para os padrões de fenol; Resultados subjetivos; Reagentes instáveis e de alto custo; contaminação por fenol.	(MARTH, 1978; CASTRO, 2005)
A.O.A.C SHARER ESPECTROFOTOMETRIA MODIFICADA	Colorimétrico Quantitativo Qualitativo	650 nm	Fenilfosfato dissódico livre	Valor >2,3 mg fenol mL (positivo)	Melhor limiar de detecção comparado ao Sharer Rápido Visual. Aplicável a leite fluído e derivados lácteos.	Reagentes instáveis e de alto custo; Requer etapa de extração e longo período de incubação.	(MARTH, 1978; CASTRO, 2005)
A.O.A.C CORNELL	Colorimétrico Quantitativo	650 nm	Fenilfosfato dissódico livre	Valor >1 mg fenol/ mL (positivo)	Maior sensibilidade comparado aos métodos quantitativos Sharer Espectrofotometria modificada e Sharer Visual. Limiar máximo e mínimo de detecção melhor definido.	Reagentes instáveis e de alto custo; Uso de reagentes tóxicos, fator de risco ao manipulador;	(MARTH, 1978; KOSIKOWSKY , 1951)
A.O.A.C RUTERGS	Colorimétrico Qualitativo	N/C	Monofosfato de fenoltaleína	Comparação visual entre os padrões de cores.	Diferenciação entre fosfatase alcalina residual e reativada. Teste sensível. Etapas de execução rápida Insumos estáveis às condições de armazenamento.	Reagentes de alto custo e tóxicos. Não possui análise quantitativa apenas colorimétrica.	(MARTH, 1978; KLEYN; YEN, 1970)

REFERÊNCIAS

ABLV. Associação Brasileira da Indústria de Láceos Longa Vida. **Relatório Anual da Administração**, 2019.

ABRAHAMSEN, R. K.; NARVHUS, J. A. Can ultrasound treatment replace conventional high temperature short time pasteurization of milk? A critical review. **International Dairy Journal**, v. 131, p. 105375, 2022.

ALMEIDA, A. O. de. **CONTROLE RÁPIDO DA EFICIÊNCIA E SEGURANÇA DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO DO LEITE (HTST – High Temperature Short Time**. [s.l.] Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticaba, 2006.

ALVES, M. P.; DANTAS, T. N. P.; GUSMÃO, T. A. S. Avaliação da qualidade de leite produzido no município de Caturité. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 14, n. 1, p. 17–27, 2020.

ANDRÉN, A. (2021) **Milk-Clotting Enzymes** -. Food Engineering Series, p. 349–362.

ANTUNES, V. de C. Uso de microfiltração para melhoria da qualidade e extensão da vida de prateleira de leite pasteurizado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, p. 75–86, 2014.

ANVISA. Instrução Normativa nº 60 de 23/12/2019. **Diário Oficial da União**, v. 247, n. 1, p. 133, 2019.

BABEL, F. J. et al. Phosphatase methods. **Standard methods for the examination of dairy products, 14th ed. American Public Health Association, Washington, DC**, p. 213–229, 1978.

BABSON, A. L.; GREELEY, S. J. New substrate for alkaline phosphatase in milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 50, n. 3, p. 555–557, 1967.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual review of nutrition**, v. 23, n. 1, p. 203–227, 2003.

BERTI, R.; SANTOS, D. Importância do controle de qualidade na indústria alimentícia: prováveis medidas para evitar contaminação por resíduos de limpeza em bebida UHT. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, v. 4, n. 1, p. 23–38, 2016.

BESSEY, W. A.; LOWRY, O. H.; BROCK, M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **Journal Biological Chemistry**, n. 164, p. 321-329, 1946.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002. Dispõe sobre os regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**., 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualida. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamenta a lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017). **Diário Oficial da União**, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 5 de 14/02/2017. Dispõe sobre os requisitos para avaliação de equivalência ao Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária relativos à estrutura física, dependências e equipamentos de estabelecimento agroindustrial de pequeno porte de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. Brasília - DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos para fixação da qualidade e identidade do leite cru refrigerado, leite pasteurizado e leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, p. 1–4, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018. Dispõe sobre critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2018/19 a 2028/29 projeções de longo prazo**. Brasília-DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa do Leite: políticas públicas e privadas para o leite**. Artigo. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso: 05 de nov. 2022.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa/Tortuga, 1998. 98p.

BRUM, J. V. F. **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em Indústria de Laticínios de Curitiba - PR**, Universidade Federal do Paraná, 2004.

CASTANHEIRA, A. C. G. **Controle de Qualidade de Leite e Derivados - Manual Básico Comentado 2ª Edição**. São Paulo: Cap-Lab, 2012.

CASTRO, P. R. S. DE. **Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite**. 2005.

CLAWIN-RÄDECKER, I. et al. The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. **EFSA Journal**, v. 19, n. 4, 1 abr. 2021.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. Leite e derivados. **Análise Mensal**, p. 1–5, 2021.

COSTA, E. N. **Ácidos Graxos Do Leite Bovino**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.

DEETH, H. C.; LEWIS, M. J. **High Temperature Processing of Milk and Milk Products**. John Wiley & Sons, 2017.

DIEESE. Pesquisa Nacional da Cesta Básica de Alimentos-DIEESE (Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos). p. 5–9, 2022.

DIPOA. DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Resolução N° 10, de 22 de maio de 2003. Institui o Programa Genérico de procedimentos padrão de higiene operacional-PPHO, a ser utilizado nos Estabelecimentos de Leite e Derivados. **DOU**. 2003. p. 4–5.

EGGER, L.; NICOLAS, M.; PELLEGRINO, L. Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 963–968, 2016.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Anuário do Leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Anuario Leite**, n. 35 art, p. 104, 2019.

EMBRAPA. **Anuário do Leite 2020: Leite de vacas felizes**. 104p, 2020.

EMBRAPA. Anuário do leite 2021: saúde única e total. **Anuário 2021**, p. 102, 2021.

EMBRAPA. Anuário do leite 2022: Pecuária leiteira de precisão. **Anuário 2022**, p. 59, 2022.

FAGNANI, R. INs 76 e 77: elas estão chegando. 27 fev. 2019. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/rafael-fagnani/resumao-das-ins-76-e-77-elas-estaochegando212785/>. Acesso em: 11 jan. 2021.

FIEMG-FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE MINAS GERAIS. FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE (FEAM). **GUIA TÉCNICO AMBIENTAL DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS** - FIEMG. In: [s.l.] FIEMG - FEAM, 2015. p. 37.

FERREIRA, A. P. D. **Produção, Qualidade Físico-Química e Microbiológica de Leite Pasteurizado Comercializado no Brasil - Uma Revisão**. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA, 2020.

FOOD, E. et al. The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. **EFSA Journal**, v. 19, n. 4, p. 6576, 2021.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu. 171 p. São Paulo: 2008.

FRANCO, B. S.; MANFIO, S. R.; ANDRADE, C. J.; LEÃO, M. F. Análise das enzimas peroxidase e fosfatase em amostras de leite cru , pasteurizado e longa vida. **Revista Citino**, v. 1, n. 1, p. 52–56, 2011.

GABRIEL, M. E. **Avaliação Da Qualidade Do Leite Da Agricultura Familiar Fornecido Na Alimentação Escolar De Francisco Beltrão - Pr**. 68f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Francisco Beltrão. Francisco Beltrão-PR, 2016.

GIOMBELLI, J. et al. Avaliação da qualidade microbiológica , físico-química e dos parâmetros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B , produzidos no Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. n. 4, p. 1539–1546, 2011.

GRAHAM, W. R. Phosphorus compounds of milk - 6. The effect of heat on milk phosphatase. A simple method for distinguishing raw from pasteurised milk, raw from pasteurised cream, and butter made from raw cream from that made from pasteurised cream. **Journal of Dairy Research**, v. 5, p. 63–74, 1933.

GRAHAM, W. R.; KAY, H. D. Phosphorus compounds of milk. V. The phosphorus

partition in milk, with preliminary observations on milk phosphatase. **Journal of Dairy Research**, v. 5, n. 1, p. 54–62, 1933.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition—a review. **Lipids in health and disease**, v. 6, n. 1, p. 25, 2007.

HILAL, A. P. Validation of milk product pasteurization by Alkaline Phosphatase Activity. *Con Dai & Vet Sci* 1 (3)-2018. **CDVS. MS. ID**, v. 113, 2018.

JAMAS, L. T. et al. Parâmetros de qualidade do leite bovino em propriedades de agricultura familiar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 573–578, 2018.

JENSEN, R. G. The lipids in human milk. **Progress in Lipid Research**, v. 35, n. 1, p. 53–92, 1996.

KLEYN, D. H.; YEN, W. Spectrophotometric determination of phosphatase activity in milk utilizing a new alkaline phosphatase assay system. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 53, n. 4, p. 869–871, 1970.

KOHARA, N. A. N. et al. **Resíduos Químicos no Leite: Um Estudo para Promoção da Sustentabilidade Socioeconômica e Ambiental da Cadeia Produtiva Leiteira**. Anais Eletrônicos - XI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica. **Anais**.2019.

KOSIKOWSKY, F. V. The Effectiveness of the Cornell Phosphatase Test for Dairy Products. **Journal of Dairy Science**, v. 34, n. 12, p. 1151–1158, 1951.

LAKRA, S.; JADHAV, V. J.; GARG, S. R. Development of a chromatographic method for the determination of alkaline phosphatase activity in pasteurized milk. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 7, p. 2002–2009, 2016.

LIMA, J. S. et al. Evaluation of alkaline phosphatase detection methods in bovine, buffalo and goat milk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. 1–6, 2021.

MACHADO, G, de M. . et al. Fosfatase alcalina em leite e derivados: aspectos teóricos e práticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 370, p. 22–28, 2009.

MAHATO, K.; CHANDRA, P. Based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 128, p. 9-16, 2019.

MALISSIOVA, E.; ALEXANDRAKI, M. Preliminary Data on the Suitability of Alkaline Phosphatase Use as Pasteurization Indicator for Donkey Milk. **Acta Veterinaria**

Eurasia, v. 48, n. 2, p. 153–155, 2022.

MARSHALL, R.T. Standard methods for the examination of dairy products. 16.ed. Washington, DC: **American Public Health Association**, 1992. 546p.

MARTH, E. H. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 1978. 14th editi.

MARTINS, F. D. O. **ADAPTAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS PADRÃO DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS INTERNACIONAIS**. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MEGHWAL, K.; PATRA, F.; RAO, P. S. A consensus and controversies over the index organism for milk pasteurization: A brief review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 5, p. 873–876, 2018.

MILINSKI, C. C.; VENTURA, C. A. A. Os impactos do programa nacional de melhoria da qualidade do leite-PNMQL na região de Franca-SP. **Revista Internacional Interdisciplinar INTERthesis**, v. 7, n. 1, p. 170–198, 2010.

MUNIZ, L. C. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil : um estudo de base populacional Consumption of dairy products by adults and the elderly in the south of Brazil : a population-based study. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, p. 3515–3522, 2013.

MURTHY, G. K.; KAYLOR, L. O. Evaluation of APHA and AOACII Methods for Phosphatase in Butter and Differentiation of Milk and Microbial Phosphatases by Agarose-Gel Electrophoresis. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, n. 5, p. 681–687, 1990.

NERO, L. A. et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of Salmonella spp, Listeria monocytogenes and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 211–215, 2004.

NERO, L. A.; DA CRUZ, A. G.; BERSOT, L. S. **Produção, Processamento e Fiscalização de Leite e Derivados**. São Paulo: Atheneu Editora, 2017. 407p.

NETTO, A. S.; VIDAL. A. M. S. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 220p., 2018.

NOGUEIRA, T. S. et al. **AVALIAÇÃO DA TEXTURA SOBRE A INTENÇÃO DE COMPRA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL**. XI Jornada Científica. XI Semana de Ciência e Tecnologia IFMG Campus Bambuí - Minas Gerais. 2018

PASQUALOTTO, T. A. L.; GOIS, J. F. de. Planejamento e gestão da produção leiteira: uso da metodologia “melhor leite”. **Mundo Contemporâneo em Revista**, v. 01, p. 178–194, 2016.

PEIXOTO, M. G. C. D.; CARVALHO, M. R. S.; DE MAGALHÃES, V. M. A. **O leite bovino que produzimos e consumimos**. 2022. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1145076/1/O-leite-bovino-que-produzimos-e-consumimos.pdf>. Acesso: 05 de nov. 2022.

PELCZAR JUNIOR, MICHAEL J; CHAN, E. C. S; KRIEG, NOEL; EDWARDS, DIANE D; PELCZAR, M. Microbiologia: conceitos e aplicações. In: **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed ed. São Paulo. p. 524. 1996.

PEREIRA, F. E. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos em leite cru refrigerado e leite UHT no estado de Goiás e desenvolvimento de filme ativo antimicrobiano para inibição de Bacillus sporothermodurans**. Universidade Federal de Goiás, 2010.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014.

PUNOO, H. A. Validation of Milk Product Pasteurization by Alkaline Phosphatase Activity. **Concepts of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 1, n. 3, p. 78–89, 2018.

QUEMELLI, L. de A. **Desenvolvimento de um integrador de tempo e temperatura com a fosfatase alcalina para investigação do impacto térmico de processos de pasteurização de alimentos líquidos**. Universidade de São Paulo, 2020.

RAUTA, J.; PAETZOLD, L. J.; WINCK, C. A. RASTREABILIDADE NA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE COMO VANTAGEM COMPETITIVA. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 459–474, 2017.

RIBEIRO, L. F. **Fatores determinantes para a qualidade do leite e derivados**. Monte Carmelo MG: FUCAMP, 2021.

RICHARDSON, L. A.; MCFARREN, E. F.; CAMPBELL, J. E. Phosphatase reactivation. **Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 2, p. 205–210, 1964.

ROCCO, R. M. Fluorometric analysis of alkaline phosphatase in fluid dairy products. **Journal of food protection**, v. 53, n. 7, p. 588–591, 1990.

ROCHA, D. T. da; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. de. Cadeia produtiva do leite no Brasil : produção primária. **Circular Técnica - Embrapa Gado de Leite**, v. 123, p. 16, 2020.

SABELA, M. et al. A review of gold and silver nanoparticle-based colorimetric sensing assays. **Advanced Engineering Materials**, v. 19, n. 12, p. 24, 2017.

SANTANA, A. S. et al. Análise de indicadores higiênico-sanitários no leite bovino cru refrigerado comercializado na microrregião de Ji-Paraná – Rondônia - Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e49210211999, 2021.

SEIXAS, F. N. et al. Comparison of methods for alkaline phosphatase and peroxidase detection in milk. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p. 17–24, 2014.

SILVA, J. N.; SOUSA, F. C.; PARENTE, G. D. L.; et al. Avaliação da eficiência da pasteurização em leite tipo c através de parâmetros enzimáticos **REVISTA VERDE DE AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL - GRUPO VERDE DE AGRICULTURA ALTERNATIVA (GVAA)**, v. 6, n. n.3, p. 6–9, 2011.

SILVA, O. A. da. **Avaliação da qualidade do leite cru produzido no município de Areia-PB**. 2017.

SIQUEIRA, K. B. O mercado consumidor de leite e derivados. **Embrapa**, p. 17, 2019.

SOARES, C. F. **Avaliação de métodos colorimétricos qualitativos e quantitativos para a determinação de atividade de fosfatase alcalina em leite e queijo Minas padrão**. Universidade Federal de Minas Gerais -UFMG, Belo Horizonte, 2003.

SORIO, A. Cadeia Agroindustrial do Leite - Diagnóstico dos Fatores Limitantes à Competitividade. In: **Agronegócios e Desenvolvimento Econômico**. p. 167. Brasília - DF, 2018.

STĂNCIUC, N. et al. γ -Glutamyl transferase inactivation in milk and cream: A comparative kinetic study. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 1, p. 56–61, 2011.

VARNAM, A.; SUTHERLAND, J. M. **Beverages: technology, chemistry and microbiology**. VOL.2 ed. Springer Science & Business Media, 1994.

WITTEWER, M. et al. Inactivation kinetics of *Coxiella burnetii* during high-temperature short-time pasteurization of milk. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 2021.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. 4. The influence of certain metallic ions. **Journal of Dairy Research**, v. 23, n. 2, p. 248–257, 1956.

YU, L. et al. Disposable lateral flow-through strip for smartphone-camera to quantitatively detect alkaline phosphatase activity in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 307–315, 2015.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Comparar e verificar a eficácia e aplicabilidade dos métodos de detecção rápida da enzima fosfatase alcalina no leite bovino para comprovar a eficiência do processo de pasteurização.

Objetivos Específicos

- Padronizar os testes oficiais e rápido comercial em laboratório;
- Avaliar a detecção da fosfatase alcalina em amostras de leite sob pasteurização lenta e rápida;
- Avaliar a reativação da enzima em leites pós tratamento térmico;
- Avaliar o limiar de detecção da enzima fosfatase alcalina nos testes rápido comercial e oficiais.

**CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS QUANTITATIVOS
E QUALITATIVOS DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA NO LEITE**

FLAVIANA ANTUNES SOUSA

Avaliação de métodos colorimétricos quantitativos e qualitativos da enzima fosfatase alcalina no leite.

Flaviana Antunes Sousa¹, Ricardo Seiti Yamatogi¹

¹Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV - Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

*Correspondence author: Ricardo Seiti Yamatogi, Universidade Federal de Viçosa, Department of Veterinary Medicine, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Cep: 36.570-900; Tel: +55 31 38991472. Email: ryamatogi@ufv.br

ABSTRACT

SOUSA, Flaviana Antunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Evaluation of quantitative and qualitative colorimetric methods of alkaline phosphatase enzyme in milk.** Adviser: Ricardo Seit Yamatogi.

Milk is one of the most complete nutritional foods, being an important substrate for microorganisms, making it highly perishable. Thus, pasteurization is essential to eliminate pathogens that can contaminate milk in addition to compromising food security. The control of this heat treatment is based on the measurement of two enzymes naturally found in raw milk: alkaline phosphatase and peroxidase. This study aimed to compare the methods of detection of alkaline phosphatase in pasteurized milk in terms of the applicability and sensitivity of the procedures. Four stages of methodological development were performed, including the comparison of detection methods, pasteurization processes, enzymatic reactivation period and detection threshold. Samples of raw, pasteurized and ultra-pasteurized (UHT) milk were used. In these samples, six different tests were performed for each one of them. To evaluate the behavior of the alkaline phosphatase enzyme, qualitative and quantitative colorimetric analyzes were used, in addition to highlighting the performance of the methods in variations of the binomial time and temperature. Qualitative colorimetric analyzes show subjective interpretations of readings with propensity to error. Thus, the results are indicative of the need for validation of a Brazilian methodology applicable in routine that is fast, safe, effective and with a low threshold of quantitative detection regarding residual alkaline phosphatase activity in milk.

Keywords: Heat treatment. Colorimetric analyzes. Detection threshold; Enzymatic reactivation

1. INTRODUÇÃO

A atividade da fosfatase alcalina no leite tem sido utilizada para demonstrar a pasteurização correta, desde a década de 1930. Desse modo, a pesquisa desta enzima tem significado de destaque na segurança dos produtos lácteos, porque indica uma adequada pasteurização para consumo humano (GRAHAM; KAY, 1933).

Os métodos de detecção da fosfatase alcalina fundamentam-se na exposição da enzima em substratos específicos, sob condições controladas, com produção de compostos detectáveis pelo desenvolvimento de cor. No entanto, métodos alternativos surgiram com sensibilidade melhorada, alguns possuem vantagens como a rapidez de análise, a facilidade de manuseio, o uso reduzido de reagentes, a alta especificidade e o reconhecimento por órgãos internacionais. Contudo, a utilização desses métodos tem sido restringida pelos altos custos de equipamentos e reagentes (PAYNE; WILBEY, 2009).

De acordo com as exigências legais, diversos países vêm passando por modificações, como melhoria da sensibilidade das técnicas para atender as cobranças por segurança alimentar. Portanto, este estudo tem como objetivo comparar a eficácia e aplicabilidade dos métodos de detecção da enzima fosfatase alcalina baseados nos critérios de especificidade, comportamento sob diversos tratamentos térmicos e limiar de detecção a fim de comprovar a eficiência do processo de pasteurização do leite bovino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padronização dos métodos oficiais e rápido comercial para verificação da atividade da fosfatase alcalina.

A padronização dos métodos oficiais e rápido comercial foi conduzida na Universidade Federal de Viçosa – MG, no laboratório de produtos de origem animal – INSPOA. Numa primeira etapa, padronizou os métodos utilizando amostras de leite cru coletadas na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL) como controle positivo para a presença da enzima, e leite UHT e pasteurizado oriundos do comércio local como controle negativo.

Por dez dias consecutivos, vinte amostras de leite (cru e UHT) foram submetidas à testes quantitativos (Sharer Rápido Visual (SCHARER,1938), Sharer Espectrofotometria Modificada (MCFARREN; BLACK; CAMPBELL, 1963) e Cornell (KOSIKOWSKI, 1964; KOSIKOWSKY, 1949) e qualitativos (Metodologia oficial brasileira - MAPA (BRASIL, 2018), Rutergs (BABSON; GREELEY, 1967; KLEYN; LIN, 1968) e rápido comercial (fita colorimétrica), porém nos dois últimos dias foi acrescentada a amostra de leite pasteurizado. Resumidamente, segue a descrição de cada método:

- **Método Rápido de Scharer Visual**

Segundo metodologia de Scharer (1938), foram transferidos 0,5 mL da amostra de leite para um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução de fenilfosfato dissódico 0,1% e incubado a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}/15$ min em banho-maria. Após incubação, foram adicionadas 6 gotas de solução reagente CQC (2,6-dicloroquinona cloroimida 0,3%), 2 gotas do catalisador sulfato de cobre 0,2% e posteriormente, homogeneizados. O produto foi reincubado a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}/5$ minutos em banho-maria e resfriado em banho de gelo por 5 minutos. Após ser resfriado adicionou à amostra 3 mL de butanol P.A., invertendo suavemente quatro vezes em semicírculo para extração do indofenol produzido.

Após a homogeneização, manteve-se os tubos em descanso até a separação total do álcool butílico, sendo centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, os tubos com dificuldade de separação. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 650 nm e o resultado avaliado por meio de uma curva padrão, previamente construída conforme descrito por Scharer (1953) com os seguintes valores: 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 e 25 μg de equivalente fenol por 5mL de solução. Concentrações superiores a 1 μg de fenol/mL de leite foram consideradas indicativo de uma pasteurização inadequada ou uma contaminação por leite cru ou por produtos não-pasteurizados (SCHARER, 1953).

- **Método Sharer Espectrofotometria Modificada**

Foram adicionados 0,5 mL do leite em 5 ml de solução de substrato (fenilfosfato dissódico) e incubados em banho-maria a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}/\text{hora}$. Após a

incubação, seguiu-se a remoção dos tubos e a adição de 6 gotas de CQC (2,6 - dicloroquinona cloroimida) e 2 gotas de catalisador sulfato de cobre (CuSO_4), sendo novamente incubados por mais cinco minutos a $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ$. Posteriormente, resfriou o produto em banho de gelo, adicionou 5,0 mL de álcool butílico frio e misturou por inversão. Os tubos foram deixados em repouso por dois minutos e centrifugados.

A fase alcoólica límpida (camada superior), responsável pela presença do indofenol foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda a 650 nm e o valor a da absorbância anotado. A quantidade de microgramas foi obtido por meio da curva padrão descrito por (MCFARREN; BLACK; CAMPBELL, 1963). Concentrações superiores a 2,3 μg de fenol/mL de leite são consideradas indicativo de uma pasteurização imprópria (MCFARREN et al., 1960).

- **Método Oficial Brasileiro – MAPA**

Segundo metodologia do MAPA (2018) transferiu-se 0,5 mL da amostra para cada tubo de ensaio e adicionados 5 mL da solução de fenil fosfato dissódico 0,1%, incubado $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ$ por 20 minutos. Após incubação, o produto foi resfriado, adicionadas 6 gotas de solução reagente CQC (2,6-dicloroquinona cloroimida 0,3%) e 2 gotas do catalisador sulfato de cobre 0,2%. Posteriormente, os tubos foram incubados $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ$ por 5 minutos. Após a incubação, a leitura visual por cor foi realizado sendo interpretado a tonalidade azul e sua intensidade a deficiência na pasteurização (BRASIL, 2018).

- **Método Cornell**

Neste ensaio colorimétrico, a preparação da amostra se dá através da pipetagem de 1mL de leite fluido para um tubo de ensaio, adicionado a 10 mL de substrato tampão de carbonato à 37°C . Em seguida, misturou-se e incubou as amostras por 1 hora em banho-maria a 37°C .

Após a etapa de incubação, os tubos de ensaio foram removidos e cuidadosamente, 1 mL de ácido clorídrico tricloroacético foi adicionado ao tubo. Após alguns segundos, foi necessário a filtragem com papel filtro quantitativo (18,5cm JP 41 Faixa Preta - Filtração Rápida – QUANTY®) em um tubo de ensaio limpo de 5 mL. A cada 5 mL de filtrado, adicionou 1 mL de solução de sulfato de

cobre hexametáfosfato de sódio (NaPO_3) 6 e 5 mL de solução à 41°C de carbonato de sódio (8%). Posteriormente, realizou a homogeneização, a adição de 2 gotas de solução CQC (2,6-dicloroquinona cloroimida), homogeneização e incubação por 5 minutos a 37°C.

Após a última incubação, 5 mL de álcool butílico foram adicionados aos tubos e invertidos por 5 vezes. Após esta etapa, os tubos ficaram em repouso por um minuto ou até a formação completa de duas camadas, uma alcoólica e a outra de conteúdo do leite (KOSIKOWSKI, 1964).

Seguindo as recomendações da AOAC International (*Association of Official Agricultural Chemists*), 3 mL de solução de álcool butílico extraído de cada tubo de ensaio foi aferido em espectrofotômetro a 650 nm e os valores de absorvância transformados em microgramas por mL por meio da curva padrão conforme descrito em (KOSIKOWSKY, 1949). Valores acima de 1,0 µg de fenol por 0,5 mL de leite foi classificado como produto subpasteurização ou contaminado com leite cru ou ambos (KOSIKOWSKY, 1951).

- **Método Rápido Comercial (fita colorimétrica CAPLAB®)**

As tiras reativas para avaliação da eficiência do tratamento térmico através da pesquisa qualitativa da presença/ausência da enzima fosfatase alcalina em amostras de leite de acordo as recomendações do fabricante estavam armazenadas sob refrigeração a 8°C e as amostras dispostas em béquer de 150 mL para atingirem temperatura ambiente. Uma quantidade da amostra de leite fluido foi transferida para o béquer, o suficiente para imergir a tira reagente durante 10 segundos e aguardar 2 a 3 minutos para realizar a leitura. A presença de coloração amarela forte na área reagente da tira indica a presença da enzima fosfatase alcalina. As amostras negativas não desenvolvem coloração. Por se tratar de uma prova com leitura visual, o desenvolvimento de coloração amarelo pálido deve ser desconsiderado (TIETZ et al., 1983).

- **Método Rutergs**

Neste ensaio colorimétrico, de acordo com as instruções de Babson; Greeley (1967) o volume de 1,0 ml de leite foi adicionado em tubos de ensaio com

identificação conforme o tipo de substrato para cada amostra. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 ± 1 °C por 5 minutos para pré- aquecimento das amostras. Foram adicionados aos tubos de concentrado de substrato, 1 gota do reagente e 1 gota de concentrado padrão para o outro tubo. Os tubos foram misturados e reincubados a 37 ± 1 C por mais 30 minutos. Após incubação foi adicionado 1 gota de revelador de cor a cada tubo, misturados e comparados visualmente. A interpretação qualitativa considera que se o tubo contendo concentrado de substrato apresentar menos cor rosa do que o tubo contendo concentrado padrão, a amostra pode ser considerada adequadamente pasteurizada (KLEYN; LIN, 1968).

2.2 Detecção da fosfatase alcalina em amostras de leite sob diferentes tratamentos térmicos

Numa segunda etapa para detecção da fosfatase alcalina, foram utilizada amostras de leite cru coletadas na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL) e pasteurizado sob diversos tratamentos térmicos.

2.2.1 Pasteurização Lenta

O processo de pasteurização lenta foi realizado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – InsPOA – DVT/UFV, com utilização banho seco (*Digital Block Heater - Select BioProducts®*). As temperaturas para o tratamento térmico foram selecionadas considerando a recomendada pela Instrução Normativa Nº5 (BRASIL, 2017), adicionando duas temperaturas inferiores ao limite mínimo e uma temperatura superior ao limite máximo. Desta forma, um volume de 0,5mL de leite cru acondicionado em microtubos foram pasteurizados em bloco seco sob as temperaturas de 58, 60, 62, 65 e 67°C por 30 minutos, sendo em seguida resfriados a 4°C.

A cada pasteurização, microtubos extras com 0,5 mL de leite foram utilizados para aferir, em tempo real, a temperatura do leite durante o procedimento. Após a pasteurização, o leite foi avaliado pelos métodos de Sharer Rápido Visual, Sharer Espectrofotometria Modificada, Metodologia oficial brasileira (MAPA), Cornell, Rápido

comercial (fita colorimétrica) e Rutergs (MARTH, 1978), sendo no total, 5 repetições realizadas.

2.2.2 Pasteurização rápida

O processo de pasteurização rápida foi realizado no Laticínio Escola da UFV-Funarbe. Durante o processo de pasteurização e em acordo com a indústria, foram adquiridos um leite sub pasteurizado (68°C), amostras de leite pasteurizados (72°C e 75°C) conforme a legislação vigente (BRASIL, 2017) e amostras sob pasteurização acima do limiar máximo da legislação (78° e 80°C). Após a pasteurização, as amostras foram coletadas em frascos estéreis e armazenados sob refrigeração até o processamento em laboratório. No Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – InsPOA – DVT/UFV a cada amostra foi testada pelo métodos de Sharer Rápido Visual (SCHARER, 1938, 1953), Sharer Espectrofotometria Modificada (MCFARREN; BLACK; CAMPBELL, 1963), Metodologia oficial brasileira (BRASIL, 2018), Cornell (KOSIKOWSKI, 1964), Rutergs (KLEYN; LIN, 1968) e Rápido comercial (fita colorimétrica) (TIETZ et al., 1983). No total foram realizados um total de 5 repetições em diferentes dias.

2.3 Verificação da reativação enzimática da fosfatase alcalina no leite

A reativação da enzima fosfatase alcalina foi avaliada em amostras de leite pasteurizado do laticínio e UHT do comércio local. Para o leite pasteurizado foram coletadas uma amostra por cinco dias consecutivos e uma amostra para o leite UHT. Essas amostras foram divididas em sete frascos estéreis e armazenadas sob refrigeração de 7°C e uma alíquota analisada a cada 5 dias até o armazenamento total de 30 dias com os seguintes testes: Cornell (KOSIKOWSKI, 1964), Metodologia oficial brasileira (MAPA) (BRASIL, 2018) e Rutergs (KLEYN; LIN, 1968) e Rápido comercial (fita colorimétrica) (TIETZ et al., 1983).

2.4 Limiar de detecção da fosfatase alcalina para os testes qualitativos

O limiar de detecção dos testes qualitativos (Metodologia oficial brasileira (MAPA), Rutergs e Rápido comercial (fita colorimétrica) foi avaliado considerando

como padrão o teste quantitativo de Cornell devido sua sensibilidade. Inicialmente, as amostras de leite sob pasteurização rápida obtidas no Laticínio Escola da UFV foram tinalizadas a 100°C por 30 minutos conforme a Tabela 1, em autoclave aberta e imediatamente resfriado em banho-maria e estocado em refrigeração a 4°C (LIN; RAMASWAMY, 2011) afim de garantir um leite sem qualquer presença da enzima fosfatase alcalina ativa.

Para aferição do limiar de detecção da enzima, utilizou-se a fosfatase alcalina intestinal bovina SIGMA ALDRICH Phosphatase (Alkaline from bovine intestinal mucosa, 17,9 mg/proteína/mL - Biuret) diluída em uma solução estoque 1 (50% de glicerol contendo 5 mM de Tris, 5 mM de MgCl₂ e 0,1 mM de ZnCl₂, pH 7,0) na proporção de 28:5000 µl – solução Estoque 1, conforme descrita na Tabela 1. Como a fosfatase alcalina inicial apresentava somente a concentração aproximada (≥ 10 mg/mL), realizou-se a verificação quantitativa da fosfatase alcalina como forma de prover um valor inicial de referência. Assim, uma segunda diluição 1:10 da solução A0 em leite tinalizado foi realizado e obtido o limiar máximo de detecção do teste de Cornell. Após esse teste, diluições seriadas 1:2 em leite tinalizado (Tabela 1) foi realizado com a solução A1 e testados para os diversos métodos quantitativos afim de realizar o limiar de detecção.

Em todos os métodos, um leite cru e um leite UHT foram utilizados como controles positivos e negativos respectivamente. As diluições realizadas para identificar o limiar de detecção foram realizadas em oito soluções baseadas em (D1 a D8), conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Diluições realizadas para identificar o limiar de detecção dos métodos qualitativos.

Solução	Diluição realizada
D0	28µL FA + 4972 µL Estoque 1
D1	9 mL Leite + 1 mL A0
D2	5 mL Leite + 5 mL A1
D3	5 mL Leite + 5 mL A2
D4	5 mL Leite + 5 mL A3
D5	5 mL Leite + 5 mL A4
D6	5 mL Leite + 5 mL A5
D7	5 mL Leite + 5 mL A6
D8	5 mL Leite + 5 mL A7

*D = Diluições

3. RESULTADOS

Os resultados da padronização dos métodos aplicados com objetivo de comparar a eficácia dos ensaios, sendo os qualitativos (Metodologia oficial brasileira (MAPA), Rápido comercial (fita colorimétrica) e Ruterger) e os quantitativos (Sharer Rápido Visual, Sharer Espectrofotometria modificada e Cornell) estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da detecção da enzima fosfatase alcalina, tempo gasto de execução e valor médio dos insumos utilizados pelos métodos qualitativos do MAPA, Ruterger e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelos métodos quantitativos Sharer rápido visual, Sharer Espectrofotometria modificada e Cornell.

MÉTODO	ACERTOS	ACERTOS %	TEMPO GASTO	VALOR MÉDIO
MAPA	10/10	100	40 min.	\$\$
FITA	10/10	100	03 min.	\$
SHARER	10/10	100	50 min.	\$\$
SHARER ESP. MODIFICADO	10/10	100	100 min.	\$\$
CORNELL	10/10	100	150 min.	\$\$
RUTERGS	10/10	100	60 min.	\$\$\$

A avaliação dos métodos em amostras de leite tratadas termicamente sob pasteurização lenta, está descrita na tabela 3. Entre as temperaturas testadas, fica visível a não pasteurização a 58°C com exceção da técnica rápida que não detectou a enzima. Nas outras temperatura (60,62,65 e 67°C) apareceram detecção pontual da fosfatase alcalina.

Tabela 3: Detecção da enzima fosfatase alcalina em amostras de leite sob pasteurização lenta pelos métodos qualitativos do MAPA, Ruterger e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelos métodos quantitativos Sharer Rápido Visual, Sharer Espectrofotometria modificada e Cornell.

TESTE	°C	A1	A2	A3	A4	A5	TESTE	°C	A1	A2	A3	A4	A5
	58	-	-	-	-	-		58	+	+	+	+	+
	60	-	-	-	-	-		60	-	-	-	-	+
FITA	62	-	-	-	-	-	SHARER	62	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-		65	-	-	-	-	-
	67	-	-	-	-	-		67	-	-	-	-	+
MAPA	58	-	+	-	+	+	CORNELL	58	+	+	+	+	+

	60	-	-	-	-	-		60	-	-	-	-	-
	62	-	-	-	-	-		62	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-		65	-	-	-	-	-
	67	-	-	-	-	-		67	-	-	-	-	-
SHARER MODIF.	58	+	+	+	+	+	RUTERGS	58	+	+	+	+	+
	60	-	-	+	-	-		60	-	-	-	-	-
	62	-	-	-	-	-		62	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-		65	-	-	-	-	-
	67	-	-	-	-	-		67	-	-	-	-	-

*Letra A = amostra e 1,2,3,4,5 = repetições

A avaliação dos métodos de detecção nas amostras de leite sob pasteurização rápida ficou visível que acima da temperatura de 75°C nenhum método detectou a presença da enzima com exceção de uma detecção pontual da técnica da Metodologia oficial brasileira (MAPA). Em temperaturas de 72°C ou inferior, os métodos apresentaram em sua grande maioria a presença da enzima fosfatase alcalina como mostra na Tabela 4 a seguir:

Tabela 4: Detecção da enzima fosfatase alcalina em amostras de leite sob pasteurização rápida pelos métodos qualitativos do MAPA, Rutergs e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelos métodos quantitativos Sharer Rápido Visual, Sharer Espectrofotometria modificada e Cornell.

TESTE	°C	A1	A2	A3	A4	A5	TESTE	°C	A1	A2	A3	A4	A5
FITA	68	-	-	-	+	+	SHARER	68	+	+	+	+	+
	72	-	-	-	-	-		72	+	-	-	+	-
	75	-	-	-	-	-		75	-	-	-	-	-
	78	-	-	-	-	-		78	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-		80	-	-	-	-	-
MAPA	68	+	+	+	+	+	CORNELL	68	+	+	+	+	-
	72	-	-	-	+	+		72	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	-	-		75	-	-	-	-	-
	78	-	-	-	-	+		78	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-		80	-	-	-	-	-
SHARER MODIF.	68	+	+	+	+	-	RUTERGS	68	+	+	+	+	-
	72	-	-	-	+	-		72	-	-	-	+	-
	75	-	-	-	-	-		75	-	-	-	-	-
	78	-	-	-	-	-		78	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-		80	-	-	-	-	-

Letra A = amostra e 1,2,3,4,5 = repetições

A reativação da enzima fosfatase alcalina avaliada durante o período de 30 dias, nos primeiros 10 dias nenhuma das amostras apresentaram a presença de fosfatase alcalina. A partir do 15º dia a presença da enzima tornou-se mais visível (Tabela 5), sendo bem detectada pelo método de Rutergs e parcialmente pelo método de Cornell. O método do MAPA e do teste rápido comercial (fita colorimétrica) apresentaram detecções pontuais.

Tabela 5: Verificação da reativação da enzima fosfatase alcalina em amostras de leite pasteurizados e UHT pelos métodos qualitativos do MAPA, Rutergs e teste rápido comercial (fita colorimétrica) e pelo método quantitativo de Cornell durante o período de 30 dias.

AMOSTRA	MÉTODO	A	D15	D20	D25	D30	AMOSTRA	MÉTODO	A	D15	D20	D25	D30		
PASTEURIZAÇÃO	CORNELL	1	-	-	+	-	UHT	CORNELL	1	-	-	+	-		
		2	-	+	+	-			2	-	-	+	-		
		3	-	+	-	-			3	-	+	-	-		
		4	+	+	-	-			4	-	+	-	-		
		5	+	-	-	-			5	+	-	-	-		
	FITA	1	-	-	-	-		+	FITA	1	-	-	-	-	+
		2	-	-	-	-		-		2	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-		-		3	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-		-		4	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-		-		5	-	-	-	-	-
	MAPA	1	-	-	-	-		+	MAPA	1	-	-	-	-	+
		2	-	-	-	-		-		2	-	-	-	-	-
		3	-	-	+	-		-		3	-	-	+	-	-
		4	-	-	-	-		-		4	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-		-		5	-	-	-	-	-
	RUTERGS	1	-	+	+	+		+	RUTERGS	1	-	-	+	+	+
		2	+	+	+	+		+		2	-	+	+	+	+
		3	+	+	+	+		+		3	-	-	+	+	+
		4	+	+	+	+		+		4	-	+	+	+	+
		5	-	+	+	+		+		5	-	+	+	+	+

Letra A = amostra e D = dias

Na etapa de reativação tanto para o leite pasteurizado quanto o UHT, os resultados foram similares de acordo mostra a Tabela 5. Entre os dia 1 e 10 não obteve nenhuma alteração quanto a presença da enzima. No teste rápido comercial (fita colorimétrica), apenas no dia 30 a amostra 1 apresentou valor positivo para enzima.

No teste do MAPA, a amostra 1 e 3, nos dias 25 e 30 respectivamente foram positivas. Já o teste de Rutergs, teve uma maior sensibilidade em identificar a enzima na maioria das amostras. O teste quantitativo de Cornell teve variações na detecção entre os dias 15 e 25, porém no dia 30 não identificou a enzima em nenhuma amostra. Os controles positivos e negativos foram confirmados nessa etapa.

Além de identificar a eficácia e sensibilidade da enzima é necessário interpretar quantitativamente o limiar de detecção da mesma (Tabela 6).

Tabela 6: Limiar de detecção utilizando como padrão o teste quantitativo de Cornell ($\mu\text{c/ mL}$).

DILUIÇÃO	CORNELL (0,5 ML)	MAPA (0,5 ML)	FITA	RUTERGS (1 ML)
D1	30,58	4/4 100%	4/4 100%	4/4 100%
D2	22,96	4/4 100%	4/4 100%	4/4 100%
D3	12,34	4/4 100%	4/4 100%	4/4 100%
D4	6,38	4/4 100%	2/4 50%	4/4 100%
D5	2,66	4/4 100%	2/4 50%	4/4 100%
D6	1,10	4/4 100%	0/4 0%	4/4 100%
D7	0,09	4/4 100%	0/4 0%	4/4 100%
D8	não detectado	0/4 0%	0/4 0%	4/4 100%

- D = Diluições

A pesquisa pelo limiar de detecção baseou-se no método quantitativo de Cornell e qualitativos de Rutergs, metodologia oficial brasileira (MAPA) e método rápido comercial (fita colorimétrica).

No limiar de detecção utilizando como padrão o teste quantitativo de Cornell ($\mu\text{c/ mL}$), teve-se como resultado a média dos valores das absorvâncias das diluições das concentrações (D1 a D8). Utilizou-se a curva de calibração dos padrões de fenol para determinar os valores finais. Sendo assim, os testes de Cornell e Mapa foram eficazes para detecção da fosfatase alcalina nas concentrações de D1 a D7.

O teste de Rutergs permitiu verificação da enzima em todas as concentrações de D1 a D7, sendo parcialmente detectada em D8. O teste rápido comercial (fita colorimétrica) se limitou apenas as concentrações D1 a D3 e detecções parciais entre D4 a D5.

4. DISCUSSÃO

Os testes avaliados durante a padronização apresentaram resultados positivos para a detecção da fosfatase alcalina em 100% das repetições. Esse resultado já era esperado pois o leite cru apresenta em seu conteúdo altas quantidades da enzima em atividade (GRAHAM; KAY, 1933).

Avaliando individualmente o método de Sharer Rápido Visual e Sharer Espectrofotometria Modificado, essas técnicas apresentam resultados quantitativos importantes para avaliação da pasteurização. No entanto, devido a curva padrão ser construída somente com fenol em água, a tonalidade de azul adquiridas, segundo o método utilizado, pode não ser real pois a matriz alimentar do leite pode interferir na intensidade da coloração (SILVA, 2006). Segundo Martins (2006) e Soares (2003), ao trabalhar com leite fluido e queijo Minas padrão obteve dificuldade em comparar as tonalidades de azul devido aos componentes presentes no leite apresentando uma inespecificidade da técnica.

Outro ponto que pode ser considerado como desvantagem é a necessidade da descontaminação de fenol livre nas vidrarias caracterizando a um falso positivo (DRUCKREY; KLEYN; MURTHY, 1985), além do tempo de execução que pode variar entre 60 a 90 minutos, devido as etapas de incubação realizadas nos métodos.

Embora a técnicas de Sharer Rápido Visual e Sharer Espectrofotometria Modificado tenham alguns pontos negativos é bastante utilizada e insumos acessíveis no mercado (SILVA, 2006). Entretanto são métodos laboriosos de múltiplas etapas que exigem muita concentração além de não ser a técnica mais barata.

Outro método bem difundido e quantitativo é o teste de Cornell que se assemelha ao Sharer Rápido Visual e Sharer Espectrofotometria Modificado, pois utiliza-se de uma regressão linear entre concentração de fenol e absorvância dos padrões (curva padrão) (KOSIKOWSKY, 1951). A curva padrão de Cornell apresenta um número maior de ponto, além de limiares máximo e mínimo melhor definido que as outras duas técnicas. Isso permite uma quantificação da enzima com maior precisão.

Durante o estudo, o método de Cornell foi o que obteve o maior tempo de execução devido aos longos tempos de incubação e precipitação, caracterizando como ponto negativo. Além disso, Marth (1978) relata os insumos como instáveis e

onerosos. Já Kosikowsky (1951), relata que resultados somente quantitativos, pode ser ruim dependendo do objetivo das análises.

O teste rápido comercial por fitas colorimétricas é interpretado pela coloração amarela na área reagente da fita indicando um resultado positivo para a enzima fosfatase alcalina e a ausência da coloração ou cor amarelo pálido remete a um resultado negativo (TIETZ et al., 1983). Contudo, durante as análises essas tonalidades de amarelo variaram em grande escala gerando subjetividade nas interpretações, permitindo resultados falso negativos e problemas em Saúde Pública.

Corroborando este estudo, o trabalho realizado por Seixas et al. (2014) sobre comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite através de fitas colorimétricas, os resultados sugerem que a interpretação do teste deva ser reavaliada, pois é importante considerar as alterações das colorações, pois isso aumenta a sensibilidade e permite a detecção de menores quantidades da fosfatase alcalina.

Na metodologia oficial brasileira (MAPA) não há a extração do indofenol por butanol e nem comparação com padrões em diferentes níveis de fenol, portanto para (MACHADO et al., 2009) o fato de não ser estabelecido um limite quantitativo comparativo, torna o ensaio inferior quando comparado as demais metodologias. Além disso, (Castro, 2005) descreve que a metodologia oficial brasileira (MAPA) é aplicada somente para análise de leite fluido pasteurizado, não contemplando derivados lácteos, sendo um fator limitante. Apesar disso, Lima et al., (2021) concluiu-se que no leite bovino os procedimentos da legislação brasileira possuem maior sensibilidade por acusar baixas concentrações da enzima no alimento, ainda assim é necessário o estabelecimento de outros processos ou a otimização dos que já existem para a identificação da enzima visando a garantia da qualidade do produto.

Neste trabalho, a dificuldade devido a subjetividade nos ensaios da metodologia Oficial Brasileira (MAPA), trouxe insegurança quanto aos resultados e comparado às metodologias de Rutergs e Cornell. Além de ser um método qualitativo, não permitindo um limiar de detecção.

Em se tratando do teste de Rutergs descrito por Babson e Greeley (1967), este demonstrou ser um teste sensível, com um período de incubação relativamente rápido e ao contrário dos reagentes utilizados nos ensaios de Scharer Rápido Visual, Sharer Espectrofotometria Modificado, Mapa e Cornell, o substrato de monofosfato de fenoltaleína e seu produto de hidrólise são muito estáveis ao longo do tempo e das

condições de armazenamento. Entretanto, os reagentes utilizados possuem um custo maior, altamente tóxicos, o que exige durante o preparo medidas de segurança aplicadas. (KLEYN; YEN, 1970) acreditam que seria interessante neste método, uma análise quantitativa para estabelecer com mais firmeza o nível de fenolftaleína medido a ser usado para indicar sob pasteurização ou contaminação de leite pasteurizado com leite cru.

Durante os testes em amostras sob tratamento térmico, o ensaio rápido comercial (fita colorimétrica) não foi eficiente para detectar a fosfatase alcalina em nenhuma faixa de temperatura aplicada em amostras de leite sob pasteurização lenta. No leite sob pasteurização rápida o método também foi pouco eficiente, detectando somente 2 amostras a 68°C, temperatura esta que possui enzima ativa. Segundo estudo de Lima et al. (2021) em suas análises com as fitas colorimétricas, demonstraram baixa eficiência em acusar a presença da enzima nas amostras com o incremento de pequenas quantidades de leite cru incorporadas ao leite pasteurizado, corroborando tais resultados.

Ainda assim, Seixas et al. (2014) afirmam que as tiras comerciais possam ser usadas como prova de rotina, devido à facilidade, rapidez e praticidade quando comparadas a metodologia oficial brasileira (MAPA), que necessita de instrumentos e equipamentos, como pipetas e banho-maria para sua realização. Porém, devido a possível ocorrência de falsos negativos nos resultados das tiras, é recomendável sua utilização somente como triagem.

Tanto os dados da pasteurização lenta assim como da rápida, os testes de Cornell, MAPA, Sharer Espectrofotometria Modificado, Sharer Rápido Visual e Ruterger identificaram a enzima na maioria das amostras submetidas à 68°C, o que os tornam satisfatórios. Porém, alguns desses testes apresentaram a detecção pontual da enzima em temperaturas que a mesma deveria estar inativa.

De acordo com Lima et al. (2021), embora a metodologia proposta pela legislação brasileira necessite de equipamentos e tempo maior para a execução quando comparada com o rápido comercial (fita colorimétrica), que é mais prática e com leitura imediata, ainda assim, é o de maior eficiência e sensibilidade para a detecção de percentagens mínimas da enzima no leite bovino. Apesar disso, Castro (2005) evidencia que ambos os métodos, o Oficial Brasileiro e o Scharer Rápido Visual, apresentam limite de detecção muito elevados, tornando-os insatisfatórios para analisar níveis residuais de fosfatase alcalina em leite pasteurizado.

Problemas na variação do binômio tempo e temperatura na pasteurização pode ter sido responsável por fosfatase alcalina ativa. Painter e Bradley Jr (1997) concluíram que oscilações no tempo e temperatura de pasteurização influenciam até 7% da atividade residual da enzima. Além disso, a variação nos níveis de fosfatase alcalina natural pode levar a variações nos níveis residuais em leites pasteurizados. Essa variação influenciada por fatores já citados, podem ser ainda maiores pela presença da fosfatase microbiana, sendo mais resistente ao calor em amostras de baixa qualidade microbiológica, gerando assim uma falsa indicação de subtratamento (PAYNE; WILBEY, 2009).

O resultado do ensaio de detecção da fosfatase alcalina é indicativo da eficácia da pasteurização do leite. Os dados da Tabela 5 sobre reativação da enzima, basearam-se em leite pasteurizado e UHT. Notou-se que somente a partir do 15º dia, obteve valores de fosfatase alcalina, no entanto não pode se afirmar que seja fosfatase alcalina residual reativada, devido a possível influência da fosfatase microbiana.

Conforme Murthy et al. (1990) a fosfatase alcalina microbiana, produzida por muitas cepas bacterianas, em muitos casos, apresenta maior estabilidade térmica do que a fosfatase alcalina bovina, potencialmente aumentando o número de resultados falsos-positivos.

Murthy et al. (1976) descobriram que o leite cru submetido a aquecimento rápido acima de 85°C é mais suscetível à “reativação ou renaturação” da enzima fosfatase alcalina. Todavia, Wright e Tramer (1956) em suas pesquisas não conseguiram estabelecer uma correlação entre reativação, tempo e temperatura de pasteurização ou tempo de armazenamento pós-processo.

Conforme a *American Public Health Association* (APHA) recomenda a repasteurização de qualquer amostra positiva para fosfatase alcalina (ou seja, aquecer uma porção de leite a 63°C por 30 min). Caso a atividade enzimática da amostra repasteurizada não for visivelmente reduzida (devido à atividade da fosfatase alcalina termicamente estável), pode-se concluir que o resultado original do ensaio foi devido à presença de fosfatase alcalina bacteriana (CLAWIN-RÄDECKER et al., 2021).

Nas análises realizadas com o leite UHT, para os testes de Cornell e Rutgers detectaram a presença da enzima após o 15º dia de armazenamento à 7°C. Segundo Richardson et al. (1964), a reativação depende de vários fatores, como teor de gordura, disponibilidade de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} livres, condições de aquecimento e

armazenamento, disponibilidade de fosfatos e condições de pH. Fox e Kelly (2006) relataram que o processo de reativação é iminente no leite tratado UHT quando armazenado à temperatura ambiente.

Em relação aos resultados do método rápido comercial (fita colorimétrica), estes mostraram baixa sensibilidade da técnica, pois apenas no 30º dia em uma amostra, foi detectado a presença da enzima através da reação. O teste oficial do MAPA, teve uma baixa precisão na detecção da enzima ativada na amostragem. O método de Rutergs apesar de ser um teste de triagem e qualitativo, teve maior eficácia do que o de Cornell, o que contribui segundo Babson e Greeley (1967), pois os mesmos afirmam que o método de Rutergs pode ser utilizado para diferenciar entre fosfatase alcalina residual e reativada.

A pesquisa pelo limiar de detecção trouxe dados importantes ao compararmos os métodos aplicados, comprovando mais uma vez a eficácia do teste de Rutergs e o oficial brasileiro ao conseguir verificar a presença da enzima em concentrações abaixo de um micrograma/0,5 mL. Já o teste rápido comercial (fita colorimétrica) apresentou pelo estudo um limiar de detecção de 12 micrograma/0,5 mL, ou seja, 12 vezes acima do recomendado como leite pasteurizado segundo a técnica quantitativa utilizada. O teste de Cornell, utilizado para os cálculos da curva de calibração mostrou-se aplicável para verificar o limiar de detecção da enzima, devido ser confiável, com valores de absorbância com precisão.

Segundo Castro (2005) e Silva (2006), a utilização de Sharer Rápido Visual e Sharer Espectrofotometria Modificado para realizar o limiar de detecção de técnicas qualitativas não são satisfatórias em produtos como leite e manteiga devido ao limiar de 10 e 12 micrograma/mL. Outros métodos como o aplicado por Lakra et al. (2016) utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Por meio da densidade óptica para a determinação da atividade da fosfatase alcalina em leite pasteurizado, os autores observaram boa linearidade, exatidão e precisão e baixos limites de detecção e quantificação, indicando detecção de contaminação do leite cru de até 0,0006% de precisão e exatidão.

Payne e Wilbey (2009), realizaram uma investigação com o objetivo de comparar quantitativamente os métodos históricos de fosfatase por teste colorimétrico e fluorimétrico IDF/ISO. Foram utilizados leite com adições de leite cru, adições de fosfatase alcalina bovina purificada e tratamentos térmicos. Os autores observaram que a comparação quantitativa baseada em análise fluorimétrica por Fluorofós,

apresentou maior sensibilidade e reprodutibilidade do que procedimentos colorimétricos, sendo assim permitiu-se concluir que limites de detecção sejam definidos ainda mais próximos dos valores teóricos para leite subprocessado, para evitar incertezas nos dados.

Dessa forma, poucas revisões abrangentes podem ser encontradas que detalham as tecnologias de ensaio de detecção do limiar da fosfatase alcalina atualmente usadas e por isso mais estudos são necessários.

5. CONCLUSÃO

Este estudo forneceu informações importantes sobre o comportamento da enzima fosfatase alcalina em diferentes metodologias de identificação, além de analisar o desempenho dos métodos em variações do binômio tempo e temperatura. As análises colorimétricas qualitativas, apresentam baixa sensibilidade, além de leituras de interpretações subjetivas com propensão ao erro. Os resultados indicaram a necessidade da validação de uma metodologia brasileira aplicável na rotina, rápida, segura e eficaz com baixo limiar de detecção quantitativa referente a atividade da fosfatase alcalina residual em leites.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao comparar os métodos de detecção da fosfatase alcalina verificou-se o desempenho dos mesmos diante do processo de pasteurização do leite, considerando insumos, tempo de execução, aplicabilidade, eficácia e custos.

Com a padronização dos testes oficiais submetidos à variações de tempo e temperatura, os métodos qualitativos variaram quanto a detecção da enzima nas amostras podendo comprometer a eficácia. O método quantitativo de Cornell, apresentou uma sensibilidade melhor em comparação aos demais testes, detectando a enzima em um número maior de amostras, além de permitir quantificar os valores de absorbância através da curva padrão. O teste rápido comercial (fita colorimétrica), não é um teste oficial regulamentado, sendo assim os dados obtidos neste estudo corrobora a importância em melhorias na sensibilidade de detecção da enzima através da fita.

A etapa de reativação enzimática, permitiu resultados satisfatórios a partir de 15 dias de análise, sendo o método mais aplicável para esta etapa o de Rutergs, capaz de detectar a enzima com maior precisão. Embora, esses valores possam ser de fosfatase microbiana, interferindo na detecção da fosfatase alcalina através dos métodos de Rutergs, Rápido comercial (fita colorimétrica), Metodologia Brasileira e Cornell.

A análise do limiar de detecção da enzima, apesar do teste de Cornell ser quantitativo e utilizado como padrão para interpretação do limiar, o método de Rutergs e do Mapa foram capazes de identificar limiares da enzima em concentrações menores, tornando-os mais aplicáveis. Porém, é necessário uma maior reprodutibilidade do método para determinar um limiar de detecção enzimático mais preciso.

7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS

BABEL, F. J. et al. Phosphatase methods. **Standard methods for the examination of dairy products, 14th ed.** American Public Health Association, Washington, DC, p. 213–229, 1978.

BABSON, A. L.; GREELEY, S. J. New substrate for alkaline phosphatase in milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 50, n. 3, p. 555–557, 1967.

BRASIL. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal - MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Brasília- DF, 2018.

CASTRO, P. R. S. de. **Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 35f. Viçosa, 2005.

DRUCKREY, I., KLEYN D. H., MURTHY G. K. **Phosphatase methods in Standard methods for the examination of dairy products.** 15ª edição, 1985.

FOOD, E. et al. The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. **EFSA Journal**, v. 19, n. 4, p. 6576, 2021.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 517–532, 2006.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** 2 nd ed. São Paulo: Atheneu; 2003.182 p.

GRAHAM, W. R.; KAY, H. D. Phosphorus compounds of milk. V. The phosphorus partition in milk, with preliminary observations on milk phosphatase. **Journal of Dairy Research**, v. 5, n. 1, p. 54–62, 1933.

KLEYN, D. H.; LIN, S. H. C. Collaborative study of a new alkaline phosphatase assay system for milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 51, n. 4, p. 802–807, 1968.

KLEYN, D. H.; YEN, W. Spectrophotometric determination of phosphatase activity in milk utilizing a new alkaline phosphatase assay system. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 53, n. 4, p. 869–871, 1970.

KOSIKOWSKI, F. V. Evolutionary changes in the Cornell phosphatase test. **Journal**

of **Milk and Food Technology**, v. 27, n. 9, p. 268–270, 1964.

KOSIKOWSKY, F. V. The Effectiveness of the Cornell Phosphatase Test for Dairy Products. **Journal of Dairy Science**, v. 34, n. 12, p. 1151–1158, 1951.

LANE, J. C.; EYNON, J. A. **Official methods of analysis**. Association of official agricultural chemists (AOAC), 12th ed., Washington DC, USA, 1975.

LIMA, J. S. et al. Evaluation of alkaline phosphatase detection methods in bovine, buffalo and goat milk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. 1–6, 2021.

LIN, M.; RAMASWAMY, H. S. Evaluation of phosphatase inactivation kinetics in milk under continuous flow microwave and conventional heating conditions. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 1, p. 110–123, 2011.

MACHADO, G, de M. . et al. Fosfatase alcalina em leite e derivados: aspectos teóricos e práticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 370, p. 22–28, 2009.

MARIOTO, L. R. M., DANIEL, G. C., GONZAGA, N.; et al. Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, e-44034, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-44034>. Acesso: 5 nov. 2022

MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. [s.l.] American public health Association, 1992.

MARTH. E. H. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 14^a edição, 1978.

MCFARREN, E. F. et al. Differentiation of reactivated from residual phosphatase in high temperature-short time pasteurized milk and cream. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 43, n. 2, p. 414–426, 1960.

MCFARREN, E. F.; BLACK, L. A.; CAMPBELL, J. E. MODIFIED SPECTROPHOTOMETRIC PHOSPHATASE METHOD. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 26, n. 12, p. 395–396, 1963.

MCKIE, V. A.; MCCLEARY, B. V. A novel and rapid colorimetric method for measuring total phosphorus and phytic acid in foods and animal feeds. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 3, p. 738-743, 2016.

MURTHY, G. K.; COX, S.; KAYLOR, L. Reactivation of alkaline phosphatase in ultra high-temperature, short-time processed liquid milk products. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 10, p. 1699–1710, 1976.

MURTHY, G. K.; KAYLOR, L. O. Evaluation of APHA and AOACII Methods for Phosphatase in Butter and Differentiation of Milk and Microbial Phosphatases by Agarose-Gel Electrophoresis. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 73, n. 5, p. 681–687, 1990.

SEIXAS, N. F. et al. Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p. 17, 2014.

OTTO A. et al. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **Journal of biological chemistry**, v. 164, n. 3, p. 321-329, 1946.

PAINTER, C. J.; BRADLEY JR, R. L. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time-temperature treatments. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 5, p. 525–530, 1997.

PAYNE, C.; WILBEY, R. A. Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: A quantitative comparison of Fluorophos and colourimetric procedures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 308–314, 2009.

RICHARDSON, L. A.; MCFARREN, E. F.; CAMPBELL, J. E. Phosphatase reactivation. **Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 2, p. 205–210, 1964.

SANTOS, V. C. Ocorrências de não conformidades físico-químicas e microbiológicas em leite e derivados sob inspeção estadual em Minas Gerais no período de 2011 a 2015. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.6, p.2111-2116, 2019.

SCHARER, H. A rapid phosphomonoesterase test for control of dairy pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 21, n. 1, p. 21–34, 1938.

SCHARER, H. Laboratory Control of Milk under War Conditions: The Rapid Phosphatase Test. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 33, n. 4, p. 396–398, 1943.

SOARES, C. F. **Avaliação de métodos colorimétricos qualitativos e quantitativos para a determinação de atividade de fosfatase alcalina em leite e queijo Minas padrão**. Universidade Federal de Minas Gerais -UFMG, Belo Horizonte, 2003.

TIETZ, N. W. et al. A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. **Clinical chemistry**, v. 29, n. 5, p. 751–761, 1983.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat

treatment. 4. The influence of certain metallic ions. **Journal of Dairy Research**, v. 23, n. 2, p. 248–257, 1956.