

**FABIANA DE OLIVEIRA MARTINS**

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA DETECÇÃO DA  
ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS  
PADRÃO DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS INTERNACIONAIS.**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M386a  
2006

Martins, Fabiana de Oliveira, 1982-  
Adaptação do método rápido de Scharer para detecção  
da atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas  
padrão de acordo com as exigências internacionais /  
Fabiana de Oliveira Martins. – Viçosa : UFV, 2006.  
xiv, 77f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sebastião Cesar Cardoso Brandão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Análise. 2. Queijo-de-minas. 3. Enzimas -  
Aplicações industriais. 4. Fluorimetria. 5. Alimentos -  
Adulteração e inspeção. 6. Alimentos - Microbiologia.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.07

FABIANA DE OLIVEIRA MARTINS

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA DETECÇÃO DA  
ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS  
PADRÃO DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS INTERNACIONAIS.**

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

APROVADA: 14 de novembro de 2006.

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Co-Orientador)

---

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho  
(Co-Orientador)

---

Prof. Mauro Mansur Furtado

---

Prof. Célia Lúcia de Luces F. Ferreira

---

Prof. Sebastião Cesar Cardoso Brandão  
(Orientador)

À vovó Cecília, fonte de bondade e carinho.  
À minha mãezinha e ao meu paizinho, meus exemplos de amor, força e desprendimento.  
A Jeferson e Wanderson presentes em todos os momentos como irmãos e amigos.  
A Charles, namorado sempre companheiro e amoroso.  
Ao Professor Brandão, modelo de dedicação e competência.  
Aos que trabalham e se dedicam a uma causa para melhorar o mundo.

## AGRADECIMENTOS

A fonte de energia e amor que me gere.

A minha linda família, pela dedicação, incentivo e amor.

Ao Charles, pela presença marcante, paciência e proteção.

À D. Odete pelo carinho e cuidado.

Ao professor Brandão, pela atenção, estímulo e oportunidade.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pelo apoio em meu desenvolvimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela contribuição financeira.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) pelo auxílio neste projeto.

Aos professores que me enriqueceram com suas experiências. Especialmente Juraci, Antônio, Célia e Mauro presentes neste trabalho.

Aos funcionários do DTA e do Laticínio Escola (FUNARBE) pela ajuda prestada. Em especial a Geralda, Thiago, Maria Helena e José Carlos.

As companheiras de república (Luíza, Lívia, Maike, Cláudia e Veridiana), com as quais pude aprender melhor a arte de compartilhar coisas e sentimentos.

Aos amigos, pelos conselhos, pelas risadas ou pela simples presença. Em especial, Pollyanna, João Tomáz, Amada, Arthur.

Aos companheiros do laboratório, pela intensa e feliz convivência. Por tantas trocas de idéias e de lanchinhos! Aos mais antigos: Sandi, Tarso, Serginho, Marcondes, Márcio; Júnior, Ana Cláudia, Paula, Cláudia; e aos mais recentes: Carmem, Adriana, Juliana, Maurício, Baltazar, Bruno, Giuliano, Patrícia, Adenilson, Guilherme, Giana, Ramon e Eduardo.

Aos meus estagiários Ana Dalva, Daniela, Artur, Aline e Rogéria, pelo interesse, dedicação e amizade. Em especial, a Lílian, que acompanhou ativamente todo o trabalho.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A natureza, que através de sua complexidade nos permite desafiar nossas limitações e alcançar o improvável.

## **BIOGRAFIA**

FABIANA DE OLIVEIRA MARTINS, filha de José de Freitas Martins e Maria das Dores de Oliveira Martins, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, em 17 de julho de 1982.

Em março de 2000, iniciou-se no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em julho de 2004. Ingressou em agosto de 2004 no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nesta mesma Universidade, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2006.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	viii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1

ARTIGO 1:  
AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO  
DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL  
EM QUEIJO MINAS PADRÃO.

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite.....	7
2.2. Processamento do Queijo.....	7
2.3. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo.....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
3.1. Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite.....	9
3.2. Atividade de Fosfatase Alcalina em Queijo.....	10
4. CONCLUSÕES.....	11
5. ABSTRACT.....	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

ARTIGO 2:  
AVALIAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER NA DETERMINAÇÃO  
DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL  
EM QUEIJO MINAS PADRÃO.

RESUMO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1. Processamento do Queijo.....	16
2.2. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4. CONCLUSÕES.....	20
5. ABSTRACT.....	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

ARTIGO 3:  
ADAPTAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA DETECÇÃO DA  
ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS PADRÃO DE  
ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS INTERNACIONAIS.

RESUMO .....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
2.1. Processamento do Queijo.....	25
2.2. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4. CONCLUSÕES .....	29
5. ABSTRACT .....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

ARTIGO 4:  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL  
EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE QUEIJO MINAS PADRÃO.

RESUMO .....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
2.1. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual por meio do Método Fluorimétrico .....	34
2.2. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual por meio do Método Rápido de Scharer Adaptado .....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4. CONCLUSÕES .....	37
5. ABSTRACT .....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
CONCLUSÕES GERAIS.....	39

ANEXOS.....	41
ANEXO A - Higienização de Materiais .....	42
ANEXO B – Preparo de Soluções .....	43
ANEXO C – Processamento do Queijo .....	45
ANEXO D – Análise Físico-Química do Queijo.....	47
ANEXO E – Preparo da Curva de Calibração .....	48
ANEXO F – Resultados do Método Fluorimétrico .....	49
ANEXO G – Resultados do Método Rápido de Scharer .....	52
ANEXO H – Resultados do Método Rápido de Scharer Adaptado.....	61
ANEXO I – Resultados das Análises de Queijos Comerciais .....	71

## LISTA DE FIGURAS

Página

### AValiação DO MÉTODo FLUORIMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS PADRÃO.

1 – Variação da atividade de fosfatase alcalina em leite cru de acordo com as estações do ano em 24 repetições.....	9
2 - Atividade de fosfatase alcalina residual em leite pasteurizado.....	10

#### ANEXOS

C - PROCESSAMENTO DO QUEIJO	
1C – Fluxograma do Processamento de Queijo Minas Padrão.....	46
E - PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	
1E – Fotografia de curva de calibração utilizada no experimento.....	48
G - RESULTADOS DO MÉTODo RÁPIDO DE SCHARER	
1G – Fotografia de análise de queijo Minas Padrão realizada pelo método Rápido de Scharer Visual.....	57
H - RESULTADOS DO MÉTODo RÁPIDO DE SCHARER ADAPTADO	
1H – Fotografia de análise de queijo Minas Padrão realizada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Visual.....	67
H - RESULTADOS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS	
1I - Fotografia de análise de queijo Minas Padrão comercial realizada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Visual.....	76

## LISTA DE QUADROS

Página

### AValiação do Método Fluorimétrico na Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo Minas Padrão.

- 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada por meio do método Fluorimétrico.....10

### AValiação do Método Rápido de Scharer na Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo Minas Padrão.

- 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelo método Fluorimétrico em cinco repetições.....18
- 2 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelo método Rápido de Scharer Visual em cinco repetições.....18
- 3 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico em cinco repetições.....19

### ADAPTAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS PADRÃO DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS INTERNACIONAIS.

- 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada pelo método Fluorimétrico em seis repetições.....27
- 2 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Visual em seis repetições.....27
- 3 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico em seis repetições.....28

### AValiação da Atividade de Fosfatase Residual em Amostras Comerciais de Queijo Minas Padrão.

- 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado Visual e Fluorimétrico em três repetições.....36

## ANEXOS

### F – RESULTADOS DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO

- 1F - Atividade de fosfatase alcalina em leite cru determinada durante a primavera pelo método Fluorimétrico.....49
- 2F - Atividade de fosfatase alcalina em leite cru determinada durante o verão pelo método Fluorimétrico.....49

3F - Atividade de fosfatase alcalina em leite cru determinada durante o outono pelo método Fluorimétrico.....	49
4F - Atividade de fosfatase alcalina em leite cru determinada durante o inverno pelo método Fluorimétrico.....	49
5F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 1, em nove repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
6F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 2, em nove repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
7F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 3, em nove repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
8F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 4 em três repetições determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
9F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 5, em três repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
10F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 6, em três repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
11F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 7, em três repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
12F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 8, em seis repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
13F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 9, em seis repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
14F- Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão correspondente ao tratamento 10, em seis repetições, determinada pelo método Fluorimétrico.....	50
15F- Análise estatística para os 10 tratamentos avaliados pelo método Fluorimétrico.....	51
16F- Análise estatística para os 3 tratamentos avaliados pelo método Fluorimétrico.....	51

## G – RESULTADOS DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER

1G - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 1.....	52
2G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 1.....	52
3G - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 2.....	53
4G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 2.....	53
5G - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 3.....	54
6G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 3.....	54
7G - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 4.....	55
8G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 4.....	55
9G - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 5.....	56

10G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 5.....	56
11G: Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Visual em 5 repetições.....	57
12G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico em 5 repetições.....	58
13G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Fluorimétrico em 5 repetições.....	58
14G - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer e Fluorimétrico 5 repetições.....	58
15G - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 1.....	58
16G - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 2.....	59
17G - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 3.....	59
18G - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 4.....	59
19G - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 5.....	59
20G- Análise estatística para 10 tratamentos avaliados pelo método Rápido de Scharer.....	60
21G- Análise estatística para 3 tratamentos avaliados pelo método Rápido de Scharer.....	60

## H – RESULTADOS DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER ADAPTADO

1H - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.....	61
2H - Atividade de fosfatase alcalina em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 1.....	61
3H - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.....	62
4H - Atividade de fosfatase alcalina em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 2.....	62
5H - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 3.....	63
6H - Atividade de fosfatase alcalina em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 3.....	63
7H - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 4.....	64
8H - Atividade de fosfatase alcalina em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 4.....	64
9H - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 5.....	65
10H - Atividade de fosfatase alcalina em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 5.....	65

11H - Leitura espectrofotométrica de queijo minas padrão analisado por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 6.....	66
12H - Atividade de fosfatase alcalina em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 6.....	66
13H - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual em 6 repetições.....	67
14H - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico em 6 repetições.....	68
15H - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Fluorimétrico em 6 repetições.....	68
16H - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico 6 repetições.....	68
17H - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.....	69
18H - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.....	69
19H - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 3.....	69
20H - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 4.....	69
21H - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 5.....	69
22H - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 6.....	70
23H - Análise estatística para 3 tratamentos avaliados pelo método de Scharer Rápido Adaptado Espectrofotométrico.....	70

## I - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE QUEIJOS COMERCIAIS

1I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Fluorimétrico na repetição 1.....	71
2I - Leitura espectrofotométrica de queijos minas padrão comerciais analisados pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.....	71
3I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.....	71
4I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual na repetição 1.....	72
5I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Fluorimétrico na repetição 2.....	73
6I - Leitura espectrofotométrica de queijos minas padrão comerciais analisados pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.....	73
7I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.....	73
8I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual na repetição 2.....	74
9I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Fluorimétrico na repetição 3.....	75

10I - Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual na repetição 3.....	75
11I - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.....	77
12I - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.....	77
13I - Curva de calibração utilizada na avaliação de queijos minas padrão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 3.....	77

## RESUMO

MARTINS, Fabiana de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2006. **Adaptação do método rápido de Scharer para detecção da atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão de acordo com as exigências internacionais.** Orientador: Sebastião Cesar Cardoso Brandão. Co-Orientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Juraci Alves de Oliveira.

Nos Estados Unidos, desde 2003, a Food and Drug Administration (FDA) estabelece 350 mU/L como limite máximo da atividade de fosfatase alcalina (ALP) residual para produtos lácteos. Na Europa, o Comitê responsável pela segurança de leite e derivados, que já adotou este limite para leite, estuda a adoção para outros produtos lácteos. Já a Legislação Brasileira determina que, exclusivamente, o produto leite deve ser submetido a tratamento térmico que garanta a ALP negativa, não estabelecendo um limite quantitativo. Este estudo avaliou a sensibilidade e a linearidade de resposta dos métodos fluorimétrico e Scharer Rápido na determinação da atividade de ALP residual em queijo Minas Padrão. Adaptou-se uma metodologia analítica para detecção de atividade de ALP residual em queijo Minas Padrão, com sensibilidade na atividade de 350 mU/Kg correspondente ao método fluorimétrico, porém com custo inferior. Realizou-se uma pesquisa da atividade de ALP residual em amostras comerciais deste tipo de queijo. O método fluorimétrico apresentou-se adequado na determinação de atividade da ALP residual em queijo Minas Padrão de acordo com o limite estabelecido pela FDA. Já o método de Scharer Rápido detectou como positivas amostras com concentrações de leite cru adicionado ao leite pasteurizado superiores a 0,5% (atividade correspondente a  $8.849 \pm 797$  mU/Kg e 2 µg de fenol/g de queijo). A metodologia adaptada apresentou excelente correlação com o método fluorimétrico em atividade próxima a 350 mU/Kg (correspondente a 0,010 % de adição de leite cru adicionado ao leite pasteurizado usado para fabricar o queijo). Quanto à pesquisa da atividade de ALP residual em amostras comerciais, verificou-se, através do método fluorimétrico, que 81,25 % das amostras investigadas possuíam atividades superiores a 350 mU/Kg. A metodologia adaptada constatou resultado igual ao do método fluorimétrico. Desse modo, para avaliar a eficiência da pasteurização do leite destinado à fabricação de queijo Minas Padrão, não é recomendável o uso do Método de Scharer Rápido. O método fluorimétrico é adequado para tal finalidade, sendo sugerida a sua oficialização no Brasil. Já a metodologia adaptada surge como uma alternativa eficiente e de custo acessível para determinação da atividade de ALP residual em queijo Minas Padrão, de acordo com o nível de exigência da FDA. Sugere-se, ainda, que no Brasil seja adotado um critério quantitativo referente à atividade de ALP residual em queijos.

## ABSTRACT

MARTINS, Fabiana de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november of 2006. **Adaptation of the Rapid Scharer's Method for Detection of Alkaline Phosphatase in Minas Padrão Cheese in agreement with the International Demands.** Advisor: Sebastião Cesar Cardoso Brandão. Co-Advisors: Antônio Fernandes de Carvalho and Juraci Alves de Oliveira.

In 2003, in the United States, the Food and Drug Administration established as legal limit the activity of 350 mU/Kg for milk products, and European legislations that adopted this limit for milk, study the change for other milk products. This research evaluated the sensibility and the linearity response of the fluorimetric and Rapid Scharer's methods in the determination of the of residual alkaline phosphatase (ALP) activity in Minas Padrão cheese. Another purpose was to develop an analytic methodology (Adapted Rapid Scharer's method) for detection of residual ALP activity in Minas Padrão cheese with sensibility corresponding of the fluorimetric method in the activity of 350 mU/Kg, however with smaller cost. Was appraised the residual ALP activity in commercial samples of this cheese type, verifying the acting of Adapted Rapid Scharer's method. The fluorimetric method presented appropriate in the determination of residual ALP activity in Minas Padrão cheese in agreement with the FDA limit. The same cannot be said for the Rapid Scharer's method, that detected as positive only samples with concentrations of raw milk added to the milk pasteurized larger to 0,5 % (activity corresponding to  $8.849 \pm 797$  mU/Kg and 2  $\mu$ g of cheese fenol/g). The Adapted Rapid Scharer's method presented excellent correlation with the fluorimetric method in the strip of activity of 350 mU/Kg, and samples with approximate activity of 350 mU/Kg (corresponding to 0,010 %) were detected as positive. In commercial Minas Padrão cheese, was verified, by the fluorimetric method, that 81,25 % of the samples had larger activities to 350 mU/Kg. The same result was obtained by the Adapted Rapid Scharer's. Therefore, to evaluate the efficiency of the pasteurization of the milk destined to the production of Minas Padrão cheese isn't advisable the use of the Rapid Scharer's Method. The fluorimetric method is appropriate and is suggested your legalization in Brazil. The Adapted Rapid Scharer's appears as efficient alternative, of accessible cost, for determination of residual ALP activity in Minas Padrão cheese, in agreement with the level of international demand established for FDA. It's suggested that the quantitative criterion be adopted in Brazil.

## INTRODUÇÃO GERAL

O leite é um alimento completo para a nutrição dos mamíferos e uma fonte transmissora em potencial a homens e animais consumidores, de microrganismos patogênicos tais como *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetti*, *Escherichia coli* O157:H, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*, entre outros.

Métodos de avaliação da qualidade do leite, como contagem de bactérias em placas e detecção de microrganismos patogênicos, são limitados pela demora na resposta do teste. Assim, o desenvolvimento de um teste com resultados mais rápidos despertou os pesquisadores para os ensaios de detecção da fosfatase alcalina.

A fosfatase alcalina é uma enzima encontrada naturalmente no leite cru. Sua atividade enzimática é utilizada para verificar a eficiência de pasteurização, pois a resistência térmica desta enzima é ligeiramente superior à de microrganismos patogênicos não formadores de esporos mais resistentes. Desse modo, quando se utiliza tratamentos térmicos iguais ou superiores a 62,8 °C por 30 minutos ou 71,8 °C por 15 segundos há enorme redução na atividade da fosfatase alcalina e no número de microrganismos patogênicos.

Desse modo, a pesquisa desta enzima tem significado de destaque na segurança dos produtos lácteos porque indica se os mesmos foram adequadamente pasteurizados e não contaminados com leite cru sendo, portanto, adequados para o consumo humano.

A partir de 1933 foram elaborados diversos métodos para determinação de atividade de fosfatase alcalina. Dentre eles pode-se citar “Kay e Graham”, “Scharer”, “Cornell”, “Aschaffenburg & Müllen” e “Rutger”. Eles baseiam-se na exposição da enzima a substratos específicos, sob condições controladas, com produção de compostos detectáveis pelo desenvolvimento de cor. No entanto, são pouco precisos impossibilitando a detecção de pequenas quantidades de leite cru misturado ao leite pasteurizado.

Já durante os anos 90, os métodos fluorimétrico e quimioluminescente (Fluorophos® e PasLite®, respectivamente) surgiram com sensibilidade melhorada. Ambos 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. No entanto a utilização desses métodos tem sido restringida pelos altos preços de equipamentos e reagentes.

No tocante à exigência legal, legislações em diversos países vem passando por modificações, acompanhando as cobranças por segurança alimentar e melhoria da sensibilidade das técnicas.

A partir de 2003, nos Estados Unidos, a FDA estabeleceu a diminuição do limite máximo de aceitação da atividade de ALP residual em produtos lácteos de 500 miliunidades por litro para 350 miliunidades por litro (PMO, 2004). Ela oficializou os métodos Fluorophos® e PasLite®. Ainda neste período, o Comitê Europeu responsável pelas análises segurança dos produtos lácteos passou a adotar para leite pasteurizado o este mesmo limite (EU Community, 2003).

Em relação a queijos, a legislação brasileira exige que aqueles não maturados por períodos superiores a 60 dias, sejam elaborados a partir de leite pasteurizado. O método atualmente recomendado para avaliar a condição da pasteurização é o Scharer Visual Adaptado, que além de ser exclusivamente aplicado para leite fluido, possui limite de detecção insatisfatório.

São claras as preocupações mundiais com a utilização de técnicas eficientes na determinação da adequada condição de pasteurização do leite. Está evidente também, que existe necessidade da Legislação Brasileira adotar critério quantitativo e metodologia com melhor sensibilidade. Embora já existam métodos internacionalmente reconhecidos, estes possuem custos elevados para a realidade do Brasil.

Outro fato a destacar é a importância econômica da produção de queijo. Este produto além de possuir enorme comercialização interna, vem alcançando o mercado externo o qual tem requerido melhores critérios na avaliação de sua qualidade e segurança.

Diante do exposto, constatou-se a necessidade de se desenvolver uma metodologia, viável técnica-economicamente, para determinar a atividade de ALP residual em queijo atendendo aos limites das legislações internacionais.

Portanto, este trabalho visou a adaptação do método Rápido de Scharer para detectar, com sensibilidade adequada, a atividade de ALP residual correspondente a 350 mU/Kg, como determinado pelo método Fluorophos®, porém com custo inferior.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BALLARIN, O. Notas sobre a Bioquímica do Leite. Rio de Janeiro, 1947. 151p.

BRASIL. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. Dispõe sobre os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996. Disponível em

<<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1218>> Acesso em: 01 de nov. de 2005.

BRASIL. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Dispõe sobre os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, DF, 2003. Disponível em

<<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/Imagem?codArquivo=1802>> Acesso em 01 de nov. de 2005.

CASTRO, P.R.S. Modificação do Método de Scharer para Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite. 35p. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2005.

CASTRO, P.R.S.; RIGUEIRA, J.C.S.; BRANDÃO, S.C.C. Avaliação do Método de Scharer Modificado Visual e Espectrofotométrico e do Método Oficial Brasileiro na Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Leite. Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios, vol.60, jul/ago, nº345, 136-139p, 2005.

EARLY, R. Technology of Dairy Products. Thompson Science Published by Blackie Academic & Professional, an imprint of Thompson Science, London, 446p, 1998.

ECKLES, C.H.; COMBS, W.B.; MACY, H. Milk and Milk Products. Fourth Edition. McGraw-Hill Book Company, Inc, USA, 454p, 1957.

EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR MILK AND MILK PRODUCTS. List of Reference Methods for the Official Control of Milk & Milk Products in the Frame of the Directive 92/46 Modified. Version 3 (modified at the 6<sup>th</sup> Workshop of 3-4 July 2003).

HARRIS, A.A.; CHERUBIN, C.; BIEK, R.; EDWARDS, L.C. Frequency of *Salmonella typhimurium* the Year After a Massive Outbreak. 1990. Disponível em [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=2184983&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2184983&dopt=Abstract)>. Acesso em 08 de set. de 2006.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in Non-Pasteurized Milk on Retail Sale in Brazil: Prevalence of *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* and Chemical Residues. Brazilian Journal of Microbiology, vol. 35, n.3, 211-215p., 2004.

PAINTER, C.J. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time/Temperature Treatments. 113s. Thesis (Master of Science in Food Chemistry)- University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, 1995.

PMO – Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. Revision (2003 Revision). U.S. Food and Drug Administration. CFSAN/Office of Compliance March 2, 2004. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ear/pmo03-2.html>> Acesso em 28 de nov. de 2005.

ROCCO, R.M. In: In:MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 17<sup>th</sup> edition. Washington, p.341-362. 2004.

RYAN,C.A.; NICKELS,M.K.; HARGRETT-BEAN,N.T.; POTTER,M.E.; ENDO,T.; MAYER,L.; LANGKOP,C.W.; GIBSON,C.; MCDONALD,R.; KENNEY,R.T.; PUHR,N.D.; MSDONNELL,P.J.; MARTIN,R.J.; COHEN,M.L.; BLAKE,P.A. Massive Outbreak of Antimicrobial-Resistant Salmonellosis traced to Pasteurized Milk. JAMA, vol 258, n°22, december, 1987.

SOARES, C.F. Avaliação de Métodos Colorimétricos Qualitativos e Quantitativos para a Determinação de Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite e Queijo Minas Padrão. 45p. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2003.

USER’S manual FLM5 - The Advanced<sup>TM</sup> Fluorometer – Test System Model FLM 200. Massachussets: Advanced Instruments, Inc., 1992. 431s.

ZIOBRO, C. G. Screening Method for Phosphatase (residual) in Cheese. Bacteriological Analytical Manual online. Chapter 27. U.S. Food & Drug Administration. 2001.

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO DA  
ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL  
EM QUEIJO MINAS PADRÃO.**

**ASSESSMENT OF THE FLUORIMETRIC METHOD ON THE DETERMINATION  
OF RESIDUAL ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY  
IN MINAS PADRÃO CHEESE.**

Fabiana de Oliveira Martins  
Sebastião Cesar Cardoso Brandão.

**RESUMO**

O propósito deste trabalho foi avaliar a sensibilidade e a linearidade de resposta do método fluorimétrico (Fluorophos®) na determinação da atividade de fosfatase alcalina (ALP) residual em queijo Minas Padrão. Leite cru foi submetido às etapas de pasteurização lenta, resfriamento e adição de leite cru em 10 diferentes concentrações. Em seguida, queijos elaborados a partir destes leites “contaminados” foram analisados quanto à atividade da ALP. Verificou-se que o limite de 350 mU/Kg correspondeu à adição de 0,010 % a 0,015 % de leite cru ao leite pasteurizado e, que a atividade média de queijo produzido a partir de leite pasteurizado (118 mU/Kg) foi significativamente inferior a este limite. Os resultados revelaram associação linear entre a porcentagem de leite cru adicionada e a atividade da ALP residual ( $r=0,998$ ). O método fluorimétrico apresentou ótima sensibilidade no limite de 350 mU/Kg, sendo excelente na determinação da atividade da ALP residual em queijo Minas Padrão. Com isso, é recomendável a adoção do limite 350 mU/Kg para a atividade da ALP residual em queijo Minas Padrão e a oficialização do método fluorimétrico no Brasil.

**Palavras-Chave:** Fosfatase alcalina, Pasteurização, Queijo, Fluorimetria.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos aspectos mais relevantes para garantir a segurança alimentar dos consumidores é o estabelecimento e o aprimoramento de legislações para diversos tipos de alimentos. Em se tratando de produtos lácteos, uma das necessidades observadas foi a alteração do limite de exigência para a atividade da fosfatase alcalina (ALP) residual que era de 500 mU/L para 350 mU/L pelo método fluorimétrico. Em consequência disto, os métodos tradicionalmente utilizados tornaram-se inadequados, resultando em estímulo à criação de novos métodos com sensibilidade ajustada aos novos padrões.

Assim, a partir de 2003 o método fluorimétrico (Fluorophos®) passou a ser reconhecido como oficial por órgãos como FDA (Food and Drug Administration), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), ISO (International Organization for Standardization), IDF (International Dairy Federation) e EU Community (Europe Community).

O Fluorophos®, patenteado pela Advanced Instruments Inc., é constituído por fluorímetro e acessórios específicos para produtos lácteos. O princípio da técnica é baseado na reação de hidrólise (catalisada pela ALP) de um substrato (monoéster ortofosfórico aromático) não-fluorescente a um produto altamente fluorescente (fluoroyellow). A taxa de formação do fluoroyellow é monitorada durante 3 minutos pelo aparelho, que converte o resultado em miliunidades por litro ou quilograma de produto. Por serem pequenas as quantidades de enzimas presentes em produtos lácteos pasteurizados, adota-se a expressão dos resultados em termos de miliunidades, que significa a quantidade de enzima necessária para catalisar a reação de hidrólise de 1  $\mu$ mol do substrato fluoroyellow em um minuto, por litro ou quilograma de amostra.

O método é descrito como capaz de detectar concentrações tão pequenas quanto 0,006 % de leite cru adicionado ao leite pasteurizado, o que equivale a 10 mU/L. Isto o torna muito atrativo, já que métodos anteriormente utilizados detectam apenas 0,1 % de leite cru adicionado ao leite pasteurizado, ou seja, 500 mU/L. O método Oficial Brasileiro se mostra em condição ainda mais desfavorável por apresentar limite de detecção superior a 0,8% de leite cru adicionado ao leite pasteurizado.

Visto que muitas pesquisas estudaram o desempenho do método fluorimétrico na determinação da atividade da ALP residual em diversos produtos lácteos, este trabalho se propôs a avaliar a sensibilidade e a linearidade de resposta do método fluorimétrico na determinação da atividade da ALP residual em queijo Minas Padrão.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite**

Amostras de leite cru padronizado (3,0 a 3,5 % de gordura) foram coletadas em diferentes épocas do ano, totalizando 24 amostras, sendo 4 da primavera, 8 do verão, 4 do outono e 8 do inverno.

Parte de cada amostra de leite cru foi reservada para a avaliação da atividade de fosfatase alcalina na condição cru e, outra parte foi destinada ao processo de pasteurização ( $64 \pm 1$  °C por 30 minutos) para posteriormente ser avaliada. As amostras cruas e pasteurizadas foram submetidas à análise da atividade de fosfatase alcalina pelo método fluorimétrico (Fluorophos® Modelo FLM 200 e seus acessórios).

Alíquota de 75 µL da amostra de leite (cru ou pasteurizado) foi adicionada a uma cubeta contendo 2,0 mL de substrato previamente estabilizado em bloco de incubação a 38 °C por 20 minutos. Após a homogeneização da amostra por meio de agitação manual, mediu-se a taxa de fluorescência e determinou-se a atividade da enzima em miliunidades por litro (mU/L). Os comprimentos de onda de excitação e emissão no aparelho eram 430 nm e 560 nm, respectivamente (ROCCO, 2004).

### **2.2. Processamento do Queijo**

Amostras de leite cru padronizado (3,0 a 3,5 % de gordura) submetidas ao processo de pasteurização ( $64 \pm 1$  °C por 30 minutos), após o resfriamento, foram adicionadas de leite cru em dez concentrações: 0,000 %, 0,010 %, 0,015 %, 0,020 %, 0,050 %, 0,080 %, 0,100 %, 0,500 %, 0,800 % e 1,000 %.

A elaboração dos queijos Minas Padrão a partir dos leites “contaminados” seguiu procedimento adaptado de Soares (2003). Neste procedimento, as etapas de salga na massa, prensagem manual e embalagem em papel alumínio substituíram as etapas de salga em salmoura, prensagem mecânica e embalagem a vácuo.

O número de repetições realizadas foram as seguintes: nove para os tratamentos 1, 2 e 3; três para os tratamentos 4, 5, 6 e 7; e seis para os tratamentos 8, 9 e 10.

### **2.3. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo**

As amostras de queijo foram analisadas quanto à atividade da ALP residual por meio do método fluorimétrico.

Foi utilizado o mesmo aparelho referido para análise de leite, mudando-se a opção de produto no menu opções e efetuando-se a calibração adequada.

Em tubo de ensaio adicionou-se 0,5 g do queijo e 5,0 mL de tampão substrato pH 8,0 (Advanced Instruments Inc.), seguido de maceração com bastão de vidro e, centrifugação a 2000 g por 10 minutos. Ao substrato contido na cubeta, previamente aquecida a 38 °C, foram adicionados 75µL da amostra. Esta cubeta foi agitada manualmente e colocada no compartimento do aparelho para a realização do teste. O aparelho mediu automaticamente a taxa de fluorescência e emitiu a atividade em miliunidades por quilograma (mU/Kg). O valor de atividade emitido foi multiplicado pelo fator 10, devido à diluição da amostra no substrato (Rocco, 2004).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão usando procedimento do Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1999), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa (UFV) em 2006. O estudo do efeito da adição de leite cru ao leite pasteurizado na atividade da ALP residual em queijo Minas Padrão realizou-se por meio de regressão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite

Para o estudo da atividade de ALP em leite cru, na Figura 1 encontram-se os resultados obtidos para 24 amostras de leite cru avaliadas. Os valores apresentados no gráfico representam as médias e desvios-padrão obtidos em cada estação do ano.

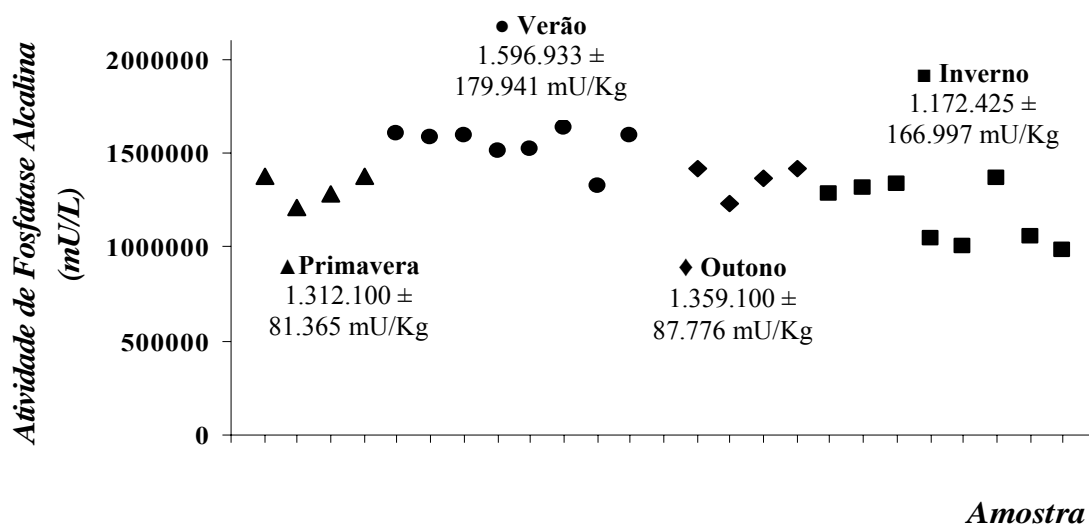


Figura 1 – Variação da atividade de fosfatase alcalina em leite cru, de acordo com as estações do ano, em 24 repetições.

Por meio do teste Duncan, a 5% de probabilidade, as médias de atividade das estações do ano foram comparadas. Verificou-se maior média de atividade (1.596.933 mU/L) no verão comparada as outras estações (Quadro 1). Estudo realizado por Castro (2005) também verificou a influência das variações sazonais na atividade da fosfatase alcalina em leite cru. A referida autora constatou níveis de atividade de 516.800 mU/L na primavera e 1.519.800 mU/L no verão.

Os desvios-padrão encontrados para leite cru são explicados pelas variações normais de concentração da enzima. Murthy et al. (1992) destacam que a atividade de fosfatase alcalina em leite de vaca varia de acordo com fatores como raça, período de lactação, volume de leite produzido e estação do ano.

Já em relação à análise de atividade da ALP residual nas 24 amostras de leite pasteurizado observou-se valores variando de 10 mU/L a 63 mU/L (Figura 2).

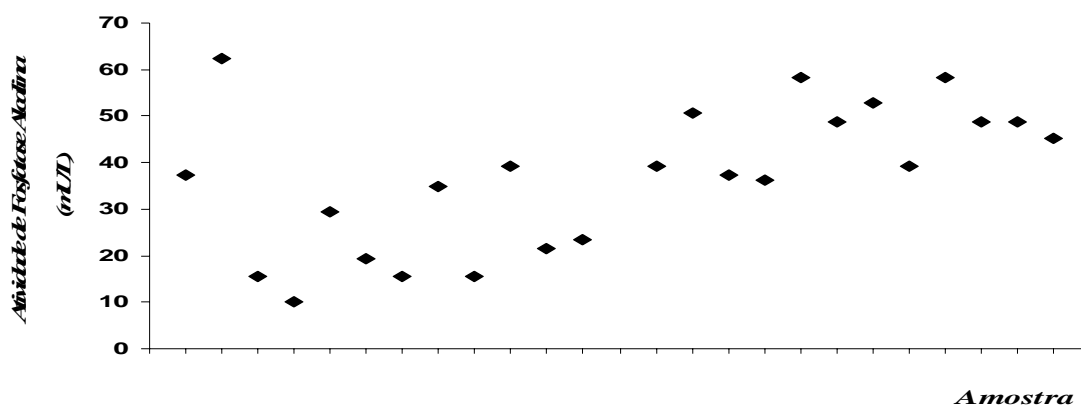


Figura 2 – Atividade de fosfatase alcalina residual em leite pasteurizado nas 24 repetições.

As variações observadas podem ser explicadas por pequenas oscilações na temperatura de pasteurização. O estudo de Painter (1995) comprova que oscilações nas condições de pasteurização influenciam a atividade da ALP residual. Especificamente para leite com 2 % de gordura submetido à pasteurização lenta, o autor fixou o tempo 30 minutos e aplicou as temperaturas de 63 e 64 °C, observando atividade residual de  $66,4 \pm 5,9$  mU/L e  $30,2 \pm 0,6$  mU/L, respectivamente.

No entanto, vale ressaltar que embora haja pequenas variações nos valores estes são, significativamente, inferiores a 350 mU/L, que é o limite atualmente adotado pelas legislações internacionais (PMO, 2004; EUCommunity, 2003).

### 3.2. Atividade de Fosfatase Alcalina em Queijo Minas Padrão

A partir de janeiro de 2005 a FDA estabeleceu um limite máximo de atividade de ALP residual de 350 mU/Kg para os produtos lácteos sólidos, incluindo-se, portanto, os queijos elaborados a partir de leite pasteurizado.

No Quadro 1, encontram-se as médias e os desvios-padrão da atividade da ALP residual em queijos produzidos a partir de leite pasteurizado adicionado de diferentes concentrações de leite cru.

Quadro 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijos Minas Padrão.

Tratamento	% Leite Cru	Atividade de Fosfatase Alcalina Residual	
		Média (mU/L)	Desvio-Padrão
1	0,000	118	15
2*	0,010	336	27
3*	0,015	389	38
4	0,020	460	58
5	0,050	974	168
6	0,080	1.584	412
7	0,100	1.841	371
8	0,500	8.184	965
9	0,800	15.704	3.074
10	1,000	18.346	2.093

\* tratamentos com atividades na faixa de interesse (350 mU/Kg).

O limite de 350 mU/Kg correspondeu à adição de 0,010 % a 0,015 % de leite cru em leite pasteurizado (tratamentos 2 e 3). O queijo elaborado com leite corretamente pasteurizado e com ausência de contaminações por leite cru apresentou média de atividade da ALP residual (118 mU/Kg) bastante inferior ao atual limite máximo estabelecido pela FDA.

Na avaliação da linearidade de resposta e da sensibilidade do método fluorimétrico, verificou-se excelente coeficiente de correlação ( $r=0,998$ ), o que evidenciou positiva associação linear entre porcentagem de leite cru adicionada ao leite pasteurizado e atividade da ALP residual. A equação  $\hat{y}=18.461x+49$ , com coeficiente de determinação  $R^2=0,9284$ , representou a relação entre essas variáveis e mostrou que o modelo linear explica adequadamente as variações de porcentagem de leite cru na atividade da ALP residual.

A correlação entre porcentagem de leite cru adicionado ao leite pasteurizado e atividade de ALP residual também foi analisada, especificamente, na faixa de atividade de interesse (para os tratamentos 1, 2 e 3 que correspondiam aos queijos pasteurizado e aqueles com atividade residual próxima a 350 mU/Kg). O método fluorimétrico apresentou ótima linearidade de resposta e sensibilidade para este limite. Obteve-se excelente coeficiente de correlação ( $r=0,989$ ) e, a equação para este estudo foi  $\hat{y}=18.584x+126$ , com  $R^2=0,979$ .

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo da relação entre as variações sazonais brasileiras e a atividade de ALP em leite cru evidenciou uma tendência ao aumento da atividade enzimática no verão (1.596.933 mU/L) comparado ao inverno (1.172.425 mU/L).

As médias de atividades em leite pasteurizado (36 mU/L) e em queijo Minas Padrão produzido a partir de leite pasteurizado (118 mU/Kg) foram significativamente inferiores aos limites de 350 mU/L e 350 mU/Kg.

A atividade próxima a 350 mU/Kg correspondeu à adição de 0,010 % a 0,015 % de leite cru adicionado ao leite pasteurizado utilizado na produção de queijo Minas Padrão.

O método fluorimétrico apresentou linearidade de resposta e sensibilidade adequada na determinação da atividade da ALP residual em queijo Minas Padrão, inclusive para resultados em torno do limite máximo (350 mU/Kg).

Observou-se linearidade de resposta, pois os ajustes dos modelos lineares foram excelentes e representados pelos elevados coeficientes de determinação ( $R^2=0,9669$  para o estudo de todos os tratamentos e  $R^2=0,9284$  para o estudo dos tratamentos 1, 2 e 3). Correlação positiva entre porcentagem de leite cru adicionado ao leite pasteurizado e a atividade enzimática residual em queijo Minas Padrão ( $r=0,998$ ) foi constatada. Avaliando-se, exclusivamente, esta correlação em atividades próximas a 350 mU/Kg, verificou-se que a mesma manteve-se significativa ( $r=0,989$ ). A precisa detecção de atividades tão baixas quanto 10 mU/Kg confirma a elevada sensibilidade do método fluorimétrico.

Vale ressaltar ainda, que o Fluorophos® possibilitou a obtenção de resultados com rapidez e facilidade nos procedimentos.

Sugere-se que, no Brasil, seja adotado um critério quantitativo referente à atividade da ALP residual em queijo Minas Padrão e, que seja oficializado o método fluorimétrico.

## 5. ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the sensibility and the linearity response of the fluorimetric method (Fluorophos®) in the determination of residual alkaline phosphatase (ALP) activity in Minas Padrão cheese. Fresh milk was submitted to the stages of LTLT pasteurization, cooling and addition of raw milk in 10 different concentrations (0,000 %, 0,010 %, 0,015 %, 0,020 %, 0,050 %, 0,080 %, 0,100 %, 0,500 %, 0,800 % e 1,000 %). That milk was used in the elaboration of cheeses, and those cheeses were analyzed to determine residual ALP activity. By Fluorophos® was verified that the limit of 350 mU/Kg corresponded to the addition of 0,010 % to 0,015 % of raw milk added to the pasteurized milk and, that the average activity of pasteurized cheese (118 mU/Kg) was smaller than this limit. The results revealed linear association among the percentage of raw milk added and residual ALP activity ( $r=0,998$ ). Therefore, is recommended the adoption of the quantitative criterion of 350 mU/Kg for residual ALP activity for cheese and of the fluorimetric method as official by the brazilian government.

**Word-key:** Alkaline Phosphatase, Pasteurization, Cheese, Fluorimetry.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, P.R.S; BRANDÃO, S.C.C. Modificação do Método de Scharer para Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite. 35p. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2005.

CORNELL UNIVERSITY – COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES. Alkaline Phosphatase Testing for Milk Pasteurization. Dairy Science Facts. Department of Food Science, Stocking Hall, Itaca, NY, 1998.

EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR MILK AND MILK PRODUCTS. List of Reference Methods for the Official Control of Milk & Milk Products in the Frame of the Directive 92/46 Modified. Version 3 (modified at the 6<sup>th</sup> Workshop of 3-4 July 2003).

MURTHY, G.K; KLEYN, D.H; RICHARDSON, T; ROCCO, R.M. In:MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 16<sup>th</sup> edition. Washington, p.413-430. 1992.

PAINTER, C.J. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time/Temperature Treatments. 113f. Thesis (Master of Science in Food Chemistry)- University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, 1995.

PAINTER, C.J.; BRADLEY, JR. R.L. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time-Temperature Treatments. Journal of Food Protection. 60, n°5, 525-530. 1997.

PMO – Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. Revision (2003 Revision). U.S. Food and Drug Administration. CFSAN/Office of Compliance March 2, 2004. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ear/pmo03-2.html>> Acesso em 28 de nov. de 2005.

ROCCO, R. M. Fluorimetric Analysis of Alkaline Phosphatase in Dairy Products. Journal of Food Protection. 53, n°7, 588-591. 1990.

ROCCO,R.M. In: In:MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 17<sup>th</sup> edition. Washington, p.341-362. 2004.

SOARES, C. F. Avaliação de Métodos Colorimétricos Qualitativos e Quantitativos para a Determinação de Atividades de Fosfatase Alcalina em Leite e Queijo Minas Padrão. 45p. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2003.

USER’S manual FLM5 - The Advanced<sup>TM</sup> Fluorometer – Test System Model FLM 200. Massachussets: Advanced Instruments, Inc., 1992. 431s.

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER NA DETERMINAÇÃO  
DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL  
EM QUEIJO MINAS PADRÃO.**

ASSESSMENT OF THE RAPID SCHARER METHOD ON THE DETERMINATION  
OF RESIDUAL ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY  
IN MINAS PADRÃO CHEESE.

Fabiana de Oliveira Martins  
Sebastião Cesar Cardoso Brandão

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a adequação do método Rápido de Scharer (visual e espectrofotométrico), aos atuais níveis de exigência internacionais, na determinação da atividade de fosfatase alcalina (ALP) residual em queijo Minas Padrão. Para tanto, leite cru foi submetido às etapas de pasteurização lenta, resfriamento e adição de leite cru em 6 diferentes concentrações. Em seguida, queijos elaborados a partir destes leites “contaminados”, em cinco repetições, foram analisados pelos métodos Rápido de Scharer e Fluorophos®. O limite de detecção do método visual foi de 0,5 % ( $8.849 \pm 797$  mU/Kg) sendo esta concentração também a mínima detectada com precisão pelo método espectrofotométrico (correspondendo a  $2,283 \pm 0,652$  µg fenol/g de queijo). As amostras com atividade na faixa de interesse de 350 mU/Kg (limite da Food and Drug Administration) não foram diferenciadas do controle, sendo detectadas como negativas pelos métodos visual e espectrofotométrico. Portanto, o método Rápido de Scharer produziu resultados falso-negativos, o que o torna ineficiente na detecção da atividade de ALP residual. Quanto à avaliação da linearidade de resposta, os resultados revelaram perda de sensibilidade do método a medida em que foi diminuída a quantidade de leite cru adicionada, principalmente em atividade na faixa de interesse. Ainda, estudando a correlação entre os métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e o Fluorophos®, observou-se que em atividade próxima a 350 mU/Kg, houve uma queda de sensibilidade do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico, o que pode ser comprovada pela análise de regressão linear. Portanto, o método Rápido de Scharer (visual e espectrofotométrico) mostrou-se com sensibilidade inadequada para detectar a atividade ALP residual correspondente a 350 mU/Kg. Assim, não é recomendável seu uso para avaliar a condição de pasteurização em queijo Minas Padrão.

**Palavras-chave:** Fosfatase Alcalina, Método Rápido de Scharer, Queijo.

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) é usada para determinar se os queijos foram fabricados a partir de leite pasteurizado. Isto porque esta enzima, presente naturalmente no leite cru, requer condições para inativação muito semelhantes às aquelas necessárias para eliminar os microrganismos patogênicos no leite.

Dentre os diversos métodos utilizados mundialmente para detecção da atividade de ALP, pode-se citar o Método Rápido de Scharer por ter sido amplamente aplicado em diversos países como metodologia oficialmente reconhecida.

O substrato fenilfosfato dissódico é hidrolisado pela ALP ocorrendo à produção de fenol, o qual reage com 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida e forma um complexo azul (indofenol). Este complexo é extraído com álcool n-butílico e pode ser detectado visualmente ou espectrofotometricamente a 650 nm.

A análise visual envolve a comparação da amostra com padrões contendo concentrações de fenol conhecidas. Já a análise espectrofotométrica, permite a análise quantitativa, pois a concentração de fenol na amostra pode ser calculada através de equação obtida de regressão linear entre concentração de fenol e absorvância dos padrões. A relação entre formação do complexo e quantidade da enzima é diretamente proporcional. Em termos de sensibilidade, a literatura descreve que o método é capaz de detectar em leite pasteurizado, concentrações superiores a 0,1 % de leite cru ou 1 micrograma de fenol por mililitro de leite.

No que se refere à legislação, os critérios de aceitação para atividade de ALP vem mudando em diversos países. O limite pelo método fluorimétrico, que era de 500 mU/Kg, foi diminuído para 350 mU/Kg pela Food and Drug Administration (FDA). Em consequência disso, inúmeros métodos tornaram-se inadequados aos novos limites.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a adequação do método Rápido de Scharer (visual e espectrofotométrico), aos atuais níveis de exigência internacionais, na determinação da atividade de fosfatase alcalina (ALP) residual em queijo Minas Padrão. Para tanto, avaliou-se a sensibilidade e a linearidade de resposta em comparação com o método fluorimétrico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Processamento do Queijo**

Amostras de leite cru padronizado (3,0 a 3,5 % de gordura) submetidas ao processo de pasteurização ( $63 \pm 2$  °C por 30 minutos), após resfriamento foram adicionadas de leite cru nas concentrações 0,000 %, 0,010 %, 0,015 %, 0,500 %, 0,800 % e 1,000 %.

A elaboração dos queijos Minas Padrão a partir dos leites “contaminados”, em 5 repetições, seguiu procedimento adaptado de Soares (2003). Neste procedimento, as etapas de salga na massa, prensagem manual e embalagem em papel alumínio substituíram as etapas de salga em salmoura, prensagem mecânica e embalagem a vácuo.

### **2.2 Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo**

Avaliou-se, em cinco repetições, a atividade de ALP residual em queijo através dos métodos Rápido de Scharer oficial e Fluorimétrico (ROCCO, 2004).

No método fluorimétrico, as amostras, em replicata de cada tratamento, foram analisadas em aparelho Fluorophos® Modelo FLM200 (Advanced Instruments Inc.).

No método Rápido de Scharer, pesou-se 5g de amostra em tubo de centrifuga e adicionou-se 2,0 mL de tampão carbonato-bicarbonato 0,40 %, pH 9,8, seguida de maceração, diluição em 18,0 mL de álcool n-butílico 8,3 % e filtração. Do filtrado retirou-se alíquota de 0,5 mL e transferiu-se para tubo de ensaio, seguida da adição de 5,0 mL de tampão substrato fenilfosfato dissódico 0,1 % e 0,1 mL de solução de acetato de magnésio (1 mg Mg/0,1 mL). O tubo, após a agitação, foi incubado a 40 °C por 15 minutos. Decorrido o período de incubação, acrescentou-se 0,1 mL de solução de sulfato de cobre (200 mg/100 mL) e 0,1 mL de solução de 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida –CQC (30 mg/10 mL). A amostra homogeneizada foi novamente incubada a 40 °C por 5 minutos e, em seqüência, transferida para banho de gelo, até atingir 10 °C, para ser adicionada de 3,0 mL de álcool n-butílico 99,4 % neutralizado. Para a extração de indofenol, realizou-se nos tubos, 4 inversões em meio círculo com intervalos de 1 segundo para inverter, pausar e retomar à posição inicial. Após pausa de 2 minutos, o mesmo procedimento de inversão foi realizado. Fez-se também controle negativo, aquecendo-se a amostra de queijo a 95 °C por 1 min, antes da análise.

A curva de calibração foi elaborada a partir de soluções contendo fenol e, os tubos possuíam as concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de equivalente fenol por 5mL de solução. O procedimento para a curva envolvia as etapas posteriores à adição de CQC e sulfato de cobre aplicadas na análise da amostra. Para a extração de indofenol, realizou-se nos tubos, 6 inversões em círculo inteiro com intervalos de 1 segundo para inverter, pausar e retomar à posição inicial.

A interpretação do resultado pelo método visual fez-se observando as colorações das camadas alcoólicas dos tubos controle negativo e da amostra.

Para a análise espectrofotométrica, transferiu-se a camada de álcool para uma cubeta e determinou-se a absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo Mini-1240 UV-Visível), a 650 nm. Os valores de absorvância e as concentrações dos padrões foram submetidos a uma análise de regressão linear, obtendo-se a equação de reta. Para calcular as concentrações de fenol nas amostras, as absorvâncias determinadas eram diminuídas da absorvância do referencial (controle negativo) e, estes valores eram substituídos na equação obtida através da curva de calibração. O valor de concentração encontrado era multiplicado pelo fator 8 para expressar o resultado em µg de fenol por grama de amostra.

As análises foram realizadas em três porções de cada queijo e em três volumes de filtrado de cada porção de queijo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão usando procedimentos do Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1999), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa em 2006. Foi avaliado o efeito da concentração de leite cru adicionado ao leite pasteurizado na concentração de fenol no queijo através de regressão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1, encontram-se os valores de atividade de ALP residual determinados através do Fluorophos® para as 5 repetições de cada tratamento. Foram calculadas as médias e os desvios-padrão.

Quadro 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada através do método fluorimétrico em cinco repetições (R).

Tratamento	(% Leite Cru	Atividade (mU/Kg)					Média	Desvio- Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5		
1	0,000	110	110	138	110	138	121	15
2	0,010	303	303	317	359	331	323	23
3	0,015	345	372	423	395	409	389	31
4	0,500	9.102	7.429	7.760	9.116	8.840	8.449	797
5	0,800	15.611	12.747	13.308	17.983	14.327	14.795	2.089
6	1,000	20.737	15.598	17.023	20.889	17.763	18.402	2.335

Na avaliação pelo método visual, houve uma dificuldade em comparar a coloração da amostra com os padrões da curva de calibração em virtude da diferença nas tonalidades de azul. Esta mesma dificuldade foi descrita por Oliveira et al. (2005) ao analisar diversos queijos. Por isso, adotou-se o critério de considerar como positivas as amostras com colorações azuladas semelhantes ao padrão com concentração 1 µg/mL. No Quadro 2, estão dispostos os resultados correspondentes às médias das 5 repetições realizadas.

Quadro 2 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada através do método Rápido de Scharer Visual em cinco repetições (R).  
As percentagens correspondem a amostras identificadas como positivas.

Tratamento	% Leite Cru	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	Média
1	0,000	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0,010	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3	0,015	0%	0%	0%	0%	0%	0%
4*	0,500	100%	100%	100%	100%	0%	80%
5*	0,800	100%	100%	100%	100%	0%	80%
6*	1,000	100%	100%	100%	100%	100%	100%

\*corresponde aos tratamentos identificados como positivos no método visual.

100% corresponde ao resultado positivo para as três replicatas.

0% corresponde ao resultado negativo para as três replicatas.

Os resultados revelaram que o método de Scharer Visual foi capaz de detectar apenas concentrações de leite cru superiores a 0,5 %. A atividade correspondente a esta concentração foi  $8.849 \pm 797$  mU/Kg. Isto mostrou a ineficácia do método visual até mesmo em relação ao antigo critério de 500 mU/Kg.

Os tratamentos 2 e 3, correspondentes a atividade em torno do limite de 350 mU/Kg, não foram detectados como positivos pelo método visual. Portanto, o método Rápido de Scharer Visual produziu resultados falso-negativos.

Em relação ao método espectrofotométrico, no Quadro 3 encontram-se as concentrações médias e os desvios-padrão calculados para os seis tratamentos avaliados em cinco repetições.

Quadro 3: Atividade de fosfatase alcalina em queijo Minas Padrão determinada através do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico, para as cinco repetições (R).

Tratamento	(% Leite Cru	Fenol (µg/g)					Média	Desvio- Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5		
1	0,000	0,521	0,012	-0,849	-0,935	-0,169	-0,284	0,611
2	0,010	0,637	0,495	-0,724	-0,085	-0,169	0,031	0,549
3	0,015	0,753	0,616	-0,474	-0,571	-0,531	-0,041	0,665
4*	0,500	2,605	2,429	2,396	2,829	1,158	2,283	0,652
5*	0,800	4,805	3,758	3,894	5,014	1,641	3,822	1,337
6*	1,000	5,384	4,604	4,643	5,378	2,365	4,475	1,239

\* corresponde aos tratamentos identificados como positivos no método espectrofotométrico.

Observou-se que o método Rápido de Scharer Espectrofotométrico foi capaz de detectar, com precisão, concentrações superiores a 0,5 % de leite cru. Este valor correspondeu a média de  $2,283 \pm 0,652$  µg fenol/g de queijo e a  $8.849 \pm 797$  mU/Kg.

Resultado semelhante para queijo Minas Padrão foi encontrado por Soares (2003) que detectou como limite, tanto para o método visual quanto para o espectrofotométrico, 0,5 % de leite cru adicionado em leite pasteurizado, o que correspondeu a  $2,3 \pm 0,356$  µg de fenol/g de queijo.

O método espectrofotométrico não foi capaz de detectar com precisão atividade enzimática residual na faixa de atividade de interesse (tratamentos 2 e 3). Portanto, não foi possível diferenciar os queijos com atividade 350 mU/Kg daqueles elaborados exclusivamente com leite pasteurizado. Assim, os elevados valores de desvio-padrão explicam a imprecisão do método nesta faixa de atividade. Portanto, o método Rápido de Scharer Espectrofotométrico mostrou-se em desacordo com a exigência atual do FDA que é uma referência mundial como órgão regulador de alimentos e medicamentos.

Estudou-se a relação entre % de leite cru e concentração de fenol para os seis tratamentos e, especificamente para os tratamentos 1, 2 e 3 que correspondiam aos queijos com atividade residual de 350 mU/Kg.

Observou-se excelente correlação ( $r=0,998$ ) entre % de leite cru e concentração de fenol quando todos os tratamentos foram analisados, sendo o modelo linear

adequadamente ajustado na explicação da relação, com equação  $\hat{y}=4,74x+0,12$  e  $R^2=0,993$ . No entanto, quando avaliada esta relação apenas nos tratamentos 1, 2 e 3, constatou-se a não-adequação do modelo linear, o que revelou a pouca precisão do método na faixa de interesse.

Ainda, investigou-se a correlação entre os métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e o Fluorophos®. Não foi constatada correlação significativa entre concentração de fenol e atividade residual, no nível de 5 % de probabilidade. Desse modo, o estudo reforçou a falta de precisão do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico.

Assim, os métodos Rápido de Scharer, Visual e Espectrofotométrico, detectaram precisamente apenas concentrações acima de 0,5 % de leite cru adicionado ao leite pasteurizado, o que correspondeu à atividade de  $8.849 \pm 797$  mU/Kg. Portanto, não se apresentaram sensíveis na detecção de concentrações de fenol correspondentes à atividade de 350 mU/Kg em queijo minas padrão.

#### **4. CONCLUSÕES**

O método Rápido de Scharer Visual apresentou limite mínimo de detecção de 0,5 %, o que correspondeu à atividade de  $8.849 \pm 797$  mU/Kg.

Por sua vez, o método Rápido de Scharer Espectrofotométrico detectou precisamente concentrações também superiores a 0,5 %, sendo equivalente a 2 µg de fenol/g de queijo. Este limite é consideravelmente superior à atividade de 350 mU/Kg atualmente estabelecida como limite pela FDA. O modelo de primeiro grau não pôde ser aplicado na faixa de atividade de interesse, mostrando a não-linearidade de resposta e a baixa precisão do método espectrofotométrico.

Ambos os métodos, Visual e Espectrofotométrico, não apresentaram sensibilidade o suficiente para diferenciar um queijo pasteurizado de um queijo com atividade residual de 350 mU/Kg.

Portanto, os métodos Rápido de Scharer (visual e espectrofotométrico) mostrou-se impreciso na detecção de atividade ALP residual correspondente ao limite atualmente estabelecido pela FDA. Assim, eles não são recomendáveis para avaliar a condição de pasteurização ou de contaminação pós-pasteurização em queijo Minas Padrão.

## 5. ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the Rapid Scharer's method (visual and spectrophotometric) with relationship to the current international demand levels. Fresh milk was submitted to the stages of LTLT pasteurization, cooling and addition of raw milk in 6 different concentrations (0,000 %, 0,010 %, 0,015 %, 0,500 %, 0,800 % e 1,000 %). That milk was used in the elaboration of cheeses, and those cheeses were analyzed to determine the residual ALP activity by Rapid Scharer's and Fluorophos® methods. Were accomplished 5 repetitions. The limit of detection of the visual method was 0,5 % ( $8.849 \pm 797$  mU/Kg) and this concentration was the low detected accurately by the method spectrophotometric (corresponding to  $2,283 \pm 0,652$  µg fenol/g cheese). The samples with activities of 350 mU/Kg (FDA limit) weren't differentiated of the control, and were detected as negative by the visual and spectrophotometric methods. Therefore, the Rapid Scharer's method produced false-negative results, what turns it inefficient in the detection of the residual ALP activity. In the evaluation of the response linearity, the results revealed excellent linear tendency among the raw milk % and the phenol concentration, but the sensibility decreases in the interest strip (350 mU/Kg). Wasn't observed significant correlation among Spectrophotometric Rapid Scharer's and Fluorophos® methods, in the level of 5 % of probability. Therefore, the method of Rapid Scharer's came with inadequate sensibility to detect the residual ALP activity corresponding to 350 mU/Kg. Thus, it isn't advisable your use to evaluate the pasteurization condition in Minas Padrão cheese.

**Key-words:** Residual Alkaline Phosphatase, Scharer's Method, Cheese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, P.R.S; BRANDÃO, S.C.C. Modificação do Método de Scharer para Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite. 35p. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2005.

EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR MILK AND MILK PRODUCTS. List of reference methods for the official control of milk & milk products in the frame of the Directive 92/46 Modified. Version 3 (modified at the 6<sup>th</sup> Workshop of 3-4 July 2003).

MURTHY, G.K; KLEYN, D.H; RICHARDSON, T; ROCCO, R.M. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 16<sup>th</sup> edition. Washington, p.413-430. 1992.

OLIVEIRA, A.M.G.; NEVES, V.J.; BOAVENTURA, R.L.; PIRES, L.L.; LIMA, L.L. Análises de Fosfatase Alcalina Residual em Queijos Inspeccionados pelo Estado de Minas Gerais. Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios, vol.60, jul/ago, n°345, 427-430p, 2005.

PAINTER, C.J. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time/Temperature Treatments. 113s. Thesis (Master of Science in Food Chemistry)- University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, 1995.

PMO – Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. Revision (2003 Revision). U.S. Food and Drug Administration. CFSAN/Office of Compliance March 2, 2004. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ear/pmo03-2.html>> Acesso em 28 de nov. de 2005.

RIBEIRO, J.I.J. Análises Estatísticas no Excel Guia Prático. Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 249p. 2005.

ROCCO, R.M. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 17<sup>th</sup> edition. Washington, p.341-362. 2004.

SOARES, C. F. Avaliação de Métodos Colorimétricos Qualitativos e Quantitativos para a Determinação de Atividades de Fosfatase Alcalina em Leite e Queijo Minas Padrão. 45p. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2003.

USER'S manual FLM5 - The Advanced<sup>TM</sup> Fluorometer – Test System Model FLM 200. Massachusetts: Advanced Instruments, Inc., 1992. 431s.

# ADAPTAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS PADRÃO DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS INTERNACIONAIS.

## ADAPTATION OF THE RAPID SCHARER'S METHOD FOR DETECTION OF ALKALINE PHOSPHATASE IN MINAS PADRÃO CHEESE IN AGREEMENT WITH THE INTERNATIONAL DEMANDS.

Fabiana de Oliveira Martins  
Sebastião Cesar Cardoso Brandão

### RESUMO

A pasteurização do leite é importante para evitar a transmissão de doenças, já que leite cru é fonte transmissora em potencial de microrganismos patogênicos. Este estudo teve como objetivo adaptar o método Rápido de Scharer de maneira a melhorar sua sensibilidade na detecção da atividade de fosfatase alcalina (ALP) residual em queijo Minas Padrão no limite de 350 mU/Kg (estabelecido pela Food and Drug Administration). Para tanto, leite cru com 3,0 a 3,5 % de gordura foi submetido às etapas de pasteurização lenta, resfriamento e adição de leite cru em 6 diferentes concentrações (0,000 %; 0,010 %; 0,015 %; 0,500 %; 1,000 %). Em seguida, os queijos elaborados a partir destes leites “contaminados” foram analisados, em seis repetições, pelos métodos Rápido de Scharer Adaptado (metodologia adaptada neste trabalho) e Fluorimétrico. O limite de detecção do método Rápido de Scharer Adaptado Visual ocorreu nos queijos cujo leite pasteurizado foi adicionado de 0,010 % de leite cru, o que correspondeu a atividade de  $323 \pm 23$  mU/Kg pelo método Fluorimétrico. A concentração mínima detectada com precisão pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico correspondeu a  $0,078 \pm 0,016$  µg fenol/g de queijo. Desse modo, a metodologia adaptada mostrou-se eficiente na detecção da atividade de ALP residual no limite de 350 mU/Kg. Os resultados revelaram associação linear entre a % de leite cru e a concentração de fenol. A regressão linear aplicada a estas variáveis mostrou ótima linearidade do método em atividade próxima a 350 mU/Kg. Além disso, observou-se excelente correlação entre o método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico e o método Fluorimétrico. Portanto, o método Rápido de Scharer Adaptado mostrou-se com sensibilidade adequada para detectar a atividade de ALP residual correspondente a 350 mU/Kg e, ainda com custo de reagentes (R\$ 0,32) muito acessível comparado ao do método Fluorimétrico (R\$ 25,00). Assim, é recomendável a avaliação de seu uso para verificar a condição de pasteurização em queijo Minas Padrão.

**Palavras-chave:** Fosfatase Alcalina, Método Rápido de Scharer, Queijo.

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) do leite pode ser determinada usando diversos métodos de análises laboratoriais. O limite de detecção depende do método e dos equipamentos utilizados. Limites máximos de atividade da ALP foram estabelecidos para comprovar a segurança dos produtos lácteos. No entanto, investigações científicas elaboradas a partir de surtos ocorridos devido ao consumo de produtos lácteos, apontaram para a redução dos limites de atividade residuais.

A Food and Drug Administration (FDA-USDA) e órgãos oficiais de diversos países mudaram o limite para leite pasteurizado de 500 mU/L, pelo método fluorimétrico, para 350 mU/L. No caso da FDA, esse mesmo limite é válido para todos os produtos lácteos, incluindo leite pasteurizado, queijos, creme e manteiga. Essa mudança fez com que alguns métodos de análise laboratorial se tornassem inadequados, por não apresentarem sensibilidade suficiente no limite de detecção. O método de Scharer, muito usado até então, não é capaz de detectar níveis residuais de atividade de fosfatase alcalina correspondentes a 350 mU/L.

Atualmente somente os métodos de análises fluorimétrico (Fluorophos®) e o de quimioluminescência (PasLite Charm®) apresentam sensibilidade suficiente para analisar os produtos lácteos. Entretanto, esses métodos analíticos usam equipamentos e reagentes caros.

Desse modo, este trabalho teve como objetivo adaptar o método Rápido de Scharer, Visual e Espectrofotométrico, de maneira a possibilitar a detecção da atividade residual de ALP em queijo minas padrão, com sensibilidade igual a do método Fluorimétrico para o limite máximo de 350 mU/Kg.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Processamento do Queijo**

Amostras de leite cru padronizado (3,0 a 3,5 % gordura) submetidas a pasteurização ( $64 \pm 1$  °C por 30 minutos), após resfriamento, foram adicionadas de leite cru em seis concentrações: 0,000 %, 0,010 %, 0,015 %, 0,500 %, 0,800 % e 1,000 %.

A elaboração dos queijos Minas Padrão, realizada em 6 repetições, a partir dos leites “contaminados”, seguiu procedimento adaptado de Soares (2003). Neste procedimento, as etapas de salga na massa, prensagem manual e embalagem em papel alumínio substituíram as etapas de salga em salmoura, prensagem mecânica e embalagem a vácuo.

### **2.2. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual em Queijo**

Avaliou-se, em seis repetições, a atividade de ALP residual em queijo através dos métodos Fluorimétrico e pela metodologia desenvolvida, adaptada do Método Rápido de Scharer 14.020 e 14.030 descrito no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (ROCCO, 2004). A adaptação correspondeu ao aumento da massa de queijo, dos volumes de fase aquosa e da solução de acetato de magnésio e ainda, da substituição da etapa de centrifugação pela de filtração.

Em se tratando da metodologia desenvolvida neste trabalho, ela é a seguir referenciada como método de Scharer Adaptado.

No método Fluorimétrico, descrito por Rocco (2004), amostras em replicata de cada queijo foram analisadas em aparelho Fluorophos® Modelo FLM200 (Advanced Instruments Inc.).

Na metodologia adaptada, pesou-se 30 g de amostra em tubo de centrífuga e adicionou-se 2,0 mL de tampão carbonato-bicarbonato 0,40 %, pH 9,8, seguida de maceração, diluição em 18,0 mL de álcool n-butílico 8,3 % e centrifugação, a 2000 g, por 10 minutos. Da fase aquosa separada retirou-se alíquota de 3,0 mL e transferiu-se para tubo de ensaio, seguida da adição de 5,0 mL de tampão substrato fenilfosfato dissódico 0,1 % e 0,6 mL de solução de acetato de magnésio (1 mg Mg/0,1 mL). O tubo, após a agitação, foi incubado a 40 °C por 15 minutos. Decorrido o período de incubação, acrescentou-se 0,1 mL de solução de sulfato de cobre (200 mg/100 mL) e 0,1 mL de solução de 2,6- dicloroquinona-4-cloroimida - CQC (30 mg/10 mL). A amostra homogeneizada foi novamente incubada a 40 °C por 5 minutos e, em

seqüência, transferida para banho de gelo, até atingir 10 °C, para ser adicionada de 3,0 mL de álcool n-butílico 99,4 % neutralizado. Para a extração de indofenol, os tubos foram submetidos a 4 inversões em meio círculo com intervalos de 1 segundo para inverter, pausar e retomar à posição inicial. Após pausa de 2 minutos, o mesmo procedimento de inversão foi realizado. Fez-se também controle negativo, aquecendo-se a amostra de queijo a 95 °C por 1 min, antes da análise.

A curva de calibração foi elaborada a partir de soluções contendo fenol e, os tubos possuíam as concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de equivalente fenol por 5mL de solução. O procedimento para a curva envolvia as etapas posteriores à adição de CQC e sulfato de cobre aplicadas na análise da amostra. Para a extração de indofenol, realizou-se nos tubos, 6 inversões em círculo inteiro com intervalos de 1 segundo para inverter, pausar e retomar à posição inicial.

A interpretação do resultado pelo método visual fez-se observando as colorações das camadas alcoólicas dos tubos controle negativo e da amostra.

Para a análise espectrofotométrica, transferiu-se a camada de álcool para uma cubeta e determinou-se a absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo Mini-1240 UV-Visível), a 650 nm. Os valores de absorvância e as concentrações dos padrões foram submetidos à análise de regressão linear. Para calcular as concentrações de fenol nas amostras, as absorvâncias determinadas eram diminuídas da absorvância do referencial (controle negativo) e, estes valores eram substituídos na equação obtida através da curva de calibração. O valor de concentração encontrado era multiplicado pelo fator 0,22 para expressar o resultado em µg de fenol por grama de amostra.

As análises foram realizadas em três porções de cada queijo e em três volumes de fase aquosa de cada porção de queijo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão usando procedimentos do Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1999), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa em 2006. Foi avaliado o efeito da concentração de leite cru adicionado ao leite pasteurizado na concentração de fenol através de regressão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1, encontram-se os valores médios e os desvios-padrão de atividade enzimática residual determinados através do método Fluorimétrico para as seis repetições. Os queijos com 0,010 % e 0,015 % de leite cru adicionado ao leite pasteurizado corresponderam a atividades próximas a 350 mU/Kg, que é o limite estabelecido pela FDA.

Quadro 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada pelo método Fluorimétrico em seis repetições.

Queijo	% Leite Cru	Atividade (mU/Kg)						Média	Desvio-Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6		
1	0,000	110	110	138	110	138	110	119	14
2	0,010	303	303	317	359	331	221	306	46
3	0,015	345	372	423	395	409	317	377	40
4	0,500	9.102	7.429	7.760	9.116	8.840	6.854	8.184	965
5	0,800	15.611	12.747	13.308	17.983	14.327	15.120	14.849	1.873
6	1,000	20.737	15.598	17.023	20.889	17.763	18.066	18.346	2.093

\*queijos com atividade que correspondem à faixa de interesse (350 mU/Kg)

No Quadro 2 estão dispostos os resultados correspondentes às médias das 6 repetições realizadas através do método visual.

Na avaliação visual existiu a dificuldade em comparar a coloração da amostra com os padrões da curva de calibração devido à diferença nas tonalidades de azul. Esta mesma dificuldade foi descrita por Oliveira et al. (2005) ao analisar diversos queijos. Por isso, a interpretação do resultado fez-se observando o controle negativo e a amostra. Simultaneamente, ausência de coloração no controle negativo e coloração azulada na amostra indicava resultado positivo para a amostra.

Quadro 2 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual, em seis repetições (R). As percentagens correspondem a amostras identificadas como positivas.

Tratamento	% Leite Cru	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	Média
1	0,000	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0%
2*	0,010	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	ND	100 %
3*	0,015	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
4	0,500	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
5	0,800	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
6	1,000	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

\* corresponde as concentrações identificadas como positivas no método visual.

100% corresponde ao resultado positivo para as três replicatas.

0% corresponde ao resultado negativo para as três replicatas.

ND atividade não determinada

Os resultados revelaram que o método Rápido de Scharer Adaptado Visual foi capaz de detectar como positivas todas as amostras adicionadas de leite cru nas concentrações equivalentes a 0,010% e 0,015% em seis repetições realizadas (100 %). As atividades correspondentes a essas concentrações eram  $306 \pm 46$  mU/Kg e  $377 \pm 40$  mU/Kg, respectivamente. Isto mostrou que a adaptação resultou em aumento da sensibilidade do método, alcançando o limite de detecção de 350 mU/Kg.

No Quadro 3 encontram-se as atividades enzimáticas expressas em microgramas de fenol por grama de queijo e os desvios-padrão calculados para as 6 repetições.

No método Adaptado Espectrofotométrico não foi possível calcular a concentração real de fenol nas amostras com adição de leite cru de 0,500 %, 0,800 % e 1,000% ao leite pasteurizado. Possivelmente, a quantidade do complexo de fenol superava a capacidade de extração do álcool n-butílico, evidenciado pela camada aquosa visível que permanecia azulada após o procedimento de extração.

Quadro 3: Atividade em queijo Minas Padrão determinada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico para as seis repetições (R).

Tratamento	%	Fenol ( $\mu\text{g/g}$ )						Média	Desvio-Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6		
1	0,000	0,027	0,000	0,014	0,004	-0,015	-0,001	0,005	0,014
2*	0,010	0,088	0,067	0,062	0,101	0,072	ND	0,078	0,016
3*	0,015	0,103	0,070	0,100	0,108	0,102	0,075	0,093	0,016

\* corresponde aos tratamentos identificados como positivos no método espectrofotométrico.

ND atividade não-determinada

O valor de 350 mU/Kg do método fluorimétrico correspondeu a  $0,078 \pm 0,016$   $\mu\text{g}$  de fenol/g de queijo pelo método Espectrofotométrico Adaptado.

O estudo de correlação revelou associação linear positiva entre a percentagem de leite cru e a concentração de fenol ( $r=0,995$ ). A equação da regressão linear entre essas variáveis foi  $\hat{y}=5,99x+0,0066$  com coeficiente de determinação  $R^2=0,990$ .

Houve também correlação significativa entre a metodologia Aadaptada e o método Fluorimétrico, no nível de 5% de probabilidade. Esta correlação foi representada pelo coeficiente  $r=0,919$ .

O método Rápido de Scharer Adaptado, Visual e Espectrofotométrico, detectou, precisamente, como positivas todas as amostras de queijo com atividade de ALP residual próxima a 350 mU/Kg. A maior sensibilidade da metodologia adaptada em relação ao método original se deve ao aumento da quantidade da enzima na amostra analisada.

O custo de reagentes da análise por meio do método Adaptado apresentou-se significativamente inferior (R\$ 0,32) ao do método fluorimétrico (R\$ 25,00).

Portanto, a metodologia adaptada apresentou sensibilidade e linearidade de resposta adequada, além de custo acessível tornando recomendável o estudo de sua validação oficial para utilização na verificação da eficiência de pasteurização de queijo Minas Padrão.

#### **4. CONCLUSÕES**

O método Rápido de Scharer Adaptado Visual apresentou limite mínimo de detecção de 0,010 %, o que correspondeu à atividade de  $323 \text{ mU/Kg} \pm 23 \text{ mU/Kg}$ . Este limite corresponde ao critério atualmente estabelecido pela FDA para a atividade de ALP residual em queijos.

Por sua vez, o método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico também detectou precisamente concentrações de 0,010 %, sendo esta concentração equivalente a  $0,078 \pm 0,016 \text{ } \mu\text{g}$  de fenol por grama de queijo. Este valor equivaleu à atividade de  $323 \pm 23 \text{ mU/Kg}$  determinada pelo método fluorimétrico.

Portanto, a metodologia desenvolvida mostrou-se com sensibilidade adequada para a detecção de atividade da fosfatase alcalina residual correspondente ao limite de  $350 \text{ mU/Kg}$ , atualmente estabelecida pela FDA. Além disso, o custo com reagente por análise foi muito acessível. Assim, é recomendável o estudo de sua validação oficial para que o mesmo possa ser utilizado por indústrias e órgãos de inspeção na verificação da condição de pasteurização em queijo Minas Padrão.

## 5. ABSTRACT

The pasteurization of the milk is important to avoid the transmission of diseases, since raw milk is vehicle in potential of pathogenic microorganisms. This study had the purpose to adapt the Rapid Scharer's method, improving your sensibility to in the detection of the activity of alkaline phosphatase (ALP) residual in Minas Padrão cheese, in the limit of 350 mU/Kg (established for the Food and Drug Administration). Fresh milk was submitted to the stages of LTLT pasteurization, cooling and addition of raw milk in 6 different concentrations (0,000 %, 0,010 %, 0,015 %, 0,500 %, 0,800 % e 1,000 %). That milk was used in the elaboration of cheeses, and those cheeses were analyzed to determine the residual ALP activity by Rapid Scharer's and Fluorophos® methods. Were accomplished 6 repetitions. The limit of detection of the visual method was 0,010 % ( $323 \pm 23$  mU/Kg) and this concentration was the low detected accurately by the Spectrophotometric Adapted Rapid Scharer's method (corresponding the  $0,078 \pm 0,016$  µg phenol /g cheese). Therefore, the Adapted Rapid Scharer's method was efficient in the detection of residual ALP activity in the limit of 350 mU/Kg. Linear regression applied to the Spectrophotometric Adapted Rapid Scharer's method showed appropriate sensibility to detect the residual ALP activity corresponding to 350 mU/Kg. Besides, excellent correlation was observed among the Spectrofotometric Adapted Rapid Scharer's and the Fluorimetric methods. The cost related the chemical products used in the analysis was very accessible (R\$ 0,32). Therefore, it is advisable the evaluation of use to verify the pasteurization condition in Minas Padrão cheese.

**Key-words:** Residual Alkaline Phosphatase, Scharer's Method, Cheese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, P.R.S; BRANDÃO, S.C.C. Modificação do Método de Scharer para Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina em Leite. 35p. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2005.

EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR MILK AND MILK PRODUCTS. List of reference methods for the official control of milk & milk products in the frame of the Directive 92/46 Modified. Version 3 (modified at the 6<sup>th</sup> Workshop o 3-4 July 2003).

MURTHY, G.K; KLEYN, D.H; RICHARDSON, T; ROCCO, R.M. In:MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 16<sup>th</sup> edition. Washington, p.413-430. 1992.

OLIVEIRA, A.M.G.; NEVES,V.J.; BOAVENTURA,R.L.;PIRES,L.L.; LIMA,L.L. Análises de Fosfatase Alcalina Residual em Queijos Inspeccionados pelo Estado de Minas Gerais. Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios, vol.60, jul/ago, n°345, 427-430p, 2005.

PAINTER, C.J. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time/Temperature Treatments. 113s. Thesis (Master of Science in Food Chemistry)- University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, 1995.

PMO – Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. Revision (2003 Revision). U.S. Food and Drug Administration. CFSAN/Office of Compliance March 2, 2004. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ear/pmo03-2.html>> Acesso em 28 de nov. de 2005.

RIBEIRO, J.I.J. Análises Estatísticas no Excel Guia Prático. Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 249p. 2005.

ROCCO, R.M. In: In:MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 17<sup>th</sup> edition. Washington, p.341-362. 2004.

SOARES, C. F. Avaliação de Métodos Colorimétricos Qualitativos e Quantitativos para a Determinação de Atividades de Fosfatase Alcalina em Leite e Queijo Minas Padrão. 45p. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2003.

USER’S manual FLM5 - The Advanced<sup>TM</sup> Fluorometer – Test System Model FLM 200. Massachusetts: Advanced Instruments, Inc., 1992. 431s.

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE QUEIJO MINAS PADRÃO.**

### **EVALUATION OF THE RESIDUAL ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN COMMERCIAL SAMPLES OF MINAS PADRÃO CHEESE.**

Fabiana de Oliveira Martins  
Sebastião Cesar Cardoso Brandão

#### **RESUMO**

Os queijos são alimentos de importância nutricional e econômica muito relevante, sendo o Minas Padrão um dos mais consumidos no Brasil. No entanto, sabe-se que o consumo de queijo, elaborado a partir de leite cru, constitui risco de saúde pública em virtude da possibilidade de transmissão de doenças, tornando necessário o controle de processos que assegurem a saúde dos consumidores. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de fosfatase alcalina (ALP) residual em amostras comerciais de queijos Minas Padrão e verificar a adequação do método Rápido de Scharer Adaptado na determinação de atividade enzimática. Foram analisadas 16 amostras de 6 marcas inspecionadas por órgãos de fiscalização como o Serviço de Inspeção Federal e o Instituto Mineiro de Agropecuária. Adotou-se os métodos Rápido de Scharer Adaptado e o Fluorimétrico. A pesquisa revelou que 81,25 % dos queijos analisados apresentaram atividade de ALP residual superior a 350 mU/Kg. Todos os controles microbianos realizados para as amostras positivas apresentaram atividade enzimática inferior à 350 mU/Kg, confirmando que a enzima era proveniente de leite cru. O método Rápido de Scharer Adaptado Visual obteve respostas positivas para 100 % das amostras com atividades superiores a 350 mU/Kg. Portanto, foi constatada a comercialização de queijos Minas Padrão com atividades superiores ao limite de 350 mU/Kg, indicando que existiram falhas no processo de pasteurização ou contaminações após este processo. Desse modo, o consumo de queijo Minas Padrão pode constituir risco de saúde pública.

**Palavras-chave:** Fosfatase Alcalina, Método Rápido de Scharer Modificado, Queijo.

## 1. INTRODUÇÃO

A Legislação Brasileira determina que os queijos maturados por períodos inferiores a 60 dias devem ser elaborados a partir de leite tratado termicamente que garanta a fosfatase alcalina (ALP) residual negativa.

O Comitê Europeu para segurança de produtos lácteos estabelece o limite máximo de 350 mU/L para a atividade de ALP residual em leite. Já a Food and Drug Administration (FDA) determina que este mesmo limite deve ser aplicado a diversos produtos lácteos.

Tais considerações se devem ao fato do leite cru poder veicular inúmeros microrganismos causadores de doenças como salmonelose, listeriose, brucelose entre outras.

Portanto, o teste de atividade de ALP residual é importante ferramenta para auxiliar na garantia da segurança de produtos lácteos.

Considerando a importante aplicação deste teste, muitas variações do mesmo foram criadas com o intuito de atender as exigências legais que vem mudando ao longo dos tempos. Atualmente, os métodos Fluorimétrico e Quimioluminescente são os únicos reconhecidos por órgãos de fiscalização em diversos países do mundo. No entanto, uma metodologia desenvolvida a partir de uma adaptação do método de Scharer Rápido apresentou resultados satisfatórios na determinação de atividade de ALP residual em queijo Minas Padrão de acordo com o limite internacional de 350 mU/Kg.

Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de ALP residual em amostras de queijo Minas Padrão comercializadas na região de Viçosa (MG) e, verificar a adequação do método Rápido de Scharer Adaptado na determinação de tal atividade.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Amostras de queijo Minas Padrão foram adquiridas em supermercados nas cidades de Viçosa e Ponte Nova, Minas Gerais. Foram analisadas 16 amostras de 6 empresas que são inspecionadas por órgãos fiscalizadores como Serviço de Inspeção Federal (SIF) ou Instituto Mineiro Agropecuário (IMA).

### **2.1. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual por meio do Método Fluorimétrico**

Avaliou-se a atividade da ALP residual nos queijos através do método Fluorimétrico descrito por Rocco (2004). Foi utilizado o aparelho Fluorophos® Modelo FLM200 (Advanced Instruments Inc.).

Além da avaliação da atividade de ALP residual, realizou-se o teste de fosfatase microbiana. Neste, a amostra de queijo era aquecida a 66 °C por 30 minutos, ou seja, realizava-se a “repasteurização” da amostra. O controle, depois de resfriado em água corrente, foi submetido aos mesmos procedimentos adotados para a amostra (ROCCO, 2004).

### **2.2. Determinação da Atividade de Fosfatase Alcalina Residual por meio do Método Rápido de Scharer Adaptado**

Os queijos foram analisados pelo método Rápido de Scharer Adaptado que é uma adaptação do método Rápido de Scharer descrito por Rocco (2004). A adaptação se deve ao aumento da massa de queijo, dos volumes de fase aquosa e da solução de acetato de magnésio e a substituição da etapa de centrifugação pela de filtração.

Na metodologia adaptada, pesou-se 30 g de amostra em tubo de centrífuga e adicionou-se 2,0 mL de tampão carbonato-bicarbonato 0,40 %, pH 9,8, seguida de maceração, diluição em 18,0 mL de álcool n-butílico 8,3 % e centrifugação, a 2000 g, por 10 minutos. Da fase aquosa separada retirou-se alíquota de 3,0 mL e transferiu-se para tubo de ensaio, seguida da adição de 5,0 mL de tampão substrato fenilfosfato dissódico 0,1 % e 0,6 mL de solução de acetato de magnésio (1 mg Mg/0,1 mL). O tubo, após a agitação, foi incubado a 40 °C por 15 minutos. Decorrido o período de incubação, acrescentou-se 0,1 mL de solução de sulfato de cobre (200 mg/100 mL) e 0,1 mL de solução de 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida - CQC (30 mg/10 mL). A amostra homogeneizada foi novamente incubada a 40 °C por 5 minutos e, em

seqüência, transferida para banho de gelo, até atingir 10 °C, para ser adicionada de 3,0 mL de álcool n-butílico 99,4 % neutralizado. Para a extração de indofenol, os tubos foram submetidos a 4 inversões em meio círculo com intervalos de 1 segundo para inverter, pausar e retomar à posição inicial. Após pausa de 2 minutos, o mesmo procedimento de inversão foi realizado. Fez-se também controle negativo, aquecendo-se a amostra de queijo a 95 °C por 1 min, antes da análise.

A curva de calibração foi elaborada a partir de soluções contendo fenol e, os tubos possuíam as concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de equivalente fenol por 5mL de solução. O procedimento para a curva envolvia as etapas posteriores à adição de CQC e sulfato de cobre aplicadas na análise da amostra. Para a extração de indofenol, realizou-se nos tubos, 6 inversões em círculo inteiro com intervalos de 1 segundo para inverter, pausar e retomar à posição inicial.

A interpretação do resultado pelo método visual fez-se observando as colorações das camadas alcoólicas dos tubos controle negativo e da amostra. A ausência de coloração no controle negativo e coloração azulada na amostra indicava resultado positivo para a amostra.

Para a análise espectrofotométrica, transferiu-se a camada de álcool para uma cubeta e determinou-se a absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo Mini-1240 UV-Visível), a 650 nm. Os valores de absorvância e as concentrações dos padrões foram submetidos à análise de regressão linear, obtendo-se a equação da reta. Para calcular as concentrações de fenol nas amostras, as absorvâncias determinadas eram diminuídas da absorvância referencial (controle negativo) e, estes valores eram substituídos na equação obtida através da curva de calibração. O valor de concentração encontrado era multiplicado pelo fator 0,22 para expressar o resultado em µg de fenol por grama de amostra.

As análises foram realizadas em três porções de cada queijo e em três volumes de fase aquosa de cada porção de queijo.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No Quadro 1, encontram-se os resultados obtidos através dos métodos Rápido de Scharer Adaptado Visual e Fluorimétrico para as 16 amostras. As letras A, B, C, D, E e F representam as empresas analisadas.

A pesquisa pelo método Fluorimétrico revelou que 81,25 % dos queijos analisados apresentaram atividade de ALP residual superior a 350 mU/Kg.

O teste de fosfatase microbiana realizado nas amostras com atividades superiores a 350 mU/Kg, para verificar a origem da fosfatase alcalina, constatou em 100 % dessas amostras valores inferiores a 350 mU/Kg, o que significa que a atividade enzimática medida nas amostras era oriunda de enzimas provenientes de leite cru e não de produção microbiana. A diminuição da atividade no controle microbiano se deve ao fato da ALP endógena do leite ser termosensível, sendo assim reduzida com o tratamento térmico aplicado, o que não ocorre com a ALP microbiana.

O método Rápido de Scharer Adaptado Visual concluiu como positivas 100% das amostras com atividades superiores a 350 mU/Kg (Quadro 1). Já o método Espectrofotométrico não pôde ser aplicado para amostras com altas concentrações de indofenol, pois este não foi efetivamente extraído pelo uso do álcool n-butílico. As amostras D1, D2 e E1, com atividades inferiores a 350 mU/Kg apresentaram concentrações de fenol estimadas em 0,032; 0,019; e 0,041 µg/g. Estes valores são coerentes uma vez que queijos com atividades maiores que 350mU/Kg possuem concentrações de fenol superiores a  $0,078 \pm 0,016$  µg/g.

Quadro 1 – Atividade de fosfatase alcalina residual em queijo Minas Padrão determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado Visual e Fluorimétrico.

Empresa	Repetição	Método Visual	Atividade da Amostra (mU/Kg)	Atividade do Controle Microbiano (mU/Kg)
A	1	+	1.480	138
A	2	+	961	152
A	3	+	14.816	152
B	1	+	2.179	<100
B	2	+	2.726	221
B	3	+	6.266	165
C	1	+	2.082	207
C	2	+	2.629	152
D	1	-	179	
D	2	-	276	
D	3	+	671	248
E	1	-	165	
E	3	+	1.384	165
F	1	+	2.055	207
F	2	+	1.370	179
F	3	+	2.496	331

Sombreado corresponde às amostras com atividade inferior a 350mU/Kg.

Por meio da análise dos resultados, constatou-se que o Método Rápido de Scharer Adaptado foi efetivo na determinação da atividade de ALP residual em amostras comerciais de queijo Minas Padrão. O método Rápido de Scharer Adaptado Visual apresentou excelente desempenho na identificação de queijos com atividades superiores a 350 mU/Kg e, o método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico detectou como negativas as amostras com atividades inferiores a 350 mU/Kg.

Constatou-se em 81,25 % dos queijos comerciais analisados a não-adequação de ao limite de 350 mU/Kg, indicando falha na pasteurização do leite ou contaminações após este processo.

#### **4. CONCLUSÕES**

Das amostras de queijo Minas Padrão avaliadas, 85,25 % apresentaram atividade de ALP residual superiores à 350 mU/Kg, estando portanto, em desacordo com o atual limite máximo adotado pelo FDA.

O método Rápido de Scharer Adaptado constatou resultados positivos para todas as amostras com a atividade de ALP residual superior a 350 mU/Kg, mostrando-se adequado na determinação de atividade de ALP residual em amostras comerciais de queijo Minas Padrão.

Estes resultados refletem a ocorrência de falhas na pasteurização de leite destinado à fabricação de queijo, ou ainda contaminações do leite pasteurizado com leite cru após este processo. A comercialização de produtos contaminados com leite cru pode constituir risco à saúde pública, devendo ser abolida através de ações de fiscalização por autoridades responsáveis pela segurança dos produtos lácteos.

Ainda, considerando a produção de diversos tipos de queijos com diferentes condições de processamento, sugere-se a realização de estudos para outras variedades.

#### **5. ABSTRACT**

Was analyzed the residual ALP activity in 16 marketed samples of Minas standard cheese of 6 marks inspected by Federal Inspection Service or Mineiro Institute of Agricultural. The Adapted Rapid Scharer's and Fluorophos® method were adopted. The research revealed that 81,25 % of the cheeses presented residual ALP activity larger at 350 mU/Kg. These positive results were confirmed with 100 % of microbial controls with smaller active than 350 mU/Kg. The visual Adapted Rapid Scharer's method obtained positive results for 100 % of the samples with larger activities than 350 mU/Kg. The evaluation of residual ALP activity in marketed Minas Padrão cheeses was accomplished appropriately by the Adapted Rapid Scharer's method. These results were coherent to the found by Fluorimetric method. Was verified the commercialization of Minas Padrão cheeses with larger activities than 350 mU/Kg. This indicates failure in

the pasteurization or raw milk-contamination after this process, and the consumption of such a product constitutes public health risk. Therefore, the Rapid Scharer's Adapted method presents an alternative to evaluate the pasteurization condition in Minas Padrão cheese.

**Key-words:** Alkaline Phosphatase, Scharer's Method, Cheese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. Dispõe sobre os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, 1996. Disponível em <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1218>> Acesso em: 01 de nov. de 2005.

BRASIL. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Dispõe sobre os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, DF, 2003. Disponível em <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/Imagem?codArquivo=1802>> Acesso em 01 de nov. de 2005.

EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR MILK AND MILK PRODUCTS. List of reference methods for the official control of milk & milk products in the frame of the Directive 92/46 Modified. Version 3 (modified at the 6<sup>th</sup> Workshop of 3-4 July 2003).

MURTHY, G.K; KLEYN, D.H; RICHARDSON, T; ROCCO, R.M. In:MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 16<sup>th</sup> edition. Washington, p.413-430. 1992.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.;PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in Non-Pasteurized Milk on Retail Sale in Brazil: Prevalence of *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* and Chemical Residues. Brazilian Journal of Microbiology, vol. 35, n.3, 211-215p., 2004.

PAINTER, C.J. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milks Subjected to Various Time/Temperature Treatments. 113p. Thesis (Master of Science in Food Chemistry)-University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, 1995.

PMO – Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. Revision (2003 Revision). U.S. Food and Drug Administration. CFSAN/Office of Compliance March 2, 2004. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ear/pmo03-2.html>> Acesso em 28 de nov. de 2005.

ROCCO, R.M. In: In:MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard Methods for Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 17<sup>th</sup> edition. Washington, p.341-362. 2004.

## CONCLUSÕES GERAIS

As médias de atividade da fosfatase alcalina (ALP) residual, determinadas através do método Fluorimétrico, em leite pasteurizado (36 mU/L) e em queijo Minas Padrão elaborado a partir de leite pasteurizado (118 mU/Kg) foram inferiores aos limites de 350 mU/L e 350 mU/Kg estabelecidos pela FDA.

O método fluorimétrico apresentou linearidade de resposta e sensibilidade adequada na determinação de atividade de ALP residual em queijo Minas Padrão. A atividade de 350 mU/Kg correspondeu à adição de 0,010 % e 0,015 % de leite cru adicionado ao leite pasteurizado.

O método Rápido de Scharer Visual mostrou-se inadequado as atuais exigências legais porque apresentou limite de detecção de 0,5 % de leite cru adicionado ao leite pasteurizado, o que correspondeu à atividade de  $8.849 \pm 797$  mU/Kg. Este mesmo valor foi detectado precisamente por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico, correspondendo a 2  $\mu$ g de fenol/g. Ainda, na faixa da atividade de 350 mU/Kg, não houve linearidade de resposta significativa no nível de 5 % de probabilidade, sendo que a este mesmo nível de probabilidade não foi constatada correlação significativa com o método Fluorimétrico. Não houve, através do método Rápido de Scharer, sensibilidade adequada que possibilitasse diferenciar queijo elaborado a partir de leite pasteurizado de queijo com atividade residual de 350 mU/Kg, mostrando sua imprecisão em detectar atividade de ALP correspondente ao atual limite estabelecido pela FDA.

O método Rápido de Scharer Adaptado para queijo Minas Padrão mostrou-se adequado aos padrões de exigência estabelecido pela FDA. O método Adaptado Visual apresentou limite mínimo de detecção de 0,010 %, o que correspondeu à atividade de  $323\text{mU/Kg} \pm 23\text{mU/Kg}$ , sendo este também, o limite do método Adaptado Espectrofotométrico o que correspondeu a  $0,078 \pm 0,016$   $\mu$ g de fenol/g de queijo. Obteve-se elevada correlação entre porcentagem de leite cru adicionada ao leite pasteurizado e concentração de fenol ( $r=0,995$ ). Houve linearidade de resposta significativa e, correlação significativa entre os métodos Adaptado e Fluorimétrico ( $r=0,919$ ) a este mesmo nível de probabilidade.

A pesquisa de atividade de ALP residual em amostras comerciais de queijo minas padrão constatou, através do método Fluorimétrico, 81,25 % dos queijos com atividades superiores a 350 mU/Kg, refletindo falhas na pasteurização do leite ou contaminações após este processo.

A avaliação da atividade de ALP residual nestas amostras comerciais foi também realizada adequadamente, pelo método Rápido de Scharer Adaptado, sendo que os resultados obtidos através dele foram coerentes àqueles alcançados por meio do método Fluorimétrico.

Portanto, ambos os métodos Adaptado, Visual e Espectrofotométrico, revelaram sensibilidade apropriada em detectar atividade de ALP residual correspondente a 350 mU/Kg. Além disso, o custo de reagentes do método Adaptado (R\$ 0,16) é muito inferior ao do método Fluorimétrico (R\$ 25,00).

Portanto, sugere-se a validação oficial dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico no Brasil. Estes surgem como alternativas para que indústrias e órgãos de fiscalização possam assegurar que os queijos comercializados são, exclusivamente, elaborados com leite pasteurizado. Já o método Rápido de Scharer não é recomendado na avaliação de tal situação.

Sugere-se ainda, que no Brasil seja adotado um critério quantitativo referente à atividade de fosfatase alcalina residual em queijos.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### HIGIENIZAÇÃO DE MATERIAIS

Os detergentes utilizados em higienização de materiais podem conter fenol livre. Esta substância, caso não seja adequadamente removida, pode contaminar os materiais e, conseqüentemente promover a obtenção de resultados falso-positivos. Portanto, muita atenção deve ser adotada no preparo de materiais a serem utilizados nas análises.

#### Etapas para higienização dos materiais:

- ✓ Pré-Lavagem: enxaguar previamente os materiais em água corrente.
- ✓ Molho: depositar estes materiais em recipiente contendo detergente (preferencialmente livre de fenol). Permanecer nesta condição por no mínimo uma hora.
- ✓ Lavagem: esfregar os materiais com buchas e escovas de maneira a remover todas as sujidades.
- ✓ Enxágüe: promover o enxágüe em água corrente por, aproximadamente, quinze vezes.
- ✓ Molho ácido: imergir os materiais em recipiente contendo solução sulfonítrica diluída. A permanência deverá ser de, no mínimo, uma hora.
- ✓ Enxágüe: promover o enxágüe em água corrente por, aproximadamente, dez vezes.
- ✓ Enxágüe final: promover o enxágüe em água destilada por, aproximadamente, cinco vezes.

✚ Solução sulfonítrica concentrada: diluir, cuidadosamente, 1 parte de ácido sulfúrico em 3 partes de ácido nítrico ([www.pcarp.usp.br](http://www.pcarp.usp.br)<Acesso em 27 de julho de 2006>).

✚ Solução sulfonítrica diluída: adicionar 250mL de solução sulfonítrica concentrada em 350mL de água destilada.

## ANEXO B

### PREPARO DE SOLUÇÕES

As técnicas são descritas no “Standard Methods for The Examination of Dairy Product (ROCCO, 2004).

▶ **Tampão carbonato pH 9,8:**

Dissolver 46,89g de carbonato de sódio e 37,17g de bicarbonato de sódio em água destilada. Transferir para balão volumétrico e completar o volume. A estabilidade desta solução é de 6 meses sob refrigeração.

▶ **Tampão carbonato de trabalho 0,4% pH 9,8 (força dupla):**

Transferir 10mL de tampão carbonato pH 9,8 para um balão volumétrico de 100mL e completar o volume com água destilada. A solução é estável por seis meses sob refrigeração.

▶ **Solução de 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida (CQC):**

Dissolver 30mg de CQC em 10mL de álcool metílico. Acondicionar em frasco âmbar por no máximo três meses sob refrigeração. Não utilizá-la caso a cor torne-se marrom.

▶ **Solução de sulfato de cobre:**

Dissolver 200mg de sulfato de cobre em 100mL de água destilada. Acondicionar em frasco de vidro e armazenar em geladeira.

▶ **Álcool n-butílico neutralizado (para extração de indofenol):**

Alguns ácidos livres podem estar presentes no álcool n-butílico comercial, portanto, é necessário que estes sejam neutralizados para que não interfiram na atividade da enzima. Misturar 10mL de tampão carbonato pH 9,8 a 3,785L de álcool n-butílico (Recomenda-se usar o álcool com ponto de ebulição de 116 a 118°C). A solução deve ser mantida sob refrigeração.

▶ **Álcool n-butílico 8,3% (v/v) (para extração de queijo):**

Misturar 83mL de álcool n-butílico neutralizado com 997mL de água destilada. Acondicionar em frasco âmbar e armazenar sob refrigeração.

▶ **Substrato de trabalho em tampão carbonato (força dupla):**

Dissolver 0,5g de fenilfosfato dissódico em 10mL de água destilada e transferir para um funil de separação com capacidade para 100mL. Adicionar 50mL de tampão carbonato,

0,1mL de solução de CQC e 0,1mL de solução de sulfato de cobre. Agitar e deixar em repouso por 5 minutos. Adicionar 3mL de álcool n-butílico neutralizado e misturar. Agitar lentamente e aguardar alguns minutos em repouso para ocorrer a separação de fases. Observar a coloração do butanol (fase superior). Caso esteja transparente, transferir a fase aquosa (inferior) para um balão volumétrico de 500mL. Completar o volume com água destilada. Já se a solução apresentar qualquer coloração, repetir a operação de extração quantas vezes forem necessárias até que não apareça coloração alguma.

▶ **Solução de acetato de magnésio 1mg Mg/0,1mL:**

Dissolver 8,82g de acetato de magnésio em água destilada. Transferir para um balão volumétrico e completar o volume para 100mL. Armazenar em geladeira.

▶ **Solução de ácido clorídrico 0,1N:**

Em balão de 1000mL contendo 500mL de água destilada, adicionar 8,3mL de ácido clorídrico concentrado. Completar o volume com água destilada. Preparar a solução no momento do uso.

▶ **Solução estoque de fenol – padrão 1mg/mL:**

Dissolver 1g de fenol anidro em solução de ácido clorídrico 0,1N. Transferir para balão volumétrico de 1000mL e completar o volume com o mesmo ácido. A solução terá estabilidade por três meses se acondicionada em frasco âmbar sob refrigeração. Observação: 1mL desta solução contém 1mg de fenol.

▶ **Solução intermediária “A” de fenol– padrão 10µg/mL:**

Transferir 5mL da solução estoque de fenol para balão volumétrico de 100mL e completar o volume com água destilada. Preparar a solução no momento do uso. Observação: 1mL desta solução contém 10µg de fenol.

▶ **Solução intermediária “B” de fenol – padrão 1µg/mL:**

Transferir 10mL da solução intermediária “A” de fenol para balão volumétrico de 100mL e completar o volume com água destilada. Preparar a solução no momento do uso. Observação: 1mL desta solução contém 1µg de fenol.

## ANEXO C

### PROCESSAMENTO DO QUEIJO

Os queijos foram elaborados a partir de procedimento adaptado de Soares (2003).

- ◆ O leite utilizado foi adquirido no Laticínio Escola da Fundação Arthur Bernardes.
- ◆ O processamento do queijo foi realizado em laboratório utilizando banho-maria para as etapas de aquecimento e resfriamento.
- ◆ Foi usado leite cru padronizado para 3,0% a 3,5% de gordura.
- ◆ A cultura láctica utilizada foi o fermento tipo “O” (*Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris*) - Marca Rhodia.
- ◆ O coalho aplicado possuiu força 1:90.000 – Marca Chr. Hansen.
- ◆ O cloreto de cálcio foi utilizado na concentração de 50% (m/v).
- ◆ Durante a prensagem as formas de queijos eram envolvidas por papel alumínio para evitar a contaminação entre os queijos.
- ◆ A etapa de secagem realizou-se em geladeira.

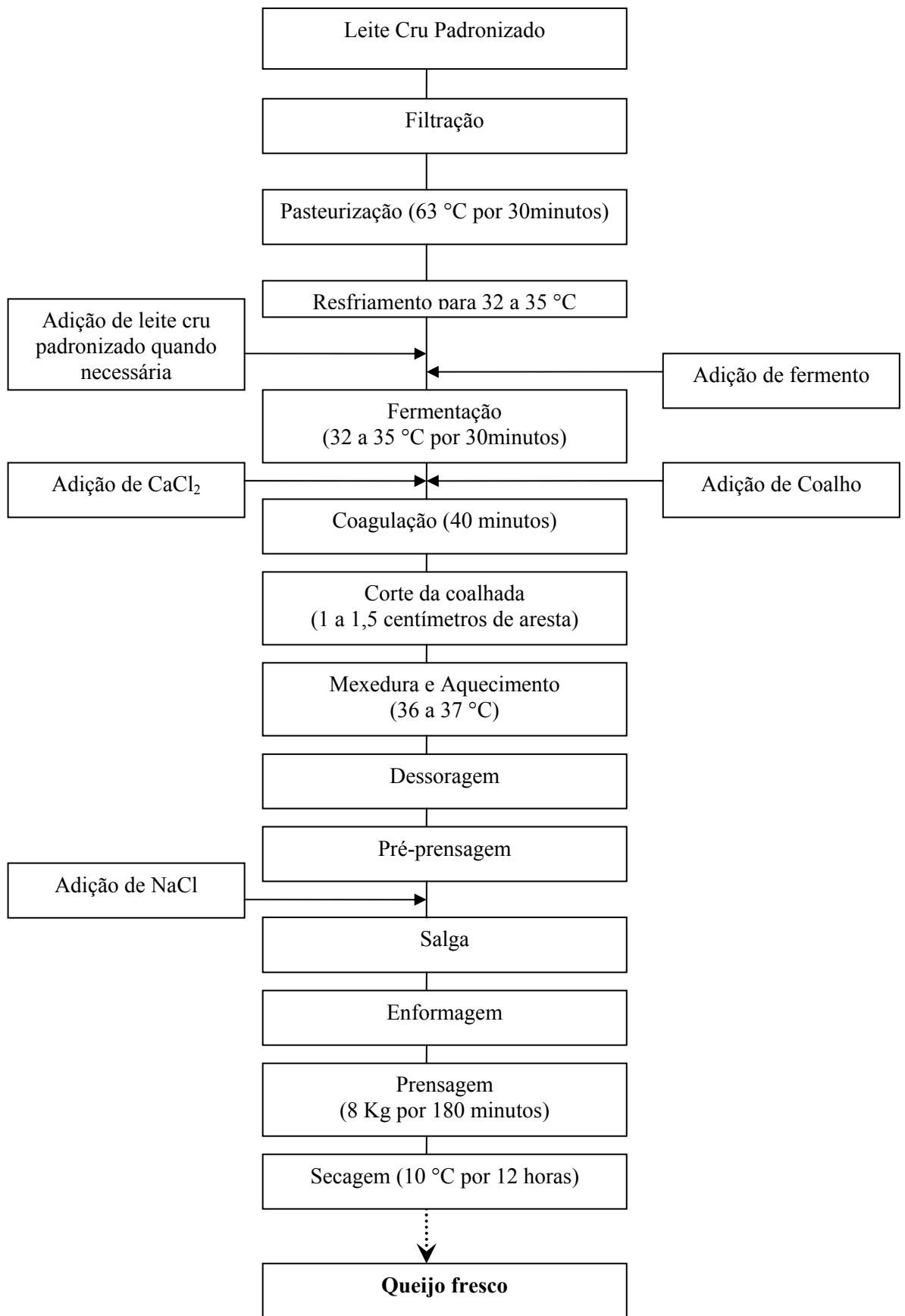


Figura 1C: Fluxograma do Processamento de Queijo Minas Padrão.

**ANEXO D**  
**ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO**

Os valores de pH dos queijos foram medidos utilizando metodologia descrita na Instrução Normativa nº22 que trata dos “Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos” de 02 de maio de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Etapas:

- 1) Calibração do pHmetro: com as soluções tampões pH 4 e 7.
  
- 2) Preparo da amostra: a 20mL de água destilada eram adicionados 5g de queijo ralado. A amostra era macerada com bastão de vidro.
  
- 3) Medição: procedia-se à leitura no aparelho.

## ANEXO E

### CURVA DE CALIBRAÇÃO

Os padrões de fenol foram preparados diariamente seguindo técnica descrita no Anexo B.

O esquema descrito em Rocco (2004) esquematiza o procedimento seqüencial adotado e a correspondência de concentração de fenol.

Esquema do preparo de padrões de fenol para curva de calibração.

<b>mL de Solução Intermediária "B"</b>	<b>mL de Água Destilada</b>	<b>Concentração de fenol (µg por 0,5mL)</b>	<b>Equivalente de fenol (µg por 1,0mL)</b>
0,0	5,0	0,0	0,0
0,5	4,5	0,5	1,0
1,0	4,0	1,0	2,0
2,5	2,5	2,5	5,0
5,0	0,0	5,0	10,0

A uma série de tubos de ensaio foram adicionadas a solução intermediária de fenol "B", água destilada e 0,5mL de tampão carbonato pH 9,8.

Os tubos após incubados a 40 °C por 5 minutos, resfriados em banho de gelo para 10 °C, adicionados de 3,0mL de butanol neutralizado resfriado, foram submetidos a 6 inversões em voltas completas com intervalos de 1 segundo para inverter, pausar e retomar a posição original.

Cada padrão de fenol continha a metade de equivalente de fenol por 5,0mL. A relação gráfica foi realizada entre *equivalente* de fenol e absorvância para evitar a multiplicação do resultado por dois, já que 0,5g de amostra foi utilizada.

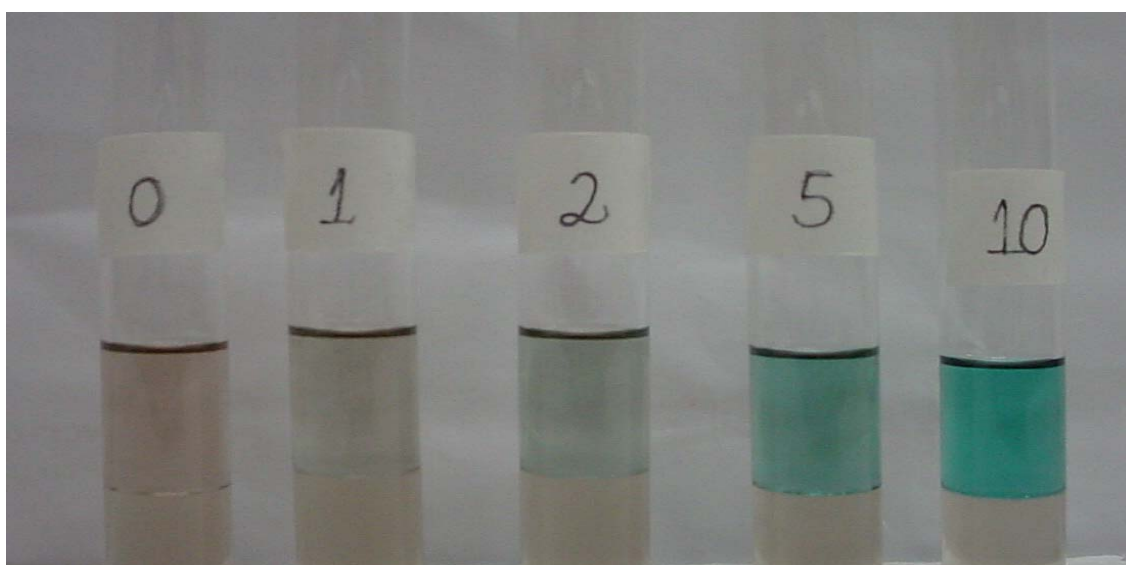


Figura 1E – Fotografia de curva de calibração utilizada no experimento.

**ANEXO F**  
**RESULTADOS DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO**

Atividades de fosfatase alcalina obtidas através do método fluorimétrico para 24 amostras de leites cru e 24 amostras de leite pasteurizado coletadas nas quatro estações do ano.

Quadro 1F: Atividade de fosfatase alcalina em leite cru durante a primavera.

<b>Repetição</b>	<b>Atividade do Leite Cru (mU/L)</b>	<b>Atividade do Leite Pasteurizado (mU/L)</b>
1	1.373.100	37
2	1.208.100	63
3	1.286.700	16
4	1.380.500	10

Quadro 2F: Atividade de fosfatase alcalina em leite cru durante o verão.

<b>Repetição</b>	<b>Atividade do Leite Cru (mU/L)</b>	<b>Atividade do Leite Pasteurizado (mU/L)</b>
1	1.603.400	29
2	1.583.700	19
3	1.597.000	16
4	1.510.000	35
5	1.517.000	16
6	1.632.900	39
7	1.325.800	22
8	1.593.300	23
9	2.009.300	10

Quadro 3F: Atividade de fosfatase alcalina em leite cru durante o outono.

<b>Repetição</b>	<b>Atividade do Leite Cru (mU/L)</b>	<b>Atividade do Leite Pasteurizado (mU/L)</b>
1	1.420.000	39
2	1.232.900	51
3	1.365.800	37
4	1.417.700	36

Quadro 4F: Atividade de fosfatase alcalina em leite cru durante o inverno.

<b>Repetição</b>	<b>Atividade do Leite Cru (mU/L)</b>	<b>Atividade do Leite Pasteurizado (mU/L)</b>
1	1.284.900	58
2	1.318.000	49
3	1.336.800	53
4	1.040.300	39
5	999.400	58
6	1.363.500	49
7	1.056.400	49
8	980.100	45

Atividades de fosfatase alcalina residual obtidas através do método fluorimétrico para as amostras de queijo Minas Padrão nas dez concentrações.

Quadro 5F:  
Tratamento 1 - 0,000%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	110
2	138
3	100
4	138
5	110
6	110
7	138
8	110
9	110

Quadro 6F:  
Tratamento 2 - 0,010%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	331
2	317
3	359
4	317
5	303
6	303
7	372
8	359
9	359

Quadro 7F:  
Tratamento 3 - 0,015%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	423
2	395
3	317
4	409
5	423
6	395
7	423
8	372
9	345

Quadro 8F:  
Tratamento 4 - 0,020%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	506
2	478
3	395

Quadro 9F:  
Tratamento 5 - 0,050%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	1.085
2	1.057
3	781

Quadro 10F:  
Tratamento 6 - 0,080%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	1.945
2	1.673
3	1.135

Quadro 11F:  
Tratamento 7 - 0,100%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	2.193
2	1.876
3	1.453

Quadro 12F:  
Tratamento 8 - 0,500%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	8.840
2	6.854
3	9.116
4	7.760
5	7.429
6	9.102

Quadro 13F:  
Tratamento 9 - 0,800%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	14.327
2	15.120
3	17.983
4	13.308
5	12.747
6	15.611

Quadro 14F:  
Tratamento 10 - 1,000%

Repetição	Atividade (mU/Kg)
1	17.763
2	18.066
3	20.889
4	17.023
5	15.598
6	20.737

Análise estatística dos dados obtidos através do método fluorimétrico.

Quadro 15F: Análise estatística para 10 tratamentos avaliados pelo método Fluorimétrico.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>
(Tratamento)	(9)	(288.044.296)
Regressão	1	2.580.124.522 *
Falta de Ajuste	8	1.534.268 ns
Erro Puro	47	1.585.290

\* Significativo em 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

ns Não-significativo em 5% de probabilidade ( $P > 0.05$ )

Quadro 16F: Análise estatística para 3 tratamentos avaliados pelo método Fluorimétrico.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>
(Tratamento)	(2)	(185.224)
Regressão	1	362.638 *
Falta de Ajuste	1	7.810 *
Erro Puro	26	792

\* Significativo em 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

Na faixa de atividade de 350mU/Kg, embora o modelo linear tenha apresentado falta de ajuste significativa, ele foi considerado bom na explicação da relação estudada. Isto porque além do coeficiente de determinação ser bastante elevado, a regressão utilizou a maior parte dos dados.

**ANEXO G**  
**RESULTADOS DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER**

Resultados obtidos através do método Rápido de Scharer (visual e espectrofotométrico) para as cinco repetições.

**REPETIÇÃO 1:**

Quadro 1G: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 1.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,058	0,058	0,059	0,058	0,001
C.N*		-	0,059	0,060	0,061	0,060	0,001
C.N*		-	0,060	0,063	0,060	0,061	0,002
1	0,000	-	0,057	0,060	0,058	0,058	0,002
1	0,000	-	0,057	0,059	0,060	0,059	0,002
1	0,000	-	0,059	0,058	0,058	0,058	0,001
2	0,010	-	0,059	0,058	0,057	0,058	0,001
2	0,010	-	0,059	0,059	0,060	0,059	0,001
2	0,010	-	0,059	0,062	0,058	0,060	0,002
3	0,015	-	0,059	0,059	0,059	0,059	0,000
3	0,015	-	0,060	0,060	0,062	0,061	0,001
3	0,015	-	0,058	0,059	0,060	0,059	0,001
4	0,500	+	0,075	0,075	0,076	0,075	0,001
4	0,500	+	0,077	0,078	0,078	0,078	0,001
4	0,500	+	0,077	0,075	0,077	0,076	0,001
5	0,800	+	0,091	0,090	0,093	0,091	0,002
5	0,800	+	0,097	0,102	0,102	0,100	0,003
5	0,800	+	0,093	0,096	0,093	0,094	0,002
6	1,000	+	0,102	0,094	0,098	0,098	0,004
6	1,000	+	0,102	0,100	0,103	0,102	0,002
6	1,000	+	0,096	0,098	0,102	0,099	0,003

Quadro 2G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 1.

Queijo	Método Visual	% Leite Cru	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*	-		0,060	0,001	0,000		
1	-	0,000	0,058	0,000	-0,002	0,521	110
2	-	0,010	0,059	0,001	-0,001	0,637	303
3	-	0,015	0,060	0,001	0,000	0,753	345
4	+	0,500	0,076	0,001	0,016	2,605	9.102
5	+	0,800	0,095	0,005	0,035	4,805	15.611
6	+	1,000	0,100	0,002	0,040	5,384	20.737

\* Controle Negativo

## **REPETIÇÃO 2:**

Quadro 3G: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 2.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,055	0,057	0,058	0,057	0,002
C.N*		-	0,057	0,059	0,059	0,058	0,001
C.N*		-	0,054	0,057	0,057	0,056	0,002
1	0,000	-	0,057	0,059	0,060	0,059	0,002
1	0,000	-	0,057	0,058	0,058	0,058	0,001
1	0,000	-	0,057	0,058	0,060	0,058	0,002
2	0,010	-	0,061	0,063	0,062	0,062	0,001
2	0,010	-	0,063	0,061	0,060	0,061	0,002
2	0,010	-	0,062	0,063	0,061	0,062	0,001
3	0,015	-	0,064	0,063	0,069	0,065	0,003
3	0,015	-	0,062	0,063	0,062	0,062	0,001
3	0,015	-	0,061	0,061	0,062	0,061	0,001
4	0,500	+	0,074	0,081	0,081	0,079	0,004
4	0,500	+	0,075	0,086	0,079	0,080	0,006
4	0,500	+	0,075	0,076	0,076	0,076	0,001
5	0,800	+	0,088	0,085	0,086	0,086	0,002
5	0,800	+	0,085	0,106	0,089	0,093	0,011
5	0,800	+	0,089	0,089	0,088	0,089	0,001
6	1,000	+	0,092	0,098	0,100	0,097	0,004
6	1,000	+	0,099	0,094	0,096	0,096	0,003
6	1,000	+	0,087	0,096	0,098	0,094	0,006

Quadro 4G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 2.

Queijo	Método Visual	% Leite Cru	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*	-		0,057	0,001	0,000		
1	-	0,000	0,058	0,001	0,001	0,012	110
2	-	0,010	0,062	0,000	0,005	0,495	303
3	-	0,015	0,063	0,002	0,006	0,616	372
4	+	0,050	0,078	0,002	0,021	2,429	7.429
5	+	0,800	0,089	0,004	0,032	3,758	12.747
6	+	1,000	0,096	0,002	0,039	4,604	15.598

\* Controle Negativo

### **REPETIÇÃO 3:**

Quadro 5G: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 3.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,061	0,061	0,063	0,062	0,001
C.N*		-	0,066	0,064	0,064	0,065	0,001
C.N*		-	0,062	0,063	0,064	0,063	0,001
1	0,000	-	0,059	0,057	0,059	0,058	0,001
1	0,000	-	0,059	0,059	0,059	0,059	0,000
1	0,000	-	0,058	0,059	0,060	0,059	0,001
2	0,010	-	0,057	0,060	0,061	0,059	0,002
2	0,010	-	0,062	0,061	0,058	0,060	0,002
2	0,010	-	0,061	0,061	0,060	0,061	0,001
3	0,015		0,060	0,063	0,063	0,062	0,002
3	0,015	-	0,061	0,061	0,065	0,062	0,002
3	0,015	-	0,062	0,064	0,062	0,063	0,001
4	0,500	+	0,082	0,086	0,085	0,084	0,002
4	0,500	+	0,086	0,087	0,089	0,087	0,002
4	0,500	+	0,085	0,086	0,085	0,085	0,001
5	0,800	+	0,097	0,100	0,094	0,097	0,003
5	0,800	+	0,095	0,091	0,096	0,094	0,003
5	0,800	+	0,100	0,098	0,104	0,101	0,003
6	1,000	+	0,103	0,110	0,101	0,105	0,005
6	1,000	+	0,103	0,102	0,104	0,103	0,001
6	1,000	+	0,100	0,103	0,099	0,101	0,002

Quadro 6G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 3.

Queijo	Método Visual	% Leite Cru	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*	-		0,063	0,002	0,000		
1	-	0,000	0,059	0,000	-0,004	-0,849	138
2	-	0,010	0,060	0,001	-0,003	-0,724	317
3	-	0,015	0,062	0,000	-0,001	-0,474	423
4	+	0,500	0,085	0,002	0,022	2,396	7.760
5	+	0,800	0,097	0,003	0,034	3,894	13.308
6	+	1,000	0,103	0,002	0,040	4,643	17.023

\*Controle Negativo

**REPETIÇÃO 4:**

Quadro 7G: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 4.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,063	0,061	0,064	0,063	0,002
C.N*		-	0,058	0,061	0,062	0,060	0,002
C.N*		-	0,062	0,062	0,062	0,062	0,000
1	0,000	-	0,053	0,053	0,057	0,054	0,002
1	0,000	-	0,050	0,052	0,052	0,051	0,001
1	0,000	-	0,051	0,053	0,059	0,054	0,004
2	0,010	-	0,060	0,052	0,060	0,057	0,005
2	0,010	-	0,052	0,060	0,070	0,061	0,009
2	0,010	-	0,061	0,067	0,061	0,063	0,003
3	0,015	-	0,056	0,063	0,058	0,059	0,004
3	0,015	-	0,058	0,054	0,052	0,055	0,003
3	0,015	-	0,050	0,053	0,056	0,053	0,003
4	0,500	+	0,088	0,087	0,084	0,086	0,002
4	0,500	+	0,079	0,087	0,084	0,083	0,004
4	0,500	+	0,084	0,081	0,086	0,084	0,003
5	0,800	+	0,107	0,109	0,105	0,107	0,002
5	0,800	+	0,100	0,101	0,107	0,103	0,004
5	0,800	+	0,100	0,096	0,095	0,097	0,003
6	1,000	+	0,101	0,107	0,104	0,104	0,003
6	1,000	+	0,106	0,110	0,102	0,106	0,004
6	1,000	+	0,102	0,104	0,108	0,105	0,003

Quadro 8G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 4.

Amostra	Método Visual	% Leite Cru	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*	-		0,062	0,001	0,000		
1	-	0,000	0,053	0,002	-0,009	-0,935	110
2	-	0,010	0,060	0,003	-0,002	-0,085	359
3	-	0,015	0,056	0,003	-0,006	-0,571	395
4	+	0,500	0,084	0,002	0,022	2,829	9.116
5	+	0,800	0,102	0,005	0,040	5,014	17.983
6	+	1,000	0,105	0,001	0,043	5,378	20.889

\* Controle Negativo

**REPETIÇÃO 5:**

Quadro 9G: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 5.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,057	0,059	0,054	0,057	0,003
C.N*		-	0,056	0,055	0,057	0,056	0,001
C.N*		-	0,055	0,057	0,055	0,056	0,001
1	0,000	-	0,056	0,059	0,056	0,057	0,002
1	0,000	-	0,057	0,057	0,060	0,058	0,002
1	0,000	-	0,059	0,056	0,057	0,057	0,002
2	0,010	-	0,058	0,060	0,058	0,059	0,001
2	0,010	-	0,060	0,057		0,059	0,002
2	0,010	-	0,056	0,055	0,052	0,054	0,002
3	0,015	-	0,052	0,052	0,052	0,052	0,000
3	0,015	--	0,056	0,055	0,055	0,055	0,001
3	0,015	-	0,055	0,057	0,055	0,056	0,001
4	0,500	-	0,065	0,072	0,068	0,068	0,004
4	0,500	-	0,068	0,068	0,073	0,070	0,003
4	0,500	-	0,064	0,066	0,068	0,066	0,002
5	0,800	-	0,072	0,071	0,073	0,072	0,001
5	0,800	-	0,071	0,074	0,072	0,072	0,002
5	0,800	-	0,065	0,073	0,074	0,071	0,005
6	1,000	+	0,075	0,080	0,078	0,078	0,003
6	1,000	+	0,072	0,072	0,075	0,073	0,002
6	1,000	+	0,084	0,080	0,087	0,084	0,004

Quadro 10G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Espectrofotométrico e Fluorimétrico na repetição 5.

Queijo	Método Visual	% Leite Cru	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*			0,056	0,001	0,000		
1	-	0,000	0,057	0,001	0,001	-0,169	138
2	-	0,010	0,057	0,002	0,001	-0,169	331
3	-	0,015	0,054	0,002	-0,002	-0,531	409
4	-	0,500	0,068	0,002	0,012	1,158	8.840
5	-	0,800	0,072	0,001	0,016	1,641	14.327
6	+	1,000	0,078	0,005	0,022	2,365	17.763

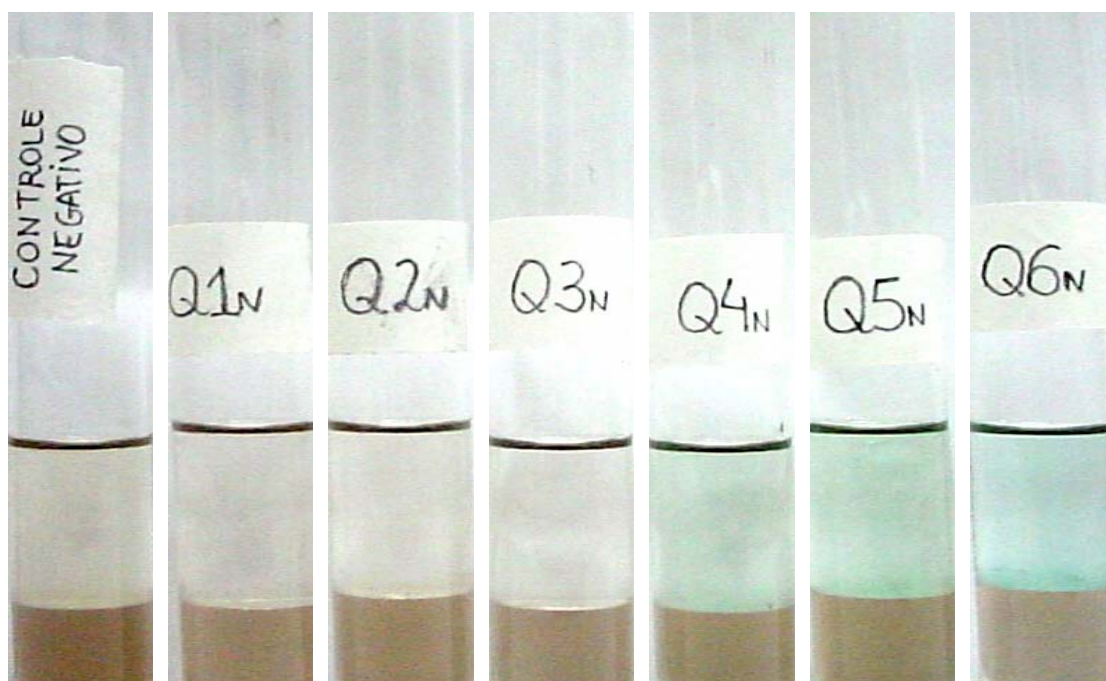
\* Controle Negativo

## **RESUMO DAS 5 REPETIÇÕES:**

Quadro 11G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio do método Rápido de Scharer Visual em 6 repetições.

<b>Queijo</b>	<b>% Leite Cru</b>	<b>Resultados Positivos em 5 Repetições</b>	
Controle Negativo		0	0%
1	0,000	0	0%
2	0,010	0	0%
3	0,015	0	0%
4	0,500	4	80%
5	0,800	4	80%
6	1,000	5	100%

O resultado de cada repetição é decorrente da média do resultado das replicatas. Todas as três replicatas de cada repetição apresentaram mesmo resultado.



<b>Controle Negativo</b>	<b>0%</b>	<b>0,010%</b>	<b>0,015%</b>	<b>0,5%</b>	<b>0,8%</b>	<b>1,0%</b>
	138mU/Kg	331mU/Kg	409mU/Kg	8.840mU/Kg	14.327mU/Kg	17.763mU/Kg

Figura 1G: Fotografia de análise de queijo realizada pelo método Rápido Scharer Visual.

Quadro 12G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico em 5 repetições (R).

Queijo	% Leite Cru	Fenol (µg/g)					Média	Desvio-Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5		
1	0,000	0,521	0,012	-0,849	-0,935	-0,169	-0,284	0,611
2	0,010	0,637	0,495	-0,724	-0,085	-0,169	0,031	0,549
3	0,015	0,753	0,616	-0,474	-0,571	-0,531	-0,041	0,665
4	0,500	2,605	2,429	2,396	2,829	1,158	2,283	0,652
5	0,800	4,805	3,758	3,894	5,014	1,641	3,822	1,337
6	1,000	5,384	4,604	4,643	5,378	2,365	4,475	1,239

Quadro 13G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio do método Fluorimétrico em 5 repetições (R).

Queijo	% Leite Cru	Atividade (mU/Kg)					Média	Desvio-Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5		
1	0,000	110	110	138	110	138	121	15
2	0,010	303	303	317	359	331	323	23
3	0,015	345	372	423	395	409	389	31
4	0,500	9.102	7.429	7.760	9.116	8.840	8.449	797
5	0,800	15.611	12.747	13.308	17.983	14.327	14.795	2.089
6	1,000	20.737	15.598	17.023	20.889	17.763	18.402	2.335

Quadro 14G: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer e Fluorimétrico 5 repetições (R).

Queijo	% Leite Cru	Média de Fenol (µg/g)	Média de Atividade (mU/Kg)
1	0,000	-0,284	121
2	0,010	0,031	323
3	0,015	-0,041	389
4	0,500	2,283	8.449
5	0,800	3,822	14.795
6	1,000	4,475	18.402

Curvas de Calibração utilizadas no Método Rápido de Scharer Espectrofotométrico.

### **REPETIÇÃO 1:**

Quadro 15G: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 1.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,142	0,151	0,140	0,144	0,000
1,0	0,221	0,206	0,204	0,210	0,066
2,0	0,265	0,273	0,272	0,270	0,126
5,0	0,476	0,469	0,473	0,473	0,329
10,0	0,796	0,798	0,907	0,834	0,690

Equação:  $y = 0,0691x - 0,0065$  com  $R^2 = 0,9993$

**REPETIÇÃO 2:**

Quadro 16G: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 2.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,143	0,144	0,133	0,140	0,000
1,0	0,192	0,212	0,213	0,206	0,066
2,0	0,274	0,277	0,275	0,275	0,135
5,0	0,468	0,457	0,494	0,473	0,333
10,0	0,832	0,796	0,778	0,802	0,662

Equação:  $\hat{y} = 0,0662x + 0,0009$  com  $R^2 = 1,000$

**REPETIÇÃO 3:**

Quadro 17G: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 3.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,154	0,162	0,154	0,157	0,000
1,0	0,215	0,236	0,232	0,228	0,071
2,0	0,278	0,292	0,277	0,282	0,126
5,0	0,474	0,477	0,509	0,487	0,330
10,0	0,801	0,777	0,816	0,798	0,641

Equação:  $\hat{y} = 0,0641x + 0,0028$  com  $R^2 = 0,9996$

**REPETIÇÃO 4:**

Quadro 18G: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Espectrofotométrico na repetição 4.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,111	0,120	0,122	0,118	0,000
1,0	0,170	0,187	0,165	0,174	0,056
2,0	0,264	0,240	0,254	0,253	0,135
5,0	0,442	0,456	0,456	0,451	0,333
10,0	0,797	0,767	0,756	0,773	0,655

Equação:  $\hat{y} = 0,0659x - 0,0013$  com  $R^2 = 0,9996$

**REPETIÇÃO 5:**

Quadro 19G: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 5.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,186	0,183	0,174	0,181	0,000
1,0	0,244	0,266	0,243	0,251	0,070
2,0	0,311	0,281	0,340	0,311	0,130
5,0	0,522	0,528	0,526	0,525	0,344
10,0	0,858	0,844	0,823	0,842	0,661

Equação:  $\hat{y} = 0,0663x + 0,0024$  com  $R^2 = 0,9994$

Análise estatística dos dados obtidos por meio do método Rápido de Scharer Espectrofotométrico.

Quadro 20G: Análise estatística para 6 tratamentos avaliados pelo método Rápido de Scharer.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>
(Tratamento)	(5)	(22,30)
Regressão	1	111,08*
Falta de Ajuste	8	0,10 ns
Erro Puro	47	0,81

\* Significativo em 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

ns Não-significativo em 5% de probabilidade ( $P > 0.05$ )

Quadro 21G: Análise estatística para 3 tratamentos avaliados pelo método Rápido de Scharer.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>
(Tratamento)	(2)	(0,14)
Regressão	1	0,20 ns
Falta de Ajuste	1	0,07 ns
Erro Puro	12	0,80

ns Não-significativo em 5% de probabilidade ( $P < 0.05$ )

**ANEXO H**  
**RESULTADOS DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER ADAPTADO**

Resultados obtidos através do método Rápido de Scharer Rápido Adaptado (visual e espectrofotométrico) para as cinco repetições.

**REPETIÇÃO 1:**

Quadro 1H: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado na repetição 1.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,059	0,053	0,055	0,056	0,003
C.N*		-	0,057	0,055	0,053	0,055	0,002
C.N*		-	0,056	0,054	0,055	0,055	0,001
1	0,000	-	0,055	0,057	0,055	0,056	0,001
1	0,000	-	0,059	0,056	0,057	0,057	0,002
1	0,000	-	0,056	0,060	0,061	0,059	0,003
2	0,010	+	0,079	0,073	0,074	0,075	0,003
2	0,010	+	0,081	0,072	0,074	0,076	0,005
2	0,010	+	0,077	0,074	0,079	0,077	0,003
3	0,015	+	0,076	0,082	0,078	0,079	0,003
3	0,015	+	0,084	0,079	0,086	0,083	0,004
3	0,015	+	0,084	0,078	0,081	0,081	0,003
4	0,500	+	0,696	0,727	0,765	0,729	0,035
4	0,500	+	0,647	0,676	0,734	0,686	0,044
4	0,500	+	0,684	0,677	0,569	0,643	0,064
5	0,800	+	0,840	0,828	0,771	0,813	0,037
5	0,800	+	0,728	0,913	0,985	0,875	0,133
5	0,800	+	0,900	1,023	0,887	0,937	0,075
6	1,000	+	0,897	1,021	1,053	0,990	0,082
6	1,000	+	0,958	1,069	1,057	1,028	0,061
6	1,000	+	1,040	0,963	0,925	0,976	0,059

Quadro 2H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico na repetição 1.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*		-	0,055	0,000	0,000		
1	0,000	-	0,057	0,002	0,002	0,027	110
2	0,010	+	0,076	0,001	0,021	0,088	303
3	0,015	+	0,081	0,002	0,026	0,103	345
4	0,500	+	0,686	0,043	0,631		9.102
5	0,800	+	0,875	0,062	0,820		15.611
6	1,000	+	0,998	0,027	0,943		20.737

\* Controle Negativo

## **REPETIÇÃO 2:**

Quadro 3H: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado na repetição 2.

<b>Queijo</b>	<b>% Leite Cru</b>	<b>Método Visual</b>	<b>Absorvância Absoluta 1</b>	<b>Absorvância Absoluta 2</b>	<b>Absorvância Absoluta 3</b>	<b>Absorvância Média</b>	<b>Desvio-Padrão</b>
C.N*		-	0,053	0,058	0,058	0,056	0,003
C.N*		-	0,053	0,053	0,052	0,053	0,001
C.N*		-	0,051	0,053	0,052	0,052	0,001
1	0,000	-	0,052	0,053	0,054	0,053	0,001
1	0,000	-	0,054	0,056	0,057	0,056	0,002
1	0,000	-	0,056	0,056	0,058	0,057	0,001
2	0,010	+	0,071	0,076	0,078	0,075	0,004
2	0,010	+	0,07	0,076	0,075	0,074	0,003
2	0,010	+	0,076	0,08	0,072	0,076	0,004
3	0,015	+	0,073	0,072	0,076	0,074	0,002
3	0,015	+	0,075	0,076	0,081	0,077	0,003
3	0,015	+	0,077	0,077	0,081	0,078	0,002
4	0,500	+	0,592	0,511	0,541	0,548	0,041
4	0,500	+	0,601	0,604	0,617	0,607	0,009
4	0,500	+	0,625	0,703	0,752	0,693	0,064
5	0,800	+	0,959	0,981	0,806	0,915	0,095
5	0,800	+	0,942	1,16	0,898	1,000	0,140
5	0,800	+	0,853	1,021	0,765	0,880	0,130
6	1,000	+	0,914	0,961	0,939	0,938	0,024
6	1,000	+	0,958	0,977	1,015	0,983	0,029
6	1,000	+	1,089	0,973	0,933	0,998	0,081

Quadro 4H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico na repetição 2.

<b>Queijo</b>	<b>% Leite Cru</b>	<b>Método Visual</b>	<b>Absorvância Média</b>	<b>Desvio-Padrão</b>	<b>Absorvância Líquida</b>	<b>Fenol (µg/g)</b>	<b>Atividade (mU/Kg)</b>
C.N*		-	0,054	0,002	0,000		
1	0,000	-	0,055	0,002	0,001	0,000	110
2	0,010	+	0,075	0,001	0,021	0,067	303
3	0,015	+	0,076	0,002	0,022	0,070	372
4	0,050	+	0,616	0,073	0,562		7.429
5	0,800	+	0,932	0,062	0,878		12.747
6	1,000	+	0,973	0,031	0,919		15.598

\* Controle Negativo

### **REPETIÇÃO 3:**

Quadro 5H: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado na repetição 3.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,052	0,051	0,048	0,050	0,002
C.N*		-	0,051	0,052	0,053	0,052	0,001
C.N*		-	0,052	0,052	0,054	0,053	0,001
1	0,000	-	0,058	0,062	0,061	0,060	0,002
1	0,000	-	0,057	0,058	0,060	0,058	0,002
1	0,000	-	0,059	0,061	0,059	0,060	0,001
2	0,010	+	0,074	0,073	0,075	0,074	0,001
2	0,010	+	0,074	0,070	0,072	0,072	0,002
2	0,010	+	0,072	0,073	0,073	0,073	0,001
3	0,015	+	0,076	0,077	0,091	0,081	0,008
3	0,015	+	0,085	0,083	0,082	0,083	0,002
3	0,015	+	0,088	0,092	0,086	0,089	0,003
4	0,500	+	0,696	0,573	0,470	0,580	0,113
4	0,500	+	0,517	0,602	0,495	0,538	0,057
4	0,500	+	0,465	0,596	0,493	0,518	0,069
5	0,800	+	0,667	0,625	0,576	0,623	0,046
5	0,800	+	0,651	0,633	0,658	0,647	0,013
5	0,800	+	0,616	0,654		0,635	0,027
6	1,000	+	0,526	0,677	0,695	0,633	0,093
6	1,000	+	0,617	0,654	0,613	0,628	0,023
6	1,000	+	0,566	0,665	0,693	0,641	0,067

Quadro 6H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico na repetição 3.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*		-	0,052	0,001	0,000		
1	0,000	-	0,059	0,001	0,007	0,014	138
2	0,010	+	0,073	0,001	0,021	0,062	317
3	0,015	+	0,084	0,004	0,032	0,100	423
4	0,500	+	0,545	0,031	0,493		7.760
5	0,800	+	0,635	0,012	0,583		13.308
6	1,000	+	0,634	0,007	0,582		17.023

\* Controle Negativo

**REPETIÇÃO 4:**

Quadro 7H: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado na repetição 4.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,064	0,061	0,055	0,060	0,005
C.N*		-	0,053	0,056	0,055	0,055	0,002
C.N*		-	0,052	0,054	0,052	0,053	0,001
1	0,000	-	0,056	0,056	0,056	0,056	0,000
1	0,000	-	0,055	0,054	0,053	0,054	0,001
1	0,000	-	0,057	0,057	0,059	0,058	0,001
2	0,010	+	0,081	0,091	0,079	0,084	0,006
2	0,010	+	0,086	0,091	0,086	0,088	0,003
2	0,010	+	0,085	0,084	0,081	0,083	0,002
3	0,015	+	0,088	0,074	0,084	0,082	0,007
3	0,015	+	0,088	0,089	0,087	0,088	0,001
3	0,015	+	0,090	0,094	0,093	0,092	0,002
4	0,500	+	0,707	0,645	0,815	0,722	0,086
4	0,500	+	0,699	0,810	0,774	0,761	0,057
4	0,500	+	0,724	0,825	0,706	0,752	0,064
5	0,800	+	0,949	0,881	1,088	0,973	0,106
5	0,800	+	0,907	1,000	0,952	0,953	0,047
5	0,800	+	0,979	0,799	1,003	0,927	0,111
6	1,000	+	1,021	0,981	1,050	1,017	0,035
6	1,000	+	0,990	1,022	1,034	1,015	0,023
6	1,000	+	0,996	0,977	1,061	1,011	0,044

Quadro 8H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico na repetição 4.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*		-	0,056	0,004	0,000		
1	0,000	-	0,056	0,002	0,000	0,004	110
2	0,010	+	0,085	0,002	0,029	0,101	359
3	0,015	+	0,087	0,005	0,031	0,108	395
4	0,500	+	0,745	0,020	0,689		9.116
5	0,800	+	0,951	0,023	0,895		17.983
6	1,000	+	1,015	0,003	0,959		20.889

\* Controle Negativo

**REPETIÇÃO 5:**

Quadro 9H: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado na repetição 5.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*o		-	0,057	0,057		0,057	0,000
C.N*		-	0,057	0,059	0,060	0,059	0,002
C.N*		-	0,056	0,059	0,059	0,058	0,002
1	0,000	-	0,055	0,054	0,055	0,055	0,001
1	0,000	-	0,057	0,058	0,062	0,059	0,003
1	0,000	-	0,055	0,055	0,056	0,055	0,001
2	0,010	+	0,083	0,076	0,082	0,080	0,004
2	0,010	+	0,082	0,087	0,082	0,084	0,003
2	0,010	+	0,082	0,085	0,083	0,083	0,002
3	0,015	+	0,084	0,087	0,086	0,086	0,002
3	0,015	+	0,097	0,088	0,098	0,094	0,006
3	0,015	+	0,093	0,096	0,094	0,094	0,002
4	0,500	+	0,523	0,649	0,733	0,635	0,106
4	0,500	+	0,626	0,664	0,657	0,649	0,020
4	0,500	+	0,516	0,598	0,617	0,577	0,054
5	0,800	+	0,781	0,780	0,865	0,809	0,049
5	0,800	+	0,677	0,777	0,699	0,718	0,053
5	0,800	+	0,833	0,906	0,918	0,886	0,046
6	1,000	+	0,924	0,968	0,816	0,903	0,078
6	1,000	+	0,822	0,894	1,098	0,938	0,143
6	1,000	+	0,903	0,985	0,798	0,895	0,094

Quadro 10H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico na repetição 5.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*		-	0,058	0,001	0,000		
1	0,000	-	0,056	0,002	-0,002	-0,015	138
2	0,010	+	0,082	0,002	0,024	0,072	331
3	0,015	+	0,091	0,005	0,033	0,102	409
4	0,500	+	0,620	0,038	0,562		8.840
5	0,800	+	0,804	0,084	0,746		14.327
6	1,000	+	0,912	0,023	0,854		17.763

\* Controle Negativo

**REPETIÇÃO 6:**

Quadro 11H: Leitura espectrofotométrica de amostras analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado na repetição 6.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Desvio-Padrão
C.N*		-	0,054	0,055	0,054	0,054	0,001
C.N*		-	0,052	0,052	0,059	0,054	0,004
C.N*		-	0,054	0,061	0,055	0,057	0,004
1	0,000	-	0,061	0,061	0,060	0,061	0,001
1	0,000	-	0,059	0,062	0,065	0,062	0,003
1	0,000	-	0,065	0,062	0,064	0,064	0,002
2	0,010	-	0,080	0,076	0,076	0,077	0,002
2	0,010	-	0,077	0,072	0,072	0,074	0,003
2	0,010	-	0,073	0,075	0,068	0,072	0,004
3	0,015	+	0,086	0,083	0,090	0,086	0,004
3	0,015	+	0,085	0,080	0,086	0,084	0,003
3	0,015	+	0,085	0,086	0,076	0,082	0,006
4	0,500	-	0,620	0,541	0,490	0,550	0,066
4	0,500	-	0,451	0,673	0,573	0,566	0,111
4	0,500	-	0,545	0,620	0,576	0,580	0,038
5	0,800	-	0,789	0,840	0,749	0,793	0,046
5	0,800	-	0,765	0,827	0,784	0,792	0,032
5	0,800	-	0,810	0,926	0,661	0,799	0,133
6	1,000	+	0,847	0,755	0,826	0,809	0,048
6	1,000	+	0,813	0,794	0,601	0,736	0,117
6	1,000	+	0,793	0,828	0,899	0,840	0,054

Quadro 12H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico na repetição 6.

Queijo	% Leite Cru	Método Visual	Absorvância Média	Desvio-Padrão	Absorvância Líquida	Fenol (µg/g)	Atividade (mU/Kg)
C.N*			0,055	0,001	0,000		
1	0,000	-	0,062	0,002	0,007	-0,001	110
2	0,010	-	0,074	0,003	0,019	0,040	221
3	0,015	+	0,084	0,002	0,029	0,075	317
4	0,500	+	0,565	0,015	0,510		6.854
5	0,800	+	0,795	0,004	0,740		15.120
6	1,000	+	0,795	0,053	0,740		18.066

\* Controle Negativo

### RESUMO DAS 6 REPETIÇÕES:

Quadro 13H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual em 6 repetições.

Queijo	% Leite Cru	Resultados Positivos em 6 Repetições	
Controle Negativo		0	0%
1	0,000	0	0%
2	0,010	5	83,33%
3	0,015	6	100%
4	0,500	6	100%
5	0,800	6	100%
6	1,000	6	100%

O resultado de cada repetição é decorrente da média do resultado das replicatas. Todas as três replicatas de cada repetição apresentaram mesmo resultado.

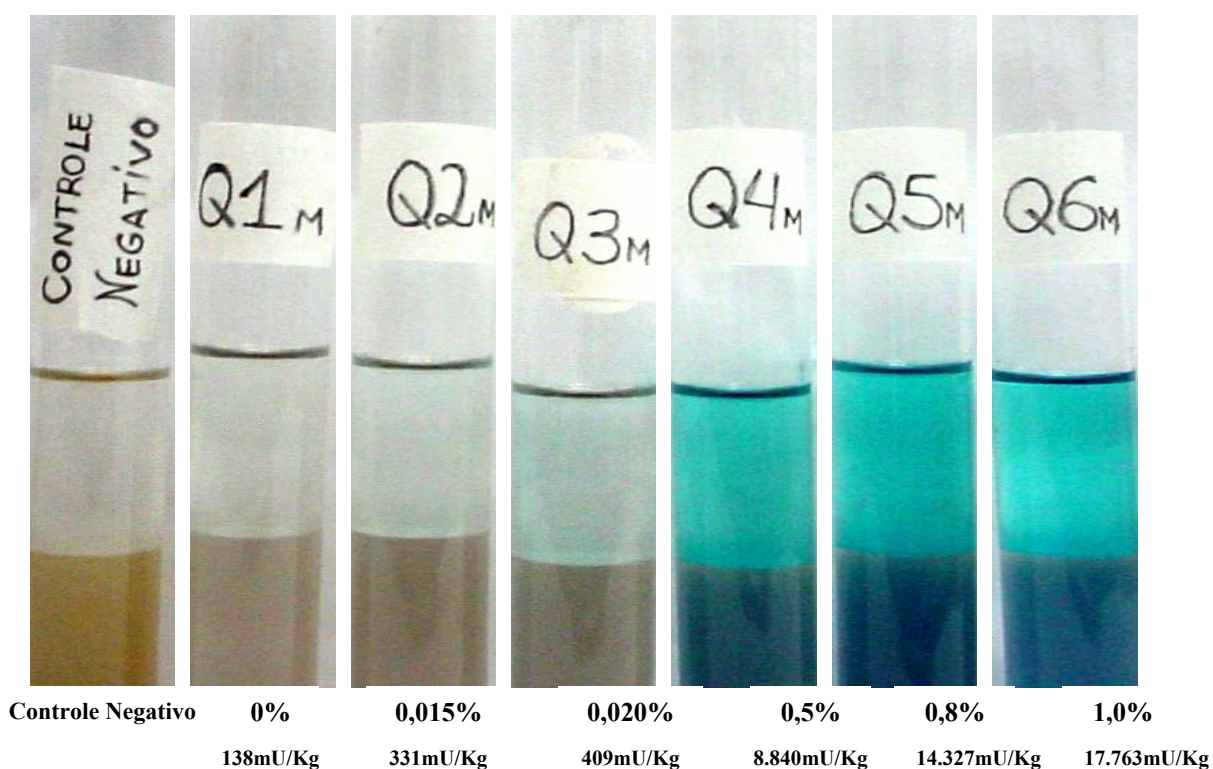


Figura 1H: Fotografia de análise de queijo realizada pelo método Rápido de Scharer Adaptado Visual.

Quadro 14H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico em seis repetições (R).

Queijo	% Leite Cru	Fenol ( $\mu\text{g/g}$ )						Média	Desvio-Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6		
1	0,000	0,027	0,000	0,014	0,004	-0,015	-0,001	0,005	0,014
2	0,010	0,088	0,067	0,062	0,101	0,072	0,040	0,072	0,021
3	0,015	0,103	0,070	0,100	0,108	0,102	0,075	0,093	0,016

Quadro 15H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio do método Fluorimétrico em seis repetições (R).

Queijo	% Leite Cru	Atividade (mU/Kg)						Média	Desvio-Padrão
		R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6		
1	0,000	110	110	138	110	138	110	119	14
2	0,010	303	303	317	359	331	221	306	46
3	0,015	345	372	423	395	409	317	377	40
4	0,500	9.102	7.429	7.760	9.116	8.840	6.854	8.184	965
5	0,800	15.611	12.747	13.308	17.983	14.327	15.120	14.849	1.873
6	1,000	20.737	15.598	17.023	20.889	17.763	18.066	18.346	2.093

Quadro 16H: Atividade de ALP em queijo determinada por meio dos métodos Rápido de Scharer Adaptado e Fluorimétrico seis repetições (R).

Queijo	% Leite Cru	Média de Fenol ( $\mu\text{g/g}$ )	Média de Atividade (mU/Kg)
1	0,000	0,005	119
2	0,010	0,072	306
3	0,015	0,093	377

Curvas de Calibração utilizadas no Método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico.

### **REPETIÇÃO 1:**

Quadro 17H: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,142	0,151	0,140	0,144	0,000
1,0	0,221	0,206	0,204	0,210	0,066
2,0	0,265	0,273	0,272	0,270	0,126
5,0	0,476	0,469	0,473	0,473	0,329
10,0	0,796	0,798	0,907	0,834	0,690

Equação:  $\hat{y} = 0,0691x - 0,0065$  com  $R^2 = 0,9993$

### **REPETIÇÃO 2:**

Quadro 18H: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,143	0,144	0,133	0,140	0,000
1,0	0,192	0,212	0,213	0,206	0,066
2,0	0,274	0,277	0,275	0,275	0,135
5,0	0,468	0,457	0,494	0,473	0,333
10,0	0,832	0,796	0,778	0,802	0,662

Equação:  $\hat{y} = 0,0662x + 0,0009$  com  $R^2 = 1,000$

### **REPETIÇÃO 3:**

Quadro 19H: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 3.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,154	0,162	0,154	0,157	0,000
1,0	0,215	0,236	0,232	0,228	0,071
2,0	0,278	0,292	0,277	0,282	0,126
5,0	0,474	0,477	0,509	0,487	0,330
10,0	0,801	0,777	0,816	0,798	0,641

Equação:  $\hat{y} = 0,0641x + 0,0028$  com  $R^2 = 0,9996$

### **REPETIÇÃO 4:**

Quadro 20H: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 4.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,111	0,120	0,122	0,118	0,000
1,0	0,170	0,187	0,165	0,174	0,056
2,0	0,264	0,240	0,254	0,253	0,135
5,0	0,442	0,456	0,456	0,451	0,333
10,0	0,797	0,767	0,756	0,773	0,655

Equação:  $\hat{y} = 0,0659x - 0,0013$  com  $R^2 = 0,9996$

**REPETIÇÃO 5:**

Quadro 21H: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 5.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,186	0,183	0,174	0,181	0,000
1,0	0,244	0,266	0,243	0,251	0,070
2,0	0,311	0,281	0,340	0,311	0,130
5,0	0,522	0,528	0,526	0,525	0,344
10,0	0,858	0,844	0,823	0,842	0,661

**Equação:**  $\hat{y} = 0,0663x + 0,0024$  com  $R^2 = 0,9994$

**REPETIÇÃO 6:**

Quadro 22H: Curva de calibração na avaliação de queijos pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 6.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,111	0,115	0,116	0,114	0,000
1,0	0,189	0,193	0,195	0,192	0,078
2,0	0,249	0,262	0,230	0,247	0,133
5,0	0,455	0,448	0,428	0,444	0,330
10,0	0,758	0,782	0,724	0,755	0,641

**Equação:**  $\hat{y} = 0,0636x + 0,0074$  com  $R^2 = 0,9994$

Análise estatística dos dados obtidos através do método de Scharer Rápido Adaptado Espectrofotométrico.

Quadro 23H: Análise estatística para 3 tratamentos avaliados pelo método de Scharer Rápido Adaptado Espectrofotométrico

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Quadrado Médio
(Tratamento)	(2)	(0,0127)
Regressão	1	0,0251 *
Falta de Ajuste	1	0,0003 ns
Erro Puro	15	0,0003

\* Significativo em 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ )

ns Não-significativo em 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ )

**ANEXO I**  
**RESULTADOS DAS ANÁLISES DE QUEIJOS COMERCIAIS**

Resultados obtidos nas análises de amostras comerciais de queijo minas padrão através dos métodos Rápido de Scharer Adaptado (visual e espectrofotométrico) e Fluorimétrico para 3 repetições.

**REPETIÇÃO 1:**

Quadro 1I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Fluorimétrico na repetição 1.

Empresa	Amostra	Atividade (mU/Kg)
A	C.Microbiano*	138
A	A	<b>1.480</b>
B	C.Microbiano*	<100
B	B	<b>2.179</b>
C	C.Microbiano*	207
C	C	<b>2.082</b>
D	C.Microbiano*	
D	D	179
E	C.Microbiano*	
E	E	165
F	C.Microbiano*	207
F	F	<b>2.055</b>

Negrito corresponde às amostras com atividades superiores a 350mU/Kg.

\* Controle Microbiano

Quadro 2I: Leitura espectrofotométrica de amostras comerciais analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.

Empresa	Amostra	Absorvância	Absorvância	Absorvância	Absorvância	Desvio-Padrão
		Absoluta 1	Absoluta 2	Absoluta 3	Média	
D	C.Negativo**	0,057	0,057	0,057	0,057	0,000
D	C.Negativo**	0,058	0,057	0,061	0,059	0,002
D	C.Negativo**	0,053	0,055	0,056	0,055	0,002
D	1	0,072	0,061	0,059	0,064	0,007
D	1	0,073	0,06	0,065	0,066	0,007
D	1	0,077	0,075	0,062	0,071	0,008
E	C.Negativo**	0,057	0,056	0,056	0,056	0,001
E	C.Negativo**	0,056	0,058	0,059	0,058	0,002
E	C.Negativo**	0,058	0,057	0,058	0,058	0,001
E	1	0,068	0,066	0,069	0,068	0,002
E	1	0,073	0,069		0,071	0,003
E	1	0,071	0,069	0,069	0,07	0,001

\*\* Controle Negativo

Quadro 3I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.

Empresa	Amostra	Método	Absorvância	Desvio-Padrão	Absorvância	Fenol (µg/g)
		Visual	Média		Líquida	
D	C.Negativo**	-	0,057	0,002	0,000	
D	1	-	0,067	0,004	0,010	0,032
E	C.Negativo**	-	0,057	0,001	0,000	
E	1	-	0,070	0,002	0,013	0,041

\*\* Controle Negativo

Quadro 4I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual na repetição 1.

<b>Empresa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Método Visual</b>
A	C.Negativo**	-
A	C.Negativo**	-
A	C.Negativo**	-
A	1	+
A	1	+
A	1	+
B	C.Negativo**	-
B	C.Negativo**	-
B	C.Negativo**	-
B	1	+
B	1	+
B	1	+
C	C.Negativo**	-
C	C.Negativo**	-
C	C.Negativo**	-
C	1	+
C	1	+
C	1	+
D	C.Negativo**	-
D	C.Negativo**	-
D	C.Negativo**	-
D	1	-
D	1	-
D	1	-
E	C.Negativo**	-
E	C.Negativo**	-
E	C.Negativo**	-
E	1	-
E	1	-
E	1	-
F	C.Negativo**	-
F	C.Negativo**	-
F	C.Negativo**	-
F	1	+
F	1	+
F	1	+

\*\* Controle Negativo

## **REPETIÇÃO 2:**

Quadro 5I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Fluorimétrico na repetição 2.

<b>Empresa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Atividade (mU/Kg)</b>
A	C.Microbiano*	152
A	A	<b>961</b>
B	C.Microbiano*	221
B	B	<b>2726</b>
C	C.Microbiano*	152
C	C	<b>2629</b>
D	C.Microbiano*	
D	D	276
F	C.Microbiano*	179
F	F	<b>1370</b>

Negrito corresponde às amostras com atividades superiores a 350mU/Kg.

\* Controle Microbiano

Quadro 6I: Leitura espectrofotométrica de queijos comerciais analisadas por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.

<b>Empresa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Desvio-Padrão</b>
		<b>Absoluta 1</b>	<b>Absoluta 2</b>	<b>Absoluta 3</b>	<b>Média</b>	
D	C.Negativo**	0,055	0,053	0,052	0,053	0,002
D	C.Negativo**	0,056	0,056	0,06	0,057	0,002
D	C.Negativo**	0,052	0,052	0,054	0,053	0,001
D	1	0,056	0,069	0,06	0,062	0,007
D	1	0,065		0,064	0,065	0,001
D	1	0,06	0,06	0,061	0,06	0,001

\*\*Controle Negativo

Quadro 7I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual Espectrofotométrico na repetição 2.

<b>Empresa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Método</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Desvio-Padrão</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Fenol (µg/g)</b>
		<b>Visual</b>	<b>Média</b>	<b>Padrão</b>	<b>Líquida</b>	
D	C.Negativo**	-	0,054	0,002	0	
D	1	-	0,062	0,003	0,008	0,019

Negrito corresponde às amostras com resultado positivo.

\*\*Controle Negativo

Quadro 8I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual na repetição 2.

<b>Empresa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Método Visual</b>
A	C.Negativo**	-
A	C.Negativo**	-
A	C.Negativo**	-
A	1	+
A	1	+
A	1	+
B	C.Negativo**	-
B	C.Negativo**	-
B	C.Negativo**	-
B	1	+
B	1	+
B	1	+
C	C.Negativo**	-
C	C.Negativo**	-
C	C.Negativo**	-
C	1	+
C	1	+
C	1	+
D	C.Negativo**	-
D	C.Negativo**	-
D	C.Negativo**	-
D	1	-
D	1	-
D	1	-
F	C.Negativo**	-
F	C.Negativo**	-
F	C.Negativo**	-
F	1	+
F	1	+
F	1	+

\*\* Controle Negativo

### **REPETIÇÃO 3:**

Quadro 9I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Fluorimétrico na repetição 3.

<b>Empresa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Atividade (mU/Kg)</b>
A	C.Microbiano*	152
A	A	<b>14.816</b>
B	C.Microbiano*	165
B	B	<b>6.266</b>
D	C.Microbiano*	248
D	D	<b>671</b>
E	C.Microbiano*	165
E	E	<b>1.384</b>
F	C.Microbiano*	331
F	F	<b>2.496</b>

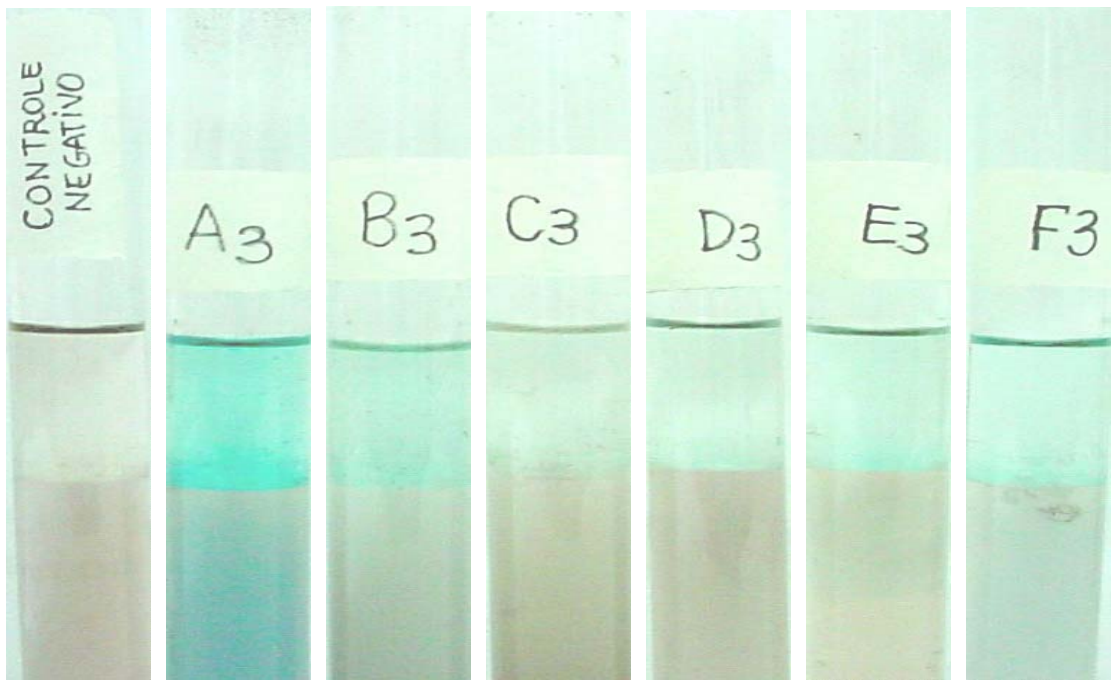
Negrito corresponde às amostras com atividade superior a 350mU/Kg.

\* Controle Microbiano

Quadro 10I: Atividade de ALP em queijos comerciais determinada por meio do método Rápido de Scharer Adaptado Visual na repetição 3.

<b>Empresa</b>	<b>Amostra</b>	<b>Método Visual</b>
A	C.Negativo**	-
A	C.Negativo**	-
A	C.Negativo**	-
A	1	+
A	1	+
A	1	+
B	C.Negativo**	-
B	C.Negativo**	-
B	C.Negativo**	-
B	1	+
B	1	+
B	1	+
C	C.Negativo**	-
C	C.Negativo**	-
C	C.Negativo**	-
C	1	+
C	1	+
C	1	+
D	C.Negativo**	-
D	C.Negativo**	-
D	C.Negativo**	-
D	1	+
D	1	+
D	1	+
F	C.Negativo**	-
F	C.Negativo**	-
F	C.Negativo**	-
F	1	+
F	1	+
F	1	+

\*\* Controle Negativo



Controle Negativo 14.816mU/Kg 6.266mU/Kg 2.685mU/Kg 671mU/Kg 1.384mU/Kg 2.496mU/Kg

Figura 1I: Fotografia de análise de queijo comercial pelo método Rápido de Scharer Adaptado Visual.

Curvas de Calibração utilizadas no método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico.

**REPETIÇÃO 1:**

Quadro 11I: Curva de calibração na avaliação de queijos comerciais pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 1.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,096	0,105	0,098	0,1	0
1,0	0,158	0,18	0,184	0,174	0,074
2,0	0,221	0,237	0,203	0,22	0,12
5,0	0,485	0,482	0,478	0,482	0,382
10,0	0,827	0,767	0,803	0,799	0,699

**Equação:**  $\hat{y} = 0,0709x - 0,0003$  com  $R^2 = 0,9959$

**REPETIÇÃO 2:**

Quadro 12I: Curva de calibração na avaliação de queijos comerciais pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 2.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,103	0,1	0,098	0,1	0
1,0	0,164	0,167	0,169	0,167	0,067
2,0	0,231	0,238	0,239	0,236	0,136
5,0	0,46	0,494	0,475	0,476	0,376
10,0	0,767	0,839	0,779	0,795	0,695

**Equação:**  $\hat{y} = 0,0703x + 0,0018$  com  $R^2 = 0,9979$

**REPETIÇÃO 3:**

Quadro 13I: Curva de calibração na avaliação de queijos comerciais pelo método Rápido de Scharer Adaptado Espectrofotométrico na repetição 3.

Concentração (µg/mL)	Absorvância Absoluta 1	Absorvância Absoluta 2	Absorvância Absoluta 3	Absorvância Média	Absorvância Líquida
0,0	0,098	0,101	0,094	0,098	0
1,0	0,179	0,157	0,163	0,166	0,068
2,0	0,243	0,23	0,242	0,238	0,14
5,0	0,478	0,456	0,485	0,473	0,375
10,0	0,766	0,789	0,755	0,77	0,672

**Equação:**  $\hat{y} = 0,0679x + 0,0067$  com  $R^2 = 0,9963$