

AVALIAÇÃO DA PASTEURIZAÇÃO EM LEITE COMERCIALIZADO NA REGIÃO DE UBERLÂNDIA-MG

Alexandre Bicalho do Amaral¹;

Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais.

<http://lattes.cnpq.br/9981010124968512>

Elaine Alves dos Santos²;

Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM), Uberlândia, Minas Gerais.

<http://lattes.cnpq.br/7870619050486209>

Geisa Juliana Gomes Marques Fortunato³;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<http://lattes.cnpq.br/2987454256175465>

Diva Mendonça Garcia⁴;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás

<http://lattes.cnpq.br/9666133157736348>

Marcella Alvares Vieira⁵;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<http://lattes.cnpq.br/7521264977782360>

Karina de Araújo Dias Lopes⁶;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<http://lattes.cnpq.br/6591056333020795>

Fernanda Heloisa Litz⁷;

Faculdade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), Uberlândia, Minas Gerais.

<http://lattes.cnpq.br/3028373778328964>

Vitor Hugo Pacheco Jardim⁸;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<http://lattes.cnpq.br/1233953168140060>

Kamila Silva Mendes⁹;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<http://lattes.cnpq.br/8869792120233451>

Larissa Silva Couto¹⁰;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<https://lattes.cnpq.br/3307510806077300>

Márcio Caliari¹¹;

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<http://lattes.cnpq.br/3558164788327179>

Manoel Soares Soares Júnior¹².

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

<http://lattes.cnpq.br/0920319108540253>

RESUMO: O leite é um alimento universal amplamente consumido em todo o mundo, importante na dieta humana. Possui uma matriz complexa composta de proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas. Para reduzir a carga microbiana, utiliza-se a pasteurização, este processo é capaz de promover a redução ou eliminação de microrganismos patogênicos. Neste trabalho foi determinado através da Instrução Normativa nº 68, a qual estabelece métodos oficiais Físico-Químicos para controle de leite e produtos lácteos, a presença ou ausência de enzimas inerentes (fosfatase e peroxidase) em leite pasteurizado. As amostras foram coletadas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais da região de Uberlândia - Minas Gerais, com cinco tratamentos diferentes (marcas), em delineamento experimental totalmente casualizado, com 14 repetições totalizando 70 amostras. Em todas as amostras não foi identificado a atividade enzimática da enzima fosfatase alcalina, indicando que o processo térmico foi eficaz. No entanto, a atividade da peroxidase não foi identificada em parte das marcas de leite pasteurizado. Apesar de todas as amostras apresentarem resultado negativo para a atividade da enzima fosfatase alcalina, é inviável comercializar as respectivas marcas (C, D e E), devido a incoerência nos resultados das análises de peroxidase, resultantes de um tratamento térmico ineficaz com variação de temperatura ou tempo de pasteurização.

PALAVRAS-CHAVE: Fosfatase. Peroxidase. Legislação.

EVALUATION OF PASTEURIZATION IN MILK SOLD IN THE REGION OF UBERLÂNDIA-MG

ABSTRACT: Milk is a universal food widely consumed throughout the world, important in the human diet. It has a complex matrix made up of proteins, carbohydrates, minerals, vitamins. To reduce the microbial load, pasteurization is used, this process can promote the reduction or elimination of pathogenic microorganisms. In this work, it was determined through Normative Instruction No. 68, which establishes official physical-chemical methods for controlling milk and dairy products, the presence or absence of inherent enzymes (phosphatase and peroxidase) in pasteurized milk. The samples were collected randomly in commercial establishments in the region of Uberlândia - Minas Gerais, with five different treatments (brands), in a completely randomized experimental design, with 14 replications totaling 70 samples. In all samples, the enzymatic activity of the alkaline phosphatase enzyme was not identified, indicating that the thermal process was effective. However, peroxidase activity was not identified in some brands of pasteurized milk. Despite all samples showing a negative result for the activity of the alkaline phosphatase enzyme, it is unfeasible to sell the respective brands (C, D and E) due to inconsistency in the results of peroxidase analysis, resulting from an ineffective heat treatment with temperature variation. or pasteurization time.

KEY-WORDS: Phosphatase. Peroxidase. Legislation.

ÁREA TEMÁTICA: Outros. (Saúde Pública)

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento universal amplamente consumido em todo o mundo, importante na dieta humana. Ele tem uma matriz complexa composta de proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas e enzimas que têm mantido com sucesso o interesse dos pesquisadores (ARADHANA, et al., 2023). Seus efeitos metabólicos estão intimamente relacionados à sua composição e qualidade do produto (CIMMINO et al., 2023).

O leite de vaca representa 83% da produção mundial (ZENK, et al., 2024). Segundo dados do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) o Brasil é um grande produtor de leite, chegando a ser o terceiro maior produtor mundial, com grande importância econômica e social (BRASIL, 2024). Porém apesar da elevada produção, quando se trata de qualidade existe uma grande deficiência, pois na maioria dos casos uma grande quantidade de microorganismos contaminantes se faz presente, podendo ser uma fonte de contaminação potencialmente perigosa (POUSHI, SHARIFI, 2024).

Para que seja oferecido leite de qualidade para o consumo, é importante que, dentre outras ações, seja aplicado o tratamento térmico adequado, e no Brasil, para o leite pasteurizado, uma das formas é assegurar o cumprimento dos requisitos exigidos

pela IN nº 76, que trata a respeito regulamento técnico de identidade e qualidade do leite, com parâmetros físico-químicos e presença ou ausência de enzimas importantes (BRASIL, 2018).

A Instrução Normativa nº 51 do MAPA (2002) a qual aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite define como o leite pasteurizado quando submetido a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75°C (setenta e dois a setenta e cinco graus Celsius) durante 15 a 20s (quinze a vinte segundos), em equipamento de pasteurização a placas, seguindo de resfriamento imediato até temperatura igual ou inferior a 4°C (quatro graus Celsius) e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações. Como parâmetro de qualidade, imediatamente o processo de pasteurização o leite deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina e teste positivo para peroxidase (BRASIL, 2002).

A resistência dessas enzimas são parâmetros essenciais para avaliar a gravidade ou eficácia do tratamento térmico de leite e produtos lácteos. Uma alta atividade de fosfatase alcalina indica um processo de pasteurização inadequado (LIAO et al, 2019). A peroxidase é considerada uma das enzimas mais termo resistentes, principalmente quando ela tenha passado pelo processo de desnaturação, significa que houve excesso de tratamento térmico. Caso a outra enzima (fosfatase) ser comprovado à atividade enzimática no leite pasteurizado, entende-se que a pasteurização não foi conduzida corretamente (FRANCO et al, 2011).

O presente estudo teve como escopo, a avaliação da eficiência da pasteurização, através das análises de peroxidase e fosfatase alcalina em amostras de leite pasteurizado e coletado no município de Uberlândia-MG.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental adotado para as amostras de leite pasteurizado que foram avaliadas em relação à presença ou não das enzimas fosfatase alcalina e peroxidase foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 14 repetições (amostras de cada marca), sendo que cada repetição (marca) era composta por um saquinho de leite, totalizando 70 amostras. Os tratamentos a que os leites foram submetidos correspondem, respectivamente, a marca A, B, C, D e E.

Foram coletadas amostras de leite pasteurizado (saquinho), selecionadas aleatoriamente no mercado informal local, na cidade de Uberlândia - MG, nos meses de fevereiro e março de 2015. Em seguida, as amostras foram acondicionadas e levadas em bolsas térmicas ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LCQSA, na Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia, e avaliadas quanto à atividade enzimática da fosfatase alcalina e peroxidase, e os resultados na sequência foram comparados com a legislação vigente.

Determinou-se a fosfatase alcalina através do método qualitativo proposto na Instrução Normativa Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011). A verificação da atividade enzimática foi aplicada mediante a adição à amostra do substrato específico da enzima em condições ideais para sua atuação. Porém, a presença do indicador permitiu identificar a atividade enzimática pela reação colorimétrica com os produtos de degradação. Para esta análise necessitou de alguns reagentes específicos, como sumariza a Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes utilizados na análise de Fosfatase Alcalina.

Reagentes	Preparo das soluções
Catalisador	Dissolveu 0,2 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p. a. em 100 mL de água destilada.
Solução Reagente	Pesou-se 0,150 g de 2,6-dicloroquinona cloroimida ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_3\text{NO}$) p. a., dissolveu em 50 mL de álcool etílico p. a., transferiu para frasco âmbar e estocou em geladeira. A coloração da solução é amarelada.
Substrato	Pesou cerca de 0,5 g de fenilfosfato dissídico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p. a. em um béquer, dissolver com o tampão diluído, transferiu para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com o tampão diluído.
Tampão carbonato	Pesou cerca de 46,89 g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) p. a. e 37,17 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) p. a., dissolveu completando o volume de 1000 mL (solução estoque). Retirou uma alíquota de 25 mL de solução estoque, transferiu para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume. O pH deste tampão diluído deve-se estar entre 9,5 e 9,7.

Fonte: BRASIL, 2006.

Foram utilizados tubos de ensaio para alocação das amostras, porém transferiu cerca de 0,5 mL de amostra de leite para um tubo de ensaio (repetiu-se esse procedimento para todas as amostras), adicionou 5 mL de substrato, tampou-se o tubo com rolha de borracha, agitou-se ligeiramente e encaminhou-se ao banho-maria sob a temperatura de 39° a 41°C durante 20 minutos. Resfriou-se o tubo de ensaio em água corrente, adicionou-se 06 gotas de solução reagente e 02 gotas do catalisador, tampou-o e levou-se o mesmo novamente para o banho-maria a 39° a 41°C por um tempo de 5 minutos. Usou-se o mesmo procedimento para todas as amostras. Para avaliar o resultado das amostras foi necessária a observação da coloração de todas as amostras, sendo que para o leite pasteurizado, a coloração deve ser cinza o que caracteriza negativo. Portanto, algumas observações são necessárias, como a tonalidade do azul vai ficando tanto mais intensa, quanto maior for a deficiência de pasteurização (BRASIL, 2006).

Determinou-se a peroxidase através do método qualitativo proposto pela Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). A Tabela 4 sumariza os reagentes utilizados nesta análise.

Tabela 4. Reagentes para determinar peroxidase

Reagentes	Preparo de Soluções
Solução de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) a 3% (v/v)	Obtida na forma pronta para uso.
Solução hidroalcoólica de guaiacol (C ₇ H ₈ O ₂) a 1% (v/v)	Em um béquer de 50 mL, colocou-se 1 mL de guaiacol, adicionou-se 10 mL de álcool etílico p.a. e agitou-se até dissolver. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada. Armazenou-se em frasco âmbar.

Fonte: BRASIL, 2006

Transferiu-se 10 mL de leite pasteurizado para um tubo de ensaio, aqueceu-se em banho-maria com temperatura de 45°C por um tempo de 5 minutos, para ativação enzimática. Na sequência acrescentou-se 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1% ao tubo de ensaio, pelas suas paredes, seguindo com a adição de 3 gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Este procedimento foi aplicado em todas as amostras. Observou-se o resultado após 5 minutos, porém para obter o resultado positivo deve constar uma coloração salmão (BRASIL, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de leite pasteurizado comercializado na cidade de Uberlândia foram submetidas a cinco tratamentos ($p > 0,05$), o que resultou em parâmetros diferentes para fosfatase alcalina e peroxidase (positiva e negativa), esses resultados podem ser observados na Tabela 5 e na Figura 2. Os resultados foram submetidos ao programa Sisvar, para obtenção da análise estatística.

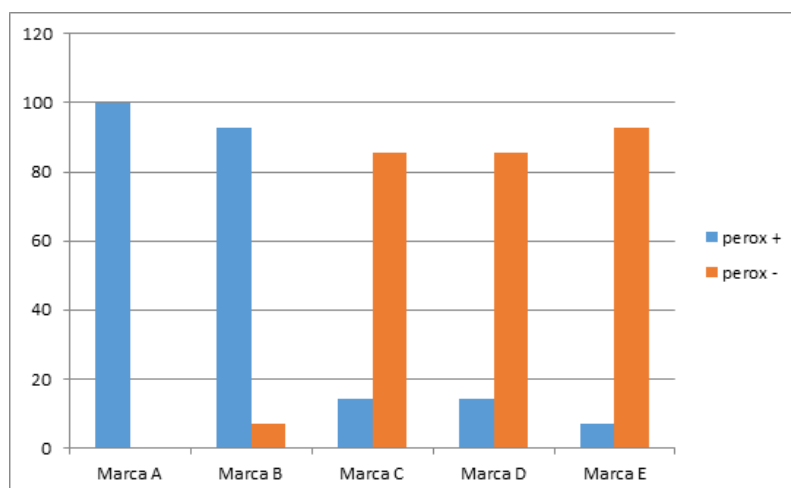
Tabela 5. Avaliação de Fosfatase e Peroxidase

Marca	Peroxidase Positivo		Peroxidase Negativo		Fosfatase	
	Amostras	%	Amostras	%	Amostras	%
A	14/14	100	-	-	14/14	100
B	13/14	92,85	1/14	7,15	14/14	100
C	2/14	14,29	12/14	85,71	14/14	100
D	2/14	14,29	12/14	85,71	14/14	100
E	1/14	7,15	13/14	92,85	14/14	100

Os dados elucidam as médias das amostras utilizadas (14 amostras de 5 marcas e a porcentagem).

Fonte: Próprio autor

Figura 2. Análises de Peroxidase e Fosfatase.



Fonte: Próprio autor

A Instrução Normativa nº76 de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018), explicita que o leite pasteurizado deve conter atividade enzimática para a enzima peroxidase positiva e para a enzima fosfatase negativa. No seguinte estudo, a enzima peroxidase, quando positiva, reagiu condensando moléculas de guaiacol, gerando produtos de coloração escura (representada pela cor salmão), ao passo que para as amostras que não possuíam atividade enzimática da peroxidase, o leite permaneceu com a coloração branca. Como resultado, tem-se que todas as amostras da marca A estão no padrão descrito pela Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018.

Em contraste, as demais marcas, apresentaram variação no resultado, ou seja, contendo amostras que diante da análise de peroxidase, pôde-se comprovar que o tratamento térmico não foi eficaz em todas as amostragens, pois apresentaram resultados positivos e negativos para a enzima peroxidase, por exemplo a marca B com (13 amostras em 14) 92,85% das amostras com peroxidase positiva (P+), ou seja, apenas uma amostra (7,15%) teve resultado negativo para peroxidase (em desacordo com a legislação), porém esta marca pode ser comercializada de acordo com a IN nº 76, devido ao baixo teor de peroxidase negativa.

Para as marcas C e D, obteve-se grande variação quando comparadas com as marcas anteriores, pois somente 2 amostras entre 14 analisadas obtiveram o resultado positivo para peroxidase (14,29% para ambas as marcas), o que comprova que o tratamento térmico destas amostras não foi eficaz e inviabiliza a comercialização destas marcas, pois 12 amostras de leite pasteurizado obtiveram o resultado negativo totalizando 85,71% das amostras analisadas que diferiram do que rege a legislação pertinente.

Na sequência, observou-se que a marca E, foi a menos rigorosa em seus tratamentos térmicos e a que traz mais risco ao ser comercializada diante da IN 76, pois somente 1 amostra constou peroxidase positiva o que resulta em 7,15% sobre o total das amostras,

demonstrando que 92,85% (13 de 14 amostras) de amostras analisadas apresentaram peroxidase negativa (fora dos parâmetros estabelecidos pela IN 76). Portanto, conclui-se que para esta marca o tratamento térmico de pasteurização não foi aplicado corretamente podendo ter ocorrido erro no binômio tempo e temperatura.

Entretanto, para obter um resultado preciso, deve-se observar também o resultado obtido para a análise de fosfatase alcalina (FA), sendo que a FA para leite pasteurizado deve apresentar coloração cinza, o que caracteriza o resultado negativo, pois só assim pode-se concluir com precisão sobre a atividade enzimática durante o processo de tratamento térmico e dizer se a marca está de acordo com o que rege a IN n° 76.

Como pode ser observado em todas as marcas, o resultado para atividade enzimática de fosfatase se mostrou negativo. Pode-se observar ainda para exemplificar, na Figura 3, a qual tem como princípio identificar a coloração das análises de peroxidase e fosfatase alcalina (tubo da esquerda), as duas análises foram comparadas com uma amostra de leite cru, o que é representado em ambas às imagens com o tubo da direita.

Em suma, diante da IN n° 76 de 26/11/2018, a qual aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite, para análise de fosfatase, todas as amostras se mostraram em concordância com a legislação vigente.

Figura 3. Análises de peroxidase e fosfatase comparada com leite cru.



(A): Peroxidase positiva (salmão) de leite pasteurizado comparada com leite cru (branca); **(B):** Fosfatase alcalina negativa (cinza) de leite pasteurizado comparada com leite cru (azul).

Fonte: o autor

Costa et al. (2019), ao analisar diferentes condições do binômio tempo/temperatura no processo de pasteurização lenta de leite caprino, obteve como resultado a ausência da atividade enzimática para fosfatase alcalina e para a enzima peroxidase o resultado foi positivo em todas as amostras, ou seja, segundo estes parâmetros, todas as amostras processadas termicamente estão de acordo com o preconizado na legislação, o que sugere que os tratamentos foram realizados de maneira adequada.

Oliveira, Magalhães e Frasso (2019), ao analisarem a eficiência da pasteurização de leites comercializados no Estado de Sergipe através de pesquisa de atividade enzimática (peroxidase e fosfatase alcalina), perceberam que todas as amostras coletadas produzidas

em estabelecimentos registrados junto à órgãos fiscalizadores oficiais, demonstraram perfil enzimático satisfatório, ou seja, foi constatada a inativação da fosfatase alcalina, e a atividade da peroxidase, indicando assim que o leite foi corretamente pasteurizado.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o processo térmico de pasteurização do leite foi inadequado em relação à atividade enzimática da peroxidase. As marcas C, D e E não atendem à Instrução Normativa IN nº 76 de 26/11/2018, pois a maioria das amostras apresentou resultado negativo para peroxidase, o que é contrário ao esperado. Embora todas as amostras tenham mostrado resultado negativo para a atividade da enzima fosfatase alcalina, a comercialização dessas marcas é inviável. A inconsistência nos resultados das análises de peroxidase sugere um tratamento térmico ineficaz, possivelmente devido a variações na temperatura ou no tempo de pasteurização.

REFERÊNCIAS

AARADHANA, S. K.; KUMAR, E. A.; VIGNESH, S.; CHIDANAND, D. V.; BASKARAN, N. Evaluating the effects of different processing methods on the nutritional quality of bovine milk. **Food and Humanity**, v. 1, p. 128-136, 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Estabelece os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 13, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. Seção 1, p.8. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa (Instrução Normativa nº 62). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. Seção 1, p. 6. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União, 30 de novembro de 2018**. Brasília, Seção 1, p. 9, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa do Leite**. Portal Gov.

br, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 27 ago. 2024.

CIMMINO, F.; CATAPANO, A.; VILLANO, I. Invited review: Human, cow, and donkey milk comparison: Focus on metabolic effects. *Journal of Dairy Science*, 106, n. 5, pp. 3072-3085, 2023. DOI: 10.3168/jds.2022-22465.

COSTA, Q. P.; REKOWSKY, B. S. S.; COSTA, M. P.; DELFINO, N. C. Eficiência da pasteurização lenta do leite de cabra em diferentes binômios tempo/temperatura. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 2019.

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

IDF. 2022. Heat treatment of milk. In: **Bulletin of the IDF nº 516/2022**. International Dairy Federation (Ed.), Brussels.

LIAO, H.; ZHONG, K.; HU, X.; LIAO, X. Effect of high pressure carbon dioxide on alkaline phosphatase activity and quality characteristics of raw bovine milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 457-462, 2019. DOI: 10.1016/j.ifset.2019.02.005.

OLIVEIRA, T. C. G. B.; MAGALHÃES, B.; FRAZÃO, G. G. S. Pesquisa de fosfatase alcalina e peroxidase em leites pasteurizados no Estado de Sergipe. **Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2019.

POUSHI, M.; SHARIFI, D. State-of-the-art in milk processing for improvement of the quality of pasteurized milk and UHT milk. In: RANA, Tanmoy (Ed.). **The Microbiology, Pathogenesis and Zoonosis of Milk Borne Diseases**. Developments in Microbiology. Academic Press, 2024. p. 19-27. DOI: 10.1016/B978-0-443-13805-8.00014-4.

ZENK, N.; LAUMER, F.; DALABASMAZ, S.; STÜTZER, J.; MAUSER, A.; PISCHETSRIEDER, M. Comprehensive species- and processing-specific peptide profiling of pasteurized, extended shelf-life and ultra-high temperature milk from cow, goat, sheep, buffalo, and mare. **Food Chemistry**, Volume 438, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137973.