

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Monisa Gouvêa Silva

**Determinação da inativação e estudo da cinética de reativação da fosfatase alcalina em
leite pasteurizado sob diferentes condições de tratamento térmico**

Juiz de Fora

2023

Monisa Gouvêa Silva

Determinação da inativação e estudo da cinética de reativação da fosfatase alcalina em leite pasteurizado sob diferentes condições de tratamento térmico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Monisa Gouvêa.

Determinação da inativação e estudo da cinética de reativação da fosfatase alcalina em leite pasteurizado sob diferentes condições de tratamento térmico / Monisa Gouvêa Silva. -- 2023.

74 f.

Orientador: Rodrigo Stephani

Coorientador: Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Leite. 2. Pasteurização. 3. Fosfatase alcalina. 4. Reativação. Stephani, Rodrigo, orient. II. Oliveira, Luiz Fernando Cappa de, coorient. III. Título.

Monisa Gouvêa Silva

Determinação da inativação e estudo da cinética de reativação da fosfatase alcalina em leite pasteurizado sob diferentes condições de tratamento térmico

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em
Química
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Química. Área de
concentração:
Química.

Aprovada em 20 de julho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Stephani - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho

Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 17/07/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 21/07/2023, às 07:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Chefe de Departamento**, em 21/07/2023, às 08:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Fernandes Souza Andrade, Professor(a)**, em 21/07/2023, às 08:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Fernandes de Carvalho, Usuário Externo**, em 26/07/2023, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1368743** e o código CRC **06110A05**.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão que sempre apoiaram e incentivaram minhas escolhas. Dedico também ao meu avô Jorge (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da minha vida e por ter me permitido viver todos os momentos até agora.

Agradeço, principalmente, à minha mãe Mônica e ao meu pai Dirceu por todo apoio, incentivo e amor incondicional. Vocês são os responsáveis por eu estar vivendo tudo isso, por eu estar realizando meus sonhos e conquistando meus objetivos. Tudo foi graças a vocês, obrigada por sempre acreditarem e fazerem de tudo por mim. Meu amor por vocês é infinito!

Agradeço ao meu irmão Matheus por sempre torcer e acreditar em mim. Eu te amo muito, maninho!

Às minhas avós Leda e Iraci, eu agradeço por todo amor e carinho. Ao meu avô Jorge (*in memoriam*), obrigada por todos os momentos vividos ao lado! Sua princesinha está aqui conquistando tudo que sempre quis.

Agradeço à minha tia Cláudia por estar sempre comigo me apoiando, me dando muito amor e carinho. Eu te amo, tia! Agradeço também à minha madrinha Rosane.

Agradeço a todas as minhas demais tias, aos meus tios e aos meus primos. Obrigada pela união e por serem uma família maravilhosa!

Agradeço às minhas “miguinhas” Bárbara, Ellen e Gabrielle por sempre estarem comigo me apoiando, me incentivando e me dando forças. Obrigada por todos os momentos que vivemos juntas, por todas as gargalhadas e por todos os puxões de orelha também. Sou muito grata por poder compartilhar a minha vida com vocês. Eu amo muito vocês!

À Livia, em especial, eu agradeço muito por estar sempre ao meu lado, nos melhores e nos piores momentos. Você é a pessoa que me entende, que me acolhe, que me escuta, que me aconselha, que me dá forças... enfim, “*You are my person*”! Obrigada pela parceria de sempre, pelo amor (daquele seu jeitinho) e por deixar eu dividir minha vida com você. Você sabe, melhor do que ninguém, tudo o que eu já vivi pra chegar até aqui. Eu te amo muito, obrigada por tudo, lindona!

Agradeço à Stephany por ter sido minha duplinha e por ter me ajudado tanto durante os anos que vivemos juntas. Como eu já te disse: eu nunca conheci alguém tão parecida comigo igual você. Eu te amo, minha pisciana!

À Gabriela, eu agradeço por você ter estado mais próxima de mim nesses últimos tempos, por ter me escutado, por ter me apoiado e por ter me ajudado quando eu precisei. Muito obrigada pelos nossos momentos, eu amo você!

À Flávia eu agradeço por ter entrado na minha vida de um jeito tão singelo e ter ocupado um espaço tão importante nela. Nesse pouco tempo de amizade você se tornou uma pessoa indispensável pra mim. Isso é a prova de que o tempo não significa nada, o que importa é a conexão e a intensidade. Você já me ajudou tanto que nem imagina. Obrigada por deixar eu compartilhar minha vida com você e deixar eu fazer parte da sua, obrigada por todos os nossos momentos, por todas as nossas conversas, por todos os seus conselhos, obrigada por tudo. Eu te amo demais!

Agradeço também à Laís que foi meu presentinho recente. Obrigada pela sua amizade, pelos nossos momentos maravilhosos, pelas ajudas, pelos conselhos, pelo seu amor e carinho. Sou muito feliz por você fazer parte da minha vida. Eu te amo!

Agradeço às minhas amigas Michele e Rayssa pelos momentos já vividos. Sei que depois que saí de Três Rios nos afastamos um pouco, mas meu sentimento por vocês sempre será de muito amor e carinho. Vocês fazem parte da minha história e eu sou muito feliz por tudo que já vivemos.

Agradeço, em especial, aos meus orientadores Rodrigo Stephani e Luiz Fernando Cappa de Oliveira. Obrigada por todos os ensinamentos durante esses anos, obrigada por terem acreditado em mim desde o início e terem me proporcionado tantas oportunidades de crescimento profissional e pessoal. Serei eternamente grata a vocês por isso e muito mais! Agradeço também à professora Juliana Costa e ao professor Ítalo Perrone por todos os ensinamentos.

Agradeço à Natalia Casas por ter sido minha duplinha dinâmica, por ter me ajudado em tudo, por ter me aconselhado, por ter me incentivado, por ter me ensinado tanto sobre ciência, quanto sobre a vida. Você foi e é uma pessoa muito importante pra mim, Nat. *Muchas gracias por todo, te amo!*

Agradeço a todos os meus amigos do QUIMTEC pela ajuda, pelo companheirismo, pelo apoio e confiança. Sem vocês nenhuma pesquisa seria possível. Em especial, agradeço à Jaqueline, à Natália Alves, à Nathália Campos, à Carol Barroso, à Carol Neves, à Kamilla, ao Taynan, ao Igor, ao Ramon, à Maria Esther e à Julia Francisquini. Obrigada por vocês terem me ajudado e me ensinado tanto! Como já disse o Luiz Fernando: “Fazer ciência é bom, mas fazer ciência com os amigos é melhor ainda”.

Gostaria de agradecer a parceria da empresa Cap-Lab por ter me proporcionado viver a experiência do MAI. Em especial, agradeço à Leyre Barros por ter sido minha supervisora industrial.

Agradeço também a parceria da empresa Piracanjuba que foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, e à Universidade Federal de Juiz de Fora. Em destaque, agradeço a todos os professores do departamento de Química que foram essenciais para a minha trajetória acadêmica.

“...For in dreams we enter a world that is entirely our own. Let them swim in the deepest ocean or glide over the highest cloud.” (J. K Rowling, 1999, p. 165)

RESUMO

O leite é uma das *commodities* mais relevantes do mundo. Estima-se que cerca de 10% da população mundial depende diretamente da pecuária leiteira. O Brasil, atualmente, é o terceiro maior produtor de leite do mundo, somando mais de 34 bilhões de litro/ano, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e Índia. Os produtos lácteos contribuem significativamente com as necessidades de proteínas, carboidratos, lipídeos e micronutrientes, sendo os principais responsáveis pelo aporte de cálcio para o nosso organismo; além de contribuírem com a ingestão de magnésio, selênio, riboflavina e vitamina B12. No Brasil, o leite fluido para ser consumido *in natura* deve passar por um processo de pasteurização previsto na legislação vigente. Para atestar que o processamento térmico foi realizado de forma efetiva, imediatamente após a pasteurização o leite deve apresentar prova negativa para a fosfatase alcalina e positiva para a peroxidase. Com isso, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade da fosfatase alcalina em leite submetido a diferentes condições de tratamento térmico, além de investigar uma possível reativação da enzima ao longo de um *shelf-life* do leite de 72h. Foram aplicados métodos qualitativo (oficial adotado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e quantitativo (colorimétrico de Scharer descrito pela *American Public Health Association*). Com os resultados deste trabalho, foi possível definir um parâmetro no qual o método oficial qualitativo detectou a presença da fosfatase alcalina, sendo ele definido em 4,13 μg de fenol mL^{-1} de leite. Além disso, foi apresentado que não existe uma relação direta entre a adição de leite cru e a concentração de fenol gerada. Dessa forma, não é aconselhado a utilização de dopagem de leite para avaliar o método oficial qualitativo, uma vez que as mesmas dosagens de leite cru podem resultar em diferentes concentrações de fenol, devido a composição de cada leite. Os dados apontaram que a composição do leite utilizado nos tratamentos térmicos influenciou na inativação da enzima e a gordura, aparentemente, foi um dos componentes responsáveis por tal resultado. Foi evidenciado que o método oficial não se mostrou adequado para verificar a pasteurização do leite, uma vez que não detectou a presença da enzima em uma amostra de sub-pasteurização (70°C/20s). Além do mais, o limite expresso pelo método de Scharer (1 μg fenol mL^{-1}) para verificar a pasteurização do leite não se mostrou apropriado, visto que as amostras devidamente pasteurizadas (72 °C/20s, 75 °C/20s e 65 °C/30 minutos) apresentaram valores acima do estipulado pelo método. Algumas amostras de leite tratadas termicamente apresentaram aumento na atividade residual da fosfatase alcalina ao longo do *shelf-life*, apontando que a enzima pode ter sofrido uma reativação após o tratamento térmico. Concluiu-se que o método oficial não apresentou uma boa sensibilidade de detecção da

fosfatase alcalina, verificou-se que o parâmetro limite para atestar a eficiência de pasteurização do método quantitativo deve ser ajustado para cada tipo de leite: desnatado, semidesnatado e integral; e foi reforçado a exigência de se realizar o teste da ALP imediatamente após o processo de pasteurização do leite, a fim de minimizar as chances de resultados falso-positivos devido à possível reativação da enzima.

Palavras-chave: Leite. Pasteurização. Fosfatase alcalina. Reativação.

ABSTRACT

Milk is one of the most relevant commodities in the world. It is estimated that about 10% of the world's population depends directly on dairy farming. Brazil is currently the third largest producer of milk in the world, adding more than 34 billion liters/year, behind only the United States and India. Dairy products contribute significantly to the needs of proteins, carbohydrates, lipids and micronutrients, being the main responsible for the supply of calcium to our organism; in addition to contributing to the intake of magnesium, selenium, riboflavin and vitamin B12. In Brazil, fluid milk to be consumed in natura must undergo a pasteurization process provided for in current legislation. To attest that the thermal processing was carried out effectively, immediately after pasteurization, the milk must show a negative test for alkaline phosphatase and a positive test for peroxidase. Thus, the objective of this work was to determine the activity of alkaline phosphatase in milk subjected to different heat treatment conditions, in addition to investigating a possible reactivation of the enzyme over a 72-hour milk shelf-life. Qualitative methods (official adopted by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply) and quantitative methods (Scharer colorimetric described by the American Public Health Association) were applied. With the results of this work, it was possible to define a parameter in which the official qualitative method detected the presence of alkaline phosphatase, which was defined as 4.13 μg of phenol mL^{-1} of milk. Furthermore, it was shown that there is no direct relationship between the addition of raw milk and the generated phenol concentration. Thus, the use of milk doping to evaluate the official qualitative method is not recommended, since the same dosages of raw milk may result in different concentrations of phenol, due to the composition of each milk. The data showed that the composition of the milk used in the heat treatments influenced the inactivation of the enzyme and the fat, apparently, was one of the components responsible for this result. It was shown that the official method was not adequate to verify the pasteurization of milk, since it did not detect the presence of the enzyme in a sub-pasteurization sample (70°C/20s). Furthermore, the limit expressed by the Scharer method (1 μg phenol mL^{-1}) to verify the pasteurization of the milk did not prove to be appropriate, since the properly pasteurized samples (72 °C/20s, 75 °C/20s and 65 °C/ 30 minutes) presented values above the stipulated by the method. Some heat-treated milk samples showed an increase in residual alkaline phosphatase activity over the shelf-life, indicating that the enzyme may have undergone reactivation after heat treatment. It was concluded that the official method did not show a good sensitivity for alkaline phosphatase detection, it was verified that the limit parameter to certify the pasteurization efficiency of the quantitative method must be adjusted

for each type of milk: skimmed, semi-skimmed and whole; and the requirement to perform the ALP test immediately after the milk pasteurization process was reinforced, in order to minimize the chances of false-positive results due to possible reactivation of the enzyme.

Keywords: Milk. Pasteurization. Alkaline phosphatase. Reactivation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Equação química da reação envolvida no teste colorimétrico de Scharer. ...	30
Figura 2	–	Equação química da reação envolvida no teste colorimétrico de Rutgers. .	31
Figura 3	–	Equação química da reação envolvida no método de Aschaffenburg e Mullen.	32
Figura 4	–	Esquematização do espectrômetro de feixe simples.	35
Figura 5	–	Esquematização do espectrômetro de feixe duplo.	36
Fluxograma 1	–	Condições dos tratamentos térmicos aplicados ao leite cru.	40
Gráfico 1	–	Curva analítica do método espectrofotométrico de Scharer utilizada na quantificação das concentrações da ALP nas amostras de leite.	45
Figura 6	–	Imagens dos resultados positivo da amostra 6720 (a) e negativo da amostra 7020 (b), do método oficial qualitativo.	57
Gráfico 2	–	Concentração da ALP ($\mu\text{g fenol mL}^{-1}$) nas amostras de leite durante o <i>shelf-</i> <i>life</i> e nas amostras leite adicionadas de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ (n=3).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valor médio dos componentes do leite de vaca.	21
Tabela 2 – Volumes de solução padrão de fenol e água utilizados para preparar os pontos da curva analítica do método espectrofotométrico de Scharer.	42
Tabela 3 – Resultados dos métodos qualitativo oficial e quantitativo de Scharer aplicado às amostras de leite fervido com adição de diferentes concentrações de leite cru (n=1).....	47
Tabela 4 – Resultados dos métodos qualitativo oficial e quantitativo de Scharer aplicado às amostras de leite com adição de diferentes concentrações de leite cru (n=1).....	48
Tabela 5 – Resultados dos métodos qualitativo oficial e quantitativo de Scharer aplicado às amostras de leite com adição de diferentes concentrações de fenol PA (n=3). ..	50
Tabela 6 – Composição dos leites utilizados na comparação da atividade da ALP.....	51
Tabela 7 – Comparação entre as atividades residuais médias da ALP, dos métodos qualitativo e quantitativo ($\mu\text{g fenol mL}^{-1}$), nas amostras de leites com diferentes composições (n=3).....	52
Tabela 8 – Resultados dos métodos qualitativo e quantitativo ($\mu\text{g fenol mL}^{-1}$) das atividades residuais da enzima nas amostras de leite com diferentes tratamentos térmicos e durante o <i>shelf-life</i> (n=3).....	55
Tabela 9 – Resultados dos métodos qualitativo e quantitativo ($\mu\text{g fenol mL}^{-1}$) das atividades residuais da enzima nas amostras de leite tratadas termicamente e amostras de leite com adição de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ em T_{72} (n=3).....	59
Tabela 10 – Percentual do aumento das concentrações da ALP nas amostras de leite com relação às concentrações da enzima em T_0	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
ALP	Fosfatase alcalina
APHA	<i>American Public Health Association</i>
b	Caminho óptico
c	Concentração
CQC	2,6 dicloroquinona-4-cloroimida
DEN	Densidade
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
GGT	γ -Glutamil transferase
GOR	Gordura
HTST	<i>High-Temperature Short-Time</i>
IC	Inclinação da curva analítica
k	Constante de velocidade
LAC	Lactose
LD	Limite de detecção
LPO	Lactoperoxidase
LQ	Limite de quantificação
LTLT	<i>Low-Temperature Long-Time</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PA	Para análise
pI	Ponto isoelétrico
PRO	Proteína
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIF	Serviço de Inspeção Federal
T ₀	Dia do tratamento térmico do leite
T ₂₄	Tempo de 24h após o tratamento térmico do leite
T ₄₈	Tempo de 48h após o tratamento térmico do leite

T ₇₂	Tempo de 72h após o tratamento térmico do leite
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UV-VIS	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ	Absortividade molar
σ	Desvio padrão da resposta do branco
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$^{\circ}\text{F}$	Graus Fahrenheit
%	Percentual
+/-	Resultado de incerteza para o teste da ALP (difícil visualização)
-	Resultado negativo para o teste da ALP
+	Resultado positivo para o teste da ALP

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	21
2.2	TRATAMENTO TÉRMICO	22
2.2.1	Termização.....	23
2.2.2	Pasteurização	23
2.2.3	Processo UHT	24
2.3	USO DE ENZIMAS PARA AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO	25
2.3.1	γ-glutamil transferase.....	25
2.3.2	Lactoperoxidase.....	26
2.3.3	Fosfatase alcalina.....	26
2.3.3.1	<i>Reativação da ALP</i>	27
2.4	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ALP	28
2.4.1	Colorimétricos	29
2.4.1.1	<i>Método de Scharer: Visual e espectrofotométrico</i>	29
2.4.1.2	<i>Método de Rutgers</i>	31
2.4.1.3	<i>Método de Aschaffenburg e Mullen</i>	32
2.4.2	Fluorimétricos.....	32
2.4.3	Quimioluminescentes	33
2.4.4	Métodos alternativos	33
2.5	TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	34
2.5.1	Espectrômetro de feixe simples.....	35
2.5.2	Espectrômetro de feixe duplo.....	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	OBTENÇÃO DO LEITE CRU	38

4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSICIONAIS DO LEITE CRU	38
4.3	PREPARO DE AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE LEITE CRU E SOLUÇÃO PADRÃO DE FENOL	38
4.3.1	Fortificação com leite cru	39
4.3.2	Fortificação com solução padrão de fenol.....	39
4.4	PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE COM DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS.....	39
4.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ALP NAS AMOSTRAS DE LEITE.....	40
4.5.1	Reagentes e soluções	40
4.5.2	Aplicação do método colorimétrico qualitativo nas amostras de leite	41
4.5.3	Aplicação do método espectrofotométrico de Scharer nas amostras de leite	41
4.5.3.1	<i>Construção da curva analítica</i>	<i>41</i>
4.5.3.2	<i>Sensibilidade do método espectrofotométrico de Scharer.....</i>	<i>42</i>
4.5.3.3	<i>Análise espectrofotométrica das amostras de leite.....</i>	<i>43</i>
4.5.4	Avaliação da reativação da ALP ao longo do tempo de armazenamento	44
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO QUANTITATIVO.....	45
5.1.1	Linearidade do método quantitativo	45
5.1.2	Limite de detecção e quantificação	46
5.2	AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS.....	46
5.2.1	Avaliação da atividade da ALP em amostras de leite fortificadas com leite cru	46
5.2.2	Avaliação da atividade da ALP em amostras de leite fortificadas com solução padrão de fenol	49
5.3	INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO LEITE NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALP.....	51
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALP NO LEITE DURANTE O SEU <i>SHELF-LIFE</i>	53

5.5	AVALIAÇÃO DA REATIVAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALP AO LONGO DO <i>SHELF-LIFE</i>	57
6	CONCLUSÃO	63
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma das *commodities* mais relevantes do mundo. Estima-se que cerca de 10% da população mundial depende diretamente da pecuária leiteira. Em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, o setor de laticínio promove a subsistência sustentável de pequenos produtores rurais, gerando renda que sustenta suas famílias (SIQUEIRA, 2019). O Brasil, atualmente, é o terceiro maior produtor de leite do mundo, somando mais de 34 bilhões de litro/ano, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e Índia, segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020).

Os produtos lácteos são um dos principais responsáveis por fornecer nutrientes essenciais para uma dieta saudável. Eles contribuem significativamente com as necessidades de proteínas, carboidratos, lipídeos e micronutrientes da dieta humana, sendo os principais responsáveis pelo aporte de cálcio para o nosso organismo (DROR; ALLEN, 2014). Além disso, eles também contribuem com a ingestão de magnésio, selênio, riboflavina e vitamina B12 (SIQUEIRA, 2019). No cenário nacional, segundo dados do IBGE nos anos de 2017 e 2018, os produtos mais consumidos pelos brasileiros foram leite fluido, queijos e iogurtes. Os dados mostraram que, em média, 32,2 kg de lácteos são consumidos por ano (SIQUEIRA, 2021).

O leite cru pode ser considerado um ótimo meio de cultura de diversos microrganismos, sendo estes patógenos e não patógenos (VIDAL; NETTO, 2021). No Brasil, para que o leite fluido possa ser consumido de forma direta ele deve passar por um processo de pasteurização previsto na legislação, visando inativar os microrganismos patogênicos do leite cru (BRASIL, 2017). De acordo com a legislação, após o processamento térmico do leite, o mesmo deve ser submetido à prova da fosfatase alcalina (ALP), para garantir a eficiência de pasteurização do produto (BRASIL, 2018).

Diante de tais importâncias econômicas, nutricionais e tecnológicas do leite, este trabalho visa contribuir com dados atuais sobre os métodos já utilizados para a detecção e a quantificação da ALP em leite, além de fornecer informações sobre as influências dos diferentes tipos de leite na avaliação da eficiência de pasteurização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico deste trabalho aborda as informações essenciais sobre os temas discutidos ao longo da pesquisa.

2.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE

O leite por definição é a secreção das glândulas mamárias dos animais mamíferos e a sua principal função é servir de nutrição para seus filhotes (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Entretanto, o leite de diferentes espécies como ovelha, cabra, camela e búfala é comumente consumido pelos humanos de forma direta ou através de seus derivados.

A composição principal do leite é dividida em água, gordura, carboidratos, proteínas e minerais. Ela varia de acordo com cada espécie de mamífero, raça do animal, estágio de lactação, sazonalidade e outros fatores (VIDAL; NETTO, 2021). Na Tabela 1 é apresentada a composição média do leite de vaca da região dos países baixos.

Tabela 1 – Valor médio dos componentes do leite de vaca.

Componente	Média (% m/m)
Água	87,1
Gordura	4,0
Sólidos não gordurosos	8,9
Lactose	4,6
Proteína	3,3
Minerais	0,7

Fonte: Adaptado de Walstra (2006).

A água é o componente majoritário do leite e é onde se encontram emulsionados os demais componentes (VIDAL; NETTO, 2021).

A gordura é composta de uma mistura de ácidos graxos de comprimento de cadeia variados. Ela é encontrada no leite na forma de pequenos glóbulos, envolto por uma membrana constituída de fosfolipídios que impede a coalescência entre esses glóbulos de gordura (VIDAL; NETTO, 2021; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Os sólidos não gordurosos incluem a lactose, a proteína e os minerais presentes no leite.

A lactose, que é o principal açúcar encontrado no leite, é um dissacarídeo composto de uma molécula de glicose e uma molécula de galactose. É um açúcar redutor e está presente no leite de todos os mamíferos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A parte proteica do leite pode ser dividida entre as caseínas e as proteínas do soro. A caseína é a sua principal proteína e é fragmentada em α_{S1} , α_{S2} , β -caseína e κ -caseína. As proteínas do soro, por outro lado, são compostas pela α -lactoglobulina, β -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidase, albumina do soro bovino, imunoglobulinas, glicomacropéptídeos, entre outras (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017). Além disso, o leite ainda possui uma ampla variedade de enzimas (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Os principais minerais encontrados no leite são cálcio, sódio, potássio e magnésio, além dos fosfatos inorgânicos, citratos e cloretos (GAUCHERON, 2005).

Posto isso, fica claro que o leite é uma matriz complexa. A sua composição química define o seu valor nutricional, os aspectos sensoriais e são responsáveis pela extensão das reações químicas existentes neste sistema (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

2.2 TRATAMENTO TÉRMICO

As indústrias de alimentos usam os tratamentos térmicos visando a destruição dos seus microrganismos patogênicos, garantindo assim a segurança do alimento. Além disso, esses processamentos ainda aumentam o *shelf-life*, uma vez que inativam as bactérias responsáveis pela deterioração do alimento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Os tratamentos térmicos mais utilizados nas indústrias de alimentos são a termização, a pasteurização e o processo *Ultra High Temperature* (UHT). Estes métodos diferem, principalmente, com relação à temperatura e ao tempo de aquecimento do produto. Como consequência disso, as características do alimento e o seu prazo de validade são distintos (ARAÚJO et al., 2021).

No Brasil, o órgão responsável pelo controle e fiscalização do leite e seus derivados é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que dispõe do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Este tem como objetivo a inspeção e a fiscalização de estabelecimentos de produtos de origem animal que realizam o comércio interestadual ou internacional, sendo estas ações de responsabilidade do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 2017).

2.2.1 Termização

Pela legislação brasileira, a termização é definida como a “aplicação de calor ao leite em aparelhagem própria com a finalidade de reduzir sua carga microbiana, sem alteração das características do leite cru” (BRASIL, 2017).

A termização é o tratamento térmico mais brando que é aplicado ao leite com o objetivo de inibir temporariamente o crescimento bacteriano, até que o leite possa passar pelo processo de pasteurização (ARAÚJO et al., 2021). O binômio tempo/temperatura desse processo consiste no aquecimento do leite de 63 °C a 65 °C por 15s ou 60 °C a 69 °C por 20s (ARAÚJO et al., 2021; BYLUND, 1995).

Os alvos deste processo são os microrganismos psicrotróficos, que podem produzir lipases e proteases resistentes ao calor (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Para evitar o desenvolvimento de bactérias formadoras de esporos, o leite, após sofrer o processo de termização, deve ser armazenado a uma temperatura de 4 °C (BYLUND, 1995).

2.2.2 Pasteurização

A pasteurização foi descrita pela primeira vez em 1864 pelo cientista francês Louis Pasteur (1822 – 1895), que descobriu que o aquecimento do vinho preservava as características do produto por mais tempo, pois destruía seus microrganismos deteriorantes. Pasteur determinou o tempo e a temperatura exata para destruir os microrganismos nocivos do vinho, sem que o produto perdesse sua qualidade. A partir do século XIX, o processo de pasteurização se tornou uma prática comum para garantir uma segurança de consumo de alguns alimentos, inclusive o leite (PATRA; RAO; MEGHWAL, 2018).

A pasteurização foi desenvolvida, inicialmente, para destruir o microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela tuberculose. No século XIX, o leite era o principal responsável por essa infecção. Após a adoção desse tratamento no produto, os casos de tuberculose diminuíram significativamente na Europa. Naquela época, a condição de pasteurização era de 61 °C / 30 min, tendo como referência o *Mycobacterium tuberculosis*. Entretanto, a atual definição do *Codex Alimentarius Commission* aponta que o processo de pasteurização também deve ser eficiente para a destruição do *Coxiella burnetii*, que é mais resistente e causador da febre Q. Com isso, o binômio tempo/temperatura do processo foi alterado para ser eficaz na destruição de ambos os microrganismos (CERF; CONDRON, 2006).

O processo de pasteurização pode ser realizado de forma lenta ou rápida. A pasteurização lenta (LTLT, *Low Temperature Long Time*) consiste no aquecimento indireto do leite a uma temperatura na faixa de 63 °C a 65 °C por 30 minutos. O processamento rápido (HTST, *High Temperature Short Time*) compreende o aquecimento na faixa de temperatura de 72 °C a 75 °C de 15 a 20 segundos (BRASIL, 2017).

Geralmente, o tratamento térmico HTST é o mais utilizado pelas indústrias. Neste caso, a pasteurização realizada de forma indireta a partir de equipamentos que possuem trocador de calor a placas. Após ser aquecido, o leite permanece por um tempo determinado, em um tubo de retardamento. Esse processo torna-se mais econômico, pois o próprio leite que passa pelo pasteurizador aquece o leite que ainda será pasteurizado. Após o aquecimento, o leite segue para o resfriamento em uma seção que troca calor com água gelada (ARAÚJO et al., 2021).

2.2.3 Processo UHT

De acordo com o RIISPOA, entende-se por processo UHT o tratamento térmico aplicado ao leite a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C por 4s. O tratamento é realizado por meio do processo de fluxo contínuo, sendo o produto resfriado a temperatura inferior a 32 °C, imediatamente após o aquecimento, e envasado sob condições assépticas em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 2017). As condições de esterilização do leite foram estabelecidas com base nos parâmetros de destruição dos esporos *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (ARAÚJO et al., 2021).

Nesse processo, o leite é submetido a envase asséptico, sendo utilizadas embalagens esterilizadas com peróxido de hidrogênio e ar quente. Devido a essas condições e à temperatura a que o produto é submetido, o seu *shelf-life* é estendido e não é necessário a refrigeração do mesmo (VIDAL; NETTO, 2021).

Esse tratamento térmico severo ocasiona alterações físico-químicas no leite após armazenamento prolongado, podendo levar a percepções sensoriais ao consumidor, como sabores desagradáveis e escurecimento do produto. Os principais processos que afetam esses parâmetros são proteolíticos, oxidativos e a reação de escurecimento não enzimático (reação de Maillard) (KARLSSON et al., 2019).

2.3 USO DE ENZIMAS PARA AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO

O setor de alimentos é o que requer o maior uso industrial das enzimas para a realização de processos. Elas são aplicadas em diversos segmentos como panificação, produção de derivados lácteos, produção de bebidas, tratamentos térmicos, suplementos dietéticos, entre outros (GARG; SEHRAWAT; YADAV, 2016).

Com base no setor de laticínio, o leite é um produto de matriz complexa no qual relaciona-se a presença de pelo menos 60 enzimas endógenas. Várias dessas enzimas têm uma importância tecnológica do ponto de vista de deterioração, tratamento térmico, infecção e atividade antimicrobiana (ANDRÉN, 2021; FOX et al., 2015a).

O grande interesse pelas enzimas de uso industrial se dá devido à sua grande especificidade em relação ao pH, substratos, temperatura e pressão, além do seu alto grau de conversão para os produtos de interesse e da sua excelente atividade no leite (FERNANDES, 2010).

Com foco no tratamento térmico, as principais enzimas utilizadas para esse fim são a γ -glutamil transferase, a lactoperoxidase e a fosfatase alcalina (ANDRÉN, 2021; REHMAN et al., 2003).

2.3.1 γ -glutamil transferase

A γ -glutamil transferase (GGT) é uma enzima (EC 2.3.2.2) que catalisa as transferências de resíduos γ -glutamil de peptídeos que contém esse aminoácido (REHMAN et al., 2003). Ela foi isolada e caracterizada pela primeira vez por Tate e Meister (1976). A GGT é uma glicoproteína encontrada na membrana do glóbulo de gordura do leite. É um dímero de peso molecular igual a 80 kDa com subunidades de 57 kDa e 26 kDa (FOX et al., 2015a). Sua atividade ótima é na faixa de pH 8 – 9,5, seu ponto isoelétrico (pI) é igual a 3,85 a 45 °C. Sua atividade é inibida com a presença de iodoacetato, diisopropilfluorofosfato e íons metálicos, como Cu^{2+} e Fe^{3+} (FARKYE, 2003).

Na indústria de laticínios a GGT pode ser utilizada para avaliar o tratamento térmico de pasteurização do leite, pois apresenta uma resistência térmica em um intervalo de 72 °C a 80 °C por 15s (FARKYE, 2003).

2.3.2 Lactoperoxidase

A lactoperoxidase (LPO) é uma enzima (EC 1.11.1.7) que catalisa reações de um substrato que pode ser oxidado ou um doador de hidrogênio, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FOX et al., 2015b).

A LPO é a segunda enzima mais abundante do leite e é sintetizada nas glândulas mamárias do animal. É um dímero de peso molecular igual a 82 kDa sendo formado por duas subunidades idênticas. Esta enzima se liga aos íons cálcio (Ca^{2+}), que é fundamental para sua estabilidade e que também contribui para sua alta resistência ao calor (FOX et al., 2015b).

Uma das suas principais funções é diminuir a quantidade de H_2O_2 no leite e isso justifica o fato do leite cru apresentar baixos níveis desse composto. Além do mais, em condições adequadas de adição de H_2O_2 e de íons tiocianato (SCN^-), pode-se formar um sistema que inibe o crescimento de microrganismos (PRUIT, 2003). Esse sistema formado de LPO- H_2O_2 -SCN pode ser utilizado para pasteurizar o leite a frio e é empregado em casos onde não há refrigeração ou pasteurização térmica (FOX et al., 2015b).

A LPO é a enzima mais termorresistente do leite. Ela se torna inativa na condição de aquecimento de 80 °C por 2,5 segundos. Devido a isso, essa enzima pode ser utilizada no controle da pasteurização do leite, garantindo que o produto não sofreu um superaquecimento (LORENZEN et al., 2010).

2.3.3 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima (EC 3.1.3.1) natural que está presente em todo leite cru. Ela foi caracterizada pela primeira vez por Graham e Kay (1933). Esta enzima é uma fosfomonoesterase que catalisa a hidrólise de monoésteres de ácidos fosfóricos (REHMAN et al., 2003). Sua atividade ótima está na faixa de pH de 9,5 – 10 em uma temperatura de 37 °C (AHMAD PUNOO, 2018).

A ALP se encontra concentrada na interface da membrana do glóbulo de gordura do leite (AHMAD PUNOO, 2018). Cerca de 30-50% da ALP é encontrada na fase creme e o restante disperso no leite desnatado, provavelmente nas partículas de lipoproteínas (REHMAN et al., 2003). Sua concentração inicial varia devido à sazonalidade, a espécie do animal e o tempo de lactação (FOX et al., 2015).

Essa enzima é uma glicoproteína que contém ácido siálico. É um homodímero de duas subunidades de massa molecular de aproximadamente 85 kDa cada (FOX et al., 2015;

REHMAN et al., 2003). Na sua forma ativa ela está complexada com quatro átomos de Zn que garantem as suas propriedades funcionais (AHMAD PUNOO, 2018).

A ALP é a enzima mais importante no leite, do ponto de vista tecnológico, pois é utilizada como índice de pasteurização de produtos lácteos. Isso porque sua inativação térmica acontece em condições ligeiramente superiores às de destruição dos microrganismos patogênicos do leite, principalmente o *Mycobacterium tuberculosis* e a *Coxiella burnetii*, que são bactérias alvos da pasteurização (FOX; KELLY, 2006; PATRA; RAO; MEGHWAL, 2018). Estudos mostraram que a inativação da ALP segue uma reação de primeira ordem, tendo como ponto médio de desnaturação uma temperatura de 56 °C por um tempo de 30 minutos (LEVIEUX; GENEIX; LEVIEUX, 2007; STĂNCIUC et al., 2011). Dessa maneira, se for verificada a redução da atividade da ALP, pode-se inferir que houve a destruição desses microrganismos alvos (RANKIN et al., 2010).

Após a pasteurização do leite, o produto deve apresentar teste negativo para ALP, para garantir que o mesmo alcançou a temperatura de inativação dos microrganismos, e apresentar teste positivo para a LPO, garantindo que ele não sofreu um processo de superaquecimento (BRASIL, 2018).

Apesar da ampla utilização da ALP como índice de verificação de pasteurização, esta enzima pode não ser a mais adequada para isso, devido à possibilidade de existência de ALP de origem microbiana, cuja resistência térmica é maior do que a ALP endógena do leite (MACHADO et al., 2009; RANKIN et al., 2010). Além disso, a enzima pode se inativar em condições de sub-pasteurização, como 70 °C por 16 segundos e também, em certas condições, sofrer reativação devido à sua renaturação (FOX; KELLY, 2006; REHMAN et al., 2003).

2.3.3.1 Reativação da ALP

A reativação da ALP foi evidenciada pela primeira vez por Wright e Tramer (1953) que observaram que o leite UHT apresentou resultado negativo no teste da ALP logo após o processo térmico, mas que após um tempo de estocagem apresentou resultado positivo.

A reativação dos produtos tratados por HTST acontece com menor frequência, entretanto, em certas condições de armazenamento e pH, ela pode ocorrer. A temperatura ótima de ocorrência desse processo é de 34 °C e o pH de 6,5 (AHMAD PUNOO, 2018).

Em geral, a reativação da enzima aumenta com a temperatura de pasteurização e a diminuição do tempo de retardamento (REHMAN et al., 2003). Os produtos com alto teor de gordura são mais aptos a sofrerem reativação (PATRA; RAO; MEGHWAL, 2018).

Os íons metálicos Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} causam uma mudança conformacional na ALP desnaturada, fazendo com que ela volte para seu estado nativo e exerça sua atividade. Do contrário, os íons Sn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} , compostos quelantes como etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e fosfatos inorgânicos são inibitórios da renaturação (FOX et al., 2015).

Os grupos sulfidríla (SH) aparentemente são importantes para a reativação, o que explica o fato dos produtos tratados por UHT serem mais propensos à reativação do que os produtos tratados por HTST. A função do grupo SH, proveniente da desnaturação das proteínas do soro, é de quelar os metais e evitar a renaturação da enzima. Dessa forma, as proteínas do soro se ligam aos metais e diminuem a concentração de Zn^{2+} e Mg^{2+} do meio (FOX et al., 2015). No processo UHT, a desnaturação das proteínas do soro é maior, entretanto, elas estão, em sua grande maioria, formando ligações dissulfetos com κ -caseína. Assim, a função quelante que as soroproteínas desempenhariam, principalmente a β -lactoglobulina, fica comprometida deixando os metais livres, e acabam não atuando na prevenção da renaturação da enzima (MACHADO et al., 2009).

2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ALP

O método oficial internacional para a medição da ALP é o fluorimétrico (ISO 11816-1:2013) designado para avaliação da atividade da enzima em leite cru e pasteurizado. Este pode ser aplicado em leite integral, semidesnatado, desnatado e leites aromatizados, oriundos de vaca, cabra ou ovelha; além de também ser aplicável a produtos em pó após reidratação. Neste teste, é considerado negativo se a atividade residual da enzima no leite de vaca for inferior a 350 mU/L. Esta atividade é equivalente à adição de 0,02 – 0,05% de leite cru em leite pasteurizado segundo Greenwood e Rampling (1997) e 0,1% de acordo com Scintu et al. (2000).

No geral, os testes validados para a análise da ALP são classificados em três tipos: colorimétricos, fluorimétricos e quimioluminescentes (AHMAD PUNOO, 2018). Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para a verificação da ALP, desde que eles sejam validados frente aos métodos de referências (CLAWIN-RÄDECKER et al., 2021).

2.4.1 Colorimétricos

Os ensaios colorimétricos para a avaliação da atividade da ALP são fundamentados na liberação de produtos cromogênicos. A maioria dos testes colorimétricos atuais são embasados no primeiro teste descrito por Kay e Graham Jr (1935). Nestas avaliações, a atividade da enzima é avaliada de forma indireta pela determinação espectrofotométrica do produto, após a desfosforilação de diferentes substratos como: fenilfosfato, fenilfosfato de sódio, fenolftaleína fosfato, 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato, ou p-nitrofenilfosfato (CLAWIN-RÄDECKER et al., 2021). Vale ressaltar que alguns testes são qualitativos, sendo eles analisados apenas visualmente.

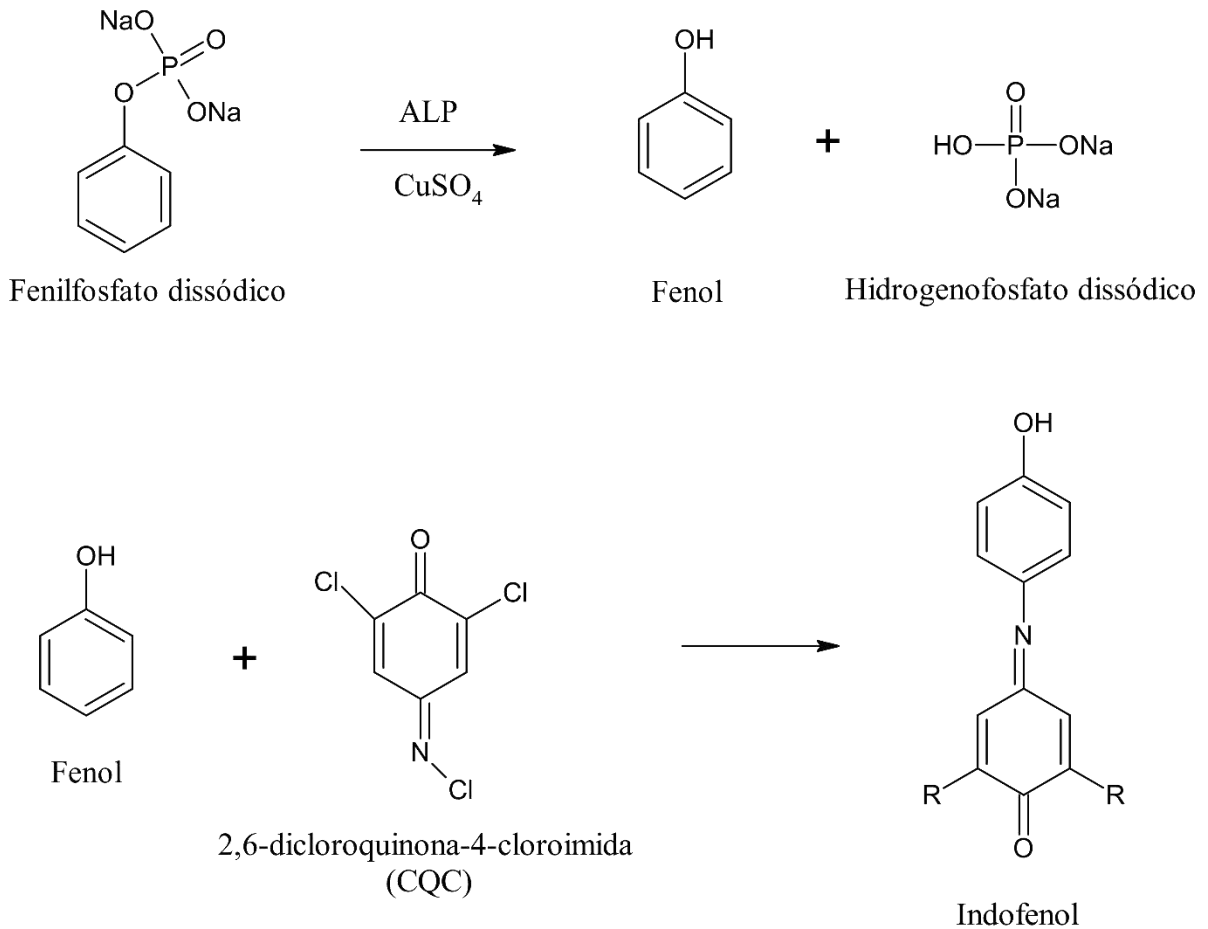
Os métodos colorimétricos mais utilizados atualmente são os de Scharer (1938), espectrofotométrico e visual, o de Rutgers (BABSON; GREELEY, 1967) e o de Aschaffenburg e Mullen (1949).

2.4.1.1 Método de Scharer: Visual e espectrofotométrico

O método de Scharer é considerado um método rápido, pois oferece uma redução considerável do tempo de análise em relação ao método original (KAY; GRAHAM JR, 1935), o qual ele foi baseado.

Neste teste a ALP cliva a ligação éster monofosfórica do substrato fenilfosfato dissódico, liberando fenol e fosfato. O fenol liberado reage com o reagente cromogênico 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida (CQC) e forma um composto azul de indofenol (RANKIN et al., 2010). Esta reação é descrita na Figura 1. A mediação da atividade da ALP é realizada de forma indireta pela quantificação do indofenol formado.

Figura 1 – Equação química da reação envolvida no teste colorimétrico de Scharer.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Adaptado de (RANKIN et al., 2010).

O aumento da intensidade da coloração azul infere um aumento da concentração da ALP. No caso do método visual, a intensidade da cor azul é comparada com um conjunto de padrões, enquanto no método quantitativo a determinação é realizada de forma espectrofotométrica no comprimento de onda de 650 nm. A quantificação da enzima é feita com o auxílio da curva analítica construída a partir de diferentes concentrações de fenol. De acordo com o método, um valor igual ou acima de 1 µg fenol mL⁻¹ de produto é indicativo de pasteurização inadequada (WEHR; FRANK, 2004).

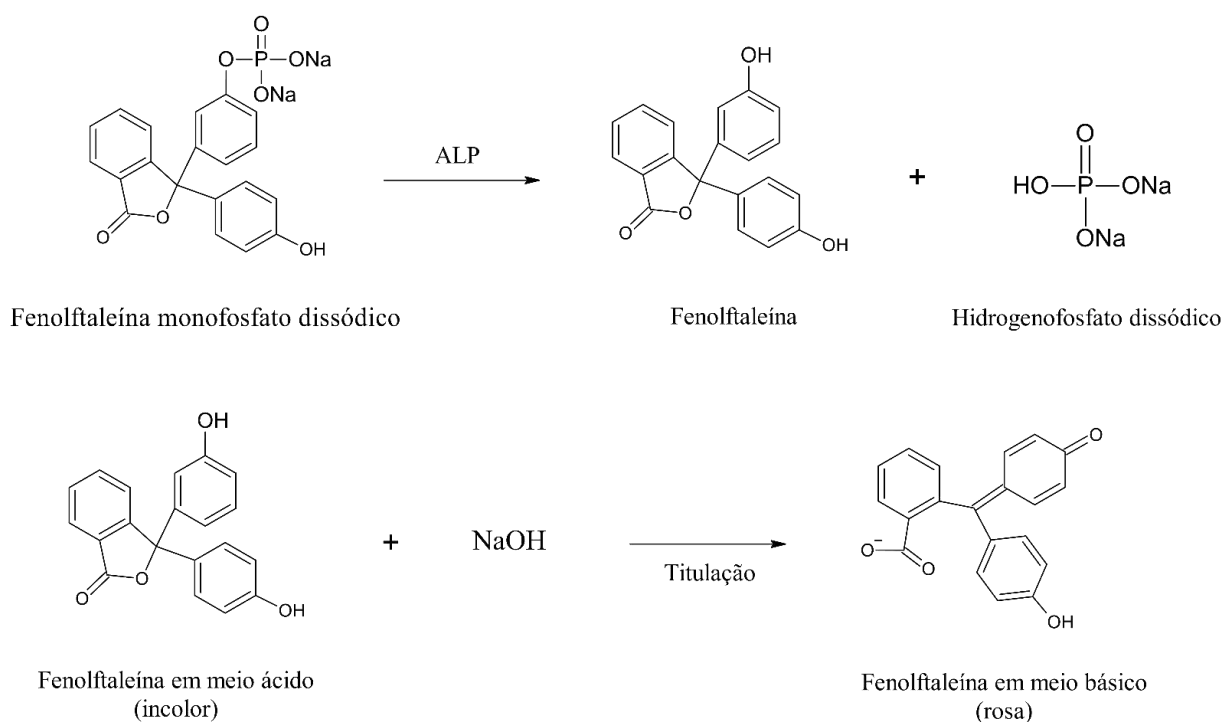
Apesar do método de Scharer ser rápido e de fácil utilização, ele apresenta limitações que podem interferir na sua aplicação. Scharer ressalta o cuidado com o uso de vidrarias, uma vez que as mesmas podem ser contaminadas com fenol e gerar resultados falso-positivos no teste da ALP. Além disso, o indofenol formado é instável ao longo do tempo, o que pode gerar resultados falso-negativos (SCHARER, 1943).

2.4.1.2 Método de Rutgers

No teste de Scharer, o indofenol liberado é extraído com butanol para realizar a leitura da absorbância no espectrofotômetro. Entretanto, foi relatado que em alguns casos pode ocorrer a formação de emulsão que reduz a eficiência da extração (RANKIN et al., 2010). Devido a isso, Babson e Greeley (1967) propuseram o uso do substrato monofosfato de fenolftaleína, dando origem ao método de Rutgers.

Neste método, ao passo que a ALP catalisa a reação de hidrólise e libera a fenolftaleína, a sua concentração pode ser determinada por titulação com NaOH. Esta reação é descrita na Figura 2.

Figura 2 – Equação química da reação envolvida no teste colorimétrico de Rutgers.



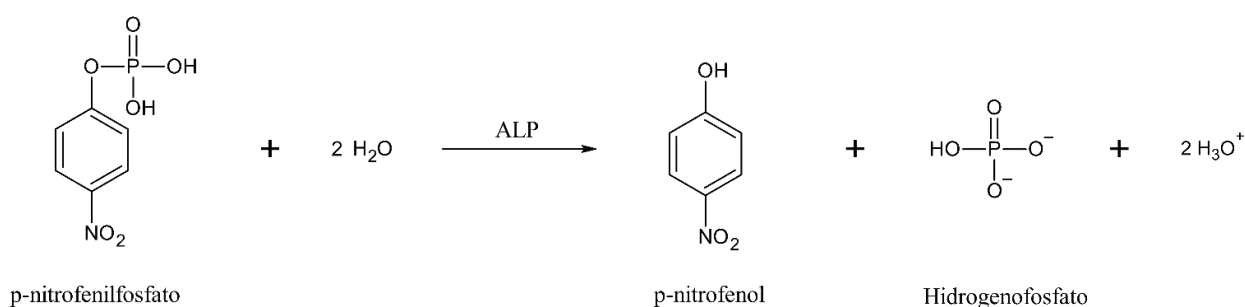
Fonte: Elaborado pela autora (2023). Adaptado de (RANKIN et al., 2010).

Ao contrário do produto liberado na reação de Scharer, a fenolftaleína liberada nesse caso é estável ao longo do tempo, com isso, minimiza-se a chance de resultados falso-negativos (AHMAD PUNOO, 2018).

2.4.1.3 Método de Aschaffenburg e Mullen

No ensaio de Aschaffenburg e Mullen o substrato utilizado é o p-nitrofenilfosfato que é clivado pela ALP, gerando o indicador nitrofenol e o fosfato. Neste caso, o produto formado possui coloração amarela. A reação pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Equação química da reação envolvida no método de Aschaffenburg e Mullen.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). Adaptado de (RANKIN et al., 2010).

Este método possui uma vantagem de não haver a necessidade de extração do produto, além do curto tempo de análise. Assim como o método de Scharer, este é um método aceito pela *American Public Health Association* (APHA) para a avaliação da ALP (AHMAD PUNOO, 2018).

2.4.2 Fluorimétricos

Os métodos fluorimétricos são baseados na quantificação de um radical fosfato liberado devido à catálise da ALP sobre um substrato auto-indicador, liberando um produto que é altamente fluorescente. Esse é o caso da reação com o 4 metilumbeliferil fosfato, liberando 7-hidróxi-4-metilcumarina, que tem fluorescência ótima em pH 14 (YOSHITOMI, 2004).

Um ensaio para medir a atividade da ALP em uma gama de produtos lácteos foi relatada por Fenoll et. al (2002), baseado na quantificação do produto fenolato, gerado pela hidrólise do trifluorometil-β-umbeliferona fosfato.

Atualmente, um éster monofosfórico aromático não fluorescente (2'-[2-benzotiazolil]-6'-hidroxibenzotiazol fosfato) é utilizado para avaliar de forma direta a atividade da ALP em produtos lácteos, pela quantificação do produto 2'-(2-benzotiazolil)-6'-hidroxibenzotiazol. Neste caso, a medição da atividade da enzima é medida a 38 °C ao longo de 3 minutos (ISO

11816-1, 2013). Esse método foi comparado com os métodos colorimétricos de Aschaffenburg e Mullen, e Scharer, demonstrando ter uma alta precisão, além de ser mais rápido e simples de executar. Com isso, foi relatado que este método fluorimétrico é cerca de 100 a 1000 vezes mais sensível do que os métodos colorimétricos (RANKIN et al., 2010).

2.4.3 Quimioluminescentes

A abordagem quimioluminescentes é baseada na desfosforilação de substratos de adamantil 1,2-dioxetano, como o adamantil-1,2-dioxetano fenilfosfato. Esse substrato é hidrolisado pela ALP para formar intermediários fenóxidos, que se decompõem com emissão prolongada de luz, podendo ser lida por um luminômetro ou dispositivo de contagens de fótons (AHMAD PUNOO, 2018). Os ensaios quimioluminescentes apresentam sensibilidades semelhantes aos métodos fluorimétricos (INSKI et al., 1994)

Uma metodologia quimioluminescente (ISO 22160: 2007) foi revisada e aprovada pela *International Dairy Federation* e é considerada então um método validado para testes da atividade da ALP em produtos lácteos. Essa metodologia junto com o método fluorimétrico (ISO 11816-1:2013) são os mais aceitos para verificar a atividade da enzima (RANKIN et al., 2010).

2.4.4 Métodos alternativos

Além dos métodos validados para a verificação da enzima, existem diversos métodos alternativos que são aplicados para verificar a atividade da ALP. Os mais comuns são os métodos rápidos comercializados em kit de reagentes e as tiras colorimétricas (SEIXAS et al., 2014).

Um estudo realizado por Serra et al. (2005) demonstrou o uso da eletroquímica para o monitoramento rápido da ALP em leite. Nesta pesquisa foi utilizado um biossensor de tirosinase composto de grafite-teflon amperométrico. O fenilfosfato foi utilizado como substrato, em que o fenol produzido enzimaticamente pela ação da ALP, era oxidado à quinona pela tirosinase. A quinona formada então era reduzida à catecol na superfície do eletrodo. Isso produzia um ciclo entre o produto eletroativo e o substrato da tirosinase, que permitia a detecção da ALP. O biossensor proposto apresentou a vantagem de não requerer nenhuma etapa de incubação,

demonstrando-se uma metodologia simples e rápida. Além disso, o método se mostrou altamente sensível com um limite de detecção (LD) de $6,7 \times 10^{-14}$ mol L⁻¹.

Outra abordagem utilizando um biossensor foi reportada por Mahato e Chandra (2019) que utilizou um protótipo desenvolvido com papel para a detecção da ALP a olho nu, em amostras de leite. A avaliação quantitativa foi realizada com uma técnica baseada em colorimetria de imagem digital integrada com *smartphone*, que empregou o uso do sistema RGB (*Red, Green and Blue*) para a quantificação. O biossensor foi desenvolvido pela imobilização covalente de anticorpos ALP na superfície do papel. Os resultados quantitativos foram obtidos com base na reação entre a sonda-sensor ligada a ALP e o 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato. Esta reação gera um precipitado azul-esverdeado, passível de ser processado com um *smartphone*. O biossensor foi considerado pelos autores altamente sensível mostrando uma recuperação de 91 a 100% de ALP em amostras de leite.

2.5 TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

A espectroscopia é o estudo da interação da luz com a matéria. A técnica de espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-VIS) é uma técnica de que se baseia na medição da absorção de luz monocromática, no comprimento de onda entre 160 e 800 nm, por compostos moleculares (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A espectrofotometria UV-VIS se fundamenta na lei de Beer-Lambert (Equação 1), em que a absorbância ou a transmitância da solução contida em uma cubeta transparente é proporcional à concentração do analito (PAIVA et al., 2014).

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad \text{Equação (1)}$$

onde, A é a absorbância, T é a transmitância, I₀ é a intensidade da luz incidida na célula contendo a solução, I é a intensidade da luz transmitida, ε é absorvidade molar do analito, b é o caminho óptico e c a concentração do analito (PAIVA et al., 2014).

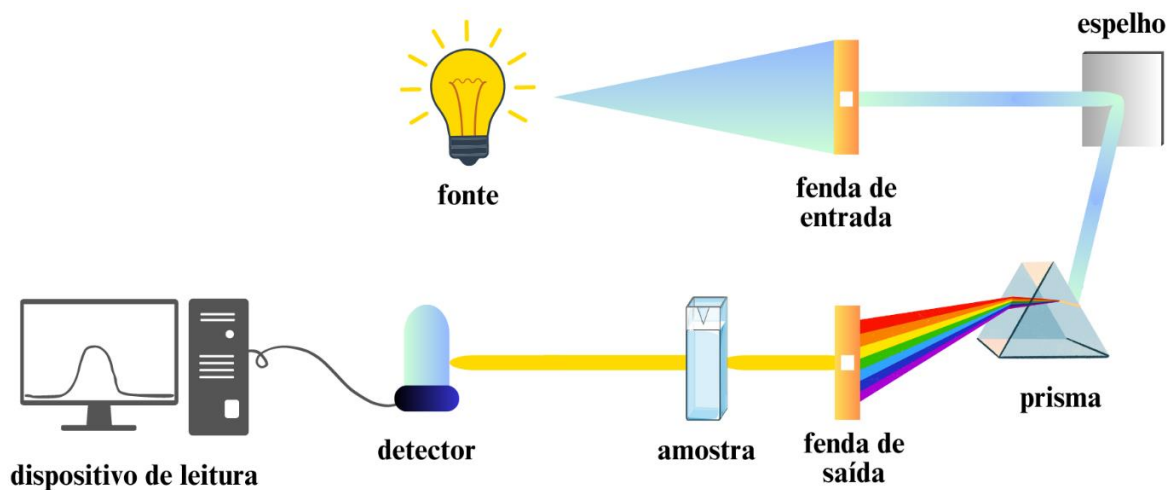
A espectrofotometria UV-VIS possui inúmeras aplicações como: a elucidação de estruturas orgânicas, a determinação da concentração de um analito, a detecção de impurezas nos compostos, a análise de compostos farmacêuticos para inferir sua qualidade, entre outras (VERMA; MISHRA, 2018).

Existem dois tipos de equipamentos utilizados para realizar as análises espectrofotométricas: o espectrômetro de feixe simples e o de feixe duplo (VERMA; MISHRA, 2018).

2.5.1 Espectrômetro de feixe simples

O espectrômetro UV-VIS de feixe simples, ilustrado na Figura 4, é composto por fontes de radiação, que no geral, são de tungstênio e deutério; um monocromador ou um filtro, para a seleção do comprimento de onda; a célula da amostra; um detector e um sistema de leitura, que consta com um amplificador e um leitor (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Figura 4 – Esquemática do espectrômetro de feixe simples.



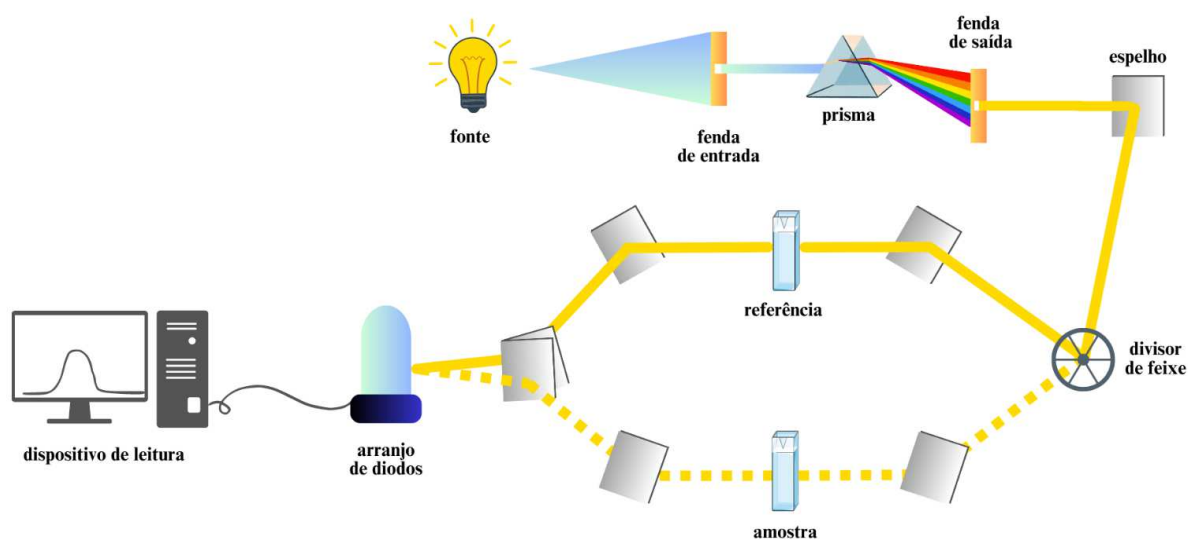
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os equipamentos de feixe simples variam entre as complexidades e as características de desempenho. Os mais sofisticados trabalham em uma faixa de comprimento de onda de 200 a 1000 nm, utilizando fontes de lâmpadas intercambiável de tungstênio e deutério, células de amostra transparentes de quartzo ou sílica fundida, monocromadores de alta resolução com rede de difração, e válvulas fotomultiplicadoras como detector (PAIVA et al., 2014; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

2.5.2 Espectrômetro de feixe duplo

Os espectrofotômetros de feixe duplo, ilustrado na figura 5, são os equipamentos mais modernos. Seus componentes são os mesmos do espectrofotômetro de feixe simples, entretanto, neste caso dois feixes são gerados no espaço por um divisor de feixe. Em seguida, estes passam por uma série de espelhos para os quais eles são direcionados a uma célula da amostra e uma célula de referência. Neste caso, o detector é um arranjo de diodos que permite a detecção simultaneamente da absorbância dos feixes em todos os comprimentos de onda (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; VERMA; MISHRA, 2018).

Figura 5 – Esquematização do espectrômetro de feixe duplo.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Esse tipo de equipamento pode ser utilizado tanto para análise qualitativa, quanto para análise quantitativa; além de também serem utilizados para estudos cinéticos. Ele costuma ser mais eficiente e preciso para análises quantitativas, pois a todo momento há o desconto da absorbância do branco em relação a absorbância das amostras. A desvantagem desse tipo de equipamento, é o seu alto custo, quando comparado com um espectrofotômetro de feixe simples (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

3 OBJETIVOS

Determinar a atividade da fosfatase alcalina em leite submetido a diferentes condições de tratamento térmico, por meio da aplicação de métodos qualitativo e quantitativo. Além de avaliar as mudanças da atividade da enzima ao longo do tempo de estocagem do produto.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a sensibilidade do método oficial qualitativo adotado pelo MAPA;
- b) Analisar a influência da composição do leite, utilizado nos tratamentos térmicos, na análise da ALP;
- c) Verificar a atividade da ALP nas amostras de leite pasteurizado pelo método oficial qualitativo adotado pelo MAPA;
- d) Determinar a atividade da ALP nas amostras de leite pasteurizado pelo método espectrofotométrico de Scharer;
- e) Investigar a reativação da enzima ao longo do tempo de armazenamento do leite pasteurizado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os métodos utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa são descritos nos subtópicos do item 4.

4.1 OBTENÇÃO DO LEITE CRU

Os leites crus utilizados nesta pesquisa foram adquiridos no Laticínio Bela Vista na unidade de Juiz de Fora – MG, pela parceira do laboratório QUIMTEC com a empresa Piracanjuba. Também foram adquiridos leites crus com produtor rural na cidade de Três Rios – RJ.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSICIONAIS DO LEITE CRU

As análises de pH dos leites crus foram realizadas, em triplicata, com o pHmetro de bancada PG1400 GEHAKA®.

Os teores de gordura, proteína e lactose foram determinados no analisador de leite EkoMilk Cap-Lab®. A densidade foi determinada pelo termolactodensímetro Cap-Lab®, o extrato seco total (EST) foi calculado pela fórmula de *Fleischmann* (Equação 2) e o extrato seco desengordurado (ESD) foi obtido pela diferença do valor do EST e da gordura (PEREIRA et al., 2001).

$$\% \text{ EST} = 1,2 \times \text{GOR} + 2,665 \times \frac{(\text{DEN} - 1)}{\text{DEN}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

onde GOR representa a gordura (% m/m) e DEN a densidade relativa a 15 °C.

4.3 PREPARO DE AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE LEITE CRU E SOLUÇÃO PADRÃO DE FENOL

Para realizar a avaliação dos métodos foram preparadas amostras de leite aquecido a 98 °C/1 min fortificadas com leite cru e com solução padrão de fenol 1 mg mL⁻¹.

4.3.1 Fortificação com leite cru

Inicialmente, 500 mL de leite cru foram aquecidos a, aproximadamente, 98 °C por 1 min, seguido de resfriamento a temperatura ambiente de 21 °C, a fim de se obter um leite com a ALP totalmente inativada. Posteriormente, em balões volumétricos de 100 mL, foram preparadas soluções de leite tratado termicamente com adição de 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0% e 2,0% (v/v) de leite cru. Em um segundo momento, foram preparadas novas soluções cujas concentrações foram de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,8% e 1,0% (v/v) de leite cru.

4.3.2 Fortificação com solução padrão de fenol

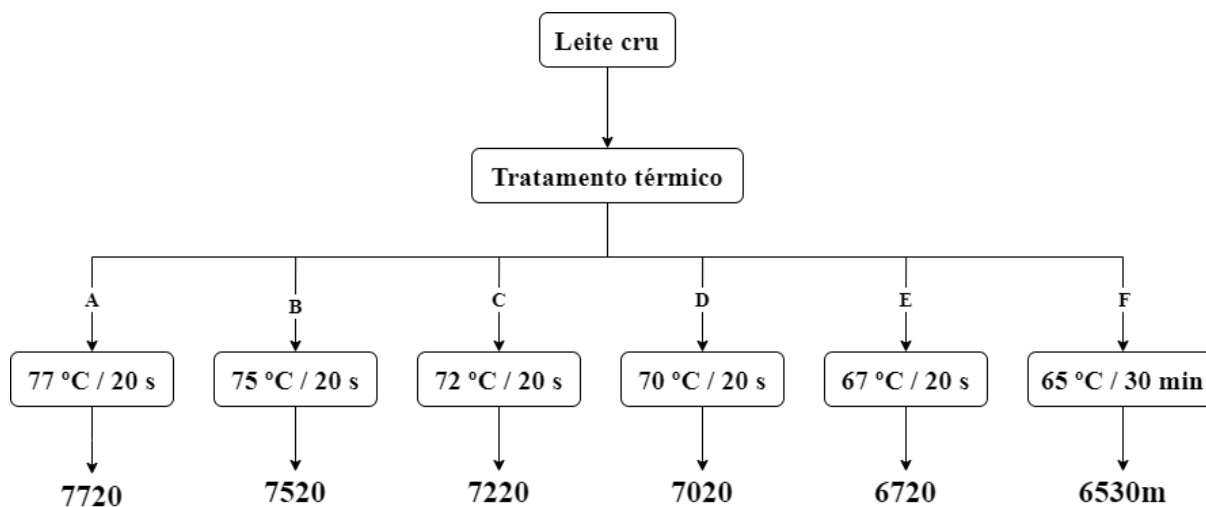
As amostras de leite fortificadas com fenol foram preparadas a partir de leite aquecido com adição de solução padrão de fenol 1 mg mL⁻¹.

Inicialmente, 500 mL de leite cru foram aquecidos a, aproximadamente, 98 °C por 1 min, seguido de resfriamento a temperatura ambiente de 21 °C, para se obter um leite com a ALP totalmente inativada. Em seguida, com esse leite, em balões volumétricos de 10 mL, foram preparadas soluções de concentrações igual de 1, 2, 3, 4 e 5 µg de fenol mL⁻¹ de leite.

4.4 PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE COM DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS

Os tratamentos térmicos aplicados ao leite cru foram realizados no banho-maria da marca QUIMIS[®], seguindo as condições apresentadas no Fluxograma 1. As amostras foram preparadas a partir de 12 mL de leite aquecido em tubos de ensaio de vidro com tampa (16 × 1550 mm). A temperatura de aquecimento foi controlada com um termômetro digital calibrado inserido diretamente no tubo da amostra, para garantir a temperatura desejada. O tempo de aquecimento foi controlado por um cronômetro digital e só foram contados a partir do momento em que o leite atingiu a temperatura desejada. A taxa média de aquecimento foi de 0,73 °C s⁻¹.

Fluxograma 1 – Condições dos tratamentos térmicos aplicados ao leite cru.



Nas codificações das amostras os dois primeiros dígitos representam a temperatura de aquecimento (°C) e os dois últimos dígitos, o tempo de aquecimento. Dessa maneira, 7720 representa a amostra aquecida a 77 °C por 20s, 7520 representa a amostra aquecida a 75 °C por 20s, 7220 representa a amostra aquecida a 72 °C por 20s, 7020 representa a amostra aquecida a 70 °C por 20s, 6720 representa a amostra aquecida a 67 °C por 20s e 6530m representa a amostra aquecida a 65 °C por 30 min.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As condições B e C foram escolhidas para representar a pasteurização HTST, e a condição F a pasteurização LTLT, ambas previstas na legislação. Já as condições D e E foram selecionadas a fim de estudar a sub-pasteurização do leite. Por fim, a condição A foi escolhida para avaliar uma situação de temperatura superior à da pasteurização.

4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ALP NAS AMOSTRAS DE LEITE

As amostras de leite foram avaliadas por dois métodos colorimétricos, um qualitativo e um quantitativo. O primeiro, trata-se do método oficial adotado pelo MAPA para verificar a pasteurização do leite (BRASIL, 2022) e o segundo, o método espectrofotométrico de Scharer descrito pela APHA (WEHR; FRANK, 2004).

4.5.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, sendo eles da marca Sigma-Aldrich[®]. No anexo I encontra-se a descrição dos preparos das soluções utilizadas na execução dos métodos.

4.5.2 Aplicação do método colorimétrico qualitativo nas amostras de leite

O método colorimétrico qualitativo oficial é uma adaptação do método visual de Scharer descrito pela APHA (MACHADO et al., 2009; WEHR; FRANK, 2004).

Para realizar o teste, as amostras de leite foram homogeneizadas a temperatura ambiente de 21 °C e uma alíquota de 500 µL de cada uma foi transferida para tubos de ensaio previamente rotulados. Em seguida, em cada tubo contendo a amostra foram adicionados 5 mL do substrato de trabalho. Os mesmos foram tampados, agitados e incubados em banho-maria à 40 ± 1 °C por 20 min. Logo após o tempo de incubação, os tubos foram resfriados em água corrente e, posteriormente, foram adicionadas 6 gotas do reagente CQC e 2 gotas do catalisador. Por fim, os tubos foram levados novamente para o banho-maria por 5 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com uma amostra de leite cru e uma amostra de leite fervido, para a obtenção dos controles positivo e negativo, respectivamente (BRASIL, 2022).

4.5.3 Aplicação do método espectrofotométrico de Scharer nas amostras de leite

O método espectrofotométrico de Scharer é uma adaptação do método visual, que foi modificado para extrair e quantificar, por espectrofotometria UV-VIS, o complexo de indofenol formado (WEHR; FRANK, 2004).

4.5.3.1 Construção da curva analítica

A curva analítica do método foi construída de acordo com a Tabela 2. As soluções dos pontos foram preparadas em balões volumétricos de 5,00 mL utilizando água deionizadas e solução padrão de fenol $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 2 – Volumes de solução padrão de fenol e água utilizados para preparar os pontos da curva analítica do método espectrofotométrico de Scharer.

Pontos	Padrão de fenol (1µg de fenol mL ⁻¹)	Água (mL)	µg de fenol / 0,5 mL de amostra	µg de fenol / mL de amostra equivalente*
0	0,00	5,00	0,00	0,00
1	0,25	4,75	0,25	0,50
2	0,50	4,50	0,50	1,00
3	1,00	4,00	1,00	2,00
4	2,50	2,50	2,50	5,00
5	4,00	1,00	4,00	8,00
6	5,00	0,00	5,00	10,00

* No método de Scharer, uma amostra de 0,5 mL de leite fluido é usada no ensaio. No entanto, os resultados finais para este ensaio são relatados em µg fenol / mL de amostra. Esses padrões, foram convertidos para 1 mL de amostra, de modo que os resultados finais não precisam sofrer nenhuma conversão adicional.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após a preparação das soluções, as mesmas foram transferidas para tubos de vidro e foi adicionado 500 µL de tampão de carbonato estoque (pH 9,8), 100 µL de reagente CQC e 100 µL do catalisador de sulfato de cobre. Em seguida, os tubos foram misturados e incubados imediatamente em banho-maria a 40 ± 1 °C por 5 minutos, após atingirem a temperatura do banho.

No final da incubação, os tubos foram resfriados em banho de gelo por pelo menos 10 minutos. Por fim, foram adicionados 5 mL de butanol neutralizado em cada tubo e os mesmos foram invertidos 6 vezes para extrair o indofenol. Após a extração, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos para a obtenção de uma camada alcoólica límpida.

A camada extraída dos padrões foi lida em um espectrofotômetro UV1800 Shimadzu® no comprimento de onda de 650 nm.

4.5.3.2 Sensibilidade do método espectrofotométrico de Scharer

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada a partir dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

O LD estabelece a menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto que o

LQ define a menor quantidade de analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. A determinação destes parâmetros foi obtida pelo método simplificado, utilizando as equações (3) e (4), baseando-se nos dados da curva analítica (ANVISA, 2017).

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação (3)}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad \text{Equação (4)}$$

onde IC é o valor da inclinação da curva analítica e σ é o desvio-padrão do coeficiente linear da curva analítica.

4.5.3.3 *Análise espectrofotométrica das amostras de leite*

Em tubos de ensaio previamente rotulados foi adicionado 500 μL de amostra e 5 mL do substrato de trabalho. Os tubos foram misturados e colocados imediatamente em um banho-maria por 15 minutos a 40 ± 1 °C. Após este tempo de incubação, os tubos foram removidos do banho-maria, foi adicionado 100 μL do reagente CQC e 100 μL do catalisador de sulfato de cobre. Novamente os tubos foram misturados e colocados de volta no banho-maria a 40 ± 1 °C por 5 minutos.

Ao final da incubação, os tubos foram resfriados em um banho de gelo abaixo de 10 °C. Em seguida, foi adicionado 5 mL do butanol neutralizado frio e os tubos foram vertidos delicadamente 4 vezes. Após isso, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos. A camada extraída de indofenol das amostras foi lida em um espectrofotômetro UV1800 Shimadzu® no comprimento de onda de 650 nm. Assim, a partir dos valores das absorbâncias e por meio da curva analítica de padrão de fenol, a concentração das amostras foi determinada.

O resultado do teste é expresso em μg de fenol mL^{-1} de leite; um valor acima de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ é indicativo de sub-pasteurização ou contaminação por leite cru. De acordo com o método, o coeficiente de variação é de 4,4 a 13,4% ao longo da faixa analítica (WEHR; FRANK, 2004).

4.5.4 Avaliação da reativação da ALP ao longo do tempo de armazenamento

A avaliação da reativação da ALP foi realizada pela comparação das concentrações das amostras de leite tratadas termicamente, de acordo com às condições apresentadas no Fluxograma 1, sendo elas comparadas com amostras de leite que sofreram os mesmos processos, porém, com adição de acetato de magnésio ($\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$) no tempo de armazenamento de 72h (T_{72}).

O preparo das amostras adicionadas de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ (354 mg mL^{-1}) foi realizado em 5 mL de cada amostra de leite com adição de 100 μL da solução do sal em cada tudo. Os mesmos foram incubados por 1h a $34 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, com mistura ocasional. Em sequência, foi realizada a aplicação dos métodos qualitativo e quantitativo.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre as médias dos dados foi realizada com um nível de significância de 5% pelo teste de Tukey, sendo executada no software R[®] (*The R Project for Statistical Computing*) versão 4.2.1 e no SigmaPlot[®] 15.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados foram divididos em tópicos que abordam: A avaliação dos métodos qualitativo e quantitativo, a influência da composição do leite, o efeito do tratamento térmico e do *shelf-life*, e a avaliação de uma possível reativação da ALP.

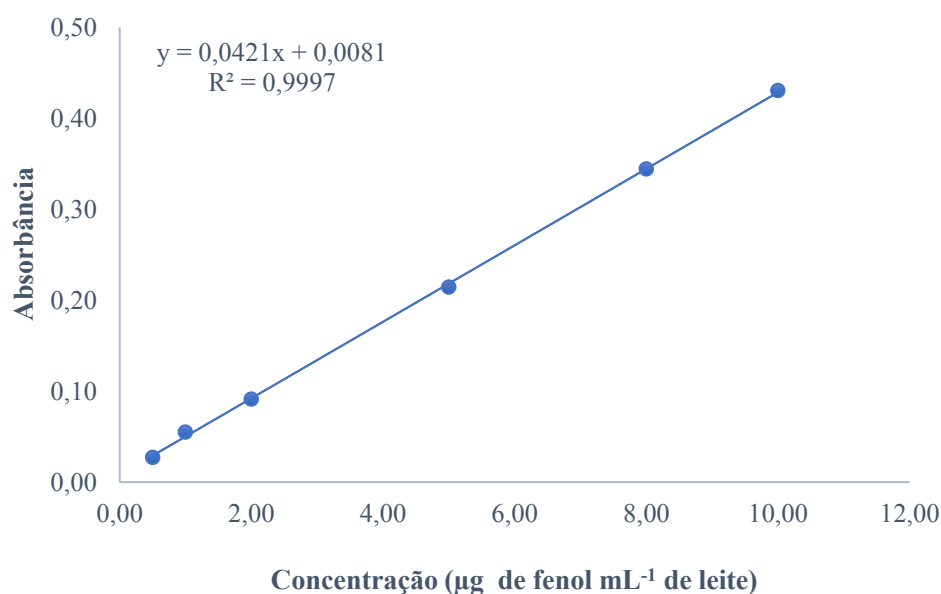
5.1 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO QUANTITATIVO

Inicialmente, o desempenho do método espectrofotométrico de Scharer foi avaliado em relação a sua linearidade, pelos coeficientes de determinação (R^2) e de correlação de Pearson (r), e a sensibilidade através do LD e LQ.

5.1.1 Linearidade do método quantitativo

A linearidade do método espectrofotométrico de Scharer foi verificada na faixa de trabalho de 0,50 a 10,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução padrão de fenol. A curva analítica foi construída com o auxílio do Software Microsoft Excel[®] e é apresentada no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Curva analítica do método espectrofotométrico de Scharer utilizada na quantificação das concentrações da ALP nas amostras de leite.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Obteve-se os valores do R^2 e r igual a 0,9997 e 0,9998, respectivamente, verificando com isso uma boa linearidade do método.

5.1.2 Limite de detecção e quantificação

OLD e LQ foram obtidos seguindo as normas do INMETRO pelo método simplificado, utilizando as equações (3) e (4) e os parâmetros da curva analítica. Os valores do LD e LQ foram de 0,11 e 0,34 μg de fenol mL^{-1} de leite, respectivamente.

5.2 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS

Inicialmente, o método oficial qualitativo foi confrontado com o método quantitativo para definir uma faixa de concentração, em μg de fenol mL^{-1} , na qual o método oficial detectava a presença da ALP. Para isso, foram avaliadas amostras de leite fervido fortificadas com diferentes concentrações de leite cru e concentrações de padrão de fenol PA.

5.2.1 Avaliação da atividade da ALP em amostras de leite fortificadas com leite cru

A Instrução Normativa Nº 76 de 2018 do MAPA (IN76), a qual abrange o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado estabelece que o leite cru deve conter no mínimo 3,0 g/100 g de gordura, 8,4 g/100 g extrato seco desengordurado (ESD), 11,4 g/100 g de extrato seco total (EST), 2,9 g/100 g de proteína, 4,3 g/100 g de lactose e densidade relativa entre 1,028 e 1,034 a 15 °C (BRASIL, 2018).

As soluções com adição de diferentes concentrações de leite cru foram preparadas a partir de um leite com $4,0 \pm 0,1$ g/100g de gordura, $8,6 \pm 0,1$ g/100g de ESD, $12,6 \pm 0,1$ g/100g de EST, densidade relativa de $1,030 \pm 0,001$ a 15 °C, $3,1 \pm 0,1$ g/100g de proteína e pH de $6,7 \pm 0,1$. Com isso, nota-se que o leite cru atendeu todas as exigências da IN76.

A partir disso, as soluções preparadas foram analisadas pelos métodos qualitativo e quantitativo. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados dos métodos qualitativo oficial e quantitativo de Scharer aplicado às amostras de leite fervido com adição de diferentes concentrações de leite cru (n=1).

Amostra	Método	
	Qualitativo	Quantitativo*
Leite fervido	–	0,00 ± 0,00 ^a
0,1%	–	0,93 ± 0,03 ^b
0,5%	+	5,59 ± 0,07 ^c
0,8%	+	6,22 ± 0,02 ^d
1,0%	+	7,78 ± 0,04 ^e
2,0%	+	13,01 ± 0,10 ^f
Leite cru	+	61, 50 ± 0,19 ^g

–Resultado negativo para o teste da ALP. + Resultado positivo para o teste da ALP.

*Concentração em $\mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

Leite fervido: sem adição de leite cru. Amostra 0,1% representa uma solução de 0,1% (v/v) de leite cru, amostra 0,5% representa uma solução de 0,5% (v/v) de leite cru, amostra 0,8% representa uma solução de 0,8% (v/v) de leite cru, amostra 1,0% representa uma solução de 1,0% (v/v) de leite cru e amostra 2,0% representa uma solução de 2,0% (v/v) de leite cru.

Pelo teste de Tukey, à um nível de significância de 5%, as letras iguais não diferem estatisticamente entre si. As letras minúsculas indicam a comparação das médias entre o as amostras.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No método qualitativo oficial adotado pelo MAPA, para o teste da ALP, é reportado positivo quando há o aparecimento de uma coloração azul no tubo da amostra, mais próximo a coloração de uma amostra de leite cru. Do contrário, o resultado negativo é relatado quando a coloração do tubo da amostra é cinza, semelhante a coloração de um tubo com uma amostra de leite fervido (BRASIL, 2022).

Foi observado que o método oficial qualitativo só foi capaz de detectar a presença da ALP a partir de uma concentração de 0,5% de leite cru, o que representa quantitativamente 5,59 μg de fenol mL^{-1} de leite, determinando assim o limite de detecção visual do método.

Castro (2005) relatou que o método oficial só foi capaz de detectar a atividade enzimática em amostras com adição de 1% (v/v) de leite cru, referente à $11,72 \pm 2,57 \mu\text{g}$ de fenol mL^{-1} . O presente estudo já mostrou um valor inferior de concentração que o método oficial pode detectar.

Com intuito de melhorar o limite de detecção visual, novas soluções foram preparadas a partir de um leite com $5,2 \pm 0,1 \text{ g}/100\text{g}$ de gordura, $8,5 \pm 0,1 \text{ g}/100\text{g}$ de ESD, $13,7 \pm 0,1 \text{ g}/100\text{g}$ de EST, densidade relativa de $1,029 \pm 0,001$ a 15 °C, proteína de

$3,2 \pm 0,1$ g/100g e pH de $6,8 \pm 0,1$. Os resultados da aplicação dos métodos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos métodos qualitativo oficial e quantitativo de Scharer aplicado às amostras de leite com adição de diferentes concentrações de leite cru (n=1).

Amostra	Método	
	Qualitativo	Quantitativo*
Leite fervido	–	$0,00 \pm 0,00^a$
0,1%	–	$4,05 \pm 0,07^b$
0,2%	+/-	$4,56 \pm 0,01^c$
0,3%	+/-	$8,91 \pm 0,06^d$
0,4%	+	$10,86 \pm 0,02^e$
0,5%	+	$13,53 \pm 0,03^f$
0,8%	+	$17,29 \pm 0,10^g$
1,0%	+	$25,66 \pm 0,08^h$
Leite cru	+	$98,78 \pm 0,26^i$

–Resultado negativo para o teste da ALP. + Resultado positivo para o teste da ALP. +/- Resultado de incerteza.

*Concentração em $\mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

Leite fervido: sem adição de leite cru (controle negativo). Leite cru (controle positivo). Amostra 0,1% representa uma solução de 0,1% (v/v) de leite cru, amostra 0,2% representa uma solução de 0,2% (v/v) de leite cru, amostra 0,3% representa uma solução de 0,3% (v/v) de leite cru, amostra 0,4% representa uma solução de 0,4% (v/v) de leite cru, amostra 0,8% representa uma solução de 0,8% (v/v) de leite cru e amostra 1,0% representa uma solução de 1,0% (v/v) de leite cru.

Pelo teste de Tukey, à um nível de significância de 5%, as letras iguais não diferem estatisticamente entre si. As letras minúsculas indicam a comparação das médias entre o as amostras.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A partir da avaliação dos dados reportados na Tabela 4, nota-se que o resultado do método qualitativo das amostras 0,2% e 0,3% resultou em uma incerteza da coloração, uma vez que os tubos dessas amostras apresentaram uma coloração muito escura, tornando difícil a identificação da cor desenvolvida nos tubos. Assim, evidenciou-se uma subjetividade do método oficial qualitativo, tornando este teste inadequado para verificar a pasteurização do leite, uma vez que o resultado expressado é determinado somente pela interpretação do analista.

Nesta segunda avaliação foi verificado que os valores das concentrações foram muito superiores quando comparado com as amostras preparadas na primeira avaliação (Tabela 3). Isso pode estar relacionado com o alto teor de gordura do leite cru utilizado no preparo das soluções. Como já citado, a ALP no leite encontra-se adsorvida na membrana do glóbulo de

gordura, isso pode implicar que leites com alto teores de gordura podem conter maiores quantidades da enzima, uma vez que mais de 40% do conteúdo da ALP é encontrada na fase creme (CLAEYS; VAN LOEY; HENDRICKX, 2002; MARCHAND et al., 2009). Além disso, a membrana do glóbulo de gordura pode atuar com uma proteção frente ao tratamento térmico (LU; PIYASENA; MITTAL, 2001; RANKIN et al., 2010), ocasionando uma maior concentração residual da enzima em leites com elevado teor de gordura (PAINTER; BRADLEY, 1997).

Esses resultados mostram que leites com diferentes composições podem influenciar na quantidade inicial da enzima presente (CLAWIN-RÄDECKER et al., 2021). Além disso, outros compostos presentes no leite, como os ácidos fenólicos podem reagir com o reagente cromogênico e serem quantificados pelos métodos colorimétricos, como é o caso do ácido vanílico, ácido hidroxibenzóico e o ácido salicílico (ROCCHETTI et al., 2022).

Em conclusão, fica claro que não existe uma relação direta entre a adição de leite cru e a concentração de fenol gerada. Com isso, não é recomendado que se utilize este método de dopagem de leite para avaliar o método qualitativo, uma vez que as mesmas dosagens de leite cru podem resultar em diferentes concentrações de fenol.

5.2.2 Avaliação da atividade da ALP em amostras de leite fortificadas com solução padrão de fenol

Como foi verificado no tópico anterior que não existe uma relação direta entre a adição de leite cru e a concentração de fenol gerada, para definir um parâmetro de detecção visual do método qualitativo (em $\mu\text{g fenol mL}^{-1}$) confiável, soluções com adição de diferentes concentrações de fenol PA (1 mg mL^{-1}) foram preparadas. A composição do leite utilizado no preparo destas soluções foi de $4,5 \pm 0,3 \text{ g/100g}$ de gordura, $8,5 \pm 0,1 \text{ g/100g}$ de ESD, $13,0 \pm 0,1 \text{ g/100g}$ de EST, densidade relativa de $1,029 \pm 0,001$ a 15°C , $3,3 \pm 0,1 \text{ g/100g}$ de proteína e pH de $6,7 \pm 0,1$. Os resultados da aplicação dos métodos são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados dos métodos qualitativo oficial e quantitativo de Scharer aplicado às amostras de leite com adição de diferentes concentrações de fenol PA (n=3).

Amostra	Método	
	Qualitativo	Quantitativo*
Leite fervido	–	0,00 ± 0,00 ^a
1	–	0,97 ± 0,15 ^b
2	–	2,12 ± 0,20 ^c
3	–	3,18 ± 0,29 ^d
4	+	4,13 ± 0,40 ^e
5	+	5,92 ± 0,18 ^f
Leite cru	+	66,98 ± 0,10 ^g

*Concentração em $\mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

–Resultado negativo para o teste da ALP. + Resultado positivo para o teste da ALP.

Amostra 1 representa a adição de $1 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$, amostra 2 representa a adição de $2 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$, amostra 3 representa a adição de $3 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$, amostra 4 representa a adição de $4 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$ e amostra 5 representa a adição de $5 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

De acordo com o teste T as concentrações teóricas e experimentais não podem ser consideradas estatisticamente ($p < 0,05$) diferentes.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na avaliação desses dados, pode-se observar que o método qualitativo apresentou um resultado positivo a partir da amostra 4. Dessa maneira, ficou determinado que o limite de detecção visual do método qualitativo se estabeleceu em $4 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

O método espectrofotométrico de Scharer expressa que um valor acima de $1 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$ de leite é indicativo de pasteurização inadequada (WEHR; FRANK, 2004). Assim, comparando o método oficial brasileiro com o método de Scharer, nota-se que o primeiro apresentou uma sensibilidade muito inferior ao método espectrofotométrico.

O método de Scharer é considerado um dos métodos mais aceitáveis para de verificar a pasteurização do leite em diversos países do mundo, sendo que no Canadá este é o método oficial (CLAWIN-RÄDECKER et al., 2021). Logo, isso evidencia que o método oficial brasileiro está detectando a presença da enzima em concentrações muito superiores à concentração estabelecida por um método de referência internacional.

5.3 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO LEITE NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALP

Sabendo agora que a composição do leite influencia na avaliação da atividade da ALP e que a gordura é um componente propício a sofrer alteração devido a diversos fatores como: sazonalidade, estágio de lactação, alimentação, espécie e saúde do animal (CHEN; LEWIS; GRANDISON, 2014; DALEY; ARMENTANO; HANIGAN, 2022; LI; YE; SINGH, 2022; SAMKOVÁ et al., 2012), uma comparação da atividade da enzima em amostras de leites com três diferentes níveis de gordura foi realizada. A composição dos leites é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição dos leites utilizados na comparação da atividade da ALP.

Leite	Semidesnatado	Integral	Alto teor
GOR (g/100 g)	0,8 ± 0,1 ^A	3,8 ± 0,2 ^B	5,3 ± 0,1 ^C
ESD (g/100 g)	8,7 ± 0,1 ^A	8,7 ± 0,3 ^A	9,0 ± 0,4 ^A
EST (g/100 g)	9,5 ± 0,1 ^A	12,5 ± 0,5 ^B	14,4 ± 0,5 ^C
DEN	1,033 ± 0,001 ^A	1,032 ± 0,001 ^A	1,031 ± 0,002 ^A
PRO (g/100 g)	3,3 ± 0,1 ^A	3,4 ± 0,1 ^A	3,5 ± 0,1 ^A
LAC (g /100 g)	4,6 ± 0,1 ^A	4,6 ± 0,1 ^A	4,8 ± 0,2 ^A
pH	6,7 ± 0,1 ^A	6,7 ± 0,1 ^A	6,7 ± 0,1 ^A

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Pelo teste de Tukey, à um nível de significância de 5%, as letras iguais não diferem estatisticamente entre si. As letras maiúsculas indicam a comparação das médias entre os componentes dos diferentes tipos de leites (mesma linha).

GOR = gordura, ESD = extrato seco desengordurado, EST = extrato seco total, DEN = densidade relativa a 15 °C, PRO = proteína e LAC = lactose.

Na comparação dos leites, os mesmos apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) com relação à gordura e ao EST, os demais componentes não apresentaram diferenças estatísticas.

Como a fosfatase alcalina é uma enzima termorresistente (MCKELLAR et al., 1994), a sua atividade residual foi determinada em amostras com diferentes tratamentos térmicos. Para isso, cada tipo de leite foi submetido a diferentes condições de tratamento, apresentadas no Fluxograma 1, e foram avaliados pelos métodos qualitativo e quantitativo. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação entre as atividades residuais médias da ALP, dos métodos qualitativo e quantitativo ($\mu\text{g fenol mL}^{-1}$), nas amostras de leites com diferentes composições (n=3).

Amostra	Semidesnatado		Integral		Alto teor	
	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*
Leite cru	+	88,99 \pm 3,86 ^{Aa}	+	82,00 \pm 30,52 ^{Aa}	+	97,64 \pm 13,52 ^{Aa}
6720	+	12,15 \pm 8,73 ^{Ab}	+	13,85 \pm 7,98 ^{Ab}	+	22,49 \pm 0,42 ^{Ab}
7020	–	0,69 \pm 0,60 ^{Ac}	–	1,36 \pm 0,48 ^{Ac}	–	2,81 \pm 0,56 ^{Bc}
7220	–	0,64 \pm 0,16 ^{Ac}	–	1,20 \pm 0,19 ^{Bc}	–	1,60 \pm 0,15 ^{Bc}
7520	–	0,51 \pm 0,12 ^{Ac}	–	1,15 \pm 0,30 ^{A,Bc}	–	1,73 \pm 0,47 ^{Bc}
7720	–	0,36 \pm 0,23 ^{Ac}	–	0,48 \pm 0,26 ^{Ac}	–	2,17 \pm 1,58 ^{Ac}
6530m	–	0,18 \pm 0,04 ^{Ac}	–	1,19 \pm 0,43 ^{Bc}	–	1,07 \pm 0,34 ^{Bc}
Leite fervido	–	0,00 \pm 0,00 ^{Ad}	–	0,00 \pm 0,00 ^{Ad}	–	0,00 \pm 0,00 ^{Ad}

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

*Concentração em $\mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

–Resultado negativo para o teste da ALP. + Resultado positivo para o teste da ALP.

Pelo teste de Tukey, à um nível de significância de 5%, as letras iguais não diferem estatisticamente entre si. As letras maiúsculas indicam a comparação de médias entre os diferentes leites (mesma linha) e as letras minúsculas indicam a comparação das médias entre os tratamentos térmicos (mesma coluna).

As amostras 7020, 7220 e 7520 apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) com relação às concentrações da ALP entre os leites semidesnatado e com alto teor de gordura, enquanto que a amostra 6530m apresentou uma diferença estatística ($p < 0,05$) entre o leite semidesnatado e o integral. Os elevados valores dos desvios-padrão das amostras de leite cru e 6720 podem ser justificados pelo fato das médias das atividades da enzima terem sido obtidas de leites com diferentes composições, e conseqüentemente, diferentes concentrações iniciais de ALP. Além disso, esses desvios também podem ser explicados pela diluição de 5 ×, que foi necessária para obtenção dos resultados das atividades dentro da faixa de trabalho da curva analítica do método espectrofotométrico.

Nota-se pelos valores das concentrações destas amostras que a medida em que há o aumento do teor de gordura do leite, há um aumento na atividade da enzima. Esses resultados estão em concordância com os de Painter e Bradley (1997) que relatam que o aumento no nível de gordura do leite resulta em um aumento na atividade residual da enzima. Além disso, Sharma e Rajput (2009) relataram que a ALP no leite desnatado é cerca de 47% menor quando comparada com a concentração da enzima no leite integral.

Estima-se que de 30% a 40% da ALP encontra-se adsorvida na membrana do glóbulo de gordura (LU; PIYASENA; MITTAL, 2001), logo, os altos níveis da atividade da ALP em leites gordos podem indicar uma proteção da gordura frente ao tratamento térmico do leite (PAINTER; BRADLEY, 1997). Desse modo, quanto menor o nível de gordura, menor a proteção e mais efetivo é o tratamento térmico. Isso está de acordo com os resultados obtidos por Angelino et al. (1999) em que os autores demonstraram que a taxa de inativação da ALP depende do teor de gordura. Quanto mais gordo for o leite, maior deve ser a temperatura ou o tempo de aquecimento a fim de inativar a enzima.

Em suma, fica claro que a composição do leite, e principalmente o teor de gordura do produto, influencia na atividade inicial e residual (após tratamento térmico) da atividade da ALP.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALP NO LEITE DURANTE O SEU *SHELF-LIFE*

Nas indústrias de laticínios, o principal interesse em avaliar a atividade da ALP é em relação à verificação da eficiência do processo de pasteurização do leite (ANDRÉN, 2021). Sendo assim, a atividade residual da ALP no leite foi investigada ao longo de um *shelf-life* de 72h, em amostras tratadas em diferentes condições térmicas.

Os tratamentos térmicos das amostras de leite foram executados de acordo com o Fluxograma 1 e a atividade residual da enzima foi acompanhada em quatro tempos (T_0 , T_{24} , T_{48} , T_{72}): Onde T_0 representa o dia da realização do tratamento térmico, T_{24} - 24h após o tratamento térmico, T_{48} - 48h após o tratamento térmico e T_{72} - 72h após o tratamento térmico.

O leite cru utilizado no preparo das amostras continha $3,8 \pm 0,2$ g/100g de gordura, $8,7 \pm 0,3$ g/100g de ESD, $12,5 \pm 0,5$ g/100g de EST, densidade relativa de $1,032 \pm 0,001$ a 15°C , $3,4 \pm 0,1$ g/100g de proteína e pH de $6,7 \pm 0,1$. Com isso, nota-se que o leite cru atendeu às exigências da IN76. Os resultados da aplicação dos métodos são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados dos métodos qualitativo e quantitativo ($\mu\text{g fenol mL}^{-1}$) das atividades residuais da enzima nas amostras de leite com diferentes tratamentos térmicos e durante o *shelf-life* (n=3).

Amostra	T ₀		T ₂₄		T ₄₈		T ₇₂	
	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*
Leite cru	+	82,00 ± 24,92 ^{Aa}	+	82,00 ± 24,92 ^{Aa}	+	82,00 ± 24,92 ^{Aa}	+	82,00 ± 24,92 ^{Aa}
6720	+	13,85 ± 6,5 ^{Ab}	+	10,86 ± 0,24 ^{Ab}	+	10,05 ± 1,92 ^{Ab}	+	8,10 ± 2,60 ^{Ab}
7020	-	1,36 ± 0,39 ^{Ac}	-	1,77 ± 0,36 ^{Ac}	-	1,70 ± 0,56 ^{Ac}	-	2,08 ± 1,84 ^{Ab}
7220	-	1,20 ± 0,14 ^{Ac}	-	1,64 ± 0,18 ^{Ac}	-	1,48 ± 0,06 ^{Ac}	-	2,54 ± 1,77 ^{Ab}
7520	-	1,15 ± 0,24 ^{Ac}	-	1,32 ± 0,41 ^{Ac}	-	1,13 ± 0,25 ^{Ac}	-	2,22 ± 2,16 ^{Ab}
7720	-	0,48 ± 0,22 ^{Ac}	-	0,88 ± 0,27 ^{A,Bc}	-	0,85 ± 0,21 ^{A,Bc}	-	1,95 ± 0,58 ^{Bb}
6530m	-	1,19 ± 0,35 ^{Ac}	-	1,09 ± 0,27 ^{Ac}	-	1,11 ± 0,12 ^{Ac}	-	1,57 ± 1,11 ^{Ab}
Leite fervido	-	0,00 ± 0,00 ^{Ad}	-	0,00 ± 0,00 ^{Ad}	-	0,00 ± 0,00 ^{Ad}	-	0,00 ± 0,00 ^{Ac}

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

*Concentração em $\mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

-Resultado negativo para o teste da ALP. + Resultado positivo para o teste da ALP.

T₀: dia do tratamento térmico, T₂₄: 24h após o tratamento térmico, T₄₈: 48h após o tratamento térmico, T₇₂: 72h após o tratamento térmico.

Pelo teste de Tukey, à um nível de significância de 5%, as letras iguais não diferem estatisticamente entre si. As letras maiúsculas indicam a comparação de médias entre o tempo de estocagem do leite (mesma linha) e as letras minúsculas indicam a comparação das médias entre os tratamentos térmicos (mesma coluna).

Pelo teste de Tukey, a um nível de significância de 5%, as amostras não apresentaram diferenças estatísticas nas concentrações da ALP ao longo do *shelf-life*, com exceção da amostra 7720 que apresentou uma diferença após 24h do processamento do leite (T₂₄). Nota-se nesse caso que houve um aumento da atividade residual da enzima com o passar do tempo. Nos outros casos, observa-se apenas uma pequena variação da concentração da enzima ao longo dos dias de avaliação.

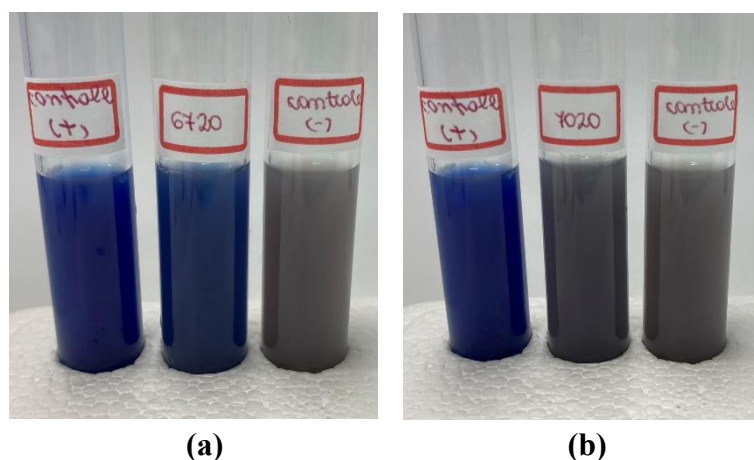
Com relação aos diferentes tratamentos térmicos, apenas a amostra 6720 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às demais amostras. Isso aponta que a partir de uma temperatura de aquecimento de 70 °C, o tratamento térmico causa um efeito de inativação na enzima de forma semelhante.

Como já mencionado, de acordo com o método quantitativo de Scharer (WEHR; FRANK, 2004), o valor de 1 µg de fenol mL⁻¹ de leite é o limite expresso para se avaliar a pasteurização efetiva do leite, ou seja, um resultado de 1 µg de fenol mL⁻¹ ou superior é indicativo de pasteurização inadequada.

No método oficial qualitativo o resultado negativo indica que o leite foi pasteurizado adequadamente, enquanto que o positivo é indicativo de pasteurização inadequada, ou então que o mesmo foi contaminado com leite cru após o processo térmico (BRASIL, 2022). O resultado positivo do método é relatado quando há o aparecimento da coloração azul no tubo da amostra, semelhante à coloração de um tubo controle (+) de leite cru, e o resultado negativo é reportado quando a coloração do tubo da amostra é cinza, similar a um controle (-) de leite fervido. Esses resultados podem ser vistos na Figura 6.

Dessa maneira, observando os valores das concentrações da ALP no tempo T₀, nota-se que as amostras que sofreram o tratamento térmico de pasteurização LTLT (6530m) ou HTST (7220 e 7520) apresentaram valores superiores à 1 µg de fenol mL⁻¹, indicando assim um resultado falso-positivo. Com isso, o valor limite expresso pelo método não se mostrou adequado para se verificar a pasteurização dessas amostras de leite. Apenas a amostra cujo tratamento térmico foi mais intenso (7720) apresentou valores inferiores à 1 µg de fenol mL⁻¹.

Figura 6 – Imagens dos resultados positivo da amostra 6720 (a) e negativo da amostra 7020 (b), do método oficial qualitativo.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados da Tabela 8 exibem que apenas a amostra 6720 apontou um resultado positivo para o teste da ALP. A amostra de sub-pasteurização 7020 apresentou um resultado falso-negativo em todos os tempos de análises. Isso deixa claro que este método oficial adotado pelo MAPA não é apropriado para verificar a pasteurização efetiva do leite.

De posse disso, é recomendado que métodos mais sensíveis devam ser avaliados e adotados para verificar a pasteurização adequada do leite, garantindo assim a segurança de consumo do produto.

5.5 AVALIAÇÃO DA REATIVAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALP AO LONGO DO *SHELF-LIFE*

Na literatura já é sabido que a ALP pode voltar a exercer sua atividade nativa pelo processo de renaturação (WRIGHT; TRAMER, 1953a). Fatores como o tempo e temperatura de estocagem do leite, temperatura de aquecimento e a presença de metais bivalentes no produto podem contribuir para a reativação da enzima (PATRA; RAO; MEGHWAL, 2018).

A partir disso, foi realizado um estudo para avaliar a reativação da ALP nas amostras tratadas termicamente. As atividades residuais da enzima foram avaliadas durante o período de *shelf-life* do leite de 72h e foram comparadas com amostra de leite adicionadas de $Mg(CH_3CO_2)_2$ no tempo T_{72} . A intenção de adicionar este sal foi forçar a reativação da enzima ao máximo.

A ALP é uma metaloenzima de íons bivalentes e o íon Mg^{2+} é um metal capaz de causar mudanças na conformação da enzima e fazer com que ela retorne para o seu estado nativo, voltando a exercer sua atividade (WRIGHT; TRAMER, 1956).

As amostras avaliadas foram preparadas submetendo o leite às condições ilustradas no Fluxograma 1. O leite utilizado nos tratamentos térmicos continha $5,3 \pm 0,2$ g/100g de gordura, $9,0 \pm 0,6$ g/100g de ESD, $14,4 \pm 0,6$ g/100g de EST, densidade relativa de $1,031 \pm 0,002$ a $15^{\circ}C$, $3,5 \pm 0,1$ g/100g de proteína e pH de $6,7 \pm 0,1$. Os resultados da aplicação dos métodos são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados dos métodos qualitativo e quantitativo ($\mu\text{g fenol mL}^{-1}$) das atividades residuais da enzima nas amostras de leite tratadas termicamente e amostras de leite com adição de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$ em T_{72} (n=3).

Amostra	T ₀		T ₂₄		T ₄₈		T ₇₂		T ₇₂ com adição de Mg^{2+}	
	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*	Qualitativo	Quantitativo*
Leite cru	+	$97,64 \pm 13,52^A$	+	$97,64 \pm 13,52^A$	+	$97,64 \pm 13,52^A$	+	$97,64 \pm 13,52^A$	+	
6720	+	$22,49 \pm 0,42^A$	+	$23,16 \pm 0,49^{A,B}$	+	$24,89 \pm 0,72^{B,C}$	+	$25,56 \pm 0,29^C$	+	$30,96 \pm 0,18^D$
7020	–	$2,61 \pm 0,62^A$	–	$2,71 \pm 0,46^A$	–	$2,97 \pm 0,70^A$	+	$4,43 \pm 0,31^A$	+	$4,81 \pm 1,12^A$
7220	–	$1,60 \pm 0,15^A$	–	$2,93 \pm 0,28^{A,B}$	–	$3,11 \pm 1,25^{A,B}$	–	$4,64 \pm 1,59^B$	+	$5,17 \pm 0,18^B$
7520	–	$1,43 \pm 0,62^A$	–	$1,66 \pm 0,10^{A,B}$	–	$1,95 \pm 0,27^{A,B}$	–	$2,43 \pm 0,80^{A,B}$	–	$3,20 \pm 0,38^B$
7720	–	$1,26 \pm 0,23^A$	–	$1,94 \pm 0,08^{A,B}$	–	$2,73 \pm 1,13^{A,B}$	–	$3,91 \pm 0,82^B$	–	$3,07 \pm 0,15^{A,B}$
6530m	–	$0,47 \pm 0,50^A$	–	$0,78 \pm 0,01^{A,B}$	–	$1,22 \pm 0,33^{A,B}$	–	$2,61 \pm 0,70^{B,C}$	–	$3,36 \pm 1,17^C$
Leite fervido	–	$0,00 \pm 0,00^A$	–	$0,00 \pm 0,00^A$	–	$0,00 \pm 0,00^A$	–	$0,00 \pm 0,00^A$	–	$3,89 \pm 0,88^B$

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

*Concentração em $\mu\text{g fenol mL}^{-1}$.

– Resultado negativo para o teste da ALP. + Resultado positivo para o teste da ALP.

T₀: dia do tratamento térmico, T₂₄: 24h após o tratamento térmico, T₄₈: 48h após o tratamento térmico, T₇₂: 72h após o tratamento térmico.

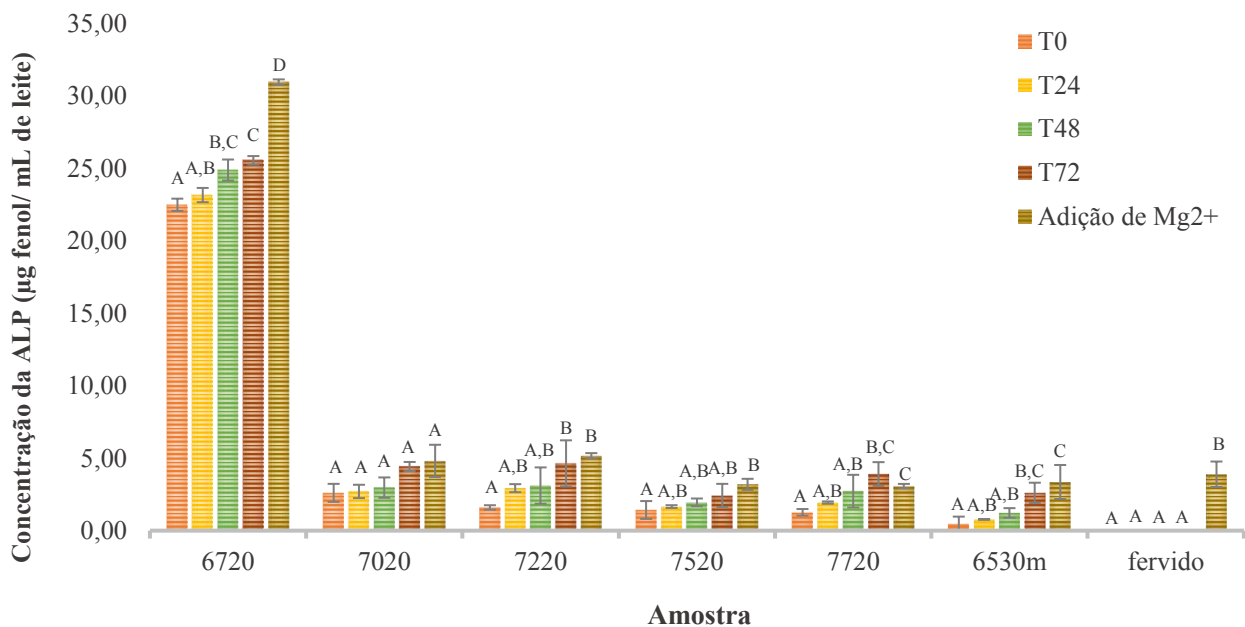
Pelo teste de Tukey, à um nível de significância de 5%, as letras iguais não diferem estatisticamente entre si. As letras maiúsculas indicam a comparação de médias entre o tempo de estocagem do leite (mesma linha).

Os dados mostram que apenas a amostra 7020 não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) nas concentrações da ALP ao longo do *shelf-life*. Observa-se que ao longo do tempo as atividades da enzima nas amostras aumentaram. Além disso, nota-se que as concentrações das amostras adicionadas de $Mg(CH_3CO_2)_2$ foram superiores às concentrações das respectivas amostras sem adição do sal. Esses resultados podem ser visualizados de forma mais clara no Gráfico 2.

Essa comparação da atividade residual da ALP com relação às concentrações das amostras com adição de Mg^{2+} retrata que, se as atividades da enzima nas amostras reativadas forem iguais ou superiores às concentrações das amostras sem $Mg(CH_3CO_2)_2$, considera-se então que a ALP sofreu reativação nas amostras sem adição do sal (AHMAD PUNOO, 2018).

Com relação ao método qualitativo, não foram observadas grandes mudanças ao longo dos tempos de análises, com exceção da amostra 7020 em T_{72} que passou a testar positivo para o teste da ALP.

Gráfico 2 – Concentração da ALP (μg fenol mL^{-1}) nas amostras de leite durante o *shelf-life* e nas amostras leite adicionadas de $Mg(CH_3CO_2)_2$ ($n=3$).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

T_0 : dia do tratamento térmico, T_{24} : 24h após o tratamento térmico, T_{48} : 48h após o tratamento térmico, T_{72} : 72h após o tratamento térmico.

Pelo teste de Tukey, à um nível de significância de 5%, as letras iguais não diferem estatisticamente entre si. As letras maiúsculas indicam a comparação de médias entre o tempo de estocagem do leite.

De acordo com Wright e Tramer (1952) os produtos lácteos com alto teor de gordura estão mais propensos a sofrerem reativação. O que também foi observado por Painter e Bradley (1997) que relataram que os produtos com baixo teor de gordura eram menos susceptíveis a esse processo. Além da questão composicional, a temperatura e o tempo a que os produtos são submetidos também influenciam neste processo de renaturação da enzima. Produtos aquecidos a temperaturas maiores tendem a se reativar mais (WRIGHT; TRAMER, 1953b).

Sabendo disso, com os dados da Tabela 9, foi calculado o percentual do aumento concentração da enzima ao longo do *shelf-life* do produto. Os valores foram obtidos pela diferença da atividade residual da enzima, nos respectivos tempos, com as concentrações da ALP em T₀. Na Tabela 10 é apresentado esse percentual em cada amostra. As comparações foram realizadas apenas com as amostras que passaram pelo tratamento HTST.

Tabela 10 – Percentual do aumento das concentrações nas amostras de leite com relação às concentrações da enzima em T₀.

Amostra	% T₂₄	% T₄₈	% T₇₂
6720	2,98	10,67	13,65
7020	3,74	13,88	69,67
7220	82,91	94,15	189,62
7520	16,40	36,80	70,29
7720	53,24	115,52	209,03

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

T₂₄: 24h após o tratamento térmico, T₄₈: 48h após o tratamento térmico, T₇₂: 72h após o tratamento térmico.

Nota-se que, no geral, as amostras que sofreram um tratamento térmico mais intenso apresentaram percentuais maiores de aumento da concentração da enzima ao longo do tempo de armazenamento. Esses resultados entram em consonância com os obtidos por Wright e Tramer (1953), que demonstraram que a reativação da ALP foi maior em leite pasteurizado a 170 e 180 °F (77 °C e 82 °C, respectivamente), quando comparado com leite pasteurizado a 160 °F (71 °C). A exceção, neste trabalho, pode ser observada na amostra 7220 que apresentou um aumento mais expressivo do que a amostra subsequente (7520).

Esses resultados deixam claro que ao longo do tempo de armazenamento do leite, após o tratamento térmico, a ALP pode sofrer uma reativação e com isso exercer sua atividade nativa. Em decorrência disso, é reforçada a exigência da legislação de se realizar o teste para

verificação da pasteurização imediatamente após o processamento do leite, a fim de se evitar resultados falso-positivos.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados desse estudo, foi possível definir um parâmetro no qual o método oficial qualitativo conseguiu detectar a presença da ALP. Evidenciou-se que esse método não apresentou uma boa sensibilidade de análise, visto que só atestou positivo para amostras com concentração a partir de 4 μg de fenol mL^{-1} de leite, sendo essa concentração muito superior à estabelecida por um método de referência, como é caso do método espectrofotométrico de Scharer.

Foi demonstrado que a composição do leite utilizado no processo de pasteurização influencia na verificação da atividade residual da enzima. A gordura, aparentemente, é um dos componentes responsáveis por essa influência, uma vez que ela pode atuar como uma proteção térmica e dificultar a desnaturação da enzima frente ao tratamento térmico.

O método oficial qualitativo não se mostrou eficaz para verificar a pasteurização adequada do leite, visto que atestou negativo para ALP na amostra de sub-pasteurização que sofreu um tratamento térmico de 70 °C por 20s. A detecção da enzima só foi evidenciada na amostra tratada a 67 °C por 20s, condição esta muito inferior à estabelecida pela legislação. Além disso, a expressão do resultado final do método espectrofotométrico de Scharer não se mostrou apropriado para verificar a pasteurização do leite, visto que as amostras que foram devidamente tratadas nas condições prevista na legislação brasileira (7220, 7520 e 6530m) apresentaram valores de concentração acima do estipulado como limite pelo método (1 μg fenol mL^{-1}), ocasionando resultados falso-positivos.

Por fim, algumas amostras tratadas termicamente apresentaram aumento na atividade residual da ALP ao longo do *shelf-life*, apontando que nessas amostras a enzima pode ter sofrido uma reativação após o tratamento térmico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho mostrou que não existe uma relação direta entre a adição de leite cru e a concentração de fenol gerada. Com isso, não é aconselhado a utilização de dopagem de leite para avaliar o método oficial qualitativo, uma vez que as mesmas dosagens de leite cru podem resultar em diferentes concentrações de fenol, devido à composição de cada leite.

O método oficial qualitativo não apresentou uma boa sensibilidade de detecção da fosfatase alcalina, uma vez que só apresentou resultado positivo para amostras de leite com concentrações de fenol muito superiores à concentração ($1 \mu\text{g fenol mL}^{-1}$) estabelecida por um método de referência internacional (Scharer espectrofotométrico). Além de não ter detectado a presença da enzima em uma amostra de sub-pasteurização (7020). Com isso, recomenda-se que métodos mais sensíveis devam ser adotados para verificar a pasteurização adequada do leite, garantindo assim a segurança de consumo do alimento.

Foi apresentado que a composição do leite influencia nos resultados finais da atividade da ALP; a gordura aparentemente foi um dos responsáveis por tal resultado. Portanto, é sugerido que o parâmetro limite para atestar a eficiência de pasteurização do método quantitativo seja ajustado para cada tipo de leite: desnatado, semidesnatado e integral.

A evidência de reativação da ALP torna-se um problema para utilizar a enzima como índice de verificação de pasteurização do leite, uma vez que após um tempo de processamento do produto, em certas condições, ela pode aumentar a sua atividade de resultar em testes falso-positivos. Logo, para minimizar as chances das ocorrências de reativação, é reforçado a exigência de se realizar o teste da ALP imediatamente após o processo de pasteurização do leite.

Em suma, este trabalho tem grande importância industrial e acadêmica, pois apresenta dados atuais que podem ser utilizados para aprimorar métodos qualitativos e quantitativos, que já são utilizados a muito tempo pelas indústrias, para avaliar a eficiência dos processos de tratamento térmico do leite. Visando assim garantir a segurança e a qualidade de um produto tão importante, que não só é consumido *in natura*, mas que também é utilizado como base para a produção de diversos derivados.

REFERÊNCIAS

AHMAD PUNOO, H. Validation of Milk Product Pasteurization by Alkaline Phosphatase Activity. **Concepts of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 1, n. 3, 15 maio 2018.

ANDRÉ, A. Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products. Em: KELLY, A. L.; LARSEN, L. B. (Eds.). 1. ed. Switzerland: Springer, Cham, 2021.

ANGELINO, P. D. et al. Residual Alkaline Phosphatase Activity in Pasteurized Milk Heated at Various Temperatures-Measurement with the Fluorophos and Scharer Rapid Phosphatase Tests. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 81–85, 1999.

ANVISA. **RDC Nº 166 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 24 jul. 2017.

ARAÚJO, C. DA S. et al. Processamento térmico do leite: Termização, pasteurização e UHT. Em: **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. 1. ed. Belo Horizonte: Poisson, 2021. v. 12.

ASCHAFFENBURG, R.; MULLEN, J. E. C. A rapid and simple phosphatase test for milk. **Journal of Dairy Research**, v. 16, p. 58–67, 1949.

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

BRASIL. **DECRETO Nº 9.013 DE 29 DE MARÇO DE 2017**. **Diário da União, seção: 1**, Brasília, DF, p. 1-3, març. 2017.

BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018**. **Diário da União, seção 1**, Brasília, DF, p. 1-5, nov. 2018.

BRASIL. **Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2022.

BYLUND, G. **Dairy processing handbook**. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB, 1995.

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

CERF, O.; CONDRON, R. Coxiella burnetii and milk pasteurization: An early application of the precautionary principle? **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 5, p. 946–951, out. 2006.

CHEN, B.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. **Food Chemistry**, v. 158, p. 216–223, 1 set. 2014.

CLAEYS, W. L.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase inactivation, and of β -lactoglobulin denaturation in milk with different fat content. **Journal of Dairy Research**, p. 69–541, 2002.

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

DALEY, V. L.; ARMENTANO, L. E.; HANIGAN, M. D. Models to predict milk fat concentration and yield of lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 10, p. 8016–8035, 1 out. 2022.

DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Dairy product intake in children and adolescents in developed countries: Trends, nutritional contribution, and a review of association with health outcomes. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 2, p. 68–81, fev. 2014.

FARKYE, N. Y. Other enzymes. Em: **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. [s.l.] Springer US, 2003.

FENOLL, J.; JOURQUIN, G.; KAUFFMANN, J.-M. Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products. **Talanta**, v. 56, p. 1021–1026, 2002.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, 2010.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Proteínas do soro do leite. **Revista FiB**, p. 26–30, 2017.

FOX, P. F. et al. Enzymology of Milk and Milk Products. Em: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Boston: Springer International Publishing, 2015a. p. 377–414.

FOX, P. F. et al. **Dairy Chemistry and Biochemistry Second Edition**. 2. ed. Switzerland: Springer International, 2015b.

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

GARG, G.; SEHRAWAT, N.; YADAV, M. Role of Enzymes in Food Industries. **Frontiers in Food Biotechnology**. Em: **Frontiers in Food Biotechnology**. 1. ed. New York: Nova Publishers, 2016. p. 219–252.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 4, p. 473–483, jul. 2005.

GRAHAM, W. R.; KAY, H. D. Phosphorus compounds of milk V: The phosphorus partition in milk, with pre-liminary observations on milk phosphatase. v. 16, p. 546–564, 1933.

GREENWOOD, M. H.; RAMPLING, A. M. Evaluation of a fluorimetric method for the detection of phosphatase in milk. **Microbiology Digest**, p. 216–217, 1997.

INSKI, R. P. et al. CHEMILUMINESCENT ASSAY OF ALKALINE-PHOSPHATASE IN MILK. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 48, p. 213–224, 1994.

ISO 11816-1. **Milk and milk products — Determination of alkaline phosphatase activity**. , 2013.

ISO 22160. **Milk and milk-based drinks — Determination of alkaline phosphatase activity — Enzymatic photo-activated system (EPAS) method**. , 2007.

KARLSSON, M. A. et al. Changes in stability and shelf-life of ultra-high temperature treated milk during long term storage at different temperatures. **Heliyon**, v. 5, n. 9, 1 set. 2019.

KAY, H. D.; GRAHAM JR, W. R. The Phosphatase Test for Pasteurized Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 6, p. 191–203, 1935.

LEVIEUX, D.; GENEIX, N.; LEVIEUX, A. Inactivation-denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay. **Journal of dairy research**, v. 74, p. 296–301, 2007.

LI, S.; YE, A.; SINGH, H. Seasonal variations in the characteristics of milk fat and the whipping properties of cream. **International Dairy Journal**, v. 127, 1 abr. 2022.

LORENZEN, P. C. et al. Activities of alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 1, p. 18–23, mar. 2010.

LU, Q.; PIYASENA, P.; MITTAL, G. S. Modeling Alkaline Phosphatase Inactivation in Bovine Milk During High-Temperature Short-Time Pasteurization. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 6, p. 479–485, 2001.

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

MAHATO, K.; CHANDRA, P. Paper-based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 128, p. 9–16, 1 mar. 2019.

MARCHAND, S. et al. Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in equine milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 12, p. 763–767, dez. 2009.

MCKELLAR, R. C. et al. Predictive Modeling of Alkaline Phosphatase Inactivation in a High-Temperature Short-Time Pasteurizer. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 5, p. 424–430, 1994.

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

PAIVA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy**. 5. ed. Meghalaya: Cengage learning, 2014.

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

PEREIRA, D. B. C. et al. **FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE E DERIVADOS**. 2. ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001.

PRUIT, K. Lactoperoxidase. Em: **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. New York: Springer US, 2003.

RANKIN, S. A. et al. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5538–5551, dez. 2010.

REHMAN, S. U. et al. Indigenous phosphatases in milk. Em: **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. 3. ed. New York: Springer New York, 2003. v. 1p. 523–543.

ROCCHETTI, G. et al. Occurrence of Polyphenols, Isoflavonoids, and Their Metabolites in Milk Samples from Different Cow Feeding Regimens. **Dairy**, v. 3, n. 2, p. 314–325, 1 jun. 2022.

ROCHA, D. T. DA; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. DE. Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária. **EMBRAPA**, 2020.

ROWLING, J. K. **Harry Potter and the Prisoner of Azkaban**. 1. ed. United States: Bloomsbury Publishing, 1999, p 165.

SAMKOVÁ, E. et al. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. **South African Journal of Animal Science**, v. 42, n. 2, p. 83–100, 2012.

SCHARER, H. A Rapid Phosphomonoesterase Test for Control of Dairy Pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 21, n. 1, p. 21–34, 1938.

SCHARER, H. Laboratory control of milk under war conditions. The rapid phosphatase test. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 33, p. 396–398, 1943.

SCINTU, M. F.; DAGA, E.; LEDDA, A. Evaluation of spectrophotometric and fluorometric methods for alkaline phosphatase activity determination in ewe's milk. **Journal of food protection**, v. 63, p. 1258–1261, 2000.

SEIXAS, F. N. et al. Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p. 17, 10 abr. 2014.

SERRA, B. et al. Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 289–294, 15 jan. 2005.

SHARMA, R.; RAJPUT, Y. Activity and thermal stability of indigenous enzymes in cow, buffalo and goat milk. 2009.

SIQUEIRA, K. B. Mercado Consumidor de leite e derivados. **Embrapa**, p. 1–17, 2019.

SIQUEIRA, K. B. **Na era do consumidor: uma visão do mercado lácteo brasileiro**. Juiz de Fora, 2021.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípio de análise instrumental**. 5. ed. Brasil: Bookman, 2002.

STĂNCIUC, N. et al. Kinetic and thermodynamic parameters of alkaline phosphatase and α -glutamyl transferase inactivation in bovine milk. **Dairy Science and Technology**, v. 91, n. 6, p. 701–717, 2011.

TATE, S. S.; MEISTER, A. Subunit structure and isozymic forms of γ -glutamyl transpeptidase*. **Biochemistry**, v. 73, n. 8, p. 2599–2603, 1976.

VERMA, G.; MISHRA, M. DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF UV-VIS SPECTROSCOPY-A REVIEW. **Govinda et al. World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, 2018.

VIDAL, A. M. C.; NETTO, A. S. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga: Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2021.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology, Second Edition**. 2. ed. Florida: CRC Press, 2006.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 17. ed. Washington: American Public Health Association, 2004.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment I. **Journal Dairy Research**, p. 177–188, 1953a.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment III. **Journal Dairy Research**, 1953b.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment IV. The influence of certain metallic ions. **Journal Dairy Research**, p. 248–256, 1956.

YOSHITOMI, K. YOSHITOMI, Ken. Alkaline phosphatase activity in cheeses measured by fluorometry. **International journal of food science & technology**, v. 39, p. 349–353, 2004.

ANEXOS

Anexo I

1. Preparo das soluções utilizadas no método oficial qualitativo

1.1 Tampão carbonato: Foi dissolvido 46,89 g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) P.A e 37,17 g de bicarbonato de sódio anidro (NaHCO_3) P.A em de água deionizada, e em seguida transferido para um balão volumétrico de 1000 mL e completado o volume (solução estoque). Retirou-se uma alíquota de 25,00 mL desta solução estoque e diluiu-se para um balão volumétrico de 500 mL. O pH desta solução diluída foi ajustado para uma faixa de 9,5 – 9,7.

1.2 Substrato de trabalho: Foi dissolvido 0,50 g de fenilfosfato dissódico dihidratado P.A em tampão diluído (1), em seguida foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL e completado o volume com tampão diluído.

1.3 Reagente CQC: Foi pesado 0,15 g de 2,6 dicloroquinona-4-cloroimida (CQC) e dissolvido em 50,00 mL de álcool etílico P.A. Em seguida, a solução foi transferida para frasco âmbar e estocada na geladeira à 7 ± 1 °C.

1.4 Catalisador: 0,20 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) P.A foram dissolvidos em 100,00 mL de água deionizada.

2. Preparo das soluções utilizadas no método espectrofotométrico de Scharer

2.1 Tampão de carbonato estoque (pH 9,8): Foi dissolvido 46,89 g de Na_2CO_3 P.A e 37,17 g NaHCO_3 P.A em de água deionizada, e em seguida, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e completado o volume.

2.2 Solução CQC de trabalho: 30 mg de 2,6 dicloroquinona-4-cloroimida (CQC) foram dissolvidos em 10,00 mL de metanol. Em seguida, a solução foi transferida para um frasco âmbar e armazenada na geladeira à 7 °C \pm 1 °C. Esta solução só foi utilizada por no máximo uma semana.

2.3 Catalisador de sulfato de cobre: Dissolveu-se 200 mg de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) anidro em 100,00 mL de água deionizada.

2.4 Butanol neutralizado: Adicionou-se 530 μL de tampão carbonato estoque pH 9,8 (2.1) à 200 mL n-butanol. A solução foi armazenada no freezer à -18 ± 1 °C.

2.5. Substrato de trabalho em tampão de carbonato: Foi dissolvido 0,50 g de fenilfosfato dissódico P.A em 10 mL de água deionizada contida em um funil de separação de 100 mL. Adicionou-se 25,00 mL de tampão de carbonato estoque pH 9,8 (2.1); 0,100 mL do reagente CQC (2.2) e 0,1 mL do reagente do catalisador de cobre (2.3). O funil foi agitado e deixado em repouso por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 5,00 mL de butanol neutralizado (2.4) e agitou-se. A camada aquosa foi retirada e o processo de extração foi repetido por mais 2 vezes. Por fim, a camada aquosa obtida na última extração foi diluída em um balão volumétrico de 500 mL com água deionizada.

2.6 Solução de ácido clorídrico (0,1 mol L⁻¹): 4,15 mL de ácido clorídrico concentrado foi pipetado em cerca de 100 mL de água deionizada em um balão volumétrico de 500 mL e, em seguida, foi completado o volume.

2.7 Solução de acetato de magnésio (354 mg mL⁻¹): 35,40 g de acetato de magnésio ($\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foi dissolvido em cerca 50,00 mL de água deionizada quente, e em seguida foi transferido para um balão volumétrico de 100,00 mL e completado o volume.

3 Preparo da curva analítica utilizada no método de Scharer

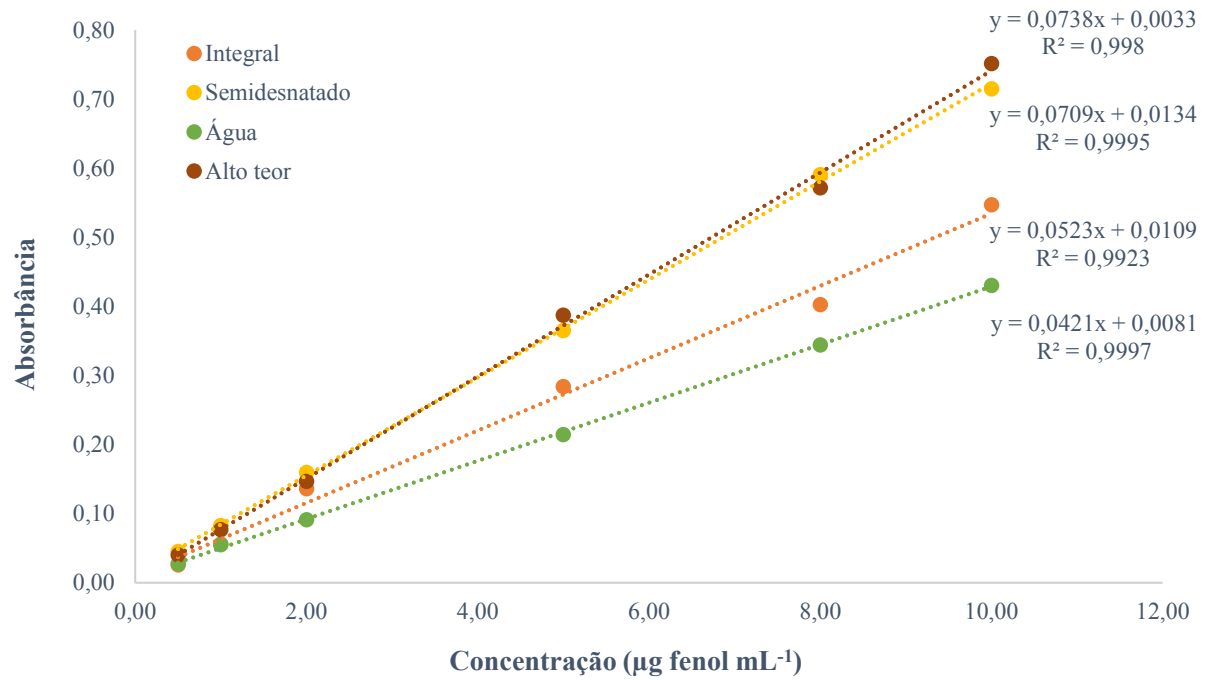
3.1 Solução estoque de fenol (1 mg mL⁻¹): 0,100 g de fenol anidro P.A foi dissolvido em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (2.6) em um balão volumétrico de 100 mL. A solução foi armazenada em frasco âmbar na geladeira à 7 ± 1 °C.

3.2 Solução de fenol intermediária A (10 μg mL⁻¹): Foi transferido 1,00 mL da solução estoque padrão de fenol (3.1) para um balão volumétrico de 100,00 mL e completado o volume com água deionizada.

3.3 Solução de fenol intermediária B ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$): 10,00 mL da solução de fenol intermediária A (3.2) foram diluídos em 100,00 mL de água deionizada.

Anexo II

Figura 1A – Curva analítica preparada com leites com diferentes composições.



Anexo III

Tabela 2A – Análise de cálcio (ppm) e pH, durante o *shelf-life*, nas amostras de leite com diferentes tratamentos térmicos.

Amostra	T ₀		T ₂₄		T ₄₈		T ₇₂		Adição de Mg ²⁺
	pH	Ca ²⁺	pH	Ca ²⁺	pH	Ca ²⁺	pH	Ca ²⁺	Ca ²⁺
Cru	6,62 ± 0,00 ^a	60 ± 2 ^a	-	-	-	-	-	-	-
6720	6,56 ± 0,02 ^{Aa}	50 ± 2 ^{Ab}	6,59 ± 0,00 ^{Aa}	38 ± 1 ^{Aa}	6,57 ± 0,04 ^{Aa}	36 ± 4 ^{Aa,b}	6,50 ± 0,00 ^{Aa}	38 ± 3 ^{Aa,b}	38 ± 3 ^{Aa,b}
7020	6,63 ± 0,01 ^{Aa,b}	51 ± 1 ^{Ab}	6,61 ± 0,02 ^{Aa}	39 ± 2 ^{Ba,b}	6,65 ± 0,01 ^{Aa}	37 ± 1 ^{Ba}	6,64 ± 0,00 ^{Ab}	34 ± 0 ^{Bb,c}	34 ± 0 ^{Bb,c}
7220	6,63 ± 0,01 ^{Ab}	50 ± 1 ^{Ab}	6,62 ± 0,02 ^{Aa}	38 ± 0 ^{Ba,b}	6,61 ± 0,01 ^{A,Ba}	34 ± 2 ^{Ba,b,c}	6,56 ± 0,00 ^{Ba,b}	33 ± 1 ^{Bb,c}	33 ± 1 ^{Bb,c}
7520	6,61 ± 0,02 ^{Aa,b}	50 ± 2 ^{Ab}	6,62 ± 0,00 ^{Aa}	43 ± 3 ^{A,Ba,b}	6,60 ± 0,00 ^{A,Ba}	27 ± 1 ^{Ca,b,c}	6,46 ± 0,04 ^{Ba}	33 ± 0 ^{B,Cb,c}	33 ± 0 ^{B,Cb,c}
7720	6,58 ± 0,00 ^{A,Ba,b}	49 ± 1 ^{Ab}	6,62 ± 0,00 ^{Aa}	46 ± 2 ^{Ab}	6,55 ± 0,01 ^{Ba}	25 ± 2 ^{Bc}	6,47 ± 0,02 ^{Ca}	27 ± 1 ^{Bc}	27 ± 1 ^{Bc}
6530m	6,60 ± 0,02 ^{Aa,b}	48 ± 1 ^{Ab}	6,60 ± 0,02 ^{Aa}	37 ± 1 ^{Ba}	6,59 ± 0,01 ^{Aa}	27 ± 1 ^{Cb,c}	6,51 ± 0,00 ^{Ba}	42 ± 1 ^{Ba}	42 ± 1 ^{Ba}
Fervido	6,61 ± 0,02 ^{Aa,b}	50 ± 2 ^b	-	-	-	-	-	-	38 ± 3 ^{Aa,b}