

PAULA ROSA SCHETINO DE CASTRO

**MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE SCHARER PARA
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE
FOSFATASE ALCALINA EM LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005**

PAULA ROSA SCHETINO DE CASTRO

**MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE SCHARER PARA
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE
FOSFATASE ALCALINA EM LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 3 de agosto de 2005.

Prof. Nélio José de Andrade
(Conselheiro)

Prof^a. Célia Lúcia de Lucas F. Ferreira
(Conselheira)

Prof. José Antônio Marques Pereira

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Prof. Sebastião César Cardoso Brandão
(Orientador)

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos, por
representarem o mais importante da minha vida.
Aos meus amigos e companheiros que tornaram essa etapa
ainda mais alegre.
A Deus, que permitiu que esta realização fosse possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e a todos aqueles que fazem parte de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Sebastião César Cardoso Brandão, por compartilhar sua sabedoria e seu conhecimento.

Aos professores conselheiros e aos demais membros da banca, pelas valiosas sugestões.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Ministério da Agricultura – LANARA – pelo apoio técnico. Em especial, ao Leonardo e ao Sidnei, pelos préstimos.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela disposição e pelo auxílio.

À Luciana, pela amizade, pelo grande apoio e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de mestrado Sérgio e Juliana, pela amizade e pelo convívio.

Aos funcionários do Laticínio Escola da Funarbe, pela ajuda e colaboração.

A todos os amigos do Laboratório de Análise de Alimentos e DTA, Maria Patrícia, Veridiana, Ana Cláudia, Júnio e Thiago, pela convivência e cooperação.

Às muitas estagiárias, pela disposição, ajuda e participação.

Aos colegas da Pós-graduação.

À minha mãe, pela luta, dedicação, confiança, e pelo apoio incondicional.

Ao meu pai, pelo apoio e exemplo.

A minha irmã, pelo incentivo, pela alegria, pelos sonhos e momentos compartilhados.

Ao meu irmão, pelo exemplo de carinho.

Ao Moisés, pela compreensão, incentivo e carinho.

Aos amigos e familiares que estão perto e também aos distantes, pelo interesse e incentivo.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e de outros departamentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

PAULA ROSA SCHETINO DE CASTRO, filha de Paulo Roberto Rosa de Castro e Cacilda Rosa Schetino de Castro, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 12 de dezembro de 1980.

Em abril de 1999, iniciou-se no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em agosto de 2003. Ingressou, em agosto de 2003, no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nesta mesma Universidade, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2005.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE QUADROS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
AVALIAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO E DO MÉTODO OFICIAL BRASILEIRO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM LEITE.....	4
RESUMO.....	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. Amostras	6
2.2 Determinação da Atividade Residual da Fosfatase Alcalina em Leite.....	6
2.2.1. Métodos Rápidos de Scharer Visual e Espectrofotométrico	6
2.2.2. Método Oficial Brasileiro (Método Scharer Visual Adaptado).....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
3.1. Determinação Quantitativa e Qualitativa da Atividade de Fosfatase Alcalina.....	7
4. CONCLUSÃO	9
5. ABSTRACT.....	9
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM LEITE	11
RESUMO.....	11
1.INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1.Amostras	12
2.2.Determinação Fluorimétrica da Fosfatase Alcalina em Leite.....	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4. CONCLUSÃO	15
5. ABSTRACT.....	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE SCHARER PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA EM LEITE	18
RESUMO.....	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. Amostras de Leite	20
2.2. Detecção da Atividade de ALP pelo Método Fluorophos®	20
2.3. Detecção da ALP pelo Método da Camada.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CONCLUSÃO GERAL.....	27
ANEXOS	28

LISTA DE FIGURAS

FIGURA..... PÁG.

AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM LEITE

- 1 – Variação da atividade de fosfatase alcalina em leite cru na primavera e no verão..... 14
- 2 – Correlação entre atividade de ALP pelo método fluorimétrico e porcentagem de leite cru adicionado de 17 repetições analisadas durante a primavera..... 14
- 3 – Correlação entre atividade de ALP em torno de 350 mU/L pelo método fluorimétrico e porcentagem de leite cru adicionado de 7 repetições analisadas durante o verão..... 15

MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE SCHARER PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA EM LEITE

- 1 – Relação linear encontrada entre o método Fluorophos[®] e o método da Camada Espectrofotométrico em seis repetições realizadas..... 24

ANEXOS

- 1B – Curva Padrão contendo 0, 1, 2, 5 e 10µg fenol/ 5 mL..... 30
- 1D – Resultado do método rápido de Scharer para uma das repetições realizadas em amostras contendo diferentes teores de leite cru..... 32

2D – Resultado do método rápido de Scharer para uma das repetições realizadas em amostras contendo diferentes teores de leite cru.....	32
1F – Resultado do método da Camada para uma das repetições realizadas para amostras em duplicata contendo diferentes teores de leite cru.....	34

LISTA DE QUADROS

QUADRO..... PÁG..

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE SCHARER RÁPIDO VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO E DO MÉTODO OFICIAL BRASILEIRO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM LEITE

1. Atividade de fosfatase alcalina em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru para o método rápido de Scharer Espectrofotométrico..... 8
2. Presença da atividade de ALP determinada pelos métodos de Scharer Visual e Oficial Brasileiro em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado..... 9

MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE SCHARER PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA EM LEITE

1. Atividade de ALP de seis repetições para os métodos Fluorophos[®] e Camada Espectrofotométrico..... 24
2. Resultados obtidos para o método da Camada Visual nas amostras contendo diferentes proporções de leite cru, em seis repetições realizadas..... 25

ANEXOS

1B – Construção da Curva-Padrão	30
1C – Resultados expressos em μg fenol por mL de leite para as 16 repetições realizadas nas amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado.....	31
1E – Resultados expressos em μg fenol por mL de leite para as 6 repetições realizadas nas amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado.....	33
1G – Resultados expressos em mU/L de leite para as 17 repetições realizadas durante a primavera, em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado.....	35
2G – Resultados expressos em mU/L de leite para as 7 repetições realizadas durante o verão, em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado.....	35

RESUMO

CASTRO, Paula Rosa Schetino de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2005. **Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite.** Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Conselheiros: Nélio José de Andrade e Célia Lúcia de Luces F. Ferreira.

A análise da atividade de fosfatase alcalina (ALP) é utilizada para verificar se leite e produtos lácteos foram corretamente pasteurizados. De acordo com o FDA (Food and Drug Administration), o valor máximo permitido de atividade residual de ALP em leite pelo método Fluorophos[®] é de 350 mU/L, o que corresponde a adição de 0,025% de leite cru ao leite tratado termicamente. O método Oficial Brasileiro, o método de Scharer Rápido Visual e Espectrofotométrico, o método Fluorophos[®] e o método desenvolvido da Camada Visual e Espectrofotométrico foram avaliados quanto a sua sensibilidade na determinação da atividade residual de ALP em leite. As amostras de leite analisadas, contendo diferentes valores de atividade de ALP, foram obtidas a partir da adição de leite cru em diferentes proporções a leite tratado termicamente (95°C/1 minuto). O método Oficial Brasileiro, do Ministério da Agricultura, foi capaz de detectar como positivas somente amostras contendo de 1% a 2% de leite cru adicionado ao leite tratado termicamente. A determinação da atividade enzimática pelo método de Scharer Rápido Visual detectou a presença de 0,8% de leite cru nas amostras. Os resultados evidenciaram que ambos os métodos, o Oficial Brasileiro e o Scharer Rápido Visual, apresentam limite de detecção muito elevados, tornando-os insatisfatórios para analisar níveis residuais de fosfatase alcalina em leite. O método de Scharer Rápido Espectrofotométrico detectou a presença de 0,1% de leite cru adicionado ao leite tratado

termicamente, concordando com o limite reconhecido para o método. No entanto, sua sensibilidade não é adequada para o novo limite do FDA de 350 mU/L. Os métodos desenvolvidos da Camada Visual e Espectrofotométrico foram testados quanto a sua sensibilidade para o limite de 350 mU/L. Todos os dois métodos desenvolvidos apresentaram sensibilidade suficiente para atender ao novo limite internacional de atividade residual de ALP em leite pasteurizado. O método da Camada apresentou boa correlação com o método Fluorophos[®] ($r = 0,9921$) sendo uma nova alternativa com menor custo para detecção de ALP em leite.

ABSTRACT

CASTRO, Paula Rosa Schetino de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2005. **Modification of the Sharer method for determination of the alkaline phosphatase activity in milk.** Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. Committee Members: Nélio José de Andrade and Célia Lúcia de Lucas F. Ferreira.

The analysis of alkaline phosphatase (ALP) is used to determine if milk and milk products were correctly pasteurized. According to FDA (Food and Drug Administration), the maximum residual activity of ALP in pasteurized milk by the Fluorophos[®] method must be below 350 mU/L, what correspond to the addition of 0,025% of raw milk to heat treated milk. The Brazilian Official method, Scharer's Rapid Visual and Spectrophotometric method, the Fluorophos[®] method, and a new developed Layer's Visual and Spectrophotometric method, were assayed for their sensitivity to determine residual ALP in milk. Milk samples, containing different ALP activity, were obtained by addition in different proportions of raw milk to heat treated milk (95°C/1 minute). The Official Brazilian method, established by Agriculture Department, was capable to detect only samples containing 1% to 2% of raw milk added to heat treated milk. The determination of the enzymatic activity by the Scharer's Rapid visual method was able to detect 0,8% of raw milk in the samples. The results showed that both the Official Brazilian method and Scharer's Rapid Visual method presented very high detection limit, what make unsatisfactory to residual alkaline phosphatase activity in milk. The Scharer's Rapid Spectrophotometric method detected 0,1% of raw milk added to the heated treated milk, as already recognized for the

method. However, its sensitivity is not adequate for the new FDA limit of 350 mU/L. The new developed Layer's Visual and Spectrophotometric method were assayed for their sensitivity of 350 mU/L limit. Both developed methods presented enough sensitivity to attend the new international limit for residual ALP activity in pasteurized milk. The layer' method presented good correlation with the Fluorophos[®] method ($r = 0,9921$) so it is a new alternative with lower costs for detection of ALP in milk.

INTRODUÇÃO GERAL

O leite obtido de vacas saudáveis contém uma grande variedade de enzimas, sendo uma delas a fosfatase alcalina (ALP), que, do ponto de vista da saúde pública, é de grande importância.

A fosfatase alcalina é uma enzima natural do leite sem pasteurização e a sua presença é indicativa da eficiência da pasteurização, pois a resistência térmica da fosfatase é ligeiramente maior do que a de microrganismos patogênicos não-formadores de esporos.

Assim, o tratamento térmico do leite igual ou mais severo do que temperaturas de 62,8°C por 30 min ou a 71,8°C por 15 segundos, aplicados comercialmente para a pasteurização, eliminará todos os microrganismos patogênicos e também toda a atividade enzimática da fosfatase alcalina. Logo, o leite e seus produtos que apresentem um teste negativo para fosfatase alcalina são considerados pasteurizados e próprios para o consumo (ZIOBRO, 2001).

A análise da ALP é utilizada mundialmente para determinar se a pasteurização foi realizada adequadamente e também para detectar possíveis contaminações de leite cru ao leite pasteurizado (MARSHALL, 1992).

Análises laboratoriais para determinar a atividade residual de ALP são baseadas na exposição de substratos específicos à enzima com subsequente detecção do produto da reação (ROBERTO et al., 2001). A enzima hidrolisa ésteres monofosfatos, em temperatura e pH adequados, liberando os produtos da reação que podem ser detectados quantitativamente (MARSHALL, 1992).

Muitos métodos foram desenvolvidos para a quantificação da atividade da fosfatase alcalina residual em produtos lácteos. O primeiro teste enzimático para determinar a eficiência da pasteurização foi desenvolvido em 1933 por Kay e Graham (KAY e GRAHAM, 1935), e hoje outros métodos já foram desenvolvidos. A evolução das metodologias seguiu a busca de uma maior sensibilidade e rapidez.

O método oficial, atualmente adotado no Brasil, para a detecção da atividade da fosfatase alcalina é uma adaptação do método rápido de Scharer Visual (BRASIL, 2003). O limite de detecção para esse método é atualmente considerado insatisfatório.

Em 1990, a AOAC aprovou o método fluorimétrico, que é atualmente o único método oficial aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para a quantificação de fosfatase alcalina. Esse método é rápido e simples de ser realizado, podendo detectar baixos níveis de ALP e é aplicável a uma grande variedade de produtos lácteos (CORNELL, 1998).

O método apresenta como principais vantagens rapidez de execução, confiabilidade dos resultados, possibilidade de quantificação e registros impressos, além de baixos limites de detecção, que podem chegar até 0,006% de leite cru (CORNELL, 1998).

No entanto, a utilização de métodos mais sensíveis, como o fluorimétrico, poderá ser dificultada pelo elevado preço dos equipamentos e reagentes.

Os objetivos deste estudo foram avaliar a sensibilidade do método Oficial Brasileiro e do método rápido de Scharer Visual e Espectrofotométrico para detecção de ALP em leite e desenvolver uma metodologia sensível e de menor custo que o método fluorimétrico para determinação da atividade residual de Fosfatase Alcalina em leite.

O valor de atividade de Fosfatase Alcalina adotado atualmente pelo FDA, para determinar se leite e produtos lácteos foram devidamente pasteurizados é de 350 mU/L, pelo método fluorimétrico, e foi utilizado como limite de detecção para o método desenvolvido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. DOU 83 maio/2003.

CORNELL UNIVERSITY – COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES. Alkaline phosphatase testing for milk pasteurization. Dairy Science Facts. Department of Food Science, Stocking Hall, Itaca, NY, 1998.

KAY, H. D., GRAHAM, W. R. The phosphatase test for pasteurized milk. **Journal Dairy Research**, v. 6, p. 191-203, 1935.

MARSHALL, R. T. Standard methods for the examination of dairy products. **American Public Health Association**. NW Washington, DC. 1992.

ROBERTO, C. D., LIMA, R. C., BRANDÃO, S.C.C. Sensitividade do método de análise da fosfatase alcalina e o controle da segurança da pasteurização do leite. **Revista Leite e Derivados**, v.58, p.32-41. São Paulo. 2001.

SCHARER, H. Scharer modified phosphatase methods. **Journal Milk Technology**, v. 16, n. 2, p. 86-88, 1953.

ZIOBRO, C. G. Screening method for phosphatase (residual) in cheese. **Bacteriological Analytical Manual online**. Chapter 27. U.S. Food & Drug Administration. 2001.

AVALIAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO E DO MÉTODO OFICIAL BRASILEIRO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM LEITE

Assessment of the Rapid Scharer Methods (visual and spectrophotometric) and the Brazilian Official Method for Residual Alkaline Phosphatase Activity Determination in Milk.

Paula Rosa Schetino de Castro; Sebastião César Cardoso Brandão.

RESUMO

No Brasil, o método oficial do Ministério da Agricultura para determinação da atividade residual da Fosfatase Alcalina (ALP) em leite é uma adaptação do método rápido de Scharer Visual, sendo o resultado qualitativo e descrito sob a forma de negativo (cinza) ou positivo (azul). O método Oficial Brasileiro, os métodos rápidos de Scharer Visual e o Espectrofotométrico foram comparados quanto a sua sensibilidade para determinar os níveis residuais de fosfatase alcalina em leite. Amostras de leite integral foram aquecidas a 95°C/1min e, depois de resfriadas, adicionadas de leite cru nas concentrações de 0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,8%; 1% e 2%. O método rápido de Scharer espectrofotométrico detectou a presença de 0,1% de contaminação de leite cru nas amostras de leite tratadas termicamente, com base no limite estabelecido internacionalmente para o método rápido de Scharer que é de 1µg fenol por mL, tanto visual como o espectrofotométrico. A determinação visual da atividade da ALP pelo método rápido de Scharer detectou a presença de 0,8% de leite cru nas amostras de leite. O método Oficial Brasileiro somente detectou como positivas as amostras contendo de 1% a 2% de leite cru adicionado ao leite tratado termicamente. Ambos os métodos, Oficial Brasileiro e o rápido de Scharer Visual, apresentam limite mínimo de detecção muito elevados, tornando-os insatisfatórios para analisar fosfatase alcalina residual em leite pasteurizado.

Palavras-chave: Fosfatase Alcalina, Método de Scharer, Método Oficial Brasileiro.

1. INTRODUÇÃO

A fosfatase alcalina (E.C. 3.1.3.1.) é uma enzima natural do leite cru e a sua determinação é indicativa da eficiência da pasteurização, pois a resistência térmica da fosfatase é maior do que a de microrganismos patogênicos não-formadores de esporos e inferior ao tratamento térmico da pasteurização. Logo, o leite e seus produtos que apresentem um teste negativo para fosfatase alcalina são considerados pasteurizados e próprios para o consumo (Murthy et al., 1976).

Análises laboratoriais para determinar a atividade residual de ALP são baseadas na exposição de substratos específicos à enzima com subsequente detecção do produto da reação (Roberto et al., 2001). O método rápido de Scharer é um teste clássico para a determinação da atividade da fosfatase alcalina em produtos lácteos e detecta níveis de 0,1% de leite cru adicionado ao leite pasteurizado. O método rápido de Scharer utiliza o fenilfosfato dissódico como substrato que, sob ação enzimática da fosfatase alcalina, libera fenol. O fenol reage com o 2,6 dicloroquinona cloroimida (CQC) para formar indofenol, que é extraído com a adição do butanol. A mensuração visual da concentração de fenol das amostras é feita por comparação com padrões e também pode ser feita por espectrofotometria, no comprimento de onda de 650 nm, para determinações quantitativas. O limite estabelecido para o método é de 1 µg fenol por mL de produto lácteo (Marshall, 1992).

No Brasil, o método oficial do Ministério da Agricultura para a detecção da atividade da fosfatase alcalina é uma adaptação do método rápido de Scharer Visual (Brasil, 2003). O resultado da metodologia oficial brasileira é qualitativo e descrito sob a forma de negativo (cinza) ou positivo (azul). O método Oficial Brasileiro não possui a etapa final de extração do indofenol por butanol, e comparação da cor formada com uma curva-padrão de fenol, como no método rápido de Scharer Visual, do qual foi adaptado. Também, não estabelece um limite quantitativo comparativo sendo o limite de detecção para este método, atualmente, considerado insatisfatório (Soares, 2003). Este trabalho teve como objetivos determinar o limite de detecção da atividade residual da Fosfatase Alcalina em leite pelos Métodos Oficial Brasileiro (Scharer Visual Adaptado), Scharer Visual e Scharer Espectrofotométrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Amostras de leite cru integral e de leite padronizado homogeneizado e pasteurizado pelo processo HTST (75°C por 15 segundos) foram coletadas no Laticínio Escola da UFV. Leite cru, nas concentrações de 0%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,8%, 1%, e 2%, foi adicionado a leite tratado a 95°C por 1 minuto (atividade ALP zero) para determinação do limite de detecção dos métodos Oficial Brasileiro, Scharer Visual e Scharer espectrofotométrico.

2.2 Determinação da Atividade Residual da Fosfatase Alcalina em Leite

2.2.1. Métodos Rápidos de Scharer Visual e Espectrofotométrico

Segundo metodologia de Marshall (1992), foram transferidos 0,5 mL da amostra para um tubo de ensaio e adicionado de 5 mL de solução substrato (fenilfosfato dissódico) 0,1%, e levado ao banho-maria a 39°C – 41°C durante 16 min. Após incubação, foram adicionadas 6 gotas de solução reagente CQC (2,6-dicloroquinona cloroimida) 0,3% e 2 gotas do catalisador sulfato de cobre 0,2%. O tubo foi levado novamente ao banho-maria a 39°C-41°C por 5 min. Após a incubação, os tubos foram removidos do banho-maria, resfriados em banho de gelo e adicionados de 3 mL de butanol resfriado, para extração do indofenol produzido. De acordo com Marshall (1992), devem ser utilizados controles em todos os procedimentos de determinação da fosfatase alcalina. Dois controles foram utilizados: um positivo e um negativo. Para o controle positivo, foi utilizado leite contendo 0,2% de leite cru e para o controle negativo amostra de leite aquecido a 95°C por 1 min. A interpretação do resultado da análise foi realizada pela comparação visual com uma curva de calibração para o método rápido de Scharer visual e para o método espectrofotométrico pela comparação da absorvância, que foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm, com a mesma curva de calibração adotada para a análise visual. A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de equivalente fenol por 5mL de solução. Concentrações superiores a 1 µg de fenol/mL de leite são consideradas indicativo de uma pasteurização

incorreta ou uma contaminação por leite cru ou por produtos não-pasteurizados (Marshall, 1992). Todas as análises foram realizadas com 15 repetições.

2.2.2. Método Oficial Brasileiro (Método Scharer Visual Adaptado)

Segundo metodologia de Brasil (2003), foram transferidos 0,5 mL da amostra para um tubo de ensaio e adicionados 5 mL de solução substrato (fenilfosfato dissódico) 0,1%, e levado ao banho-maria a 39°C – 41°C durante 20 min. Após incubação, foram adicionadas 6 gotas de solução reagente CQC (2,6-dicloroquinona cloroimida) 0,3% e 2 gotas do catalisador sulfato de cobre 0,2%. O tubo foi levado novamente ao banho-maria a 39°C-41°C por 5 min. Para o controle negativo, repetiu-se o mesmo procedimento acima descrito, utilizando-se, em lugar da amostra, 0,5 mL de leite fervido. O resultado é considerado positivo para amostras com coloração azul (presença de leite cru) e negativo para amostras com coloração cinza (ausência de leite cru).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação Quantitativa e Qualitativa da Atividade de Fosfatase Alcalina

Em função dos resultados das análises pelos diferentes métodos, foi realizada uma comparação entre os limites de detecção qualitativa e quantitativa da presença de atividade residual de fosfatase alcalina em leite pelos três métodos de análise. A concentração de fenol na amostra é calculada pela equação da reta obtida pela absorvância dos padrões contendo fenol. A média e o desvio-padrão dos resultados referentes à determinação da atividade de fosfatase alcalina nas amostras de leite das 15 repetições, expressos em concentração de fenol/mL leite, são apresentados no Quadro 1.

O método rápido de Scharer Espectrofotométrico foi capaz de detectar 0,1% de leite cru adicionado ao tratado termicamente, o que equivale a 1 µg fenol/mL, concordando com o limite reconhecido por Marshall (1992). No entanto, algumas amostras apresentaram uma concentração de fenol inferior a 1 µg fenol/mL de leite adicionado de 0,1% de leite cru, o que pode ser observado pelo valor do desvio-padrão. Isso pode ser atribuído à variação do teor de fosfatase alcalina presente no leite cru. De acordo com Haab e Smith (1956), vários fatores como a temperatura ambiente e plano nutricional a que as vacas foram submetidas, estação do ano, bem como o período de

lactação, promovem variações na atividade de fosfatase alcalina no leite cru, que podem justificar o desvio-padrão encontrado.

O método de determinação qualitativo Scharer Visual envolve a comparação da coloração da amostra com os padrões contendo fenol. Nesse método, a amostra foi considerada positiva quando apresentava uma coloração igual ou mais intensa ao padrão da curva contendo 1µg fenol/mL. De acordo com o Quadro 2, verifica-se que a determinação visual da atividade da ALP pelo método rápido de Scharer detectou somente a presença de 0,8% de leite cru nas amostras de leite tratadas termicamente. O método Oficial Brasileiro somente detectou como positivas amostras contendo de 1% a 2% de leite cru adicionado. Considerando-se o limite de 1µg de fenol/mL, os resultados demonstram que o Método rápido de Scharer Visual é ineficiente na detecção da atividade da ALP, pois acusa como positivas amostras com concentração de fenol acima de 10 µg de fenol por mL de leite (Quadro 1). No caso do método Oficial Brasileiro, somente foram determinadas como positivas amostras contendo acima de 12 µg de fenol por mL de leite (Quadros 1 e 2).

Dessa forma, ambos os métodos rápido de Scharer Visual e o Oficial Brasileiro apresentam limite mínimo de detecção muito acima de 1µg de fenol/mL, tornando-os insatisfatórios para analisar fosfatase alcalina residual em leite pasteurizado.

Quadro 1- Atividade de fosfatase alcalina em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru para o método rápido de Scharer Espectrofotométrico

Leite cru adicionado (%)	Atividade de Fosfatase Alcalina* Média**	Desvio-Padrão
0,05	0,10	0,473
0,1	1,13	0,814
0,2	3,30	1,718
0,8	10,43	3,900
1	11,72	2,568
2	23,27	5,670

* µg fenol /mL de leite.

** média para 15 repetições realizadas.

Quadro 2 – Presença da atividade de ALP determinada pelos métodos de Scharer Visual e Oficial Brasileiro em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado

Leite cru adicionado (%)	Resultados Positivos nas 15 Repetições	
	Scharer Visual	Oficial Brasileiro
0,05	0 (0%)	0 (0%)
0,1	0 (0%)	0 (0%)
0,2	0 (0%)	0 (0%)
0,8	1 (6,6%)	0 (0%)
1	6 (40%)	1 (6,6%)
2	10 (66%)	6 (40%)

4. CONCLUSÃO

Ambos os métodos, Oficial Brasileiro e o rápido de Scharer Visual, apresentaram limite mínimo de detecção muito acima de 1µg de fenol/mL, tornando-os insatisfatórios para analisar fosfatase alcalina residual em leite pasteurizado. O método rápido de Scharer Espectrofotométrico mostrou-se mais sensível que os métodos visuais; no entanto, níveis de contaminação de 0,1% de leite cru ou 1 µg de fenol por mL de leite são considerados indicadores elevados, tendo-se como base novos padrões internacionais. Dessa forma, recomenda-se que um método mais sensível para determinar níveis residuais de fosfatase alcalina seja oficializado pela legislação brasileira.

5. ABSTRACT

In Brazil, the official method of the Agriculture Department for determination of the residual alkaline phosphatase activity in milk is an adaptation of Visual rapid Scharer method, being the qualitative result and described on the form of negative (gray) or positive (blue). The Brazilian official method, Scharer's Visual and spectrophotometric method were compared regarding their sensitivity to determine the residuals levels of phosphatase alkaline in milk. Whole milk samples were heated to 95°C for 1 minute and, after cooled, added of raw milk in the concentrations of 0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,8%; 1% and 2%. The spectrophotometric Scharer method detected the presence of 0,1% of contamination of raw milk in the samples of heated milk, based in the internationally established limit for the Scharer rapid method that is 1µg phenol/mL of milk, even visual or spectrophotometric. The visual determination of

the ALP activity by Scharer's rapid method detected the presence of 0,8% of raw milk in the milk samples. The Brazilian Official method only detected as positive samples contend from 1 to 2% of raw milk added to the heated milk. Both methods Brazilian Official and Scharer rapid Visual have the minimum limit of detection very high, becoming them unsatisfactory to analyze residual alkaline phosphatase in pasteurized milk. **Keywords:** Alkaline Phosphatase, Scharer's Methods, Brazilian Official Method.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. DOU 83 maio/2003.

HAAB, W.; SMITH, L.M. Variations in alkaline phosphatase activity of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n.12, p.1644-1650, 1956.

MARSHALL, R. T. Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. NW Washington, DC. 1992.

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

ROBERTO, C. D., LIMA, R. C., BRANDÃO, S.C.C. Sensitividade do método de análise da fosfatase alcalina e o controle da segurança da pasteurização do leite. *Revista Leite e Derivados*, v.58, p.32-41. São Paulo. 2001.

SOARES, C.F. Avaliação de métodos colorimétricos qualitativos e quantitativos para a determinação de atividade de fosfatase alcalina em leite e queijo minas padrão. 2003, 45p. Tese (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AVALIAÇÃO DO MÉTODO FLUORIMÉTRICO NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM LEITE

Assessment of Fluorimetric method for the Determination of Residual Alkaline Phosphatase Activity in Milk

Paula Rosa Schetino de Castro, Sebastião César Cardoso Brandão.

RESUMO

Neste estudo, o método fluorimétrico foi avaliado quanto a sua sensibilidade na determinação da atividade de fosfatase alcalina (ALP) em leite. Amostras de leite integral foram tratadas termicamente a 95°C/1 min e, depois de resfriadas, adicionadas de leite cru nas concentrações de 0%; 0,01%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,8%; 1% e 2%. As amostras foram analisadas em fluorímetro modelo FLM 200 (Advanced Instruments, Inc). Adotando o limite de 350 mU/L, estabelecido atualmente pelo FDA para leite e produtos lácteos, verificou-se que esse valor limite corresponde a adição de 0,025% a 0,05% de leite cru ao leite tratado termicamente, dependendo do período do ano. O método Fluorophos apresenta elevada sensibilidade e reprodutibilidade, sendo capaz de detectar atividade residual de fosfatase alcalina tão baixa quanto 10 mU/L.

Palavras-Chave: Fosfatase alcalina, Método Fluorimétrico, Leite

1. INTRODUÇÃO

Diversos métodos para detecção da atividade residual da fosfatase alcalina em produtos lácteos já foram desenvolvidos e sofreram modificações ao longo do tempo, visando a uma maior sensibilidade e rapidez (Angelino et al., 1999). Os métodos antigos são complexos, necessitam de maiores períodos de incubação e possuem um nível de precisão que impossibilita a detecção de pequenas quantidades de leite cru no leite pasteurizado. Dentre os métodos rápidos e sensíveis, encontra-se o Fluorimétrico, que é adotado pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (AOAC, 2000), ISO (*International Organization for Standardization*) (ISO, 1996), *Standard Methods*

for Examination of Dairy Products (Marshall, 1992) e é atualmente o único método oficial aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para a quantificação de fosfatase alcalina (ALP) em produtos lácteos (PMO, 2003). O método fluorimétrico para quantificação da atividade de ALP utiliza como substrato um monoéster ortofosfórico aromático, denominado Fluorophos[®], que, sob hidrólise, catalisada pela ALP, perde um radical fosfato e torna-se um composto altamente fluorescente, denominado Fluoroyellow[®] (Rocco, 1989). A taxa de formação do Fluoroyellow[®] é monitorada em um fluorímetro dedicado para determinação da variação da fluorescência durante 3 min. A atividade enzimática é calculada em miliunidades por litro (mU/L). Esse método apresenta como principais vantagens a rapidez de execução, confiabilidade dos resultados, especificidade da atividade da ALP, possibilidade de quantificação automática e registros impressos; é aplicável a uma grande variedade de produtos lácteos, além de possuir baixo limite de detecção, que pode chegar a até 0,006% de leite cru (Cornell, 1998). O principal objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade do método fluorimétrico na determinação da atividade de ALP em leite brasileiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Amostras de leite cru integral e de leite padronizado pasteurizado pelo processo HTST (75°C por 15 segundos) foram coletadas no Laticínio Escola da Funarbe. A atividade da fosfatase alcalina no leite cru foi determinada em 24 amostras, destas 17 foram durante a primavera e 7 no verão. As amostras de leite foram coletadas em dias diferentes por um período de 2 meses para cada estação. Ao leite tratado a 95°C por 1 min (atividade ALP zero), foi adicionado leite cru nas concentrações de 0%, 0,01%, 0,025% e 0,05% para correlacionar o limite de 350 mU/L, estabelecido pelo FDA para o método, com a adição de leite cru ao leite tratado termicamente (PMO, 2003). Para a determinação da linearidade de resposta do método, foram utilizadas concentrações de 0%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,8%, 1%, e 2% de leite cru.

2.2. Determinação Fluorimétrica da Fosfatase Alcalina em Leite

A determinação quantitativa da fosfatase alcalina nas amostras de leite pasteurizado pelo método fluorimétrico foi realizada segundo metodologia da ISO

11816-1 (ISO, 1996), que é a mesma do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Marshall, 1992). A amostra de leite analisada foi misturada e dela retirada uma alíquota de 75 µL para teste. Dois mililitros da solução do substrato Fluorophos[®] foram adicionados em cubetas próprias que foram e estabilizadas a 38°C por 10 min no bloco de aquecimento a seco. A seguir, uma alíquota de 75 µL da amostra foi retirada, utilizando pipetador próprio, adicionada ao substrato na cubeta e misturada por inversão, limpando-se as laterais com lenço descartável. A cubeta foi introduzida no porta-cubeta do fluorímetro (Advanced Instruments, Inc), previamente calibrado com soluções-padrão. Após o primeiro minuto necessário para que haja o equilíbrio da temperatura, a taxa de aumento da fluorescência (F/min) foi medida automaticamente por 2 min pelo aparelho. A atividade calculada da fosfatase em miliunidades por litro era exibida no visor do equipamento e impressa automaticamente. Uma unidade da enzima Fosfatase Alcalina corresponde à sua quantidade que catalisa a transformação de 1 µmol de substrato Fluoroyellow[®] por minuto por litro de amostra. Os resultados são expressos em miliunidades em razão dos baixos níveis da enzima encontrada nos produtos finais (Marshall, 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados da atividade da ALP nas 24 amostras de leite cru, que variaram de 516.800 mU/L na primavera até 1.519.800 mU/L no verão. Observou-se o aumento natural da atividade da ALP no verão em relação à primavera. Haab & Smith (1956), utilizando o método de Sanders e Sager modificado, também encontraram variação na atividade de fosfatase alcalina no leite cru durante as várias estações do ano, durante o período completo de lactação (com uma concentração máxima cerca de 28 semanas após o parto), entre vacas e de acordo com a produção de leite (inversamente proporcional).

O FDA estabelece que o leite já pasteurizado deve apresentar uma atividade de fosfatase alcalina inferior a 350 mU/L (PMO, 2003). Na Figura 3, encontram-se os resultados da atividade de ALP em sete repetições realizadas em amostras contendo 0,01%, 0,025% e 0,05% de leite cru, durante o verão. Nos meses de janeiro e fevereiro, a concentração de 0,025% foi a que apresentou uma atividade de ALP próxima ao limite de 350 mU/L, que correspondia à atividade de 1.400.000 mU/L no leite cru. Nos meses de outubro a novembro, foi necessária a concentração de 0,05% para atingir 350 mU/L,

por causa da redução natural da ALP no leite cru para 700.000 mU/L. Uma excelente correlação entre a atividade da ALP e o leite cru adicionado foi encontrada ($Y = 13999X + 16$ e $R^2 = 0,9998$), sendo o método adequado para atender o limite legal.

A avaliação da sensibilidade e linearidade de resposta de todas as amostras analisadas encontra-se na Figura 2. Coeficientes de correlação acima de 0,99 foram encontrados para cada uma das repetições realizadas. Entretanto, quando se analisam as várias repetições pode-se observar, de acordo com o Desvio-Padrão, que ocorreram variações nas atividades entre as repetições, devido a variação natural da concentração da ALP no leite cru.

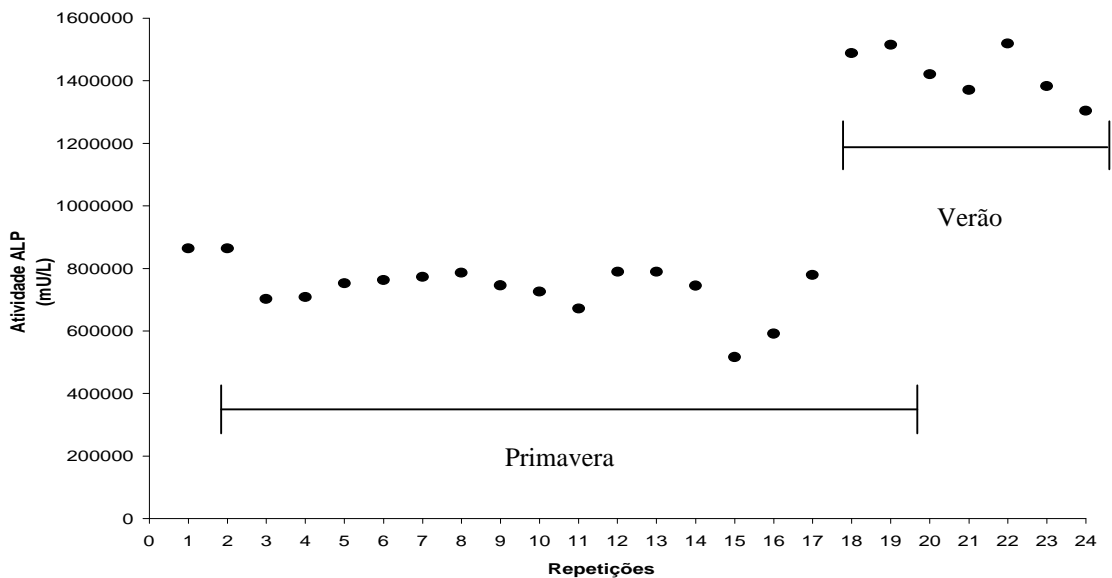


Figura 1 – Variação da atividade de fosfatase alcalina em leite cru na primavera e no verão.

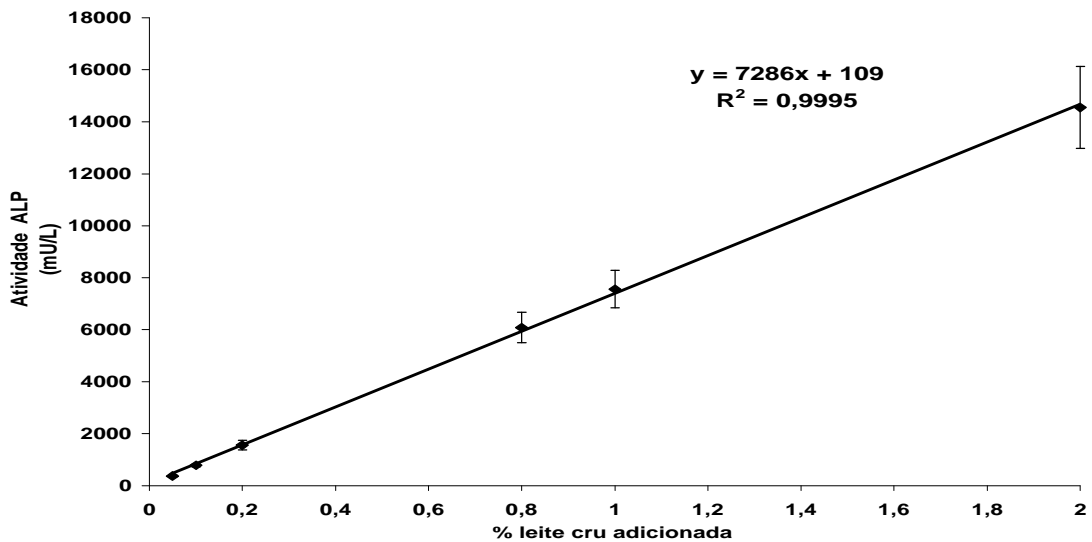


Figura 2 – Correlação entre atividade de ALP pelo método fluorimétrico e porcentagem de leite cru adicionado de 17 repetições analisadas durante a primavera.

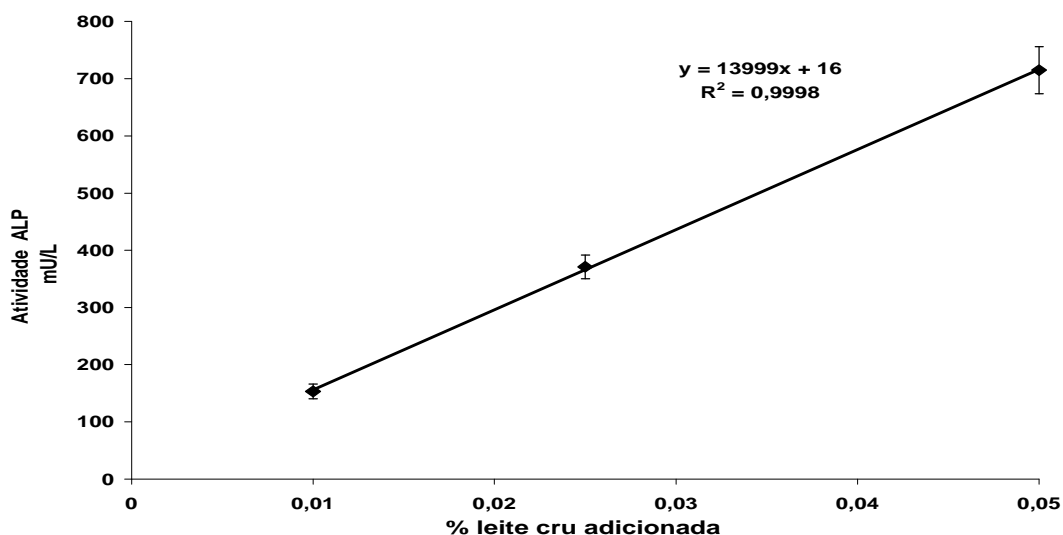


Figura 3 – Correlação entre atividade de ALP em torno de 350 mU/L pelo método fluorimétrico e porcentagem de leite cru adicionado de 7 repetições analisadas durante o verão.

Dessa forma, o estabelecimento da atividade de 350 mU/L é melhor do que o uso da concentração fixa de leite cru como limite para determinar se o leite foi corretamente pasteurizado. Apesar de o limite estabelecido pelo FDA ser de 350 mU/L, sabe-se que leite corretamente pasteurizado (75°C/ 15 segundos) apresenta valores de ALP entre 10 e 25 mU/L, segundo os padrões americanos. Estes valores podem ser bem maiores, chegando a 185 mU/L, quando a temperatura de pasteurização empregada for de 72°C (Painter, 1995).

4. CONCLUSÃO

O método fluorimétrico para determinar se o leite foi corretamente pasteurizado, utilizando-se o limite de 350 mU/L, correspondeu à adição de 0,025% a 0,05% de leite cru ao leite tratado termicamente, no verão e na primavera, respectivamente. A introdução do método Fluorophos para quantificar a atividade residual de ALP após a pasteurização do leite resulta em maior sensibilidade, precisão, facilidade de execução, rapidez (resultados são obtidos em apenas 3 min) e melhorias nos programas de segurança alimentar em indústrias de laticínios. Os métodos colorimétricos atuais não são mais adequados para garantir níveis de segurança alimentar, considerando os limites máximos internacionais oficializados para atividade de fosfatase alcalina. Recomendamos, portanto, a oficialização do método fluorimétrico no Brasil.

5. ABSTRACT

In this study the fluorimetric method was evaluated regarding its sensitivity in the determination of alkaline phosphatase activity in milk. Whole milk samples were heated at 95°C for 1 minute and after cooled, added of raw milk in the concentrations of 0%; 0,0 1%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,8%; 1% and 2%. The samples were analyzed in fluorometer model FLM 200(Advanced Instruments, Inc). Adopting the limit of 350 mU/L, established nowadays by FDA for milk and milk products, it was verified that this limit value corresponds to the addition of 0,025% to 0,05% of raw milk to the thermally treaty milk, depending on the period of the year. The Fluorophos method has elevated sensitivity and reproducibility, being able to detect residual alkaline phosphatase activity so low as 10 mU/L.

Keywords: Alkaline Phosphatase, Fluorimetric Method, Milk.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELINO, P. D., CHRISTEN, L. C., PENFIELD, M. P., BEATTIE, S. 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.

AOAC. Alkaline phosphatase activity in fluid dairy products, fluorimetric method - AOAC official method 991.24. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. William Howritz (ed.), Chapter 33, pp 37-38. Gaithersburg, Maryland, USA, 2000.

CORNELL UNIVERSITY – COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES. Alkaline phosphatase testing for milk pasteurization. *Dairy Science Facts*. Department of Food Science, Stocking Hall, Itaca, NY, 1998.

HAAB, W.; SMITH, L.M. Variations in alkaline phosphatase activity of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n.12, p.1644-1650, 1956.

ISO. Milk and milk products – determination of alkaline phosphatase activity – fluorimetric method. Part 2: Method for cheese. ISO/TC 34/SC 5. *Nederlands Normalisatie-instituut (NNI)*, Netherlands. 1996.

MARSHALL, R. T., *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association. NW Washington, DC. 1992.

PAINTER, C. J. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time/temperature treatments. 119f. Thesis (Master of Science) – University of Wisconsin, Madison. 1995.

PMO – Pasteurized Milk Ordinance, 2001 Revision, May 2002.US Food and Drug Administration.

ROCCO, R. M. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in cheese. *Journal Dairy Science*. 72 Suppl.1, 171. 1989.

MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE SCHARER PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA EM LEITE

Modification of the Phosphatase Alkaline Determination Method for Milk

Castro, Paula Rosa Schetino; Brandão, Sebastião César Cardoso

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa

Viçosa – MG, 36.570-000 – Brasil

RESUMO

Uma metodologia sensível para determinação de fosfatase alcalina em leite foi desenvolvida através de uma modificação do método rápido de Scharer. Através da utilização de n-butanol e sulfato de amônia a separação da ALP em leite homogeneizado foi otimizada, concentrando-se parte da atividade da ALP de uma amostra em uma camada facilmente separável. Esta camada contendo grande atividade da enzima foi analisada, utilizando-se os mesmos reagentes do método rápido de Scharer. Os métodos da Camada Visual e Espectrofotométrico e o método Fluorophos[®] foram avaliados na determinação da atividade da ALP em leite, considerando-se o limite máximo atualmente estabelecido pelo FDA (350 mU/L). A atividade da ALP de 350 mU/L correspondeu a adição de 0,025% de leite cru ao leite tratado termicamente. Tanto o método da Camada Visual quanto o Espectrofotométrico detectaram como positivas as amostras contendo 0,025% de leite cru (350 mU/L). O método da Camada apresentou-se muito sensível, com boa correlação com o método Fluorophos[®], tornando-se assim uma alternativa, entre os métodos sensíveis disponíveis, para detecção de baixos níveis ALP em leite, abaixo do limite de 350 mU/L estabelecido pelo FDA.

Palavras-chave: Fosfatase Alcalina, Método da Camada, Método Fluorimétrico, Leite.

1. INTRODUÇÃO

A fosfatase alcalina (ALP) (E.C. 3.1.3.1.) é uma enzima natural do leite cru e a sua presença é indicativa da eficiência da pasteurização (Murthy et al., 1976; Kleyn &

Ho, 1977). A determinação da atividade residual da ALP é utilizada mundialmente para determinar se a pasteurização foi realizada adequadamente, e também para detectar possíveis adições de leite cru ao leite pasteurizado (Marshall, 1992). Tratamentos térmicos de 62,8°C por 30 min ou a 71,7°C por 15 segundos, aplicados comercialmente para a pasteurização do leite, irão inativar a ALP e, conseqüentemente, destruir todos os microorganismos patogênicos não formadores de esporos (Ziobro, 2001). A resistência térmica da ALP é maior do que a de microorganismos patogênicos não-esporulados; dessa forma, leite e seus produtos que apresentem um resultado negativo para o teste de fosfatase alcalina são considerados corretamente pasteurizados e seguros para o consumo (Marshall, 1992).

Com o desenvolvimento de métodos mais sensíveis (Fluorimétrico e Quemiluminescência), a partir da década de 90, houve a necessidade de serem revistos os limites máximos estabelecidos para atividade de ALP. O U.S. Food and Drug Administration (FDA) reduziu o critério máximo de aceitação de 500 mU/L, o equivalente a 0,1% de leite cru adicionado ao leite pasteurizado, para 350 mU/L (equivalente a 0,075% de leite cru adicionado, segundo os padrões americanos). O método de Scharer passou a ser não mais adequado para atender aos novos limites estabelecidos para atividade de ALP em leite (PMO, 2003).

Tentativas para aumentar a sensibilidade do método de Scharer através do aumento do volume de leite analisado não apresentaram resultados satisfatórios. Entretanto, experimentos preliminares demonstraram que é possível concentrar parte da atividade da ALP de uma amostra de leite em uma camada facilmente separável. Volumes bem maiores de leite podem ser utilizados para a análise, o que permite o aumento de sua sensibilidade, pois a ALP da amostra será concentrada na camada, que será analisada em substituição aos 0,5 mL de leite do método de Scharer.

Neste trabalho, uma metodologia sensível, adequada ao limite proposto pelo FDA e de menor custo que o método fluorimétrico, para determinação da atividade residual de Fosfatase Alcalina em leite foi desenvolvida, através de uma adaptação do método rápido de Scharer. O método da Camada proposto tanto Visual como o Espectrofotométrico e o método Fluorophos[®] foram comparados para determinar a atividade da ALP em leite, considerando-se os limites atualmente estabelecidos pelo FDA (350 mU/L).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de Leite

Amostras de leite cru integral e de leite padronizado homogeneizado e pasteurizado pelo processo HTST (75°C por 15 segundos) foram utilizadas. Para se obterem amostras de leite com atividade de ALP próxima ao limite de 350 mU/L, assim como com atividade de ALP acima e abaixo desse valor, leite cru integral nas concentrações de 0%; 0,01%; 0,025% e 0,05% foram adicionadas ao leite padronizado homogeneizado tratado a 95°C por 1 minuto (atividade ALP zero) para correlacionar com os métodos Camada (Visual e Espectrofotométrico) e o Fluorimétrico.

Após os testes preliminares do desenvolvimento do método da Camada, seis repetições foram realizadas. As amostras de leite adicionadas de leite cru foram analisadas pelo método Fluorimétrico para determinação de sua atividade de ALP. Em seguida, foram imediatamente analisadas pelo método da Camada (Visual e Espectrofotométrico).

2.2. Detecção da Atividade de ALP pelo Método Fluorophos®

A determinação quantitativa da atividade da ALP nas amostras de leite pasteurizado pelo método fluorimétrico foi realizada segundo metodologia do *Standard Methods for Examination of Dairy Products* (Marshall, 1992), utilizando-se reagentes e um fluorímetro fabricados pela Advanced Instruments, Inc (*Fluorophos* test system model FLM 200) (Massachusetts, EUA). Dois mililitros da solução do substrato Fluorophos foram adicionados em cubetas próprias que foram estabilizadas a 38°C por 10 min no bloco de aquecimento. A seguir, a amostra de leite a ser analisada foi misturada e uma alíquota de 75 µL foi retirada com pipetador próprio e adicionada ao substrato na cubeta e misturada por inversão. A opção do produto a ser analisado (leite) foi selecionada e a cubeta foi introduzida no porta-cubeta do fluorímetro, previamente calibrado com soluções padrão.

2.3. Detecção da ALP pelo Método da Camada

Foram transferidos para tubos de centrífuga com capacidade para 50 mL (28 mm diâmetro e 115 mm de comprimento), 15 mL de água destilada, 25 mL da amostra de

leite e 1,5 mL de solução de sulfato de amônia 50% (p/v). Os tubos foram fechados com tampa rosqueável, agitados em Vortex e por inversão rápida por três vezes. Foram, então, adicionados 8,0 mL de álcool butílico neutralizado resfriado e os tubos foram invertidos, não-bruscamente, por 5 vezes (inverter gentilmente o tubo em aproximadamente 1 segundo, aguardando 2 segundos com o tubo invertido, em aproximadamente mais 1 segundo retornar o tubo para a posição original, aguardar mais 2 segundos e repetir por mais 3 vezes).

Após as inversões, os tubos foram centrifugados por 10 min a 1.200g. Uma fina camada contendo a enzima, semelhante a uma membrana, fica formada entre a fase do butanol (parte superior) e a parte inferior (aquosa). A fase do butanol foi retirada com auxílio de uma pipeta. Inclinando-se o tubo (45°), a parte aquosa, abaixo da fina camada formada, também foi retirada com auxílio de uma pipeta, e somente a camada contendo a enzima foi deixada no tubo de centrífuga.

Foram adicionados à camada, ainda no tubo da centrífuga, 5 mL do substrato fenilfosfato dissódico 0,1% para análise de leite e misturados em Vortex até dissolução da camada.

Os tubos foram imediatamente incubados em banho-maria a 40°C por 16 min. As amostras foram agitadas vigorosamente após 3 min de incubação (para completa dissolução da camada) e por mais duas vezes durante a incubação. Os tubos foram removidos do banho e adicionados de 0,1 mL de solução reagente CQC (2,6-dicloroquinona cloroimida) 0,3%, 2 gotas do catalisador sulfato de cobre 0,2% e agitados cinco vezes por inversão. Os reagentes (exceto a solução de sulfato de amônia) foram preparados conforme Marshall (1992).

Os tubos foram levados novamente ao banho-maria a 40°C por 5 min e depois de removidos resfriados em banho de gelo por 5 min. Três mililitros de butanol neutralizado resfriado foram adicionados e os tubos invertidos em 9 voltas completas (a inversão deve ser realizada com cuidado, não bruscamente, inverter gentilmente o tubo em aproximadamente 1 segundo, aguardando 1 segundo com o tubo invertido; em aproximadamente mais 1 segundo retornar o tubo para a posição original, aguardar mais 1 segundo e repetir por mais 7 vezes).

Para o método da camada espectrofotométrico a determinação da concentração de fenol na amostra foi obtida pela comparação da absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu, model 1240 UV-Visível) no comprimento de onda de 650 nm, com uma curva de calibração, idêntica à utilizada para o método rápido de Scharer. A curva de

calibração foi obtida a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de equivalente fenol/ 5mL de solução (Marshall, 1992).

A interpretação do resultado da análise para o método visual foi realizada pela comparação visual da amostra com 3 padrões. Um controle negativo (leite aquecido a 95°C por 1 minuto), um segundo controle negativo contendo 0,01% de leite cru adicionado ao leite aquecido a 95 °C por 1 minuto e um terceiro controle, positivo, que foi o padrão 2,0 µg fenol equivalente/5 mL da curva-padrão de fenol (que contém 0,2 µg fenol/mL). Aquelas amostras que apresentaram coloração visual superior aos padrões 0,01% e 2,0 µg fenol equivalente/5 mL da curva-padrão de fenol foram consideradas positivas para o teste.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários métodos analíticos para determinação de ALP já foram desenvolvidos (Scharer, 1953; Rocco, 1989; Girotti, et al., 1994; Sharma, et al., 2003; Chen et al., 2005). Lovrien et al. (1987) verificaram que, através da utilização de t- butanol e sulfato de amônia, proteínas e enzimas poderiam ser separadas em uma camada intermediária, através de uma partição da amostra em três fases, com separação de proteínas e enzimas em uma das fases. Utilizando-se desse procedimento, otimizou-se a separação de ALP em leite homogeneizado. Utilizando-se n-butanol e sulfato de amônia 50% (p/v), parte da ALP de um volume de 25 mL de leite foi isolada em uma camada fina e firme, semelhante a uma membrana, podendo ser separada das duas outras frações, superior e inferior.

Para uma amostra de 25 mL de leite com atividade de 378,8 mU/L, adicionada de 15 mL de água e 1,5 mL de sulfato de amônia 50% (p/v), após mistura e centrifugação, a distribuição da atividade da ALP foi de 11.603 mU/L em 0,41g da camada e 121 mU/L em 39,2 mL do líquido inferior. Não foi encontrada atividade de ALP na fração de butanol. Isso demonstra que cerca de 50% de toda a atividade da ALP no leite concentrou-se na camada, resultando em um elevado valor de atividade, o que justifica a maior sensibilidade do método da camada.

Assim como no método de Scharer, o método da camada desenvolvido utiliza como substrato o fenilfosfato dissódico, com formação de fenol que reage com o CQC, produzindo o indofenol, azul, que é extraído pelo butanol.

Considerando-se o limite máximo de 350 mU/L estabelecido pelo FDA (PMO, 2003), para leite, o método da camada foi otimizado de forma que amostras contendo valores de atividade de ALP igual ou superiores a 350 mU/L fossem determinadas como positivas, tanto para o método visual quanto para o espectrofotométrico. Volumes de leite de 5 mL, 10 mL, 20 mL foram testados, no entanto, somente utilizando-se o volume de 25 mL é que o limite de detecção desejado (equivalente a 350 mU/L) foi alcançado.

Nos meses de janeiro e fevereiro (verão), a concentração de 0,025% de leite cru foi a que apresentou uma atividade de ALP próxima ao limite de 350 mU/L, correspondendo a atividade de 1.400.000 mU/L no leite cru. No entanto, nos meses de outubro a novembro (primavera) foi necessária a concentração de 0,05% para atingir 350 mU/L, devido a redução natural da ALP no leite cru para 700.000 mU/L. Dessa forma, a porcentagem de leite cru em leite tratado termicamente, necessária para atingir 350 mU/L varia durante o ano. Haab & Smith (1956), utilizando o método de Sanders e Sager modificado, também encontraram variação na atividade de fosfatase alcalina em leite durante as várias estações do ano, durante o período completo de lactação (com uma concentração máxima cerca de 28 semanas após o parto), entre vacas, e de acordo com a sua produção.

A média e o desvio-padrão dos resultados referentes à determinação da atividade de ALP nas amostras de leite das 6 repetições, pelos métodos Fluorophos[®] e Camada, são apresentados no Quadro 1. As amostras contendo atividade de ALP próxima a 350mU/L (concentração de 0,025%) apresentaram uma concentração de fenol de 0,2 µg fenol/mL de leite. Por isso, o tubo contendo 2 µg de equivalente fenol/ 5mL de solução da curva-padrão de fenol foi adotado como padrão de comparação para o método da camada visual. As amostras contendo 0,01% e 0,05% de leite cru apresentaram uma atividade média de ALP de 155mU/L e 718mU/L, pelo método Fluorophos[®], e uma concentração de fenol de 0,09 µg e 0,34 µg fenol/mL de leite, respectivamente, pelo método da Camada Espectrofotométrico. A concentração de 0,01% de leite cru apresentou uma atividade de ALP bem abaixo do limite legal, sendo o método da Camada Espectrofotométrico bastante sensível para detectar esses baixos valores de ALP.

Um coeficiente de correlação (r) de 0,9908 foi encontrado entre a porcentagem de leite cru adicionado e a concentração de fenol das amostras analisadas pelo método da Camada Espectrofotométrico (Quadro 1). A relação linear $r = 0,9921$ (Figura 1) foi

encontrada entre o método da Camada e o método Fluorophos[®], o que demonstra a adequação do método da camada espectrofotométrico para análise de ALP em leite. De acordo com os resultados, verifica-se que o método da Camada Espectrofotométrico detecta níveis de ALP bem abaixo do limite de 350 mU/L, apresentando sensibilidade e limite de detecção adequados para determinação de ALP em leite, considerando os limites atualmente estabelecidos pelo FDA.

Quadro 1- Atividade de ALP de seis repetições para os métodos Fluorophos[®] e Camada Espectrofotométrico

Leite cru adicionado (%)	Atividade de Fosfatase Alcalina					
	Fluorophos [®] (mU/L)			Camada Espectrofotométrico (µg fenol /mL)		
	Média	DP	DP(%)	Média	DP	DP(%)
0,01	155,6	12,5	8,0	0,090	0,026	28,9
0,025	371,7	24,1	6,5	0,213	0,029	13,6
0,05	718,4	43,5	6,0	0,340	0,049	14,4
	$y = 14049x + 17$ $r = 0,9999$			$y = 6,13x + 0,04$ $r = 0,9908$		

DP: Desvio-padrão.

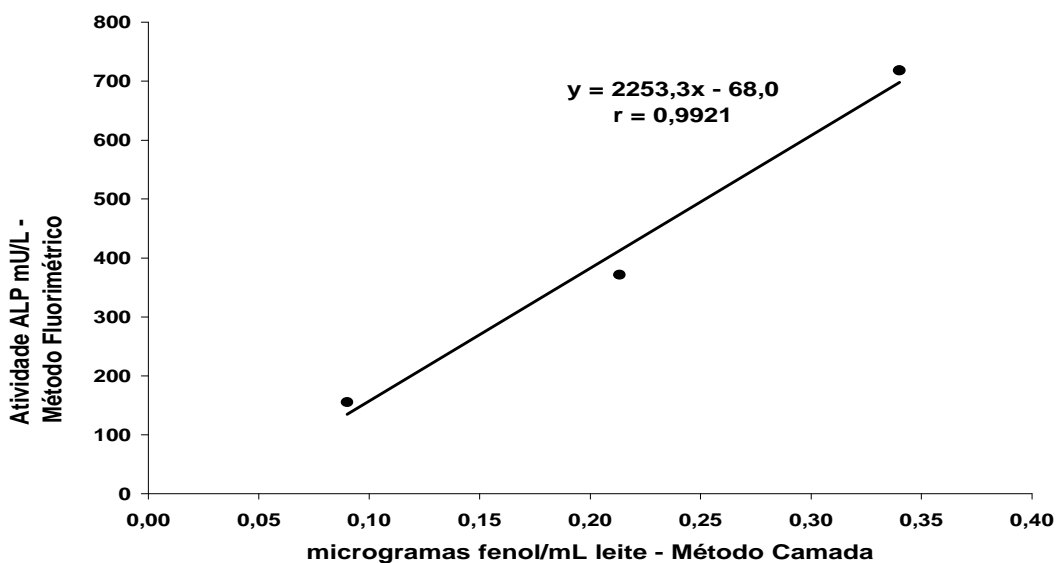


Figura 1- Relação linear encontrada entre o método Fluorophos[®] e o método da Camada Espectrofotométrico em seis repetições realizadas.

Quadro 2- Resultados obtidos para o método da Camada Visual nas amostras contendo diferentes proporções de leite cru, em seis repetições realizadas

Leite cru adicionado (%)	Atividade de Fosfatase Alcalina			
	Fluorophos (mU/L)	Coloração da amostra	Resultado do Teste	Nº. de resultados positivos (6 repetições)
0,01	155,6	verde	negativo	0
0,025	371,7	azul	positivo	6
0,05	718,4	azul	positivo	6

O método Visual da Camada também foi capaz de detectar a presença de 0,025% de leite cru adicionado ao leite tratado termicamente, ou seja, amostras com atividade de ALP de 350 mU/L (média 371,7 mU/L) foram consideradas positivas pelo método da Camada Visual (Quadros 1 e 2). Em todas as seis repetições realizadas, as amostras contendo 0,025% e 0,05% de leite cru adicionado obtiveram resultado positivo para o método da Camada Visual desenvolvido. Dessa forma, assim como o método da Camada Espectrofotométrico, o método Visual também possui limite de detecção adequado para o limite de 350 mU/L, podendo ser utilizado com segurança na detecção de ALP em leite.

O método fluorimétrico e o de Quemiluminescência são as únicas metodologias oficiais que atualmente atendem aos limites requeridos pelo FDA. O método da Camada, tanto Espectrofotométrico como Visual, mostrou-se muito sensível, apresentando limite de detecção bem abaixo de 350 mU/L e com boa correlação com o método fluorimétrico, tornando-se assim uma alternativa, entre os métodos sensíveis disponíveis, para detecção de baixos níveis ALP em leite, abaixo do limite de 350 mU/L estabelecido pelo FDA.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, CHAO-CHENG, TAI, YU:CHANG, SHEN, SZU-CHUAN, TU, YANN-YING, WU, MING-CHANG, MING-CHANG, H. Detection of alkaline phosphatase by competitive indirect ELISA using immunoglobulin in yolk (IgY) specific against bovine milk alkaline phosphatase. Food Chemistry. 2005. Disponível no site www.sciencedirect.com.

GIROTTI, S., FERRI, E., GHINI, S., BUDINI, R., RODA, A. Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase in milk. Netherlands Milk & Dairy Journal, 48, p.213-224, 1994.

HAAB, W., SMITH, L.M. Variations in alkaline phosphatase activity of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n.12, p.1644-1650, 1956.

KLEYN, D. H.; HO, C. Rapid determination of alkaline phosphatase reactivation. *Journal of the A.O.A.C*, v. 60, n.6, p. 1389-1391. 1977.

LOVRIEN, R., GOLDENSOPH, C., ANDERSON, P. C., ODEGAARD, B. Three phase (TTP) via t-butanol: enzymes separation from crudes. *Protein purification – micro to macro*. Alan R. Liss, Inc. New York, p. 131-148, 1987.

MARSHALL, R. T., *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association. NW Washington, DC. 1992.

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

PMO – Pasteurized Milk Ordinance, 2001 Revision, May 2002. US Food and Drug Administration.

ROCCO, R. M. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in cheese. *Journal Dairy Science*. 72 Suppl.1, 171. 1989.

SCHARER, H. Scharer modified phosphatase methods. *Journal Milk Technology*, v. 16, n. 2, p. 86-88, 1953.

SHARMA, S. K., SEHGAL, N., KUMAR, A. Dry-reagent strips for testing milk pasteurization. *Lebensm.-Wiss.u.-Technology*, v. 36, p. 567-571, 2003.

ZIOBRO, C. G. Screening method for phosphatase (residual) in cheese. *Bacteriological Analytical Manual online*. Chapter 27. U.S. Food & Drug Administration. 2001.

CONCLUSÃO GERAL

O limite máximo de atividade residual de ALP para leite, atualmente estabelecido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), é de 350 mU/L pelo método fluorimétrico que correspondeu à adição de 0,025% a 0,05% de leite cru adicionado ao leite tratado termicamente.

O método rápido de Scharer espectrofotométrico detectou a presença de 0,1% de contaminação de leite cru, com base no limite estabelecido internacionalmente para o método rápido de Scharer (visual e espectrofotométrico) que é de 1µg fenol por mL.

A determinação da atividade de ALP pelo método rápido de Scharer visual detectou como positivas amostras contendo 0,8% de leite cru adicionado ao leite tratado termicamente, ou seja, amostras com 10,43 µg de fenol por mL. O método Oficial Brasileiro somente detectou a presença de 1% a 2% de leite cru nas amostras de leite.

O método Visual da Camada desenvolvido foi capaz de detectar a presença de 0,025% de leite cru adicionado ao leite tratado termicamente, ou seja, amostras com atividade de ALP de 350 mU/L foram consideradas positivas pelo método da Camada Visual.

O método da Camada Espectrofotométrico apresentou sensibilidade suficiente para detectar a atividade de ALP em amostras contendo 0,01% de leite cru e bem abaixo do limite de 350 mU/L.

Os métodos da Camada, Visual e Espectrofotométrico, apresentaram-se muito sensíveis, com boa correlação com o método Fluorophos[®], tornando-se, assim, uma alternativa para detecção de baixos níveis ALP em leite, abaixo do limite de 350 mU/L estabelecido pelo FDA.

ANEXOS

ANEXO A

Preparo das soluções utilizadas na determinação de fosfatase alcalina pelos métodos rápido de Scharer e Camada, segundo Marshall (1992)

1. **Tampão carbonato:** dissolver 46,89 g de carbonato de sódio e 37,17 g de bicarbonato de sódio em água e completar para 1 litro. Estocar em garrafa de vidro tampada.
2. **CQC:** dissolver 30 mg de CQC em 10 mL de metanol. Estocar a solução em frasco âmbar sob refrigeração.
3. **Sulfato de cobre:** dissolver 200 mg de sulfato de cobre em 100 mL de água. Estocar sob refrigeração.
4. **Butanol:** para neutralizar os ácidos livres que podem estar presentes, misturar 10 mL de tampão carbonato a 40 mL de água e adicionar a 3,785 L de butanol. Misturar e estocar em geladeira.
5. **Substrato:** dissolver 0,5 g de fenilfosfato dissódico em 10 mL de água. Adicionar 25 mL de tampão carbonato, transferir para um balão volumétrico de 500 mL e completar com água destilada. Esta solução deve ser preparada diariamente.

Método da camada

1. **Solução Sulfato de Amônia 50% (p/v):** dissolver 50 g de sulfato de amônia em água destilada. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Estocar a solução em geladeira.

ANEXO B

Curva-Padrão utilizada nos métodos Rápido de Scharer Visual e Espectrofotométrico e Camada Visual e Espectrofotométrico

Construção da Curva-Padrão - Marshall (1992)

Para uma série de tubos adicionar a solução de fenol $1\mu\text{g}/\text{mL}$ e água nas quantidades especificadas na tabela abaixo. Adicionar 0,5 mL de tampão carbonato aos tubos, misturar e adicionar 0,1 mL de CQC e duas gotas do catalisador CuSO_4 . Misturar por inversão e incubar a 40°C por 5 min. Resfriar em banho de gelo e adicionar 3,0 mL de butanol resfriado. Por inversão dos tubos extrair o indofenol formado.

Quadro 1B – Construção da Curva-Padrão

Solução de fenol* (mL)	Água (mL)	Fenol equivalente ($\mu\text{g}/5\text{ mL}$) ^a	Fenol equivalente ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentração fenol real ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0,0	5,0	0	0,0	0,0
0,5	4,5	1	0,2	0,1
1,0	4,0	2	0,4	0,2
2,5	2,5	5	1,0	0,5
5,0	0,0	10	2,0	1,0

* Solução de fenol $1\mu\text{g}/\text{mL}$.

^a A quantidade de fenol em cada padrão é a metade do equivalente fenol por 5 mL. O gráfico para o método espectrofotométrico é construído com base no equivalente fenol por 5 mL versus a absorvância.

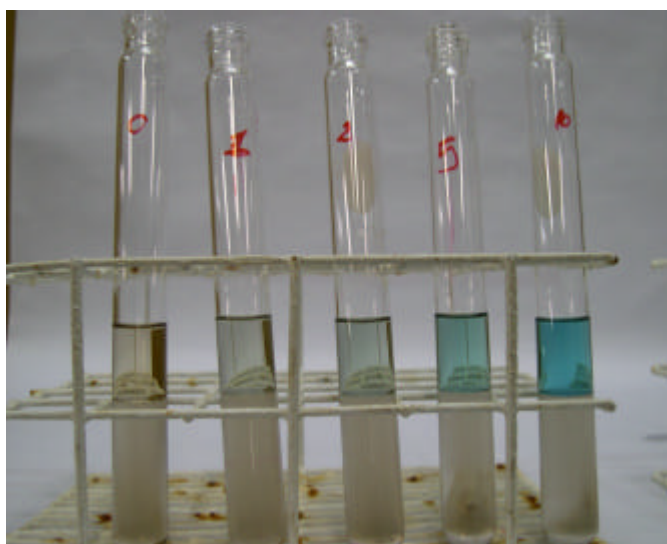


Figura 1B- Curva-padrão contendo 0, 1, 2, 5 e $10\mu\text{g}$ fenol/ 5 mL.

ANEXO C

Resultados obtidos para o método rápido de Scharer Espectrofotométrico

Quadro 1C – Resultados expressos em μg fenol por mL de leite para as 16 repetições realizadas nas amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado

Leite cru adicionado (%)						
Repetições	0,05	0,1	0,2	0,8	1	2
1	-0,31	0,61	2,19	10,03	10,28	28,88
2	-0,3	0,12	1,71	9,04	12,98	24,02
3	-0,37	0,28	2,11	7,47	10,22	17,66
4	0,16	1,49	1,54	12,66	12,62	22,55
5	0,3	1,99	7,5	19,57	13,45	26,21
6	0,65	1,2	4,83	5,93	9,89	24,47
7	0,02	2,5	4,39	6,85	10,81	14,52
8	-0,31	0,99	3,96	16,6	12,42	30,39
9	-0,54	0,03	0,84	7,14	6,43	17,78
10	0,19	0,54	2,9	10,78	14,91	29,63
11	0,09	0,95	2,75	9,7	10,53	32,44
12	0,39	1,27	3,45	7,36	18,28	17,64
13	0,93	1,16	5,85	15,79	11,21	18,09
14	0,95	2,07	3,49	8,65	11,26	21,54
15	-0,28	2,56	3,04	8,31	10,51	22,5

Os resultados negativos são provenientes de valores de absorvância da amostra inferiores ao do zero.

ANEXO D

Fotos de resultados obtidos para o método rápido de Scharer

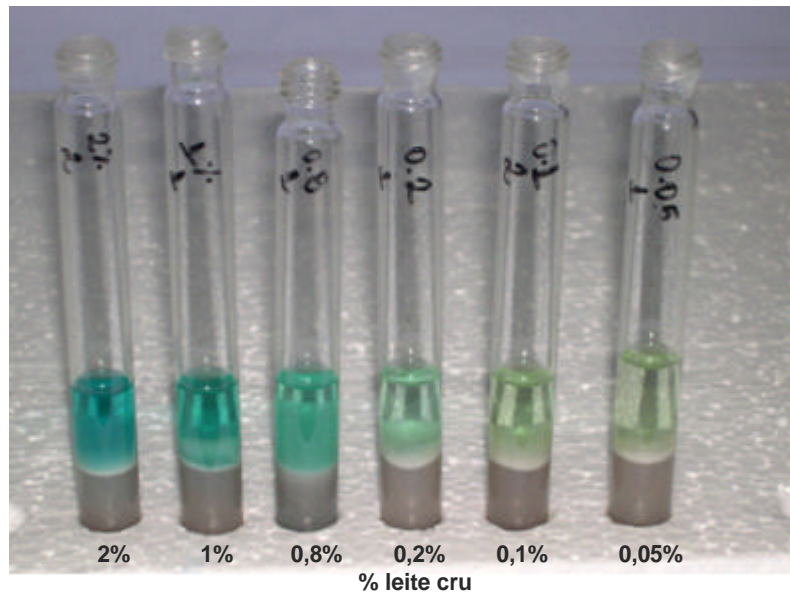


Figura 1D – Resultado do método rápido de Scharer para uma das repetições realizadas em amostras contendo diferentes teores de leite cru.

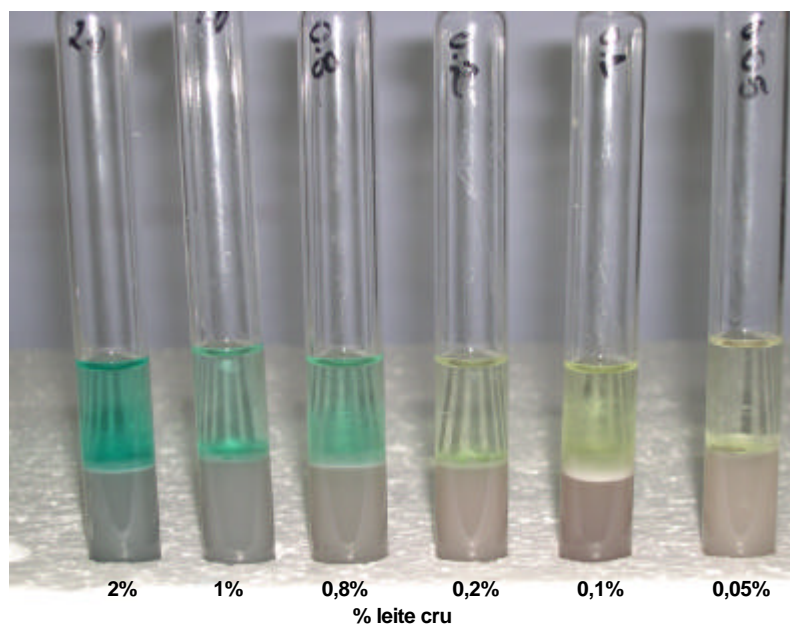


Figura 2D – Resultado do método rápido de Scharer para uma das repetições realizadas em amostras contendo diferentes teores de leite cru.

ANEXO E

Resultados obtidos para o método da Camada Espectrofotométrico

Quadro 1E – Resultados expressos em µg fenol por mL de leite para as 6 repetições realizadas nas amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado

Leite Cru Adicionado (%)	Repetições					
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
0,01	0,05	0,10	0,12	0,11	0,09	0,07
0,025	0,16	0,23	0,23	0,23	0,20	0,23
0,05	0,31	0,35	0,42	0,36	0,28	0,32

ANEXO F

Fotos de resultados obtidos para o método da Camada

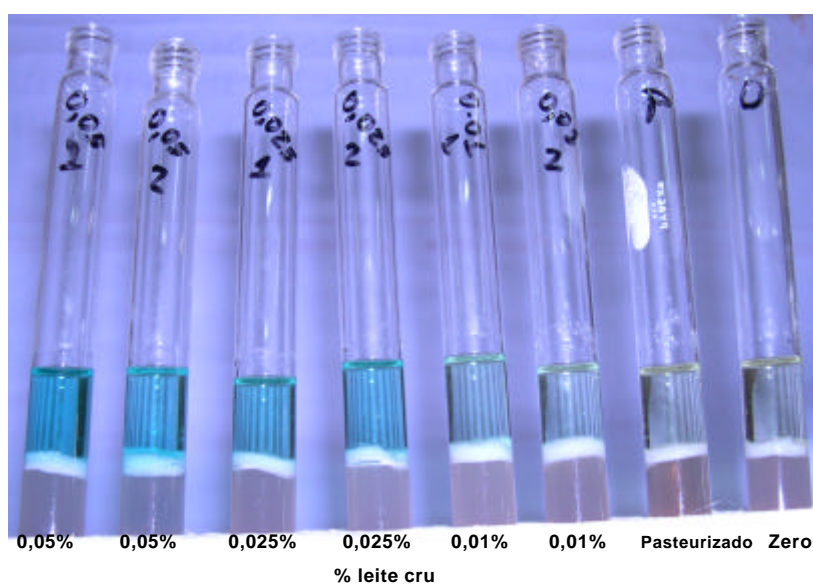


Figura 1F – Resultado do método da Camada para uma das repetições realizadas para amostras em duplicata contendo diferentes teores de leite cru.

ANEXO G

Resultados obtidos para o método Fluorophos®

Quadro 1G – Resultados expressos em mU/L de leite para as 17 repetições realizadas durante a primavera, em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado

Repetições	Leite Cru Adicionado (%)					
	0,05	0,1	0,2	0,8	1,0	2,0
1	432	859	1700	6643	8247	15772
2	432	854	1674	6831	8146	15694
3	351	808	1534	5972	7539	16214
4	354	781	1564	6114	7755	16614
5	376	768	1537	6086	7746	16056
6	381	798	1566	6300	7764	15100
7	386	774	1599	6086	7783	13120
8	393	769	1654	6371	7944	14724
9	372	769	1621	6358	7378	14550
10	362	781	1551	6109	7328	13363
11	336	681	1419	5622	6983	14536
12	394	781	1667	6367	8224	15055
13	394	853	1659	6201	7489	14278
14	372	792	1628	6211	7957	15023
15	258	666	1107	4882	5880	11368
16	295	681	1141	4620	5949	11359
17	389	845	1780	6661	8399	15156

Quadro 2G – Resultados expressos em mU/L de leite para as 7 repetições realizadas durante o verão, em amostras contendo diferentes porcentagens de leite cru adicionado

Leite cru adicionado (%)	Repetições						
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª
0,01	138,8	154,50	167,8	170,1	144,3	158,1	140,0
0,025	331,9	368,9	396,5	382,7	358,40	391,7	363,2
0,05	652,3	710,7	744,3	757,6	685,4	759,9	691,4