

**Disciplina: Tecnologia de Produtos de Origem Animal – VNP 3101**

Professor Responsável: Marcos Veiga dos Santos ([mveiga@usp.br](mailto:mveiga@usp.br))

**Aula prática: Análises físico-químicas (FQ) do leite e derivados**

**1) Introdução**

A composição do leite é uma combinação de três grupos de componentes em equilíbrio:

- Dispersão de proteínas do soro e solução coloidal de micelas de caseína ligadas a Ca e P;
- Emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis dispersos em água;
- Solução aquosa de lactose, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis.

As características físico-químicas (FQ) do leite podem ser aferidas e mensuradas por meio de provas laboratoriais, com a finalidade de determinar: densidade, teor de gordura, extrato seco total e desengordurado, acidez e índice crioscópico, pesquisa de resíduos de antibióticos.

A realização de provas FQ é de fundamental importância para a detecção de fraudes e para avaliar a qualidade e conformidade de características organolépticas da matéria-prima utilizada no processamento. Como características organolépticas gerais do leite, podemos citar: aspecto líquido opaco fluido, coloração branca (levemente amarelada), odor próprio e agradável e sabor característico.

**2) Densidade a 15°C**

É a relação entre a massa e o volume da solução, determinada por dois fatores: a concentração de elementos em solução e suspensão e a porcentagem de gordura. Dado que a água apresenta densidade de 1 g/ml, a densidade final dependerá do balanço entre os componentes do leite. A prova da densidade tem como principais objetivos:

- a) Indicar suspeita de adição de água no leite;
- b) Determinar o extrato seco total, quando associado com o teor de gordura.

**Material e Métodos:** Transfira, para uma proveta de 250 ml, uma quantidade de amostra previamente homogeneizada (T=10 a 20°C), que permita mergulhar o termolactodensímetro. Introduza lentamente o termolactodensímetro, evitando mergulhá-lo além do ponto de afloramento, tendo o cuidado de não encostar nas paredes da proveta. Faça a leitura ao nível do leite no menisco superior, levante o termolactodensímetro e enxugue a haste com lenço de papel. Mergulhe novamente o termolactodensímetro até próximo do traço observado anteriormente e espere até que a coluna de mercúrio do termômetro e o densímetro se estabilizem. Ao final, proceda à leitura da densidade e da temperatura; expresse a densidade a 15°C, utilizando tabela própria para correção do valor obtido no instrumento.

Densidade (15°C) g/mL	Interpretação
Abaixo de 1,028	Provável fraude por adição de água ao leite
1,028 a 1,034	Leite normal
Acima de 1,034	Desnatamento ou adição de leite desnatado

**3) Teor de gordura**

• **Método Químico (Gerber)**

A gordura do leite é composta na sua quase totalidade por triglicerídeos (98% da gordura total) e é o componente de maior variação no leite (3,74±0,69). O teor de gordura pode ser determinado pelo método de Gerber, o qual se baseia na quebra da emulsão gordurosa, através da ação do ácido sulfúrico, e posterior separação da gordura por centrifugação. A prova da densidade tem como principais objetivos:

- a) Aferir o percentual de gordura do leite para precificação de matéria prima;
- b) Estabelecer suspeita de desnate do leite cru.

**Material e Métodos:** Transfira 10 ml de ác. sulfúrico (d=1,820 – 1,825) para o lactobutirômetro de Gerber usando uma pipeta volumétrica. Lentamente, adicione 11 ml da amostra e 1 ml de álcool isoamílico (d=0,815), evitando molhar internamente o gargalo do lactobutirômetro. Posteriormente, feche o lactobutirômetro com a rolha e o agite até a completa dissolução (*segure o butirômetro com um pano, pois ocorre forte aquecimento do líquido*). Centrifugue a

1.000-1.200 rpm, por 15 minutos e leve ao banho-maria a 65°C, por 3-5 minutos, mantendo a rolha para baixo. Com o lactobutirômetro na posição vertical (rolha para baixo), posicione a rolha de tal modo que a camada amarelo-clara e transparente (gordura) fique situada dentro da haste graduada e faça a leitura na parte inferior do menisco, onde o nº de ml ocupado pela camada oleosa indicará de forma direta a porcentagem de gordura.

• **Método Eletrônico (LACTOSCAN)**

O analisador ultrassônico de leite permite realizar análises em 50 segundos, para uso em laticínios e cooperativas de tamanho médio. Os resultados são gerados com rapidez, sem a necessidade de uso de reagentes químicos.

<i>Procedimento</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ligar o aparelho, aguardar o BIPE</li> <li>• A mensagem "READY TO START" aparecerá no display;</li> <li>• Deixar pressionado o ENTER para selecionar o animal VACA;</li> <li>• Pressionar ENTER rapidamente para iniciar a análise;</li> <li>• A análise leva em torno de 60 segundos, quando terminar soará um bipe e os resultados aparecerão no display;</li> <li>• A temperatura do leite pode estar entre 1°C e 40°C</li> </ul>
---------------------	---

% gordura	Interpretação
< 3%	Provável fraude por adição de água ou desnatamento
> 3%	Leite normal

**4) Extrato Seco (ES)**

O extrato seco é composto por todos os constituintes do leite, excetuando-se a água. Pode ser estimado por via direta (secagem em estufa) ou por via indireta através de fórmulas de composição (relação entre gordura e densidade).

a) Disco de ACKERMANN: Faça coincidir as graduações dos círculos interno e médio, correspondentes à densidade e à gordura, respectivamente. A posição da seta indicará, no círculo externo, a % de ES.

b) Fórmula de Fleishmann:

$$ES\% = 1,2 \times G + 2,655 \times (100 \times D - 100) / D$$

Onde: ES% = % de extrato seco; G = % de gordura (item 3); D = densidade a 15°C (item 2).

Para obter o Extrato Seco Desengordurado (ESD), subtraia do (ES), o percentual de gordura (G):

$$ESD = ES - G$$

% ES	% ESD	Interpretação
abaixo de 11,5	abaixo de 8,4	provável fraude por adição de água
abaixo de 11,5	8,4 ou mais	provável fraude por desnatamento
11,5 ou mais	8,4 ou mais	normal, dentro dos limites da legislação

## 5) Prova do Alizarol

A Prova do Alizarol é qualitativa, rápida e de fácil execução, sendo realizada no momento da coleta do leite nos rebanhos. Essa prova apresenta como objetivo estimar a acidez e estabilidade térmica do leite. A acidez do leite é alterada principalmente pela contaminação por microrganismos mesófilos; já a instabilidade do leite pode ser ocasionada pela contaminação por microrganismos psicrotóxicos ou por um resultado falso-positivo denominado LINA (leite instável não ácido). Para determinar a causa da instabilidade, é realizado o teste da fervura. Nesse teste, se o leite coagular, a instabilidade apresenta origem microbiológica; se não coagular, trata-se de LINA. A estabilidade do leite ainda pode ser influenciada por fatores como a estação do ano, estágio da lactação e a presença de mastite.

**Material e Métodos:** Em um tubo de ensaio, colocar 2ml da amostra de leite homogeneizada e 2ml de álcool (de 68°GL a 78°GL). Homogeneizar e observar a coloração e presença de grumos para interpretação dos resultados, conforme descrito na tabela abaixo.

Aspecto	Interpretação
Coloração vermelho-tijolo, sem grumos	Normal
Coloração amarelada, presença de grumos	Ácido
Coloração violeta, sem grumos	Alcalino
Coloração vermelho-tijolo, com grumos	Instável

## 6) Acidez Titulável (Teste de Dornic)

O Teste de Dornic é um teste de plataforma utilizado para avaliação da qualidade microbiológica do leite. Alguns componentes do leite como citratos, fosfatos e proteínas (caseína e proteínas do soro) contribuem para uma acidez aparente do leite. No entanto, quando o leite é contaminado por bactérias mesófilas fermentadoras de lactose, há aumento significativo no teor de ácido láctico (acidez verdadeira). O Teste de Dornic é baseado na neutralização do ácido láctico presente no leite pelo hidróxido de sódio (NaOH) na presença de fenolftaleína, utilizada como indicador na determinação da quantidade de NaOH necessária para neutralizar o ácido do leite.

**Material e Métodos:** Colocar 10mL da amostra de leite homogeneizada em um béquer de 100mL (ou erlenmeyer de 125ml) e adicionar 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Após homogeneização, iniciar a titulação com a solução de Dornic (NaOH N/9) até o aparecimento de coloração rósea. Sabendo que cada 0,1mL da solução de Dornic utilizada para a neutralização corresponde a 1°D (0,1g de ácido láctico/L de leite), são feitas a determinação da acidez e interpretação dos resultados obtidos, conforme descrito na tabela abaixo.

Acidez Dornic (°D)	Interpretação
14-18	Leite normal (fresco)
<14	Leite alcalino: mastite, final de lactação, fraude com água
19-20	Leite ligeiramente ácido: presença de colostro, início de fermentação bacteriana
> 24	Leite que não suporta a pasteurização a 72°C
55-60	Leite que pode coagular em temperatura ambiente

## 7) Contagem de células somáticas (CCS)

A CCS é uma análise utilizada para avaliação da sanidade das glândulas mamárias das vacas do rebanho. O aumento da contagem de células somáticas no leite ocorre pela migração de leucócitos da corrente sanguínea para a glândula mamária e pela descamação das células epiteliais da glândula mamária. A principal causa de aumento da CCS, é a ocorrência de um processo inflamatório da glândula mamária, mas pode ocorrer variação de acordo com a fase da lactação, idade da vaca, e estresse. **Para vacas de primeira lactação, a glândula mamária é considerada saudável quando CCS < 100.000,00 células/mL; já para vacas de duas ou mais lactações CCS < 200.000,00 células/ mL. Em relação ao leite do tanque, o limite estabelecido pela legislação é de 500.000,00 células/mL (média geométrica dos últimos 3 meses).**

## 8) Provas Enzimáticas do Leite

As enzimas presentes no leite têm origem tanto do sangue quanto do metabolismo dos microrganismos que estão presentes no leite (enzimas bacterianas). A ação das enzimas é muito específica e depende fundamentalmente da temperatura e do valor de pH.

### • Peroxidase

A peroxidase é uma enzima encontrada naturalmente no leite e capaz de catalisar as reações de oxidação da gordura. Além disso, a peroxidase é componente do sistema antimicrobiano natural chamado complexo lactoperoxidase/tiocianato/peróxido de hidrogênio. A inativação da peroxidase ocorre quando o leite é aquecido em temperaturas maiores que 85°C por 5 segundos. Assim, **essa enzima deve estar presente no leite in natura e no leite pasteurizado**. Este teste avalia a eficiência do processo de pasteurização. Imediatamente após a pasteurização o produto processado deve apresentar teste positivo para a Peroxidase.

**Material e Métodos:** A avaliação da peroxidase pode ser efetuada por kits comerciais. Seguindo as instruções do fabricante, as tiras para teste Cap-Lab® devem ser imersas na amostra homogeneizada de leite por 10 segundos. Em seguida, efetuar avaliar a coloração das tiras para interpretação dos resultados, conforme descrito abaixo.

Aspecto	Interpretação
Coloração marrom avermelhada	Positivo
Sem alterações na coloração da tira (indica aquecimento do leite >75°C por > 20 s)	Negativo

### • Fosfatase alcalina

A Fosfatase Alcalina (FA) é uma enzima encontrada naturalmente no leite cru. **Com o processo de pasteurização, a FA é inativada**. Sua determinação permite avaliar a eficiência do processo de pasteurização. **Após a pasteurização, o leite deve apresentar teste qualitativo negativo para Fosfatase Alcalina**.

**Material e Métodos:** A avaliação da fosfatase alcalina pode ser efetuada por kits comerciais. Seguindo as instruções do fabricante, as tiras para teste Cap-Lab® devem ser imersas na amostra homogeneizada de leite por 10 segundos. Retirar a tira da amostra de leite e aguardar 2-3 minutos para realização da leitura. Em seguida, avaliar a coloração das tiras para interpretação dos resultados, conforme descrito abaixo.

Aspecto	Interpretação	Pasteurização
Coloração amarelada	Positivo	Ineficiente
Sem alterações na coloração da tira	Negativo	Eficiente

## Referências

- Adaptado de: Tietz NW, Rinker D, Shaw LM. IFCC method for alkaline phosphatase. J Clin Chem Clin Biochem 1983; 21:731-48.  
\*\*DiaSys Diagnostic Systems GmbH & Co. KG Alte Strasse 9-65558 Holzheim Germany
- PEREIRA, D. B. C., SILVA, P.H.F., COSTA Jr., L. C. G., OLIVEIRA, L. L. Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos. Epamig, Juiz de Fora, 234 p, 2001.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos físicos e químicos. Brasília, MA, 1981.
- Acidez Titulável. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_194\\_21720039246.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_194_21720039246.html). Acesso em: 09 de março de 2020.
- Lina: Um leite saudável, mas de má aparência. Disponível em: <http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/lina-um-leite-saudavel-mas-de-ma-aparencia>. Acesso em: 09 de março de 2020.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções. Pirassununga: 2019, v.1. p.301.
- VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. Obtenção e Processamento do Leite e Derivados. 1. ed. , 2018. v. 1. 220p. <http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/download/200/181/850-1?inline=1>