

**MARIA PATRICIA MILAGRES**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO REAL DE ÁCIDO  
LÁTICO EM LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO  
EFICIÊNCIA– EXCLUSÃO DE ÍONS.**

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

VICOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2008

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

T

M637d  
2008

Milagres, Maria Patrícia, 1983-  
Desenvolvimento de metodologia analítica para determi-  
nação da concentração real de ácido láctico em leite por  
cromatografia líquida de alto eficiência-exclusão de ions /  
Maria Patrícia Milagres. – Viçosa, MG, 2008.  
xv, 58f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 53-58.

1. Leite - Qualidade. 2. Leite - Adulteração e inspeção.  
3. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 4. Soda  
caústica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

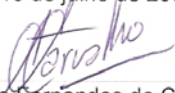
CDD 22.ed. 637.127

MARIA PATRICIA MILAGRES

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO REAL DE ÁCIDO LÁTICO EM  
LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO EFICIÊNCIA -  
EXCLUSÃO DE ÍONS.


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

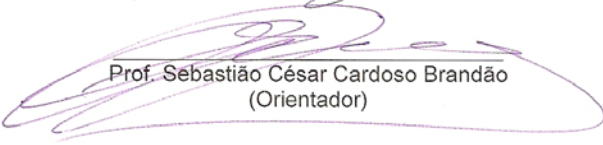
APROVADA: 18 de julho de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Antônio Fernandes de Carvalho  
(Co-Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Juraci Alves de Oliveira.  
(Co-Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Jardim Zacca

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Luis Antônio Minim

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sebastião César Cardoso Brandão  
(Orientador)

Dedico este trabalho,

A meus pais e ao meu irmão pelo apoio e motivação que me deram durante toda a minha vida, apoio e motivação que foram essenciais para eu alcançasse este objetivo.

Ao meu namorado, Tiago, pela força durante os momentos difíceis, pelo carinho amor, paciência e compreensão. Te amo.

A Mirella, aos amigos do LANAGRO-MG, exemplo de amizade e paciência. Existem amigos que são como irmãos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e pela força para enfrentar todas as dificuldades.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso.

A Pró-Reitoria de Administração da Universidade Federal de Viçosa, na pessoa da Fátima, pelo suporte nas viagens.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pela oportunidade de realização do experimento nas dependências do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), e pelo apoio financeiro.

Ao professor Sebastião César Cardoso Brandão, pela orientação nos meus trabalhos, pela amizade, confiança, paciência, e pelas palavras de apoio quando a defesa deste trabalho parecia impossível.

Ao Policial Federal Jorge Jardim Zacca, pela vinda a Viçosa para a participação em minha banca, pelas contribuições dadas.

Aos co-orientadores Professor Juraci Alves, e Antônio Fernandes pela orientação, amizade, e contribuições na tese.

Ao Professor Luis Minim pela ajuda nas análises estatísticas, pela orientação, apoio, e amizade.

Ao Policial Federal Sérgio Cibreiros pela amizade e orientação.

A minha mãe Cormarie Geralda Reis, que sempre me apoiou em meus estudos, por sempre ter feito favores para mim, que contribuíram muito para otimização do meu tempo, e ainda pelas palavras de carinho, compreensão, amor.

Ao meu Pai Virgílio de Paula Milagres, que sempre me estimulou a sonhar, e a correr atrás dos sonhos, e que me deu todo apoio, tanto pessoal como financeiro para que eu realizasse este sonho.

Ao meu irmão Rodrigo Patrick Milagres, pelo carinho, amizade, companheirismo, e por sempre me ajudar quando preciso.

Ao meu namorado Tiago, pela força, apoio e pelas palavras de conforto quando o fim deste trabalho parecia tão distante. Por ter me visitado tantas vezes em Pedro Leopoldo, e pelas ligações telefônicas a todo o momento, fazendo com que a distância entre nós não se tornasse um empecilho, pela paciência e compreensão nos momentos de nervoso

e sensibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, que sempre estão dispostos a ajudar quando necessário. Obrigada pelo carinho e pela torcida.

Aos amigos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Geruza, Mateus, Alexandre, Adenilson, Mauricio, Luana, Juliana Rigueira, Paula Rosa, Claudia, Fabiana, Ana Claudia, Sergio, Lívia, Patrícia Bernardes, Nivio, Ritinha, Vagner, Mirella pela amizade e conhecimento compartilhado.

Aos amigos da graduação, que mesmo distantes estão sempre presentes em minha vida.

Aos amigos Lidiane, Raquel, Janine, Gislaine, Yhara, Jaqueline pela eterna amizade.

A Mirella, amiga que esteve presente em todos os momentos durante a realização deste trabalho, dividindo comigo não só despesas, e casa, mas também alegrias, tristezas e conhecimento.

Ao amigo Vinicius por todo apoio dado durante a graduação e mestrado, e toda sua família, Ana, Lívia, Lucas e Mauro por estarem sempre presentes em minha vida.

**AOS AMIGOS DO LANAGRO-MG:**

Pela força, apoio, orientação, paciência e compreensão, com vocês aprendi o valor de uma amizade, nunca esquecerei vocês.

**ESPECIALMENTE A:**

Eugenia e ao Ricardo pelas oportunidades, e apoio financeiro.

Ao Jurez, Maria Helena e Eduardo pelo uso dos equipamentos.

Ao Léo, Rodrigo, Flavia, Ronaldo, Sergio, Josefa, Junio, Vagner, Gilsara, Caio, Mônica, Lucimere, Moisa, Bruna, Débora, Cristiane, Rute, pela amizade e orientação.

Aos setores de manutenção (especialmente o José Candido), secretarias (especialmente a Marcela), e recepcionistas (especialmente a Vilma e Rejane), ao setor de lavagem de material (especialmente o Vanderlei, Olívia, Eliana, Pádua), ao setor de meio de cultura (especialmente a Adriely, e Verlei.). Ao setor de microbiologia, pelo uso de seus laboratórios. Ao Rodrigo pelo domingo de férias que passou no laboratório me ajudando, pela viagem a Pará de Minas, e por ter me feito acreditar que o fim chegaria. A Lucimere e o Eduardo pela compreensão de minha ansiedade e por te feito de tudo para que este sonho se realizasse. Ao Léo pelo ombro amigo.

E finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA**

MARIA PATRÍCIA MILAGRES, filha de Virgílio de Paula Milagres e Cormarie Geralda Reais Milagres, nasceu em São Miguel do Anta, Minas Gerais, em 28 de agosto de 1983.

Em janeiro de 2005, graduou-se em Ciências e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos, nesta mesma instituição, defendendo tese em 18 de julho de 2008.

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS-----   | ix  |
| LISTA DE QUADROS-----   | xi  |
| RESUMO-----   | xii |
| ABSTRACT-----   | xiv |
| 1- INTRODUÇÃO-----  | 1   |
| 2-OBJETIVOS-----  | 2   |
| 3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----  | 3   |
| 3.1 - Fermentação natural do leite.-----  | 3   |
| 3.2 Acidez do leite. -----  | 6   |
| 3.3-Ácido láctico no leite.-----  | 6   |
| 3.4 - Microbiologia do leite.-----  | 8   |
| 3.5- Bactérias lácticas.-----   | 9   |
| 3.6- A Instrução Normativa nº 51 e a Qualidade do Leite no Brasil.-----   | 9   |
| 3.7 - Métodos para detecção de adição de neutralizantes ao leite.-----  | 12  |
| 3.7.1- Métodos Qualitativos.-----   | 12  |
| 3.7.2- Método Quantitativo- Alcalinidade das cinzas do leite.-----  | 12  |
| 3.8- Outros ácidos orgânicos em leite.-----   | 13  |
| 3.9- Métodos de determinação da concentração de ácido láctico em leite.-----  | 15  |
| 3.10 - Determinação de ácidos orgânicos em alimentos.-----  | 17  |
| 3.11- Teor de ácido láctico em leite.-----  | 22  |
| 4 - MATERIAIS E MÉTODOS -----   | 22  |
| 4.1-Coleta do leite.-----   | 22  |
| 4.2 - Desenvolvimento da metodologia para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por HPLC-IE.----- | 25  |



|  |    |
|--|----|
| 4.3 - Fermentação do leite.-----   | 25 |
| 4.4 - Neutralização do leite.-----   | 26 |
| 4.5 – Preparo do filtrado para a determinação da concentração real de ácido lático por HPLC-IE.-----   | 26 |
| 4.6 - Condições cromatográficas.-----  | 28 |
| 4.7 – Preparo da curva analítica.-----   | 28 |
| 4.8 - Determinação do tempo de retenção do ácido lático.-----  | 29 |
| 4.9 – Determinação da recuperação do ácido lático pelo método de HPLC-IE.-----   | 29 |
| 4.10 - Separação do ácido cítrico pelo método HPLC-IE.-----  | 29 |
| 4.11 - Separação do ácido orótico pelo método HPLC-IE.-----  | 30 |
| 4.12 - Estudo da influencia do ácido orótico na quantificação de ácido cítrico pelo método HPLC-IE.-----   | 30 |
| 5-RESULTADOS E DISCUSÃO-----   | 31 |
| 5.1 - Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas do leite.-----   | 31 |
| 5.2 - Desenvolvimento da metodologia para determinação da concentração real de ácido lático em leite por HPLC-IE.-----   | 31 |
| 5.3 – Determinação da recuperação do ácido lático pelo método de HPLC-IE. -----  | 32 |
| 5.4 - Determinação do tempo de retenção do acido lático.-----  | 33 |
| 5.5 - Curva analítica de ácido lático em leite.-----   | 35 |
| 5.6 - Determinação da concentração real de ácido lático, em leite fermentado com acidez titulável variando de 0,15 a 0,20 % (m/v) expressa em ácido lático.----- | 36 |
| 5.7 - Correlação entre a acidez titulável e a concentração real de ácido lático determinada pelo método HPLC-IE.-----  | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 5.8 - Determinação da concentração real de ácido láctico em leite fermentado de 0,16 a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico e neutralizado para 0,15 % (m/v) com NaOH 10 mol/L..... | 44 |
| 5.9 - Separação do ácido cítrico e ácido orótico.....   | 49 |
| 6- CONCLUSÃO.....   | 52 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 53 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| 1 - Fermentação da lactose em ácido láctico.-----   | 5  |
| 2 - Formas químicas D e L do ácido láctico.-----  | 7  |
| 3 - Reação de desdobramento da lactose.-----  | 7  |
| 4 - Fermentação e neutralização do leite para determinação da concentração real de ácido láctico por HPLC-IE.-----  | 24 |
| 5 - Preparo da amostra e do filtrado para a determinação da concentração real de ácido láctico por HPLC-IE.-----  | 27 |
| 6 - Curva analítica de ácido láctico, em água, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 mmol/L, determinada por HPLC-IE.-----   | 33 |
| 7 - Cromatograma de padrões de ácidos orgânicos em água contendo os seguintes ácidos: (1) ácido orótico, (2) ácido cítrico, (3) ácido piruvico, (4) ácido láctico, (5) ácido úrico, (6) ácido acético, (7) ácido propiônico, (8) ácido butírico.----- | 34 |
| 8 - Sobreposição de cromatogramas: Amostra de leite sobre padrão de ácido láctico em água 5 mmol/L.-----  | 35 |
| 9 - Perfil cromatográfico das amostras analisadas para a construção da curva analítica de ácido láctico em leite.-----  | 35 |
| 10 - Curva analítica de ácido láctico em leite.-----  | 36 |
| 11 - Perfil cromatográfico ilustrando o aumento da concentração real de ácido láctico determinada por HPLC-IE durante fermentação do leite incubado a 36 °C.-----   | 37 |

|   |    |
|---|----|
| 12 - Perfil cromatográfico de amostras com acidez titulável de 0,15 a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico obtidos por HPLC-IE.-----  | 38 |
| 13 - Relação entre concentração de ácido láctico determinada pelo método de acidez titulável (—) e concentração de ácido láctico determinada por HPLC-IE (—).-----                                  | 39 |
| 14 - Regressão Linear da correlação entre a acidez titulável e a concentração de ácido láctico determinada pelo método HPLC-IE.-----  | 43 |
| 15 - Sobreposição dos cromatogramas por HPLC-IE obtidos de leite fermentados e leite fermentado neutralizados, com acidez titulável variando 0,15 % a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico. ----- | 46 |
| 16 - Cromatograma das amostras de ácido cítrico nas concentrações de 0,1 ; 0,2; 0,3; 0,4 g/L, preparadas em água, obtido por HPLC-IE.-----  | 49 |
| 17 - Cromatograma por HPLC-IE das amostras de ácido orótico em água deionizada nas concentrações de 0,1 ; 0,2; 0,3; 0,4 g/L.-----   | 50 |
| 18 - Cromatograma por HPLC-IE das amostras contendo concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/L de ácido cítrico adicionada de 0,01g/L de ácido orótico.-----   | 52 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| 1 - Concentração de ácidos orgânicos em leite-----   | 15 |
| 2 - Concentração de ácidos orgânicos em iogurte-----   | 17 |
| 3 - Ácidos em leite e em amostras comerciais de iogurte e queijo Arzúa-Ulloa.-----   | 21 |
| 4 - Estudo da influencia do ácido orótico na quantificação de ácido cítrico pelo método HPLC-IE.-----  | 30 |
| 5 - Qualidade físico-química e microbiológica dos leites -----   | 31 |
| 6 - Estudo da recuperação do ácido láctico pelo método de HPLC-IE.-----  | 32 |
| 7 - Acidez titulável antes e após a fermentação até atingir 0,20 % expresso em ácido láctico, e concentração real de ácido láctico determinada por HPLC-IE.----- | 41 |
| 8 - Resultado da acidez titulável e da concentração real de ácido láctico determinada pelo método de HPLC-IE-----  | 42 |
| 9 - Correlação entre a acidez titulável e a concentração real de ácido láctico determinada pelo método HPLC-IE em leites neutralizados.-----                     | 44 |
| 10 - Concentração de ácido láctico em leite fermentado e leite fermentado neutralizado determinado por HPLC-IE.-----   | 48 |
| 11 - Curva analítica de ácido cítrico em água desionizada.-----  | 50 |
| 12 - Curva analítica de ácido orótico em água deionizada.-----   | 51 |

## RESUMO

MILAGRES, Maria Patrícia, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Julho, 2008.

**Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação da Concentração Real de Ácido Lático em Leite por Cromatografia Líquida de Alto Eficiência– Exclusão de Íons.** Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Co-orientadores: Juraci Alves de oliveira e Antônio Fernandes de Carvalho.

De acordo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) a acidez titulável é o método oficial para determinar a qualidade do leite. Porém, este método não determina a concentração real de ácido lático, e sim a acidez titulável. A neutralização ilegal da acidez do leite, usando produtos como o NaOH pode mascarar a análise da acidez titulável, tornando “aceitável” leite de péssima qualidade. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de determinação da concentração real de ácido lático no leite, que não possa ser burlado pela neutralização do leite.

Foi então desenvolvido um método de análise laboratorial por cromatografia líquida de alta eficiência com exclusão de íons (HPLC-IE) para determinar a concentração real de ácido lático do leite, utilizando uma coluna Aminex HPX-87, fase móvel de ácido fosfórico 0,02 mol/L , pH 2,3, vazão de 0,5 mL por minuto, temperatura de 65 °C, e com detecção por UV no comprimento de onda de 210 nm. O ácido lático apresentou resolução completa em relação a todos os outros compostos presentes nos cromatogramas de amostras, eluindo no tempo de 14,2 minutos.

Leite cru coletado imediatamente após a ordenha, foi incubado a 36 °C até que acidez titulável de 0,16; 0,17; 0,18; 0,19 e 0,20 % (m/v), expresso em ácido lático, fossem alcançadas. Alcançada a acidez desejável, a amostra foi preparada e utilizada na determinação da concentração real de ácido lático por HPLC-IE.

Leites fermentados até acidez titulável de 0,16; 0,17; 0,18; 0,19; 0,20 % (m/v) expresso em ácido lático foram neutralizados usando NaOH 10 mol/L até acidez titulável de 0,15 % (m/v) expresso em ácido lático. Depois da neutralização, a amostra foi preparada e injetada para determinação da concentração real de ácido lático em leite por HPLC-IE. Após desenvolvimento do método de determinação da concentração real de ácido lático em leite por HPLC-IE, este foi testado para determinar citrato em leite.

Na determinação da concentração real de ácido lático em leite fermentado, pelo

método de HPLC-IE, foi observado o aumento significativo da concentração de ácido láctico à medida que a acidez titulável aumentava. A correlação da regressão linear entre a acidez expressa em porcentagem de ácido láctico determinada pelo método de acidez titulável e a concentração real de ácido láctico, determinada pelo método HPLC-IE foi de 0,9929 %. Para um leite com acidez titulável de 0,18 % de ácido láctico, limite máximo permitido pela Instrução Normativa 51/2002 (IN 51), correspondeu à concentração de 8 mmol/L de ácido láctico real. Dessa forma, esta concentração poderia ser, como sugestão, a concentração máxima real de ácido láctico no leite cru, no leite pasteurizado, no leite UHT, e no leite em pó após reconstituição.

A presença de neutralizante não impediu a determinação da concentração real do ácido láctico pelo método de HPLC-IE. Assim o uso de neutralizantes não mascara a qualidade do produto analisado pelo método desenvolvido neste trabalho.

## ABSTRACT

MILAGRES, Maria Patrícia, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2008.

**Analytical Method Development for Determination of the Real Concentration of Lactic Acid in Milk for "High-Performance Liquid Chromatography - Íons Exclusion.** Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. CoAdvisers: Juraci Alves de oliveira e Antônio Fernandes de Carvalho.

According to Brazilian Federal Legislation, titratable acidity has been used as official method to determine acidity in milk quality analysis. The illegal neutralization of milk acidity by addition of products as NaOH can to mask the result of the titratable acidity analysis. Consequently milk of poor quality can be acceptable. The aim of this work was the development of a method to determine the real concentration of lactic acid in milk that can't be swindled by milk neutralizers.

It was developed a laboratorial analysis method by High Performance Liquid Chromatography with ions exclusion – HPLC-IE – to determine the real concentration of lactic acid in milk.

The chromatographic analysis were performed using an Aminex HPX-87 column, mobile phase of phosphoric acid 0,02 mol/L, pH 2,3, flow 0,5 mL x min<sup>-1</sup>, at 65° C, detection with UV at 210 nm.

The acid lactic resolution was complete with relation to all the others components present in samples chromatograms. The retention time of the lactic acid was 14,2 minutes.

Raw milk taken immediately after milking was incubated at 36° C up to 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20% (w/v) titratable acidity, express in lactic acid. After reach acidity ones, the samples were prepared to determine the real concentration of lactic acid by HPLC.

Fermented milks up to 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20% (w/v) titratable acidity, was neutralized with NaOH 10 mol/L up to 0,15% (w/v) .

After neutralization, the samples were prepared and injected to determine of real concentration of lactic acid by HPLC. Add to this, the method was tested for determination of citrate in milk.

The analyses to determination of lactic acid by HPLC in fermented milk showed that there was significant increase of lactic acid concentration as increased as titratable



acidity.

The linear regression analyses to compare the acidity determined by titratable acidity and HPLC methods scored 0,9929% correlation. Titratable acidity of 0,18% lactic acid in milk, maximum limit allowed in Brazil, corresponded to 8 mM/L concentration of real lactic acid. Therefore these result suggest to 8 mM/L of lactic acid must be the maximum concentration of real lactic acid in raw, pasteurized, UHT and reconstituted milk.

The addition of acidity neutralizers do not prevented the determination of real concentration of lactic acid by HPLC method developed in this work. Therefore the neutralization does not mask the product quality analyzed in this method.

## 1- INTRODUÇÃO

Em 1996, foi implementado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento o Programa Nacional da Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), com o objetivo de elaborar, diagnosticar e formular estratégias para a melhoria da qualidade do leite produzido no Brasil. Fruto deste programa, em 2002 foi publicada a Instrução Normativa nº 51 (IN 51) que estabelece, entre as determinações, a obrigatoriedade de refrigeração do leite na propriedade rural e transporte do leite, a granel, até a indústria. Tanques comunitários e tanques de imersão também podem ser usados. Por outro lado, é permitido o transporte de leite em latões à temperatura ambiente, entregue até no máximo 2 horas após a ordenha desde que se atendam os padrões de qualidade fixados. O transporte de leite em latões é comum entre a propriedade rural e o tanque comunitário, porém isto não vem acontecendo conforme os parâmetros da legislação.

Apesar da IN 51 ter sido responsável pela evolução da qualidade do leite no Brasil, muitos problemas ainda podem ser observados. A demora da entrega do latão de leite no tanque comunitário e a refrigeração inadequada do leite na fazenda, são fatores que prejudicam a qualidade do leite, favorecendo o crescimento de bactérias que fermentam a lactose, causando a acidificação do leite. Para corrigir este problema acontece a adição de forma ilegal de neutralizantes ao leite, como o hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio.

O anion lactato é um indicador da qualidade do leite, uma vez que ele é oriundo da fermentação do leite por bactérias lácticas. Estas bactérias são, na maioria das vezes, mesofílicas, e não fermentam a lactose em temperaturas de refrigeração. Alto teor de ácido láctico no leite é um indicativo que este produto não foi refrigerado após a ordenha, permanecendo algum tempo à temperatura ambiente.

O método de determinação de acidez, segundo a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006, envolve a titulação do leite com NaOH 0,1 mol/L, usando como indicador a fenoftaleína. Apesar de a acidez ser expressa em grama de ácido láctico por 100 mL de leite, o método não determina somente a concentração de ácido láctico no leite, e sim a acidez titulável de todos os outros componentes do leite. A acidez do leite é advinda de vários outros compostos naturalmente presentes no leite como as caseínas, albuminas, gás carbônico, citrato e fosfatos. Além disto, a acidez titulável elevada do

leite pode ser mascarada pelo uso ilegal de neutralizantes de acidez, não sendo assim detectada no método de acidez do leite a má qualidade do produto.

A alcalinidade das cinzas é o método quantitativo oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para detectar presenças de neutralizantes, segundo a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Este método pode indicar a adição ilegal de substâncias alcalinas ao leite ácido para reduzir a sua acidez titulável até concentrações permitidas pela legislação. Entre as substâncias alcalinas usadas ilegalmente pode-se citar o hidróxido de sódio e o bicarbonato de sódio. O teste de alcalinidade das cinzas, só é aplicável ao leite cru e ao leite pasteurizado, e não pode servir de parâmetro para reprovar o leite UHT (Ultra-High Temperature), devido à permissão da adição de citrato de sódio ao leite UHT. Esta substância aumenta a concentração de substâncias alcalinas nas cinzas do leite.

Este trabalho visa avaliar um método mais sensível, mais preciso, e mais específico do que o método de alcalinidade das cinzas para determinar se um leite foi fermentado descontroladamente, desenvolvendo acidez titulável acima da tolerada pela IN 51/2002, independente deste ter sido neutralizado.

## **2-OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo:

- Desenvolver metodologia analítica para determinar se houve aumento da acidez titulável do leite acima da tolerada pela IN 51/2002, independente do uso de neutralizantes, por meio da análise laboratorial da concentração real de ácido láctico por cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão de íons (HPLC-IE), e detecção por UV a 210 nm.
- Determinar a concentração real de ácido láctico em leite cru de boa qualidade, e em leite cru fermentado naturalmente até atingir acidez titulável de 0,20 % (m/v), expresso em ácido láctico, seguido de sua neutralização com hidróxido de sódio até sua acidez titulável original.
- Investigar a correlação entre a acidez titulável do leite naturalmente fermentado e acidificado com a sua concentração real de ácido láctico, determinado por HPLC-IE.

### **3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 - Fermentação natural do leite.**

A qualidade bacteriológica do leite é um dos principais fatores responsáveis pela manutenção de suas características químicas e organolépticas em níveis adequados. A qualidade do leite cru está intimamente ligada ao grau de contaminação inicial, e ao tempo/ temperatura que o leite é armazenado (JAY, 1996). A IN 51/2002 (BRASIL, 2002) estabelece que o leite deve ter no máximo 0,18 % (m/v) de acidez titulável expresso como ácido láctico. Leite com acidez titulável acima de 0,18 % (m/v) é considerado impróprio para consumo humano. A neutralização ilegal da acidez do leite pode mascarar a análise da acidez titulável, tornando “aceitável” leite de péssima qualidade. A neutralização da acidez pode ser realizada usando hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, citrato de sódio, entre muitos outros possíveis produtos alcalinos.

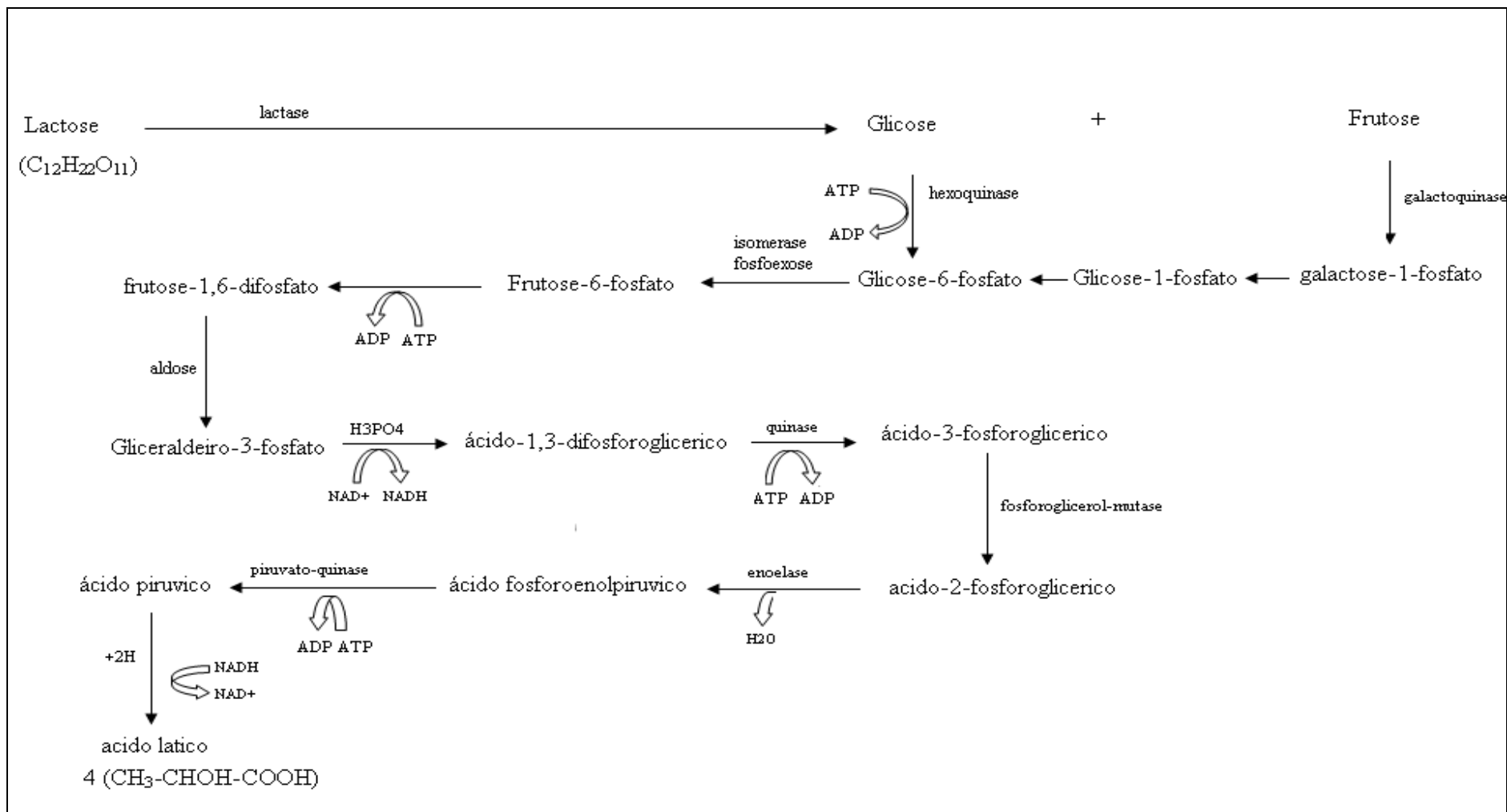
A produção de metabólicos acidificantes no leite ocorre, principalmente, devido ao aumento da população de bactérias mesófilas, que se reproduzem rapidamente quando o leite é mantido à temperatura ambiente. A refrigeração eficiente do leite imediatamente após a ordenha reduz bastante a multiplicação das bactérias mesófilas, favorecendo outro grupo de bactérias, as psicrotróficas, que causa outros problemas na qualidade do leite. Entretanto, ainda estão sendo comercializados leites que são transportados em latões, para tanques comunitários, que recebem leite de diversos produtores, fazendo com que o leite demore a ser resfriado, o que causa o aumento exagerado da microbiota mesófila. Como agravante, os latões não são bem lavados e higienizados, o que facilita muito a contaminação exagerada do leite logo após a ordenha. Além disso, o resfriamento no tanque de expansão comunitário é muito lento, o que agrava ainda mais essa situação.

Dessa forma, leite cru com adição de neutralizantes de acidez ainda existe no mercado, como foi amplamente divulgado na imprensa quando da operação Ouro Branco da Polícia Federal, em 23 de outubro de 2007. O método usado pela Inspeção Federal e pela Polícia Federal para comprovar a adição de neutralizantes ao leite (destacado pela imprensa como uso da soda cáustica) foi a determinação da alcalinidade das cinzas, descrita na IN 68/2006, que determina indiretamente a adição de metais alcalinos no leite. Esse é um método facilmente mascarado, além de ser alvo

de muitas críticas devido à sua impropriedade de aplicação em leite, em que pode ser adicionado legalmente o citrato e o fosfato de sódio, como é o caso de leite UHT e leite evaporado.

Os microrganismos capazes de fermentar a lactose dispõem de sistema enzimático necessário à sua metabolização, como a enzima lactase (beta-D-galactosidase), responsável pela quebra da lactose em glicose e galactose. A glicose e a galactose são oxidadas a ácido láctico pelos microrganismos homofermentativos pela via de Mayerhof-Embden. Os heterofermentativos, obrigatoriamente, as oxidam via “pentose fosfato”, enquanto aqueles de fermentação facultativa utilizam qualquer uma das duas vias (WALSTRA et al., 1999).

Vários outros mecanismos e produtos da fermentação da lactose podem ser enumerados, porém, considera-se o processo de fermentação da lactose em ácido láctico o mais importante. A lactose não é diretamente usada pelos microrganismos, sendo antes hidrolisada em glicose e galactose. Um esquema dos passos da fermentação da lactose em ácido láctico encontra-se na Figura 1. O sistema Meyerhof-Embden é responsável pela fermentação láctica do leite e ação dos fermentos. Este não é o único sistema de “quebra” da lactose, e não é necessariamente aplicável a toda fermentação da lactose. No entanto, aparece como principal característica da fermentação bacteriana da lactose, em microrganismos que apresentam a lactase (JENNESS & PATTON, 1959). A quantidade de ácido láctico produzida na fermentação pode ser responsável por 75 a 95% da acidez total. O restante são outros ácidos que também são produzidos na fermentação (JENNESS & PATTON, 1959).



Fonte: (JENNESS & PATTON, 1959)

**Figura 1** - Fermentação da lactose em ácido láctico

### **3.2 Acidez do leite.**

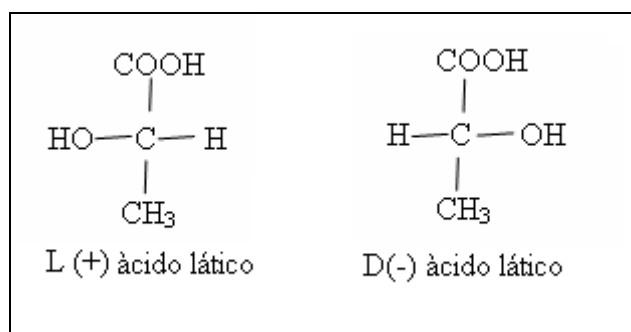
A acidez titulável do leite é resultante da contribuição de diversos compostos do leite, incluindo caseínas, albuminas, gás carbônico, citrato e fosfatos. O efeito de outros sais é praticamente desprezível devido à pequena concentração em que são encontrados no leite. A maior capacidade tamponante do leite verifica-se no pH 5,3. O pH do leite fresco varia de 6,5 a 6,7 (JENNES & PATTON, 1959).

O teste de acidez do leite implica na sua titulação com solução de hidróxido de sódio, usando a fenolftaleína neutra como indicador (solução alcoólica 1%). A fenolftaleína apresenta ponto de viragem (incolor - vermelho) no pH 8,3-8,4. A acidez do leite pode aumentar devido à fermentação da lactose, por bactérias, levando principalmente a formação de ácido láctico (ROBINSON, 2002).

### **3.3-Ácido láctico no leite.**

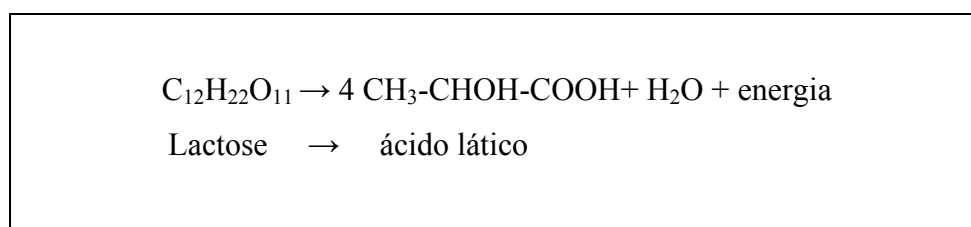
Leite é um produto natural heterogêneo, composto de espécies como as vitaminas, proteínas, lipídios e carboidrato (lactose). A degradação aeróbica da lactose produz ácido láctico (TORMO & IZCO, 2004). Concentração residual de ácido láctico e ácido pirúvico é normalmente encontrado no leite como resultado da síntese pela glândula mamária do animal (JENNESS & PATTON, 1959). A presença de ácido láctico em leite ácido foi descoberta pelo químico Carl Wilhelm Scheele, em 1782 e setenta e cinco anos mais tarde, Pasteur demonstrou que a formação do ácido láctico pela fermentação envolvia microrganismos (FOSTER et al., 1997).

O ácido láctico é um ácido fraco, e, por ser monoprótico, apresenta um único pKa no pH 3,86 (FOX, 2003). É um líquido incolor, viscoso, ligeiramente higroscópico, sem cheiro e de gosto azedo. Por causa de sua tendência em formar polímeros, o ácido láctico não pode ser encontrado em sua forma prontamente pura (JENNESS & PATTON, 1959). O ácido láctico contém um átomo de carbono assimétrico, isto é, um átomo de carbono que possui quatro grupos distintos ligados a ele. Assim o ácido ocorre nas duas formas (destrógiro) e L (levógiro) ou na mistura das formas D e L (racêmico) (Figura 2). Possui densidade de 1,206 g/mL. A forma racêmica funde a 18 °C e os D e L fundem a 28 °C



**Figura 2** - Formas químicas D e L do ácido láctico

O leite ao sair do úbere é ligeiramente ácido, em torno de 0,14 % a 0,16 % (m/v) expresso em ácido láctico, equivalente ao pH 6,6 a 6,7. Acidez acima de 0,18 % é proveniente da acidificação do leite, causada pelo desdobramento da lactose devido à ação de microrganismos presentes no leite. Por isso, pelas normas vigentes, o leite é considerado ácido se estiver acima de 0,18 %. Esse leite é impróprio para consumo e industrialização podendo ser rejeitado na plataforma do laticínio (FOX, 2003). A reação de formação de desdobramento completo da lactose em ácido láctico encontra-se na Figura 3.



**Figura 3** - Reação de desdobramento da lactose

A concentração de ácido láctico residual em amostras de leite fresco é de aproximadamente 1–2 mmol/L, mas pode aumentar para 10–20 mmol/L por causa da fermentação microbiana. Testes colorimétricos usados para detecção de ácido láctico incluem reação com resorsinol - ácido sulfúrico resultando em coloração amarela, e outro teste consiste em reação com cloreto férrico, resultando em coloração amarela (JENNESS & PATTON, 1959).



### 3.4 - Microbiologia do leite.

Normalmente a microbiota contaminante do leite é composta por bactérias. Os fungos e as leveduras são mais raros de serem encontrados. Dentre os contaminantes do leite estão as bactérias lácticas, os coliformes, os psicotróficos. As bactérias mesofílicas representam um grupo importante por incluir a maioria das bactérias do leite, tanto as deteriorantes como as patogênicas (JAY, 1996).

Os coliformes pertencem as Enterobacteriaceas e estão distribuídos no trato intestinal. Incluem neste grupo os gêneros *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, mas em geral outros gêneros e espécies estão envolvidos. Eles crescem rapidamente em leite, especialmente em temperatura acima de 20 °C e degradam proteínas e lactose (WALSTRA, 2002).

Os psicotróficos incluem os gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, e *Alcaligenes*. Psicotróficos apresentam temperatura ótima de crescimento de 20 a 30 °C, mas são capazes de crescer em baixas temperaturas (abaixo de 5 °C). Estes microrganismos produzem lipases e proteases que degradam proteínas e gorduras, causando flavor pútrido e rançoso. Ao contrário das bactérias, essas enzimas podem ser resistentes ao tratamento térmico e podem causar flavor desagradável e alteração nas propriedades físico-químicas do leite (WALSTRA, 2002).

Algumas bactérias, como *Microbacterium lacticum*, não formam esporos, mas suas células vegetativas sobrevivem à pasteurização e mesmo não apresentando atividade em temperaturas de refrigeração, são indesejáveis no leite (ROBINSON, 2002).

Podem estar presentes no leite bactérias formadoras de esporos, que sobrevivem a altos tratamentos térmicos, oriundas do solo, poeira, esterco, e ração animal (WALSTRA, 2002).

Microrganismos patogênicos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ssp, *Shigella* ssp, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Coxiella burnetti*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, podem ser encontrados no leite em condições higiênicas inadequadas de processamento (ROBINSON, 2002).

### **3.5 - Bactérias lácticas.**

As bactérias lácticas produzem ácido láctico a partir de carboidratos como a lactose. Incluem neste grupo os gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*, que crescem rapidamente em leite, especialmente em temperatura acima de 20 °C, assim a acidificação do leite ocorre rapidamente se este não for resfriado. As bactérias lácticas mesofílicas são inativadas pela pasteurização, mas isso não ocorre com as bactérias lácticas termofílicas tais como o *Streptococcus thermophilus*. Alguns streptococcus são patogênicos para humanos e animais (WALSTRA, 2002).

As bactérias do ácido láctico são Gram positivas, não formadoras de esporo, sem mobilidade, e algumas são catalase negativas. Os tipos homofermentativos produzem ácido láctico a partir de açúcares, e pequenas quantidades de outros produtos. Deste grupo podemos citar os *Streptococcus* e os *Lactococcus*. As bactérias lácticas heterofermentativas fermentam a glicose e formam CO<sub>2</sub>, álcool, ácido acético, e ainda ácido láctico. Deste grupo podemos citar os *Lactobacillus*, e os *Leuconostoc* (WEBB et al., 1974).

### **3.6 - A Instrução Normativa nº 51 e a Qualidade do Leite no Brasil.**

O Programa Nacional da Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), foi implementado em 1996, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, com o objetivo de elaborar, diagnosticar e formular estratégias para a melhoria da qualidade do leite produzido no Brasil. Fruto deste programa, em 2002 foi publicada a Instrução Normativa nº 51 (IN 51), com novas normas de produção leiteira (DIAZ, 2006), na qual se definiram os regulamentos técnicos para a produção e qualidade dos diversos tipos de leite, bem como as condições para sua refrigeração na propriedade rural e transporte do leite a granel até a indústria. A IN 51 determina que a qualidade do leite em cada propriedade rural seja acompanhada através de análises laboratoriais para que se identifiquem os problemas na origem (SILVA et al., 2006). Ainda, regula a conservação, a coleta, e o transporte de leite cru refrigerado. No caso de pequenos produtores, é prevista a possibilidade de tanque de resfriamento comunitário, para evitar a exclusão de produtores, por não contarem com recursos financeiros para adquirir equipamento de refrigeração (DIAZ, 2006). Porém, para efeito da inspeção, cada tanque

representa apenas um produtor e, portanto, uma análise. O responsável pelo tanque deverá aplicar o teste do alizarol a 72 °GL em cada latão recebido, barrando o leite com problema (FAEMG, 2005). Tanques de imersão também são permitidos, desde que consigam resfriar a 7 °C em três horas (FAEMG, 2005), o que na prática é muito difícil, não sendo este tanque apropriado para manter a qualidade do leite.

A coleta a granel do leite resfriado é efetuada por caminhões - tanques, que o encaminha ao laticínio para o processamento. Por outro lado, é permitido o transporte de leite em latões à temperatura ambiente, desde que, se atendam os padrões de qualidade fixados. Onde a planta processadora concorde em trabalhar com este tipo de matéria-prima, esta deverá ser entregue até no máximo 2 horas após a ordenha (DIAZ, 2006).

No sistema sem refrigeração, o latão de leite permanece, muitas vezes, diretamente exposto ao sol, provocando o aumento da temperatura, o que favorece a multiplicação acelerada de microrganismos e, até mesmo, a deterioração do produto. O equipamento necessário para o armazenamento e transporte adequado envolve quase sempre altas tecnologias, o que requer altos investimentos (MELLO, 2003). Entretanto, se a temperatura do leite for baixa, os processos químicos e o crescimento microbiano são retardados, atrasando a queda na qualidade do leite (HORST, 2006).

Apesar da IN 51 ter sido responsável pela evolução da qualidade do leite no Brasil, muitos problemas ainda podem ser observados. A demora da entrega do latão de leite no tanque comunitário e a refrigeração inadequada do leite na fazenda são fatores que prejudicam a qualidade do leite, favorecendo o crescimento de bactérias que fermentam a lactose, causando a acidificação do leite. Para contornar este problema, acontece o uso de neutralizantes como o hidróxido de sódio, citrato e bicarbonato ao leite.

BRITO et al. (2002), acompanhando a qualidade microbiológica do leite produzido por doze rebanhos leiteiros localizados em sete municípios da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, foi observado que as médias geométricas das contagens padrão de bactérias foram abaixo de  $6,5 \times 10^5$  UFC/mL em nove rebanhos e acima de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL em três rebanhos. E entre as 335 amostras dos 22 tanques comunitários estudados, apenas 69 (20%) apresentaram contagens abaixo de  $10^6$  UFC/mL.

Em trabalho realizado em cinco pequenas propriedades leiteiras, com produção média de 70 litros por dia, localizadas no distrito de Iguatemi, município de

Maringá, com objetivo de determinar a qualidade do leite fornecido por produtores rurais, SILVA et al (2006) constataram que a temperatura média de recebimento do leite na plataforma de um tanque comunitário era de 32,6 °C.

LAVOR et al (2006) realizaram um estudo com produtores de leite de Botucatu-SP e municípios vizinhos, cuja produção era entregue numa mesma indústria localizada na referida região. Para realização do experimento, as coletas foram divididas em 3 fases. Na Fase 1 foram analisadas 39 amostras de leite não refrigerado e entregue em latões no laticínio. Na fase 2, as 53 amostras analisadas foram coletadas diretamente do caminhão-tanque e eram originadas de propriedades que resfriavam o leite. Na fase 3, 50 amostras foram colhidas de tanques comunitários que recebem o leite de produtores. As contagens de mesófilos, expressas em logaritmo decimal foram de 8,696, 7,331 e 7,307 nas Fases 1, 2 e 3 respectivamente. Observou-se que o leite resfriado apresentou contagens significativamente menores desse grupo de microrganismos que as obtidas na Fase 1.

MARTINS et al (2006) com o objetivo de avaliar a qualidade do leite cru de tanques de refrigeração por expansão direta no Estado de Goiás, coletaram amostras de leite cru oriundas de 30 tanques de refrigeração por expansão, e verificaram que 9 estavam com Contagem Bacteriana Total (CBT) acima de  $10^6$  UFC/mL, 14 entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL e 7 abaixo de  $10^5$  UFC/mL. Dos tanques de expansão com CBT maior que  $10^6$  UFC/mL, 100% eram de uso coletivo e recebiam leite de variadas origens, incluindo de latões, ou seja, de propriedades que não possuíam refrigeração da produção pós-ordenha e que realizavam o transporte até o local do tanque de uso coletivo, também, sem a devida refrigeração.

A IN 51 estabeleceu que a contagem bacteriana máxima de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, de 2005 a 2008 nas regiões Sul, Sudeste Centro Oeste, e de 2007 até 2010 nas regiões norte e nordeste. A partir de julho de 2008 a contagem bacteriana máxima permitida nas regiões sul e sudeste será de  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL.

A qualidade do leite no Brasil é uma constante preocupação de órgãos e autoridades ligadas à área. O leite ainda apresenta problemas de qualidade, apesar das exigências da IN 51.

### **3.7 - Métodos para detecção de adição de neutralizantes ao leite.**

#### 3.7.1 - Métodos Qualitativos.

Segundo a Instrução Normativa nº 68 (IN 68), de 12 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a presença de alcalinizantes na amostra é revelada pela ação do ácido rosólico, usado como indicador. O ácido rosólico é um indicador de concentração hidrogeniônica, com ponto de viragem entre pH 7,0 a 8,0, indicando, portanto, qualquer alteração do pH do leite para faixa alcalina, quando o neutralizante é adicionado em excesso. O método consiste em colocar 5 mL de leite e adicionar 10 mL de álcool etílico neutralizado, agitar e adicionar 2 gotas de solução de ácido rosólico a 2 %. Deve-se, também, fazer um teste em branco com álcool etílico e solução de ácido rosólico a 2 % e comparar as cores. A coloração vermelho-carmim revela resultado positivo para presença de alcalinizantes em leite (BRASIL, 2006).

Outro método qualitativo usado para a detecção de neutralizantes em leite é o da fenolftaleína. Segundo a IN 68, os alcalinizantes são revelados pela ação da fenolftaleína após uma neutralização com hidróxido de sódio e reacidificação com ácido sulfúrico. O método consiste em transferir 11 mL da amostra para béquer de 150 mL, adicionar 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % e titular com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, até coloração rósea persistente. Reacidificar com 1 mL de solução de ácido sulfúrico 0,025 N, aquecer até ebulição, esfriar rapidamente em banho de gelo e adicionar 2 mL de solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %. A coloração rósea indica que ocorreu neutralização do leite com carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ou com bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (BRASIL, 2006).

#### 3.7.2 - Método Quantitativo- Alcalinidade das cinzas do leite.

A Alcalinidade das cinzas do leite é um método quantitativo para a detecção de neutralizantes em leite. Segundo a IN 68, a presença de substâncias alcalinas adicionadas ao leite e derivados faz aumentar a alcalinidade das cinzas, que é determinada por via indireta, fazendo-se reagir às cinzas com uma quantidade conhecida de solução ácida padronizada e titulando-se o excesso deste com uma solução alcalina de concentração conhecida.

O método consiste em transferir quantitativamente as cinzas, obtidas na metodologia de resíduo mineral fixo, para béquer de 400 mL, usando pequenas porções de água destilada até 75 mL. Adicionar aos poucos 50 mL de solução de ácido

clorídrico 0,1 mol/L, e se necessário triturar as cinzas com um bastão de vidro e transferir eventuais restos da amostra, juntamente com o ácido para um béquer de 400 mL. Deve-se lavar com água destilada o bastão e o cadinho, cobrir o béquer com um vidro de relógio e levar à ebulição moderada por 5 minutos, esfriar e lavar o vidro de relógio. Deve-se adicionar 30 mL de solução de cloreto de cálcio a 40 %, deixar em repouso por 10 minutos e adicionar 10 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % e titular o excesso de ácido clorídrico com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. A titulação deve ser bastante rápida até ser obtida turvação e coloração rósea persistente (BRASIL, 2006).

O teste de alcalinidade das cinzas só é aplicável ao leite cru e leite pasteurizado, e não pode servir de parâmetro para reprovar o leite UHT. O Ministério da Agricultura autoriza o uso da substância citrato de sódio no leite UHT. Esta substância aumenta o teor de substâncias alcalinas no teste

### **3.8 - Outros ácidos orgânicos em leite.**

Os ácidos orgânicos aparecem em produtos lácteos como resultado da hidrólise de gordura de leite (ácidos graxos como acético e butírico), metabolismo bioquímico normal do animal (cítrico, orótico e úrico) ou crescimento bacteriano (lático, acético, pirúvico, propiônico e fórmico). Também, eles são os principais produtos do catabolismo de carboidrato pelas bactérias lácticas. A habilidade das bactérias lácticas em produzirem ácidos e reduzir o pH é o principal fator da fermentação de leite (TORMO & IZCO, 2004).

A determinação quantitativa de ácidos orgânicos é importante para monitorar a atividade e o crescimento bacteriano e também por razões nutricionais, que contribuem para o sabor e aroma dos produtos derivados lácteos (MARTINS, 2006). O ácido cítrico está presente no leite na forma de citrato, na concentração de 1500 a 2000 mg/L e apresenta 3 pKa's, correspondendo aos pHs 3,08; 4,74; e 5,40. Este existe como íon citrato trivalente no leite natural (pH 6,6) contribuindo, portanto, muito pouco para o poder tamponante do leite (JENNESS e PATTON, 1959).

Ácido cítrico é sintetizado na glândula mamária a partir do ácido pirúvico, sendo muito significativo em leite e produtos lácteos, pois está complexado com magnésio e cálcio, o que contribui para estabilidade das proteínas do leite, evitando a coagulação, durante aquecimento ou refrigeração. Ele também é precursor de aroma e flavor de

produtos fermentados por culturas lácteas (JENNESS & PATTON, 1959). O ácido cítrico não é a primeira fonte de energia de bactérias, mas pode ser metabolizado rapidamente através de *Lactococcus lactis* subsp. *Laticis* biovar. *diacetylactis* ou *Leuconostoc spp.* em queijo Cheddar (TORMO & IZCO, 2004).

O método clássico para determinação do ácido cítrico em leite e produtos lácteos é baseado na oxidação por permanganato de potássio e ácido acetonodicarboxílico. Este ácido é tratado com bromo e forma o pentabromoacetona, o qual é mensurado gravimetricamente e, assim, a quantidade de ácido cítrico pode ser calculada (JENNESS & PATTON, 1959).

Outro ácido orgânico importante encontrado no leite é o ácido orótico. A quantidade de ácido orótico em leite depende da origem da vaca, dieta, e lactação. Ele é um produto intermediário da síntese de nucleotídeos, e é um fator de crescimento para culturas de iogurte, pois ocorre uma diminuição no conteúdo de ácido orótico durante a fabricação e armazenamento de iogurte (TORMO & IZCO, 2004). Existe em torno de 8 mg/100mL deste ácido no leite podendo variar entre espécies, individualidades do animal, e período de lactação. Estudos da concentração de ácido orótico em leite de vaca, cabras, ovelhas, éguas, porcas, ratos e homem revelam que a concentração logo após o parto atinge valores 4 a 5 vezes maior que em período final de lactação. A quantidade de ácido orótico é ligeiramente maior no verão que no inverno (WEEB et al., 1974).

Traços de ácido acético e propiônico são formados pela fermentação láctica (FOSTER et al 1957). Os teores de ácidos orgânicos encontrados por MARSILI et al (1981) em leite, encontram-se no Quadro 1.

**Quadro 1** - Concentração de ácidos orgânicos em leite.

| <b>Ácidos orgânicos</b> | <b>Concentração em leite (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b> |
|-------------------------|---|
| Orótico                 | $83,6 \pm 1,0$  |
| Cítrico                 | $940 \pm 40$  |
| Pirúvico                | $< 4$   |
| Lático                  | $< 60$  |
| Úrico                   | $21,8 \pm 0,2$  |
| Fórmico                 | $< 40$  |
| Acético                 | $< 100$   |
| Propiônico              | $< 120$   |
| Hipúrico                | $15,4 \pm 0,9$  |

Fonte: MARSILI et al (1981)

### **3.9 - Métodos de determinação da concentração de ácido láctico produtos lácteos.**

LAMPITT & BOGOD (1930) descreveram um método para a determinação de ácido láctico em leite, dependendo da oxidação do ácido láctico em uma solução límpida de acetaldeído por meio de reação com permanganato de potássio; o acetaldeído é destilado dentro de uma solução padrão de bisulfito de sódio. O excesso do bisulfito de sódio é tratado depois com iodeto de sódio 0,01 mol/L (LAMPITT & BOGOD, 1930 citado por DAVIS & MACDONALD, 1953)

HILLIG (1937) descreveu um método colorimétrico para determinar ácido láctico em leite, através de uma coloração amarela produzida pela reação entre cloreto férrico e ácido láctico (HILLIG, 1937 citado por DAVIS & MACDONALD, 1953). DAVISON (1949) descreveu um método rápido para determinar ácido láctico em leite e em produtos lácteos sem açúcares. O acetaldeído produzido pela oxidação com ácido sulfúrico na presença de sulfato de cobre permite o desenvolvimento de uma coloração roxa com *p*-hidroxidifenil (DAVISON, 1949 citado por DAVIS & MACDONALD, 1953).

Métodos para a determinação de ácido láctico em leite foram estudados também por LING (1951). Proteínas e citratos são precipitadas usando hidróxido de sódio e sulfato de zinco na presença de cloreto de bário, a coloração é então medida. LING (1951) encontrou concentração aparente de ácido láctico em leite fresco de 0,003%



(m/v), e este valor aumenta aprecialmente no decorrer do período de lactação (LING, 1951 citado por DAVIS & MACDONALD, 1953).

MARSILI et al (1981) desenvolveram uma técnica simples de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Exclusão de Íons (HPLC-IE) com vazão isocrático para a análise quantitativa de ácidos orgânicos em produtos lácteos. Uma coluna de poliestireno com divinilbenzeno sulfonada (Aminex HPX – 87) à 65 °C, 0,009N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel e detector UV 220 e 275 nm foram utilizados. Os ácidos orótico, cítrico, pirúvico, láctico, úrico, fórmico, acético, propiônico, e butírico, foram quantificados em leite, leite em pó, leiteiro, creme, ricota, iogurte, queijo Cheddar, e queijo azul pelo método.

BEVILACQUA & CALIFANO (1989) estudaram um método usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase Reversa (HPLC-RP) para a análise quantitativa de ácidos orgânicos em produtos lácteos. Uma coluna de fase reversa C18 a temperatura ambiente, usando como fase móvel tampão 0.5 % (p/v) ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em pH 2.24 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0.4 % (v/v) acetonitrila, detector UV 214 nm e vazão de 1.2 mL/min foi utilizado. Ácidos fórmico, acético, pirúvico, propiônico, úrico, orótico, cítrico, láctico e butírico foram quantificados em leite cru, iogurte, queijo Azul, Provolone, Port Salut e queijos de Quattrolo. Recuperações maiores que 85.3% foram observadas para todos os ácidos.

IZCO et al (2002) desenvolveram um método usando Eletroforese Capilar para a determinação de ácidos orgânicos (oxálico, cítrico, fórmico, succínico, orótico, úrico, pirúvico, acético, propiônico, láctico, e butírico) em produtos lácteos.

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação de ácidos orgânicos em produtos lácteos (ASHOOR & WELTY, 1984; BEVILACQUA & CALIFANO, 1989; BOUZAS et al., 1991), é capaz de fornecer perfis individuais dos compostos sem necessidade da derivatização (HARVEY et al., 1981). Este método evita problemas de extração e de limpeza total como nos métodos químicos e de cromatografia gasosa, com redução de tempo, problemas com descarte de resíduos químicos tóxicos, e perda do analíto na reação. O desenvolvimento de colunas cromatográficas baseadas na tecnologia de resinas de troca iônica reduz a necessidade de limpeza total da amostra, pois ela é menos susceptível a redução de eficiência da coluna devido à adsorção de co-extratos como, proteínas, peptídeos, lipídios, ácidos graxos (MULLIN & EMMONS, 1997).

### 3.10 - Determinação de ácidos orgânicos em alimentos.

Embora alguns métodos de Eletroforese Capilar tenham sido desenvolvidos para a análise de ácidos orgânicos em produtos lácteos, os ácidos orgânicos geralmente são analisados através de técnicas cromatográficas (TORMO & IZCO, 2004). Açúcares e ácidos orgânicos foram separados por BOUZAS (1991). Usando coluna Aminex HPX-87, e detector de ultravioleta e índice de refração, os açúcares (lactose, glicose, e galactose) e os ácidos (orótico, cítrico, pirúvico, láctico, úrico, fórmico, acético, propiônico, butírico) foram identificados pelos seus tempos de retenção. Este método é uma técnica simples para monitorar atividade de cultura starter e mudanças de atividade durante maturação de queijo.

BARRANTES et al (1996) empregaram uma metodologia de HPLC-IE, para detecção de ácidos orgânicos em iogurte produzidos com substituição da gordura do leite por gordura vegetal. Os resultados encontrados encontram-se no Quadro 2, sendo a base; a mistura para produção do iogurte antes da fermentação, fresco; o iogurte imediatamente após a produção, e estocado; o iogurte após uns idas de produção. A separação entre o ácido cítrico e o ácido orótico era alcançada usando eluição isocrática com  $H_3PO_4$  (0.0045 N, 65°C 0.7 mL/min) e uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87.

**Quadro 2** - Concentração de ácidos orgânicos em iogurte.

| Ácidos Orgânicos ( $\mu$ /g) | Iogurte |         |          |
|------------------------------|---------|---------|----------|
|                              | Base    | Fresco  | Estocado |
| <b>Orótico</b>               | 117,4   | 111,1   | 106,4    |
| <b>Cítrico</b>               | 1489,0  | 874,1   | 813,1    |
| <b>Pirúvico</b>              | 57,2    | 44,1    | 52,4     |
| <b>Láctico</b>               | 540,0   | 19596,0 | 18661,0  |
| <b>Úrico/ fórmico</b>        | 26,5    | 39,6    | 38,6     |
| <b>Acético</b>               | 0,0     | 126,4   | 19,8     |

Fonte: BARRANTES et al (1996)

Usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência, com a coluna cromatográfica Dionex Ion-Pac ICE-AS 6,9 x 259 mm MULLIN & EMMONS (1997)

não detectaram ácido láctico no leite, e o teor de citrato encontrado pelos autores foram de 1,58 mg/mL. No soro de leite o teor de ácido láctico encontrado foi de 0,24 a 0,48 mg/mL.

LUES et al (1998) comparam as técnicas de HPLC-IE e HPLC-RP para a detecção de ácidos orgânicos em queijos. O método de exclusão de íons apresentou melhores resultados para as concentrações dos compostos analisados, melhor resolução, menor tempo de corrida e maior facilidade. O método de fase reversa mostrou sucesso na separação de todos os ácidos orgânicos em uma única corrida cromatográfica, porém a resolução era baixa quando comparada ao método de exclusão de íons, a metodologia mais laboriosa, e o tempo de corrida mais longo.

FERREIRA et al (1998), em estudo para verificar a qualidade nutricional de fórmulas infantis, detectaram em leite de vaca 14 a 37 mg/100 g de ácido orótico, e 4 a 15 mg/100 g de ácido úrico. Para isto um detector de UV a 280 nm era usado. A separação cromatográfica foi alcançada em coluna cromatográfica Spherisorb NH<sub>2</sub>, 5 µm, 250 mm x 4.6 mm i.d, a fase móvel usada era acetonitrila/HCL 0,01 mol/L (84:16). As análises foram executadas usando vazão isocrático de 1,0 ml/min e a temperatura ambiente.

LEE et al (1999) fizeram uso de um método de HPLC-IE, usando uma coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H; 300 mm x 7,8 mm, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), detector UV em 220 nm, temperatura de 65 °C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0018 mol/L como fase móvel, com uma vazão de 0,7 ml/min, para a detecção de ácidos orgânicos em mingau de arroz. Posteriormente este método foi usado por KABEIR et al (2005) para a determinação de ácido láctico e acético em mingau de aveia fermentado por *Bifidobacterium longum* BB536.

Para estudar o efeito da encapsulação na atividade metabólica de probióticos em plantas de iogurte, pois a atividade metabólica de probióticos podem aumentar a quantidade de certos ácidos orgânicos no iogurte, ADHIKARI et al (2001) utilizaram uma técnica de HPLC-IE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Exclusão de íons), para separação e quantificação dos ácidos orgânicos. Uma separação isocrática foi realizada usando como fase móvel 0,02 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, um vazão de 0,6 mL/min, temperatura de coluna de 60 °C, e a detecção foi a 220 nm.

Um método de HPLC para a determinação dos principais ácidos orgânicos e açúcares em sucos de fruta foi utilizado por CHINNICI et al (2002). Nove ácidos (inclusive oxálico, cítrico, málico, galacturônico, ascórbico, succínico, e ácido

fumárico) e três açúcares (sacarose, glicose e frutose) foram separados por HPLC-IE usando uma coluna Aminex HPX 87H. O sistema de HPLC com vazão isocrático de 0,4 ml/min, detector de 210 nm, conectados em série com um índice de refração, coluna de troca iônica Aminex HPX 87H, e temperatura de 65 °C foram usados (CHINNICI et al., 2002). Para otimização do método, foram testados ácido fosfórico e sulfúrico na fase móvel, com concentrações variando de 0.1 a 0.001 mol/L. Também foram testados acetonitrila e metanol como modificadores orgânicos. Devido à estabilidade da linha base melhor, e menor ruído, ácido fosfórico foi escolhido e usado para todas as experiências sucessivas. Para ácidos orgânicos, a melhor separação foi obtida com 0.005 mol/L de ácido fosfórico como eluente (CHINNICI et al., 2002).

De acordo com IZCO et al (2002) a incidência de esporos em leite em pó desnatado é um problema, porque eles sobrevivem à pasteurização, evaporação, e secagem. Os esporos representam um risco em leite em pó desnatado porque eles são capazes de germinar e crescer neste, caso seja reidratado. Uma vez vegetativo, alguns esporos são capazes de hidrolisar lipídios, caseína, e fermentar a lactose, prejudicando a qualidade do leite em pó desnatado. A determinação quantitativa de ácidos orgânicos é importante para monitorar o crescimento e atividade bacteriana, por razões nutricionais, e porque ácidos orgânicos contribuem ao sabor e aroma de produtos lácteos. Para isto IZCO et al (2002) desenvolveram um método usando Eletroforese Capilar para a determinação de ácidos orgânicos em produtos lácteos (oxálico, cítrico, fórmico, succínico, orótico, úrico, pirúvico, acético, propiônico, láctico, e butírico). Leite em pó reconstituído e incubado a 37 °C para 24 h, e leite em pó reconstituído inoculado com esporos, foram analisados. O aumento de ácidos orgânicos como succínico, e especialmente acético, pirúvico e láctico, foi observado após incubação. O metabolismo do carboidrato presente no leite pela bactéria gera ácidos orgânicos que são detectados pela técnica. Alguns deles (pirúvico, acético, e láctico) foram considerados como um índice de crescimento bacteriano. Também, outros picos não identificados que apareceram no eletroferograma, podem ser aminoácidos libertados da proteólise das caseínas por atividade bacteriana segundo IZCO et al (2002).

Estudo realizado em vacas para avaliar mudanças do teor de L- lactato em leite em relação à mastite demonstraram que vacas com sintomas subclínicos com contagem de células somáticas (CCS) aumentada de  $4,5 \times 10^3$  para  $1 \times 10^7$  células/mL apresentaram teor de lactato 30 vezes maior que o controle (vaca sem sintomas de mastite), em torno de 3,3 mmol/L. Concentração de L-lactato excedeu 2.5 mmol/L na

presença de alguns tipos de infecção, o nível da resposta de lactato está relacionada ao impacto da infecção. Concentrações de L-lactato eram relativamente elevadas em amostras de colostro e declinava de 0,8 mmol/L para 0,14 mmol/L após 5 dias de lactação (DAVIS et al., 2004).

TORMO & IZCO (2004) relataram que a maioria dos métodos desenvolvidos de análise de ácidos orgânicos em produtos lácteos são métodos de HPLC-IE, usando ácido sulfúrico diluído como a fase móvel, temperaturas operacionais altas, aproximadamente 60 °C. TORMO & IZCO (2004) propuseram um método para detecção de ácidos orgânicos por HPLC-RP, com objetivo de solucionar problemas relatados por alguns autores no método de HPLC-IE, como trabalhar com altas temperaturas, preços elevados das colunas de troca iônica, e sobreposição de picos conforme relatada por LUES et al (1998). A separação era executada em uma coluna C18 (WATERS) 250 mm × 4.6 mm, 5 m. O pH de uma solução de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol/L era ajustado para pH 2.20 com ácido fosfórico. Essa fase móvel era usada em um gradiente com acetonitrila que iniciava com 1 % (v/v) e aumentava ao longo da corrida. O detector UV no comprimento de onda de 210 nm, e o vazão de 1,5 mL/min. De acordo com seus resultados, o ácido cítrico era o ácido orgânico presente em maior quantidade no leite cru. As quantidades de ácido cítrico encontradas eram ligeiramente mais baixas (6.5 mmol/L) que a faixa normal (7–11 mmol/L) para concentração total de ácido cítrico em leite relatada por LUES et al (1998). Ácido láctico foi o ácido orgânico mais abundantemente encontrado em iogurte (14509.8 mg/100 g matéria seca) e em queijo (14601.5 mg/100 g matéria seca). Este ácido é o produto final principal da fermentação do carboidrato (lactose no caso de leite) através de bactérias lácticas. O ácido acético é outro ácido orgânico importante descoberto em iogurte e queijo, provavelmente formado como produto da fermentação, de lactose e ácidos cítricos (TORMO & IZCO, 2004). Os resultados descritos por TORMO & IZCO (2004) encontram-se no Quadro 3.

**Quadro 3** - Ácidos em leite e em amostras comerciais de iogurte e queijo Arzúa-Ulloa.

| Ácidos<br>(mg/100g de matéria seca) | Leite cru     | Iogurte         | Queijo           |
|-------------------------------------|---------------|-----------------|------------------|
| Oxálico                             | -             | 73,0 ± 22,7     | 22,2 ± 1,4       |
| Fórmico                             | -             | -               | -                |
| Pirúvico                            | 6,4±0,6       | 52.5 ± 10,2     | 46,0 ± 4,6       |
| Lático                              | 145,2 ± 19,1  | 14509,8 ± 234,8 | 14601,5 ± 1731,2 |
| Acético                             | 86,0 ± 5,0    | 469,0 ± 122,0   | 1006,0 ± 172,0   |
| Orótico                             | 87,0 ± 2,0    | 76,1 ± 1,1      | 11,1 v 1,1       |
| Cítrico                             | 1233,0 ± 21,0 | 1938,1 ± 22,1   | 392,1 ± 51,1     |
| Succínico                           | -             | -               | 182,0 ± 51,1     |
| Úrico                               | 67,4 ± 0,7    | 67,1 ± 7,9      | 14,4 ± 1,1       |
| Propiônico                          | -             | -               | -                |
| Butírico                            | -             | -               | 226,0 ± 26,0     |

Fonte: TORMO & IZCO (2004)

Estudos por HPLC-RP foram realizados por MARTINS (2006) para identificar os produtos de fermentação formados pela inoculação de kefir e do Tibet em amostras de leite e em amostra comercial de iogurte. Pelos resultados obtidos oito ácidos orgânicos foram detectados e identificados na fermentação do leite pelos kefir e do Tibet e em amostra comercial de iogurte. Foram identificados os ácidos lático, oxálico, pirúvico, acético, úrico, cítrico, succínico e fórmico para amostra de leite fermentado pelo fungo kefir (MARTINS, 2006).

MARTINS (2006), com objetivo de confirmar o comprimento de onda de absorção dos ácidos orgânicos, usou a espectrofotometria na região do UV, para determinar o comprimento de onda de absorbância máxima. A grande maioria dos ácidos apresentou absorbância máxima em 210 nm, com exceção do ácido cítrico e úrico. Para estudar as características de quatro tipos de iogurte de leite de ovelha contendo 6.6 %, 3.8 %, 2.3 %, ou 0.9 % de gordura, KAMINARIDES et al (2007) utilizaram o método de HPLC-IE, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/L, vazão de 0,5 mL/min, e coluna de troca iônica, para detectar ácidos orgânicos em leite. O tempo de retenção do ácido lático foi em torno de 16, 93 minutos, e o tempo de retenção do ácido cítrico foi de 11,6 minutos.

### **3.11 - Teor de ácido láctico em leite.**

Existem algumas contradições entre autores nas concentrações de ácido láctico em leite. MARSILI et al (1981) usando método de HPLC-IE encontram quantidade menor que 0,6 mmol/L de ácido láctico em leite integral, já SECHAUD et al (1989) determinaram uma concentração de ácido láctico de 0.92 mmol/L em leite fresco semi-desnatado.

Usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência, com a coluna cromatográfica Dionex Ion-Pac ICE-AS 6,9 x 259 mm, MULLIN & EMMONS (1997) não detectaram ácido láctico no leite fresco.

Segundo GOMEZ-ALVAREZ et al (1999) a concentração de ácido láctico normal em amostras de leite fresco é de aproximadamente 1–2 mmol/L, mas pode aumentar para 10–20 mmol/L por causa da fermentação microbiana. O conteúdo de ácido láctico em alimentos é regulado pela legislação de cada país, apresentando diferentes valores.

A quantidade de ácido láctico em leite encontrada por TORMO & IZCO (2004) usando HPLC-RP foi de 1,45 mmol/L de ácido láctico em leite cru.

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1-Coleta do leite.**

O leite, usado neste experimento, foi proveniente da fazenda modelo do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, localizada em Pedro Leopoldo-MG, coletado no tanque de equilíbrio imediatamente após a ordenha, antes de ser refrigerado no tanque de expansão.

Numa amostra do leite cru, antes que se iniciasse a fermentação, foram realizadas análises para avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e para a determinação da concentração inicial real de ácido láctico no leite por HPLC-IE.

Os parâmetros físico-químicos, avaliados de acordo com a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, foram a acidez titulável, crioscopia, densidade, gordura. As análises

microbiológicas para a determinação da contagem de microrganismos totais foram realizadas conforme a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

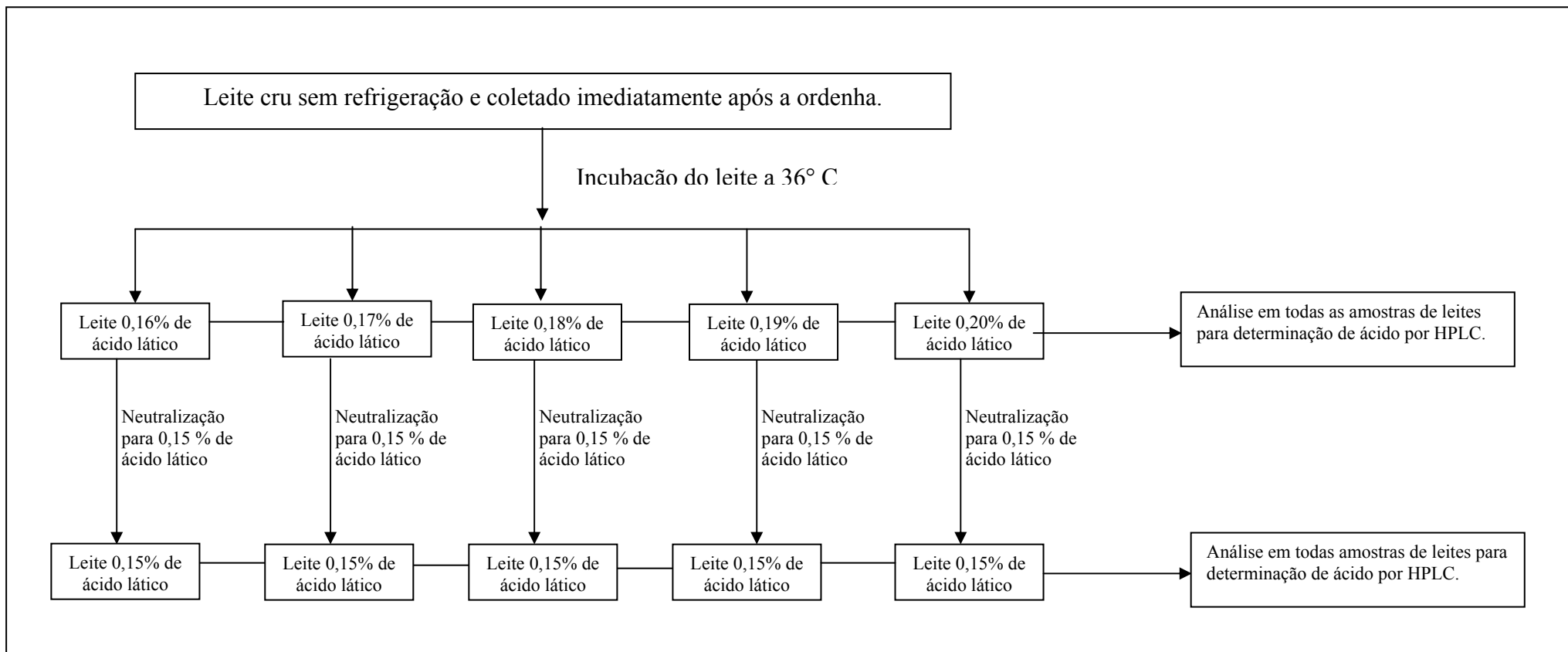
As análises foram realizadas no Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO-MG, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, situado em Pedro Leopoldo- MG.

As análises para determinação da concentração real de ácido láctico foram realizadas pelo método de HPLC-IE, desenvolvido neste trabalho, em leites fermentados naturalmente até acidez titulável de 0,16; 0,17; 0,18; 0,19 e 0,20 % (m/v) expressa em ácido láctico.

Leites fermentados naturalmente até acidez titulável de 0,16; 0,17; 0,18; 0,19 e 0,20 % (m/v) expressa em ácido láctico, e neutralizados usando hidróxido de sódio, até acidez titulável de 0,15 % (m/v), também foram analisados quanto à concentração real de ácido láctico pelo método HPLC-IE como ilustra a Figura 4.

O leite controle (leite que não sofreu fermentação) foi analisado imediatamente após a coleta e não foi neutralizado.





**Figura 4** - Fermentação e neutralização do leite para determinação da concentração real de ácido láctico por HPLC-IE.

#### **4.2 - Desenvolvimento da metodologia para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por HPLC-IE.**

Para o desenvolvimento da metodologia para a determinação de ácido láctico em leite, foram testados como fase móvel o ácido sulfúrico e o ácido fosfórico ambos em concentrações de 0,01; 0,02 e 0,03 mol/L. Todos os testes para determinar a fase móvel com vazão de 0,7 mL/min, à 65 °C.

Para otimizar a resolução do ácido láctico também avaliou-se a adição de acetonitrila na fase móvel nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 % (m/v) , com vazão de 0,7 mL/min, à 65 °C.

Definido o ácido, a concentração deste que seria usado na fase móvel, e a concentração de acetonitrila que seria adicionada na fase móvel, foram realizadas análises para determinar a vazão ideal, na faixa de 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL/min. Nestas análises foi usada temperatura de 65 °C.

Foi estudado também, o efeito da temperatura da coluna para otimização resolução da análise de ácido láctico (25, 40, 50, e 65 °C). Para teste de temperatura foi realizado com a fase móvel e fluxo que apresentou maior resolução na separação do ácido láctico.

Todos os testes para desenvolvimento de metodologia para a determinação da concentração real de ácido láctico foi realizado usando um cromatógrafo para HPLC modelo Agilent Technologies 1200 Series, com detector G1365D MWD Agilent Technologies 1200 Series, dotado de coluna de troca iônica, Aminex- HPX-87H (300 x 7,8mm), para análises de ácidos orgânicos (Bio-Rad), e termostato para controle de temperatura Agilent Technologies 1100 Series.

#### **4.3 - Fermentação do leite.**

Após a coleta, o leite foi imediatamente incubado a 36 °C e a acidez titulável foi determinada em intervalos de 30 minutos, através de titulação com NaOH 0,1 mol/L usando fenoftaleína como indicador, com objetivo de conseguir valores de acidez titulável de 0,16; 0,17; 0,18; 0,19 e 0,20 % (m/v) expressa em ácido láctico.

A titulação para a determinação de acidez titulável foi realizada com o auxílio de uma bureta automática METROHM, modelo Dosimat 715 de alta precisão.

Ao atingir a acidez desejada, a fermentação do leite foi imediatamente interrompida pela adição de 1g de ácido tricloroacético (TCA) P.A em 49 g de leite, sob agitação constante.

A mistura foi deixada em repouso durante 40 minutos para a precipitação das proteínas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 2100 x g durante 25 minutos a 5 °C, seguido de filtração do sobrenadante em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi armazenado a 10 °C.

#### **4.4 - Neutralização do leite.**

Quando o leite cru alcançou a acidez titulável de 0,16; 0,17; 0,18; 0,19 e 0,20 % (m/v) expressa em ácido láctico, utilizou-se hidróxido de sódio 10 mol/L para neutralização até acidez 0,15% (m/v), com o objetivo de simular a adulteração realizada em leite ácido para reduzir a acidez titulável.

Após a neutralização do leite foi adicionado 1 g de TCA a 49 g de leite, sob agitação constante.

A mistura foi deixada em repouso durante 40 minutos para a precipitação das proteínas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 2100 x g, durante 25 minutos a 5 °C, seguido de filtração do sobrenadante em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi armazenado a 10 °C.

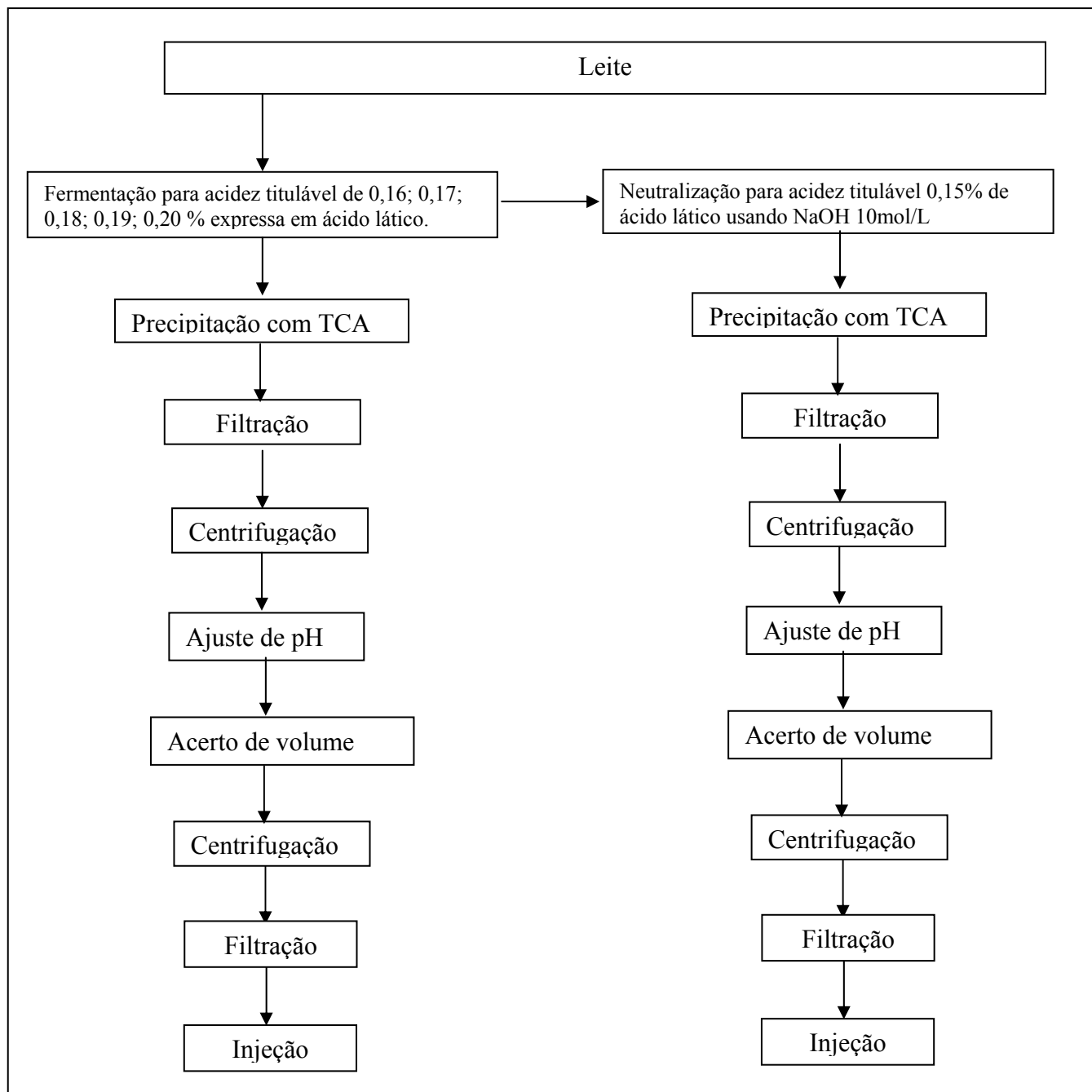
#### **4.5 - Preparo do filtrado para a determinação da concentração real de ácido láctico por HPLC-IE.**

Uma alíquota de 20 mL do filtrado obtido no preparo da amostra descritos nos itens 4.3 e 4.4, foi neutralizado com KOH 5 % (m/v) até pH 7,5, e o volume completado para 50 mL. Seguiu-se a centrifugação, a 2100 x g, durante 25 minutos para remoção do precipitado formado. O sobrenadante foi, então, filtrado em membrana millipore de 0,22 µm e imediatamente injetado em cromatógrafo para determinação da concentração real de ácido láctico.

A neutralização com KOH 5 % (m/v) tem o objetivo de complementar a extração de resíduos insolúveis da amostra. A quantidade de TCA usada é insuficiente para extração total dos componentes do leite, porém o aumento da quantidade de TCA

pode levar a saturação dos sítios de ligação da coluna de troca iônica, prejudicando assim a resolução do ácido láctico.

A Figura 5 mostra os procedimentos de preparo da amostra, e do filtrado para a determinação da concentração real de ácido láctico por HPLC-IE.



**Figura 5** - Preparo da amostra e do filtrado para a determinação da concentração real de ácido láctico por HPLC-IE.

#### **4.6 - Condições cromatográficas.**

Para determinação da concentração real de ácido láctico foi usado um cromatógrafo para HPLC modelo Agilent Technologies 1200 Series, com detector G1365D MWD Agilent Technologies 1200 Series, dotado de coluna de troca iônica, Aminex- HPX-87H (300 x 7,8mm), para análises de ácidos orgânicos (Bio-Rad), e termostato para controle de temperatura Agilent Technologies 1100 Series.

Foram injetados 20 µL de amostra para determinar a concentração real de ácido láctico em leite, sendo a fase móvel H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 mol/L com 10 % (v/v) de acetonitrila, pH 2,3, vazão de 0,5 mL/min, à 65 °C, com detecção por UV no comprimento de onda de 210 nm. A cromatografia transcorreu por 30 minutos e o tempo de retenção do ácido láctico foi em torno 14.4 minutos.

Os resultados foram integrados usando o sistema Agilent Chemstation for LC 3D System (Agilent Technology).

#### **4.7 - Preparo da curva analítica.**

Para calcular a concentração real de ácido láctico na amostra foi utilizada uma curva analítica a partir de uma solução de ácido láctico (REAGEM) a 85 % (v/v).

Foram adicionados volumes da solução de ácido láctico a 85 % em leite para obter os padrões nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 mmol/L de ácido láctico.

As amostras foram precipitadas adicionando 1g de ácido tricloroacético (TCA) P.A em 49 g de leite, sob agitação constante.

A mistura foi deixada em repouso durante 40 minutos para a precipitação das proteínas. Em seguida a amostra foi centrifugada a 2100 x g durante 25 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo, e o filtrado preparado conforme a metodologia descrita no item 4.5 e injetado nas condições cromatográficas descritas no item 4.6.

Para construção da curva analítica foi levando em consideração a presença de traços ácido láctico endógeno no branco (leite sem adição de ácido láctico). Foi diminuído de todas as concentrações usadas para a construção da curva, o valor da concentração de ácido láctico encontrado no branco.

A curva analítica foi feita com três repetições em triplicata.

#### **4.8 - Determinação do tempo de retenção do ácido láctico.**

Para determinação do tempo de retenção foi preparada uma solução padrão de ácido láctico em água deionizada e o resultado foi comparado com o padrão preparado em leite nas mesmas concentrações.

O padrão em solução aquosa foi filtrado em filtro milipore 0,22 µm (MILEX), e injetado conforme condições cromatográficas descritas no item 4.6.

A curva de calibração foi feita em três repetições em triplicata

#### **4.9 - Determinação da recuperação do ácido láctico pelo método de HPLC-IE.**

Para verificar a ocorrência de perda do ácido láctico no procedimento de extração adicionou-se 1 g de TCA em 49 g de leite, centrifugou-se a 2100 x g por 25 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi filtrado em filtro qualitativo, e no filtrado adicionou-se solução de ácido láctico 85% para obter as concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 mmol/L. Os procedimentos seguintes de preparo do filtrado e análise ocorreram conforme descrito no item 4.5 e 4.6.

Ácido láctico em concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 mmol/L foram adicionadas no leite antes do preparo da amostra. Seguiu-se a adição de 1 g de TCA em 49 g de leite, centrifugação a 2100 x g por 25 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi filtrado em filtro qualitativo, e o filtrado preparado e injetado conforme descrito no item 4.5 e 4.6.

A comparação entre os resultados da análise de ácido láctico obtidos antes e após a extração resultou no cálculo da porcentagem de recuperação.

#### **4.10 - Separação do ácido cítrico pelo método HPLC-IE.**

Este teste foi realizado com objetivo de verificar se a concentração de ácido cítrico poderia ser determinada simultaneamente usando o método desenvolvido para a determinação de ácido láctico.

Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT aprova a adição de citrato de sódio no leite, porém o uso em quantidades superiores as permitidas pode está ocorrendo. Para efetuar o controle as instituições fiscalizadoras demandam um método analítico laboratorial para determinação de citrato de sódio em leite UHT. O uso do método desenvolvido para determinação da concentração

de ácido láctico em leite para determinação de citrato de sódio em leite poderia trazer grandes benefícios.

Uma curva analítica de ácido cítrico P.A. (SIGMA 99%) foi construída a partir de uma solução padrão em água para detectar o tempo de retenção do ácido cítrico no método. As concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/L foram usados na curva analítica.

#### **4.11 - Separação do ácido orótico pelo método HPLC-IE.**

Este teste foi realizado com objetivo de verificar se a concentração de ácido orótico poderia ser determinada simultaneamente usando o método desenvolvido para a determinação de ácido láctico.

Uma curva analítica de ácido orótico P.A (SIGMA 98%) foi construída dissolvendo o padrão em água, para detectar o tempo de retenção do ácido orótico no método. As concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; e 0,4 g/L foram usados na curva analítica.

#### **4.12 - Estudo da influência do ácido orótico na quantificação de ácido cítrico pelo método HPLC-IE.**

Para verificar a influência do ácido orótico na quantificação de ácido cítrico pelo método HPLC-IE, uma curva analítica de ácido cítrico foi construída dissolvendo os padrões em água nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/L, adicionando-se em cada padrão 0,01 g/L de ácido orótico (Quadro 4).

**Quadro 4** - Estudo da influencia do ácido orótico na quantificação de ácido cítrico pelo método HPLC-IE.

| Ácido cítrico (g/L) | Ácido orótico (g/L) | Solução injetada (ácido orótico + ácido cítrico)<br>(g/L) |
|---------------------|---------------------|---|
| 0,1                 | 0,01                | 0,1 + 0,01  |
| 0,2                 | 0,01                | 0,2 + 0,01  |
| 0,3                 | 0,01                | 0,3 + 0,01  |
| 0,4                 | 0,01                | 0,4 + 0,01  |

Os resultados encontrados foram comparados com os resultados da análise de soluções padrões de citrato, sem a presença de ácido orótico.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas do leite.

As três amostras de leites coletados em dias diferentes, foram analisados quanto à sua qualidade físico-química e microbiológica e os resultados encontram-se no Quadro 5.

Todos os resultados estavam dentro dos padrões fixados pelo IN 51/2002, indicando que o leite usado neste experimento foi ordenhado em boas condições higiênicas.

**Quadro 5** - Qualidade físico-química e microbiológica dos leites.

| <b>Análises Realizadas</b>                                      | <b>1° coleta*</b>           | <b>2° coleta*</b>           | <b>3° coleta*</b>           |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Matéria gorda (g/100g)  | 3,6 ± 0,1                   | 3,4 ± 0,1                   | 3,8 ± 0,2                   |
| Densidade Relativa 15°C (g/mL)                                  | 1,030 ± 0,002               | 1,028 ± 0,001               | 1,032 ± 0,005               |
| Acidez titulável, expressa em g de ácido lático/100 mL de leite | 0,15 ± 0,01                 | 0,15 ± 0,01                 | 0,15 ± 0,01                 |
| Índice Crioscópico °H   | -0,530°H ± 0,003            | -0,530°H ± 0,003            | -0,530°H ± 0,003            |
| Contagem Padrão em Placas (CPP), (UFC/mL)                       | 4,5 X 10 <sup>4</sup> ± 0,5 | 3,8 X 10 <sup>4</sup> ± 0,5 | 5,2 X 10 <sup>4</sup> ± 0,5 |

\* Média ± Desvio Padrão

### 5.2 - Desenvolvimento da metodologia para determinação da concentração real de ácido lático em leite por HPLC-IE.

O ácido fosfórico 0,02 mol/L apresentou melhor resolução para o ácido lático, e maior estabilidade da linha de base que o ácido sulfúrico.



Apesar dos bons resultados conseguidos com o uso de ácido fosfórico 0,02 mol/L, a separação do ácido láctico ainda não foi possível com boa resolução.

O melhor resultado foi obtido utilizando-se a fase móvel adicionada de 10% de acetonitrila a 65 °C com vazão de 0,5 mL/min á 65 °C.

CHINNICI et al (2002) estudaram o ácido fosfórico e sulfúrico como fase móvel, com concentrações variando de 0,002 a 0,2 mol/L, também foram testados acetonitrila e metanol como modificadores orgânicos. Devido à estabilidade de linha base, melhor e mais baixo ruído, os autores escolheram o ácido fosfórico como melhor fase móvel, e a acetonitrila com melhor modificador orgânico para determinação de ácidos orgânicos em alimentos.

### 5.3 - Determinação da recuperação do ácido láctico pelo método de HPLC-IE.

No procedimento analítico é comum a perda de parte do analito durante as varias etapas de preparo e análise da amostra. No método de análise de ácido láctico por HPLC-IE foi feita a comparação entre os resultados da concentração de ácido láctico encontrados antes e após a extração, e a porcentagem de recuperação foi calculada para cada concentração (Quadro 6). A recuperação de mais de 99% do analito mostrou que não houve perda significativa comprovando a eficiência da metodologia empregada.

**Quadro 6** - Estudo da recuperação do ácido láctico pelo método de HPLC-IE.

| Concentração de ácido láctico                           | Concentração real de ácido láctico determinada por HPLC-IE              | Concentração real de ácido láctico determinada por HPLC-IE            |                   |
|---|---|---|-------------------|
| Adicionada antes e depois da primeira extração (mmol/L) | Ácido láctico foi adicionado antes da primeira centrifugação (mmol/L) * | Ácido láctico foi adicionado após a primeira centrifugação (mmol/L) * | % de Recuperação* |
| 5   | 5,123 ± 0,125   | 5,003 ± 0,086   | 99,8              |
| 10  | 9,983 ± 0,096   | 9,932 ± 0,102   | 99,9              |
| 15  | 15,023 ± 0,095  | 14,963 ± 0,096  | 99,9              |
| 20  | 20,156 ± 0,105  | 20,052 ± 0,112  | 99,8              |
| 25  | 25,058 ± 0,098  | 24,956 ± 0,108  | 99,8              |

\* Média ± Desvio Padrão

#### 5.4 - Determinação do tempo de retenção do ácido láctico.

O tempo de retenção do ácido láctico no método desenvolvido foi determinado usando a curva analítica de ácido láctico em água como pode ser observado no cromatograma da Figura 6.



**Figura 6** - Curva analítica de ácido láctico, em água, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 mmol/L, determinada por HPLC-IE.

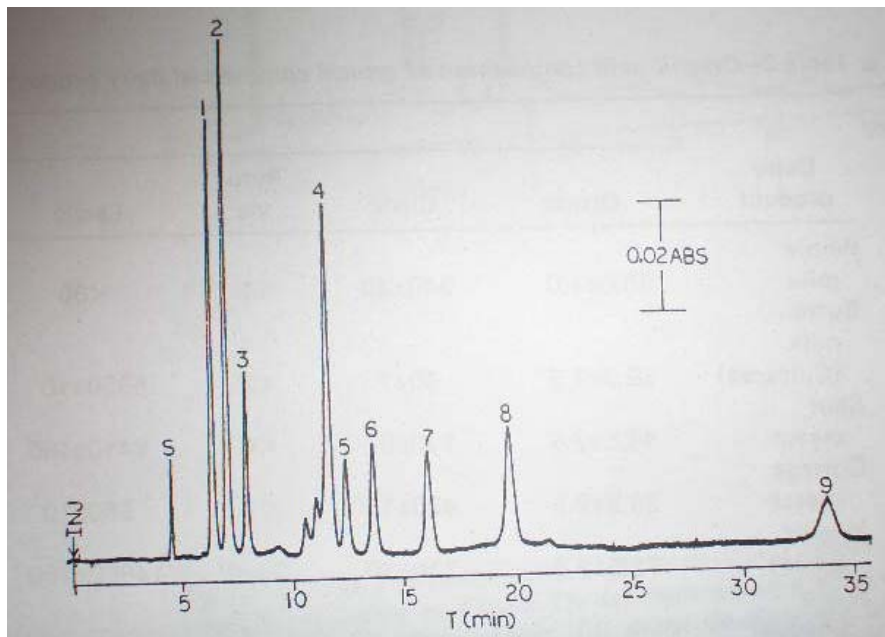
O tempo médio de retenção do ácido láctico foi de 14,4 minutos. Os demais picos foram considerados interferentes do padrão de ácido láctico, pois suas áreas cromatográficas aumentaram proporcionalmente ao aumento do padrão de ácido láctico.

A curva analítica de ácido láctico em água apresentou coeficiente de regressão de 0,993.

Segundo JENNESS & PATTON (1959) por causa de sua tendência em formar polímeros, o ácido láctico não pode ser encontrado em sua forma totalmente pura, o que pode explicar os picos interferentes.

MARSILI et al. (1981) desenvolvendo um método de determinação de ácidos orgânicos em produtos lácteos por cromatografia líquida, observaram que ao injetar os padrões de ácidos orgânicos dissolvidos em água, o cromatograma também apresentava outros picos que não eram de interesse (Figura 7). O pico de número 4 na Figura 7

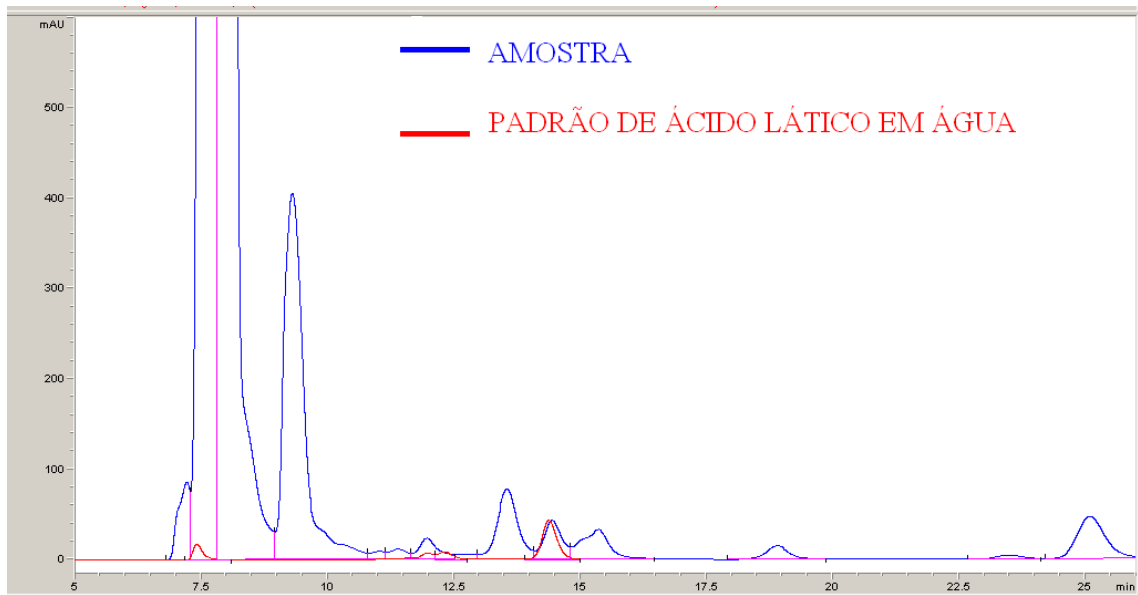
corresponde ao pico do ácido láctico e neste pode-se observar a presença de dois picos interferentes.



Fonte: MARSILI et al. (1981).

**Figura 7** - Cromatograma de padrões de ácidos orgânicos em água contendo os seguintes ácidos: (1) ácido orótico, (2) ácido cítrico, (3) ácido piruvico, (4) ácido láctico, (5) ácido úrico, (6) ácido acético, (7) ácido propiónico, (8) ácido butírico.

Ao injetar uma amostra de leite, verificou-se que o cromatograma apresentou pico de ácido láctico coincidente com aquele obtido pela aplicação do padrão de ácido láctico preparado em água (Figura 8).

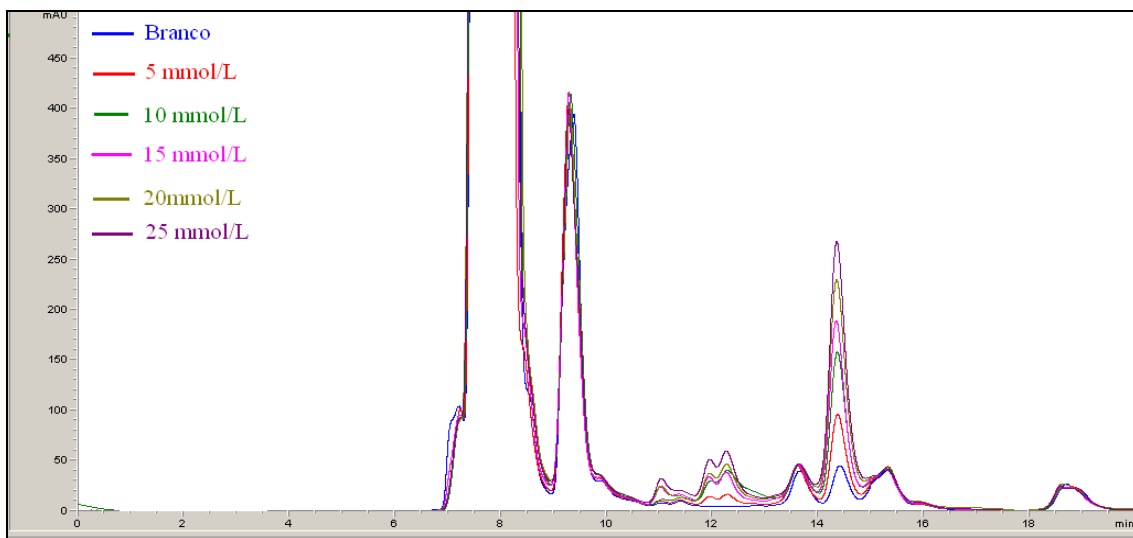


**Figura 8** - Sobreposição de cromatogramas: Amostra de leite sobre padrão de ácido lático em água 5 mmol/L.

### 5.5 - Curva analítica de ácido lático em leite.

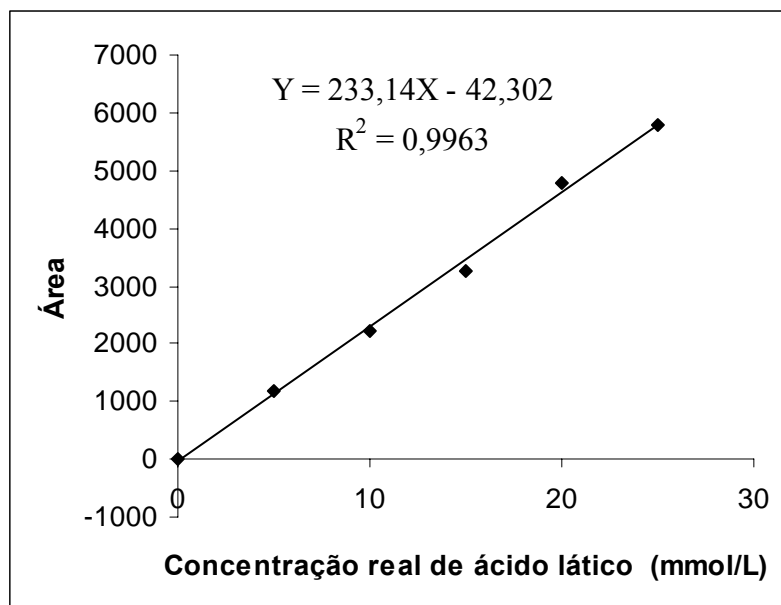
A Figura 9 mostra os cromatogramas de curva analítica de ácido lático em leite.

Observa-se que o pico no tempo de retenção 14,4 minutos aumenta a sua área cromatográfica proporcionalmente ao aumento do padrão de ácido lático, nas concentrações variando de 0 a 25 mmol/L.



**Figura 9** - Perfil cromatográfico das amostras analisadas para a construção da curva analítica de ácido lático em leite.

Os resultados obtidos demonstram a eficiência na análise de ácido láctico com resposta linear e coeficiente de regressão de 0,9963 para concentrações de ácido láctico variando de 0 a 25 mmol/L (Figura 10). A equação da regressão foi feita subtraindo-se os valores da concentração de ácido láctico encontrado no controle (leite sem fermentação).



**Figura 10** - Curva analítica de ácido láctico em leite.

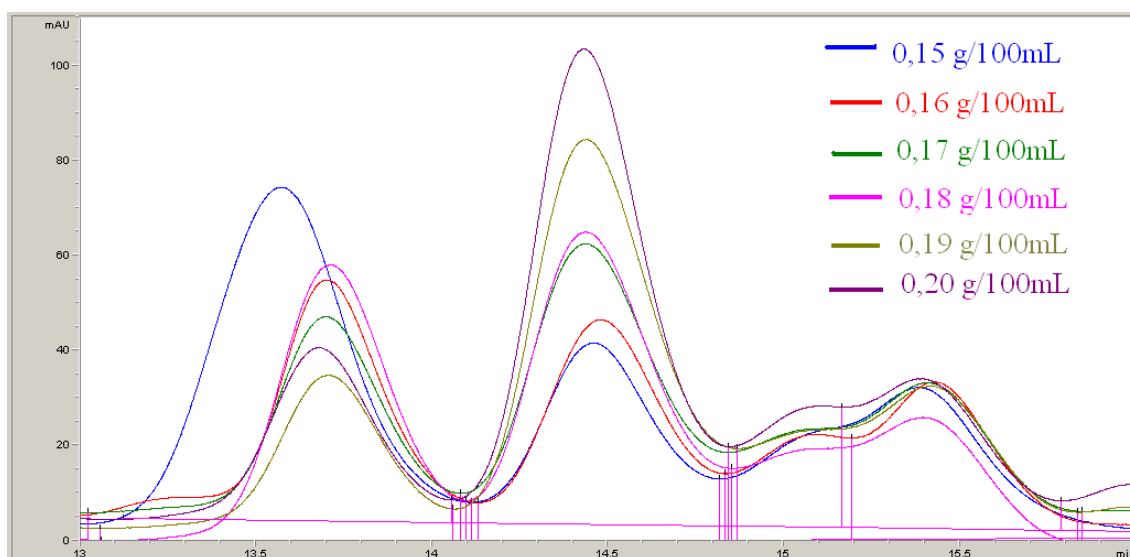
#### **5.6 - Determinação da concentração real de ácido láctico, em leite fermentado com acidez titulável variando de 0,15 a 0,20 % (m/v) expressa em ácido láctico.**

O ácido láctico é um indicador da qualidade do leite, uma vez que ele é oriundo da fermentação do leite por bactérias lácticas. Estas bactérias são na maioria das vezes mesofílicas, e não fermentam a lactose em temperaturas de refrigeração. Alto teor de ácido láctico no leite é um indicativo que este produto não foi refrigerado após a ordenha, e permaneceu à temperatura ambiente por tempo superior ao prazo estabelecido pela IN 51/2002.

Na determinação da concentração real de ácido láctico em leite fermentado, foi observado o aumento significativo da concentração de ácido láctico proporcionalmente ao aumento da acidez titulável do leite.

Segundo ROBINSON (2002) a acidez titulável do leite aumenta em razão da fermentação da lactose, por bactérias, levando principalmente a formação de ácido láctico.

A Figura 11 mostra o aumento da área cromatográfica do pico do ácido láctico proporcionalmente ao aumento da acidez titulável, no intervalo de 13 a 16 minutos.



**Figura 11** - Perfil cromatográfico ilustrando o aumento da concentração real de ácido láctico determinada por HPLC-IE durante fermentação do leite incubado a 36 °C.

Os valores de acidez titulável apresentados variando de 0,15 a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico (Figura 11), correspondem à acidez obtida pelo método oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. A acidez titulável em leite é medida em g de ácido láctico por 100 mL de leite, porém não representa somente o ácido láctico. A acidez titulável original do leite é advinda de vários outros compostos naturalmente presentes no leite, como as caseínas, albuminas, gás carbônico, citrato e fosfatos. Desta forma, o método de acidez titulável não pode ser usado para a determinação da concentração real de ácido láctico em leite. Além disso, se houver a adição de agentes alcalinos ao leite, a sua acidez titulável pode ficar na faixa considerada normal, mas, na verdade, o leite ser de qualidade ruim, por ter ocorrido fermentação descontrolada com conseqüente produção de ácido láctico.

Alto teor de ácido láctico no leite pode ser indicativo de elevada contaminação bacteriana e/ou tempo e temperatura inadequado de refrigeração, que leva a fermentação bacteriana da lactose, tendo como produto principal ácido láctico. Por isto, o conhecimento da concentração real de ácido láctico em leite é muito importante.

O método de HPLC-IE mostrou-se um método apropriado para medir a qualidade do leite, pois determinou a concentração real de ácido láctico, que é um

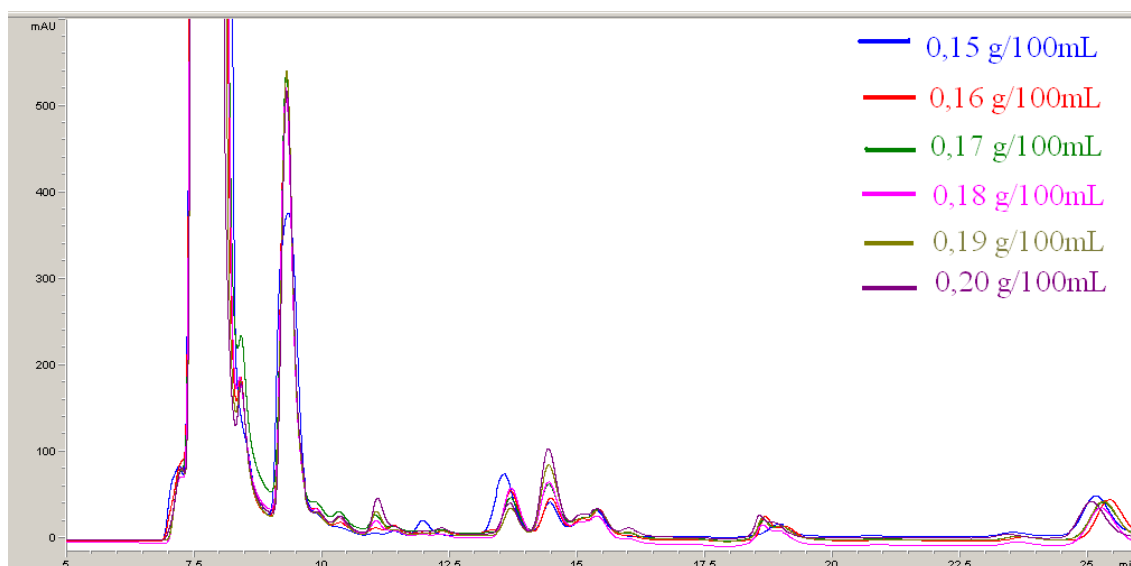
indicativo da qualidade microbiológica do leite. Portanto, é mais indicado que a determinação da acidez total pelo método oficial. O método de HPLC-IE possibilitou determinar a concentração real de ácido láctico em vários pontos de fermentação do leite.

Além do aumento da área cromatográfica do pico do ácido láctico, outros picos também modificaram suas áreas, alguns aumentaram proporcionalmente a fermentação do leite, outros diminuíram.

A fermentação do leite pode decompor outros produtos que não a lactose, como o citrato (TORMO & IZCO, 2004), e o ácido orótico (JENNESS & PATTON, 1959). O crescimento bacteriano pode gerar como produto de decomposição outros ácidos orgânicos como o acético, o pirúvico, o fórmico e o butírico. Porém, o ácido láctico é o principal composto formado, e a lactose é o principal composto metabolizado.

A Figura 12 mostra os cromatogramas completos da fermentação do leite. Observou-se o aumento das áreas cromatográficas de alguns outros picos, e diminuição da área de outros, indicando que durante a fermentação alguns compostos além da lactose são consumidos, e alguns compostos além do ácido láctico são formados.

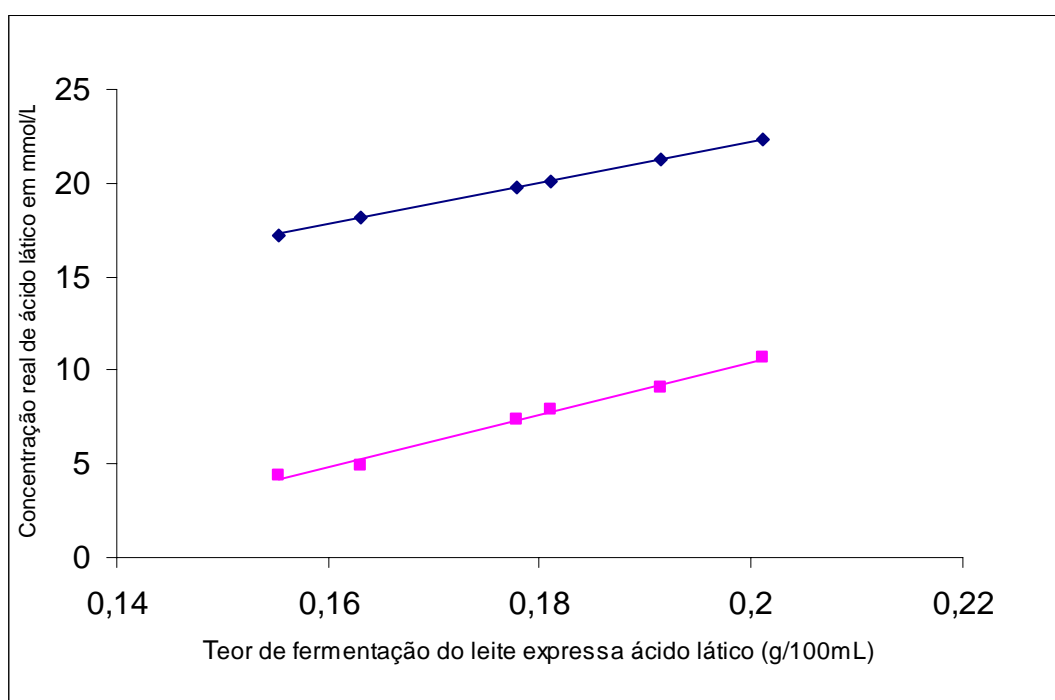
Em razão do desconhecimento dos compostos correspondente aos demais picos, não foi possível afirmar neste trabalho quais compostos foram consumidos ou produzidos pela fermentação láctea.



**Figura 12** - Perfil cromatográfico de amostras com acidez titulável de 0,15 a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico obtidos por HPLC-IE.

A Figura 13 mostra a relação existente entre o aumento da acidez titulável do leite durante a fermentação, e a concentração real de ácido lático determinada por HPLC-IE.

Pode-se observa na Figura 13 que a acidez titulável não determina somente a concentração de ácido lático, e sim todos os compostos tituláveis do leite. Porém, o maior responsável pelo aumento da acidez titulável durante a fermentação do leite é o ácido lático.



**Figura 13** - Relação entre concentração de ácido lático determinada pelo método de acidez titulável (—) e concentração de ácido lático determinada por HPLC-IE (—).

O Quadro 7 mostra a concentração real de ácido lático nas amostras calculada a partir de uma curva analítica em cada ponto da fermentação.

A concentração real de ácido lático em leite fresco encontrado pelo método de HPLC-IE é aproximadamente 4,4 mmol/L (Quadro 7). Sabe-se que a concentração varia de acordo com a qualidade do leite, raça do animal, alimentação, presença de mastite, podendo também variar de uma região para outra. Além disso, ainda existem variáveis operacionais dos diferentes métodos usados pelos autores para determinar a concentração real de ácido lático.



SECHAUD et al (1989) determinaram que a concentração real de ácido láctico em leite fresco semi-desnatado é 0.92 mmol/L.

Usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência, com a coluna cromatográfica Dionex Ion-Pac ICE-AS 6,9 x 259 mm MULLIN & EMMONS (1997) não detectaram ácido láctico no leite fresco. No entanto a quantidade de ácido láctico em leite cru encontrada por TORMO & IZCO (2004) usando HPLC-RP foi de 1,45 mmol/L de ácido láctico em leite cru.

**Quadro 7** - Acidez titulável antes e após a fermentação até atingir 0,20 % expresso em ácido láctico, e concentração real de ácido láctico determinada por HPLC-IE.

| Acidez titulável<br>(g/100 mL) | Concentração real de ácido |   |                                  |
|--------------------------------|----------------------------|---|----------------------------------|
|                                | Repetições                 | lático em mmol/L<br>(média das triplicatas) | Desvio Padrão das<br>triplicatas |
| branco (0,154)                 | 1                          | 4,322                                       | 0,100                            |
| branco (0,155)                 | 2                          | 4,381                                       | 0,008                            |
| branco (0,156)                 | 3                          | 4,465                                       | 0,104                            |
| 0,164                          | 1                          | 4,797                                       | 0,320                            |
| 0,163                          | 2                          | 4,883                                       | 0,233                            |
| 0,161                          | 3                          | 5,152                                       | 0,056                            |
| 0,179                          | 1                          | 7,255                                       | 0,100                            |
| 0,177                          | 2                          | 7,573                                       | 0,047                            |
| 0,176                          | 3                          | 7,434                                       | 0,040                            |
| 0,182                          | 1                          | 7,867                                       | 0,240                            |
| 0,180                          | 2                          | 7,992                                       | 0,032                            |
| 0,180                          | 3                          | 7,861                                       | 0,029                            |
| 0,190                          | 1                          | 8,943                                       | 0,022                            |
| 0,191                          | 2                          | 9,142                                       | 0,184                            |
| 0,193                          | 3                          | 9,211                                       | 0,071                            |
| 0,200                          | 1                          | 10,613                                      | 0,047                            |
| 0,201                          | 2                          | 10,782                                      | 0,036                            |
| 0,201                          | 3                          | 10,772                                      | 0,048                            |

### 5.7 - Correlação entre a acidez titulável e a concentração real de ácido láctico determinada pelo método HPLC-IE.

A concentração real de ácido láctico do leite cru determinada pelo método HPLC-IE apresentou correlação linear com o aumento da sua acidez titulável, durante a fermentação do leite mantido à temperatura de 36°C, em acidez titulável variando de 0,15 a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico (Quadro 8).

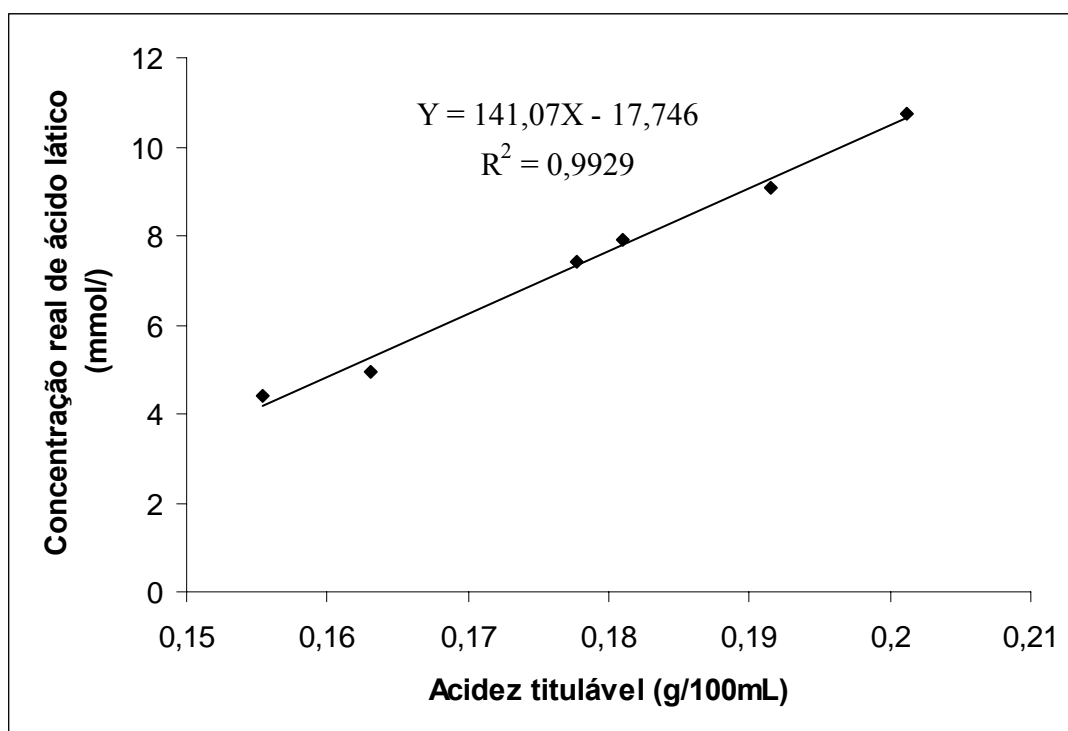
**Quadro 8** - Resultado da acidez titulável e da concentração real de ácido láctico determinada pelo método de HPLC-IE.

| Tempo médio de fermentação a 36 °C | Método de Acidez Titulável                   | Método HPLC-IE                          |
|------------------------------------|--|---|
|                                    | Concentração de ácido láctico em (g/100mL) * | Concentração de ácido láctico (mmol/L)* |
| 0 horas                            | 0,155 ± 0,001                                | 4,386 ± 0,060                           |
| 4 horas                            | 0,163 ± 0,001                                | 4,940 ± 0,184                           |
| 7 horas                            | 0,177 ± 0,001                                | 7,418 ± 0,157                           |
| 8 horas                            | 0,181 ± 0,001                                | 7,904 ± 0,076                           |
| 8,5 horas                          | 0,191 ± 0,001                                | 9,096 ± 0,689                           |
| 9 horas                            | 0,201 ± 0,005                                | 10,719 ± 0,863                          |

\* Média ± Desvio Padrão

Na Figura 14 encontra-se a curva de regressão entre a acidez titulável e a concentração real de ácido láctico no leite determinada pelo método HPLC-IE. A correlação linear foi identificada com coeficiente de regressão de 0,992.

O valor do coeficiente de regressão linear próximo a 1, indica que a variação da concentração de ácido láctico em mmol/L (método HPLC-IE) varia em função da concentração da acidez titulável com alta correlação.



**Figura 14** - Regressão Linear da correlação entre a acidez titulável e a concentração de ácido láctico determinada pelo método HPLC-IE.

De acordo a equação da regressão linear entre a acidez expressa em porcentagem de ácido láctico determinada pelo método de acidez titulável e a concentração real de ácido láctico, determinada pelo método HPLC-IE, um leite com acidez titulável de 0,18 % de ácido láctico, limite máximo permitido pela IN 51/2002, correspondeu à concentração de 8 mmol/L de ácido láctico real. Dessa forma, esta concentração poderia ser, como sugestão, a concentração máxima real de ácido láctico no leite cru, no leite pasteurizado, no leite UHT, e no leite em pó após reconstituição.

A correlação existente entre a acidez titulável e a concentração de ácido láctico determinada pelo método HPLC-IE, pode ser usada para detectar a presença de neutralizantes em leite. Por exemplo, um leite com concentração de ácido láctico de 7,418 mmol/L, deve apresentar acidez titulável em torno de 0,178 g/100 mL de ácido láctico, caso isto não aconteça, e a acidez titulável seja menor do que 0,178 g/100 mL, isto poderá ser considerado um indicativo de fraude com uso de neutralizantes no leite.

A neutralização do leite com acidez titulável 0,16 a 0,20% (m/v) expresso em ácido láctico, para 0,15 % (m/v) não interferiu na determinação da concentração real de ácido láctico pelo método de HPLC-IE (Quadro 9).

**Quadro 9** - Correlação entre a acidez titulável e a concentração real de ácido láctico determinada pelo método HPLC-IE em leites neutralizados.

| Tempo médio de fermentação a 36 °C | Método Acidez Titulável                    | Método de HPLC-IE                           |
|------------------------------------|--|---|
|                                    | Concentração de ácido láctico em g/100mL * | Concentração real de ácido láctico mmol/L * |
| 0 horas                            | 0,155 ± 0,001                              | 4,386 ± 0,060                               |
| 4 horas                            | 0,153 ± 0,05                               | 5,170 ± 0,040                               |
| 7 horas                            | 0,158 ± 0,001                              | 7,719 ± 0,112                               |
| 8 horas                            | 0,150 ± 0,001                              | 8,270 ± 0,082                               |
| 8,5 horas                          | 0,148 ± 0,001                              | 9,741 ± 0,065                               |
| 9 horas                            | 0,151 ± 0,005                              | 11,291 ± 0,007                              |

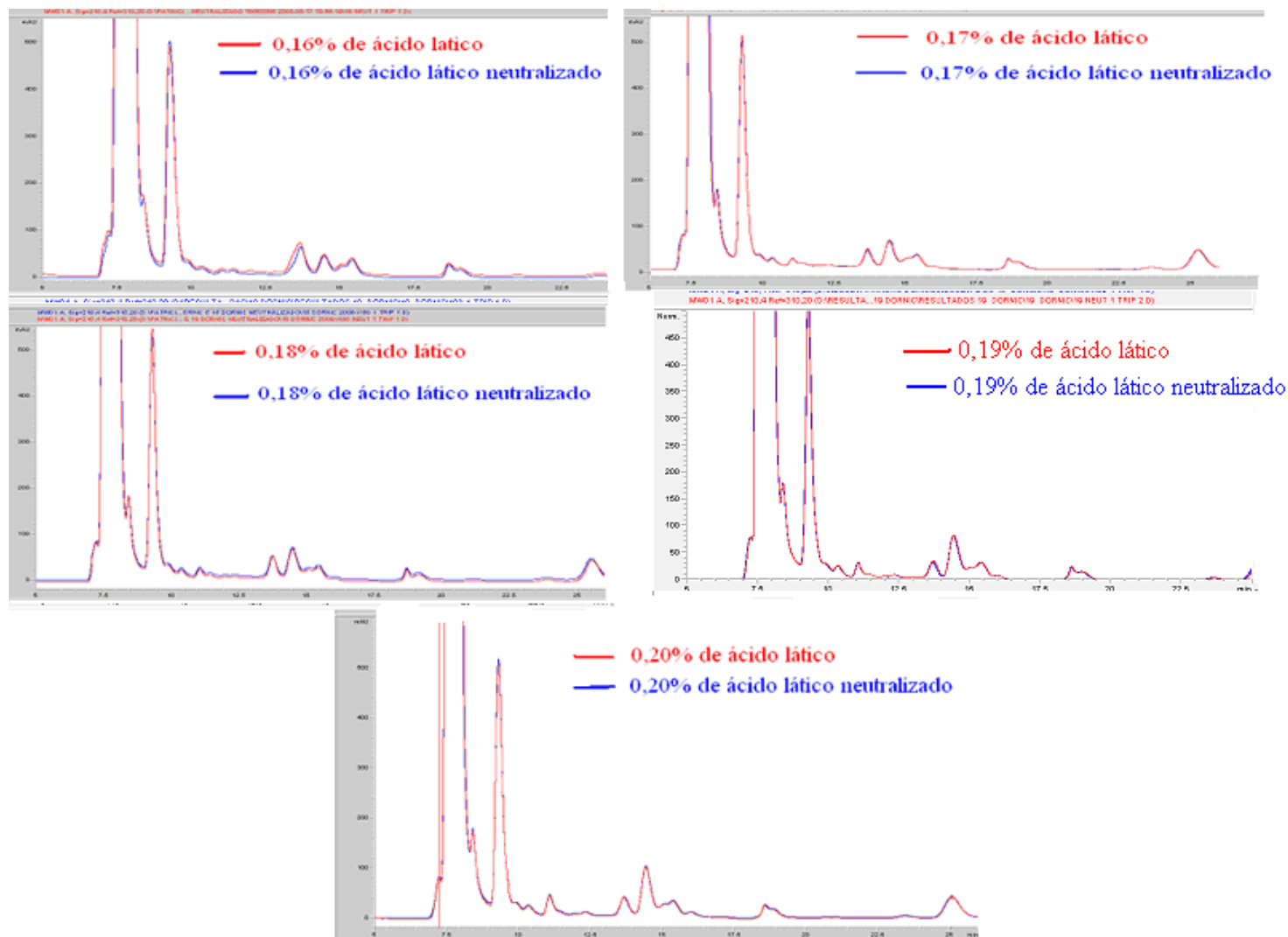
\* Média ± Desvio Padrão

### **5.8 - Determinação da concentração real de ácido láctico em leite fermentado de 0,16 a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico e neutralizado para 0,15 % (m/v) com NaOH 10 mol/L.**

O método oficial do Ministério da Agricultura para determinação da acidez do leite não detecta a concentração real de ácido láctico, e sim a acidez titulável, não sendo bom indicativo da qualidade do leite. Além disso, a acidez titulável elevada do leite pode ser mascarada pelo uso ilegal de neutralizantes de acidez, não sendo assim detectada no método de acidez titulável do leite a má qualidade do produto. Por exemplo, se o leite com acidez titulável de 0,19 % de ácido láctico for neutralizado com hidróxido de sódio (NaOH) para 0,15 %, o método oficial de determinação de acidez do Ministério da Agricultura considerará este produto como adequado para o consumo, pois o teor de acidez detectado por ele será de 0,15 % de ácido láctico, e não o teor verdadeiro que é de 0,19 % de ácido láctico. Isto acontece porque o método de acidez titulável não consegue identificar a acidez elevada do produto após o uso de neutralizantes.

A concentração real de ácido láctico nos leites fermentados sem neutralizantes foi comparada com a concentração real de ácido láctico dos leites fermentados e

neutralizados (Figura 15). Observa-se sobreposição dos picos de 0,16; 0,17; 0,18; 0,19; 0,20 % (m/v) expressa em ácido láctico, nas formas não neutralizadas e após a adição de neutralizantes para correção de acidez titulável.



**Figura 15** - Sobreposição dos cromatogramas por HPLC-IE obtidos de leite fermentados e leite fermentado neutralizados, com acidez titulável variando 0,15 % a 0,20 % (m/v) expresso em ácido láctico.

Foi evidente desta forma que a presença de neutralizante não impede a determinação da concentração real do ácido láctico pelo método de HPLC-IE.

Além do método de HPLC-IE ser apropriado para determinação da qualidade do leite, por medir a concentração real de ácido láctico, e não a acidez total do leite como mede o método de acidez titulável, o método de HPLC-IE não pode ser fraudado pelo uso de neutralizantes. Ou seja, leite com 0,19 % de ácido láctico, mesmo neutralizado com hidróxido de sódio para acidez titulável de 0,15 %, apresentará um pico com área cromatográfica relativa à concentração de ácido láctico do leite com 0,19 % de ácido láctico no método de HPLC-IE. Se fosse usado o método de acidez titulável, o leite não seria condenado, pois a acidez encontrada seria de 0,15 % de ácido láctico, e não a acidez titulável original de 0,19 % de ácido láctico, antes da adição do hidróxido de sódio.

O Quadro 10 mostra a concentração de ácido láctico em cada ponto da fermentação determinada pelo método de HPLC-IE em leites fermentados, e fermentados neutralizados.



**Quadro 10** - Concentração de ácido láctico em leite fermentado e leite fermentado neutralizado determinado por HPLC-IE.

| Acidez Titulável<br>(g/100mL) | Repetições | FERMENTADO                                | FERMENTADO<br>NEUTRALIZDO                 |
|-------------------------------|------------|---|---|
|                               |            | Concentração de ácido láctico<br>mmol/L * | Concentração de ácido láctico<br>mmol/L * |
| 0,164                         | 1          | 4,790 ± 0,321                             | 5,194 ± 0,056                             |
| 0,163                         | 2          | 4,883 ± 0,233                             | 5,193 ± 0,206                             |
| 0,161                         | 3          | 5,146 ± 0,057                             | 5,124 ± 0,051                             |
| 0,179                         | 1          | 7,254 ± 0,101                             | 7,770 ± 0,081                             |
| 0,177                         | 2          | 7,568 ± 0,047                             | 7,584 ± 0,081                             |
| 0,176                         | 3          | 7,434 ± 0,041                             | 7,803 ± 0,495                             |
| 0,182                         | 1          | 7,861 ± 0,240                             | 8,371 ± 0,091                             |
| 0,180                         | 2          | 7,993 ± 0,032                             | 8,230 ± 0,009                             |
| 0,180                         | 3          | 7,859 ± 0,030                             | 8,210 ± 0,165                             |
| 0,190                         | 1          | 9,542 ± 0,023                             | 9,719 ± 0,219                             |
| 0,191                         | 2          | 9,140 ± 0,185                             | 9,810 ± 0,368                             |
| 0,193                         | 3          | 9,208 ± 0,071                             | 9,696 ± 0,325                             |
| 0,200                         | 1          | 10,612 ± 0,048                            | 11,300 ± 0,053                            |
| 0,201                         | 2          | 10,780 ± 0,037                            | 11,289 ± 0,007                            |
| 0,201                         | 3          | 10,766 ± 0,049                            | 11,285 ± 0,045                            |

\* Média das triplicatas ± Desvio Padrão

De acordo com os resultados da comparação pareada de média pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, não existe diferença estatística significativa entre a concentração real de ácido láctico nas amostras fermentadas e a concentração real de ácido láctico das amostras fermentadas e neutralizadas.

Apesar de não existir diferença significativa entre a concentração real de ácido láctico nas amostras fermentadas e fermentadas e neutralizadas, um pequeno aumento da concentração real de ácido láctico foi observado no leite fermentado neutralizado. Este aumento pode ser explicado pelo maior tempo gasto no preparo das amostras fermentadas e neutralizadas em relação às amostras fermentadas. O tempo gasto para correção da acidez titulável do leite fermentado com NaOH, pode contribuir para que as

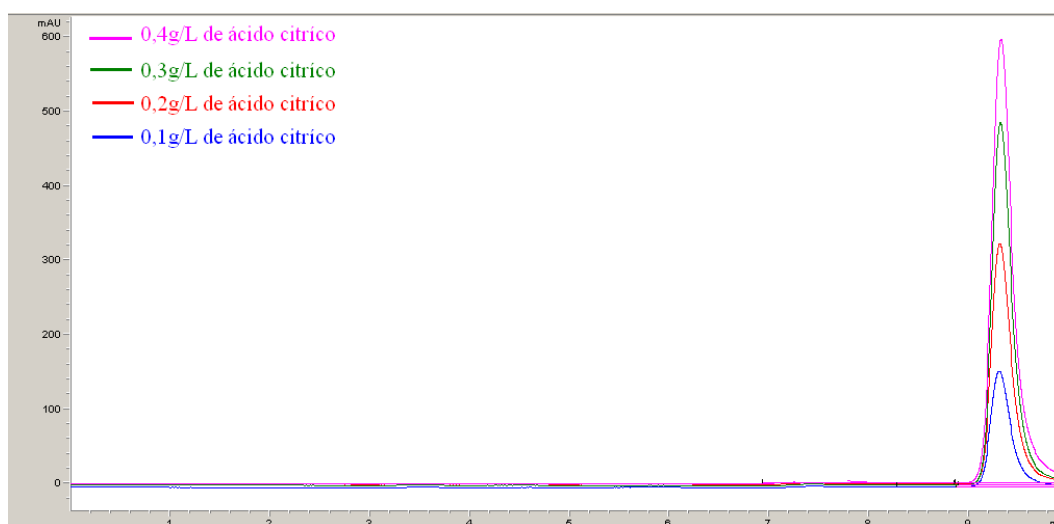
bactérias continuarem fermentando o leite, causando assim este pequeno aumento da concentração de ácido láctico.

A alcalinidade das cinzas é o método quantitativo oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para detectar presenças de neutralizantes, segundo a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Este método pode indicar a adição ilegal de substâncias alcalinas ao leite ácido para reduzir a sua acidez titulável até concentrações permitidas pela legislação. Entre as substâncias alcalinas usadas ilegalmente pode-se citar o hidróxido de sódio e o bicarbonato de sódio. O teste de alcalinidade das cinzas, só é aplicável ao leite cru e ao leite pasteurizado, e não pode servir de parâmetro para reprovar o leite UHT, devido à permissão da adição de citrato ao leite UHT. Esta substância aumenta a concentração de substâncias alcalinas nas cinzas do leite.

### 5.9 - Separação do ácido cítrico e ácido orótico

O ácido cítrico é um ácido orgânico de grande importância no leite, seja como produto natural deste, ou como adicionado como parte do processo de produção de leite UHT (Ultra-high temperature).

Como pode ser observado na Figura 16, foi possível obter pelo método HPLC-IE desenvolvido neste trabalho a detecção do ácido cítrico, com tempo de retenção de 9,3 minutos.



**Figura 16** – Cromatograma das amostras de ácido cítrico nas concentrações de 0,1 ; 0,2; 0,3; 0,4 g/L, preparadas em água, obtido por HPLC-IE.

O Quadro 11 mostra as áreas cromatográficas encontradas nas várias concentrações de ácido cítrico usadas como pontos da curva.

O coeficiente de regressão linear foi de 0,999, e a equação de regressão foi  $Y = 2348,7X + 74,181$ .

**Quadro 11** - Curva analítica de ácido cítrico em água desionizada.

| Ácido cítrico (g/L) | Área *           |
|---------------------|------------------|
| 0,1                 | 2409,30 ± 47,60  |
| 0,2                 | 4840,88 ± 46,22  |
| 0,3                 | 7022,48 ± 195,97 |
| 0,4                 | 9511,14 ± 276,54 |

\* Média ± Desvio Padrão

A quantidade de ácido orótico em leite depende da origem da vaca, dieta, e lactação. Ele é um produto intermediário da síntese de nucleotídeos, e é um fator de crescimento para culturas de iogurte, pois ocorre uma diminuição no conteúdo de ácido orótico durante a fabricação e armazenamento de iogurte (TORMO & IZCO, 2004). O leite apresenta aproximadamente 8 mg/100 mL do ácido orótico (JENNESS & PATTON, 1959).

O ácido orótico pode ser separado pelo método de HPLC-IE desenvolvido neste trabalho (Figura 17), porém ele possui tempo de retenção muito próximo ao ácido cítrico e com isso pode haver sobreposição dos dois picos no cromatograma quando ambos estiverem presentes.



**Figura 17** - Cromatograma por HPLC-IE das amostras de ácido orótico em água desionizada nas concentrações de 0,1 ; 0,2; 0,3; 0,4 g/L.

O Quadro 12 mostra as áreas cromatográficas encontradas nas várias concentrações de ácido orótico usadas como pontos da curva

**Quadro 12** - Curva analítica de ácido orótico em água deionizada.

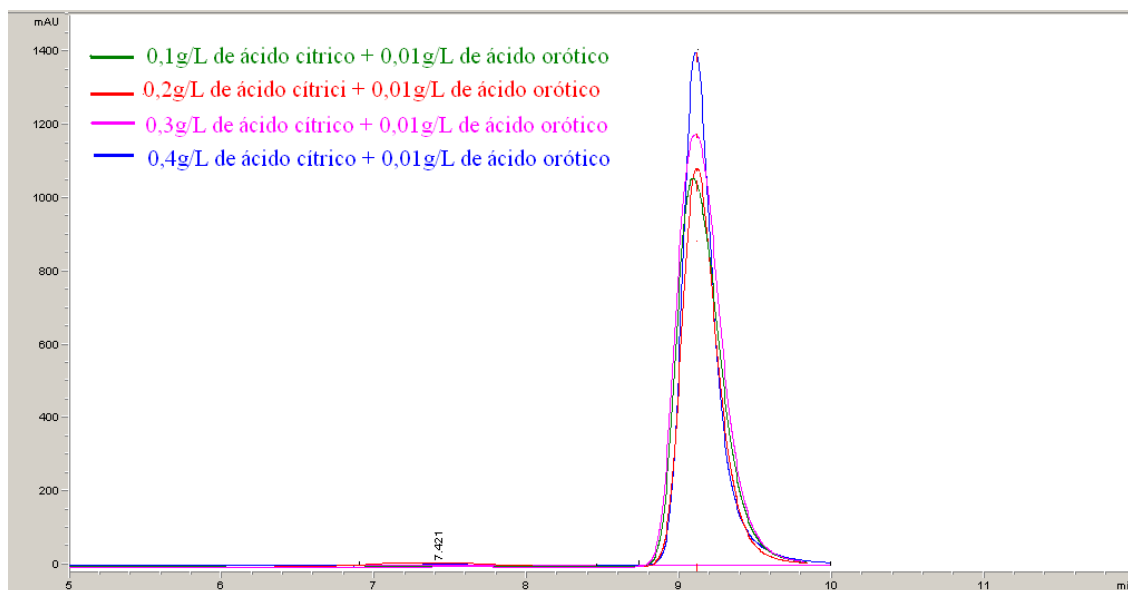
| Ácido orótico (g/L) | Área*             |
|---------------------|-------------------|
| 0,1                 | 10535,34 ± 158,26 |
| 0,2                 | 20188,05 ± 286,35 |
| 0,3                 | 28456,45 ± 562,12 |
| 0,4                 | 34216,95 ± 358,28 |

\* Média ± Desvio Padrão

Ao se comparar os valores das áreas cromatográficas relativas às concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/L de ácido orótico apresentados no Quadro 12, com os valores das áreas relativas às concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/L de ácido cítrico apresentados no Quadro 11 pode-se observar que o ácido orótico tem maior absorvância a 210 nm quando comparado com o ácido cítrico.

MARTINS (2006), com objetivo de confirmar o comprimento de onda de absorção dos ácidos orgânicos, usou a espectrofotometria na região do UV, para determinar o comprimento de onda de absorvância máxima. A grande maioria dos ácidos apresentou absorvância máxima em 210 nm, com exceção do ácido cítrico e úrico.

Na análise pelo método de HPLC-IE dos padrões contendo ácido cítrico nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/L, adicionada em todos os pontos de 0,01 g/L de ácido orótico, observou-se a sobreposição dos picos (Figura 18).



**Figura 18** - Cromatograma por HPLC-IE das amostras contendo concentrações de 0,1 ; 0,2; 0,3; 0,4 g/L de ácido cítrico adicionada de 0,01g/L de ácido orótico.

Como pode ser observado, não foi possível resolver o ácido cítrico e o ácido orótico nas condições testadas em razão da proximidade dos seus tempos de retenção.

## 6 - CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com exclusão iônica (HPLC-IE) para determinar a concentração real de ácido láctico do leite. O ácido láctico apresentou resolução completa em relação a todos os outros compostos presentes nos cromatogramas de amostras, eluindo no tempo de 14,2 minutos.

A concentração real de ácido láctico do leite cru, apresentou correlação linear com o aumento da sua acidez titulável, quando este foi mantido à temperatura de 36°C.

A regressão linear dos resultados da concentração real de ácido láctico determinado pelo método HPLC-IE com o método da determinação da acidez titulável apresentou correlação de 0,9929 %, indicando que o método é capaz de determinar o aumento da acidez do leite devido à fermentação descontrolada ao ser estocado à temperatura ambiente. O método ainda apresentou a mesma correlação quando a acidez titulável foi reduzida de até 0,20 %, expressa em ácido láctico, para 0,15 %, pois essa redução não afeta a concentração real do ácido láctico do leite.

Dessa forma, o método desenvolvido pode ser usado para determinar se o leite sofreu fermentação acidificante descontrolada, mesmo se sua acidez titulável tiver sido parcialmente reduzida, para os valores normais, por compostos alcalinizantes, como o hidróxido de sódio e o bicarbonato de sódio.

## **7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADHIKARI, K.;GRUW, I.U.; MUSTAPHA, A; FERNANDO; L.N. ; Changes in the profile of organic acids in plain set and stirred yogurts during manufacture *and* refrigerated storage. **Journal of food quality**. v. 25, n. 5, p. 435-451, 2001.

ASHOOR, S. H.; WELTY, J. Determination of Organic Acids in Foods by High-Performace-Liquid Chromatography: Lactic Acid. **Journal of Chromatography A**. v. 287, p.452-456, 1984.

BARRANTES, E.; TAMIME, A. Y., SWORD, A. M.; MUIR, D. D.; KALAB, M. The Manufacture of Set-type Natural Yoghurt Containing Different Oils - 1. Compositional Quality, Microbiological Evaluation and Sensory Properties. **International Dairy Journal**. v. 6, p. 81 1-826, 1996.

BEVILACQUA, A.E.; CALIFANO A.N. Determination of Organic Acids in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food Science**. v. 54, n. 4, p.1076-1076, 1989

BOUZAS, J.; KANTT, C. A; BODYFELT, F.; TORRES. J.A; Simultaneous Determination of Sugars and Organic Acids in Cheddar Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food Science**. v.56, n. 1 , p. 276–278 , 1991.

BRASIL,2002. Instrução Normativa nº51, de 12 de julho de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2002

BRASIL 2003. . Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2003

BRASIL, 2006. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2006

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. (Ed). Conceitos básicos da qualidade. In: -. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, São Paulo. p.59-66, 1998.

CHINNICI, F.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C.; AMATI, A.; Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.18, p.121–130, 2005.

DAVIS, J. G.; MACDONALDS, F. J.: **Dairy Chemistry**, 5º Ed, Charles Griffin & Company Limited, p. 337, 1953.

DAVIS, S. R.; FARR, V. C.; PROSSER, C. G.; NICHOLAS, G. D. ; TURNER, S. A.; LEE, J.; HART, A. L. Milk L-lactate concentration is increased during mastitis. **Journal of Dairy Research**. v. 71, p. 175–181, 2004.

DIAZ, G. O.; **Análise de Sistema para Resfriamento de leite em Fazendas Leiteiras com o uso do Biogás Geraldo em um Projeto MDL**. São Paulo- SP, 2006, p. 12- 20, Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.

FAEMG 2005, Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais, Jornal FAEMG, maio de 2005, <http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=1663&ParentPath=None;16;1488;2088>

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; GOMES, A.M.P. ; FERREIRA, M.A; Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. **Carbohydrate Polymers** . v. 37, p.225–229, 1998.

FOSTER, E. M., NELSON, F. E.; DOETSCH, R. N.; OLSON, J. C. **Dairy Microbiology**, Prentice- Hall, p.9-10, 1957.

FOX, P. F.: Advanced Dairy Chemistry, Lactose, Water, Salts and Vitamins, 2° ed, v. 3, Chapman & Hall, p. 42-69, 2003

GOMEZ-ALVAREZ, E.; LUQUE-PEREZ, E.; RIOS, A.; VALCARCEL, M.. Flow injection spectrophotometric determination of lactic acid in skimmed milk based on a photochemical reaction. **Talanta**. v.50, p. 121–131, 1999.

HARVEY, C. D., JENNESS, R. AND MORRIS, H. A. Gas chromatographic quantitation of sugars and nonvolatile water-soluble organic acids in commercial cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 64, p.1648-1 654, 1981.

HORST, J. A. Impacto da Refrigeração na Contagem Bacteriana do Leite. In. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006, Goiânia/Go. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006

IZCO, J. M.; TORMO, M.; JIMEÑEZ-FLORES, R. Development of a CE Method to Analyze Organic Acids in Dairy Products: Application to Study the Metabolism of Heat-Shocked Spores. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 50, p. 1765-1773, 2002.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Chapman & Hall. . 5° Ed. p. 285, 1996

JENNESS, R.; PATTON, S. **Principles of Dairy Chemistry**, Chapman & Hall, p. 224-232, p.95-99, 1959.

KABEIR, B.M.; ABD-AZIZ, S.; MUHAMMAD, K.; SHUHAIMI M.; YAZID, A.M.; Growth of *Bifidobacterium longum* BB536 in medida (fermented cereal porridge) and



their survival during refrigerated storage. **Letters in Applied Microbiology**. v. 41, p.125–131, 2005.

KAMINARIDES, S.; STAMOU, P.; MASSOURAS, T.; Comparison of the characteristics of set type yoghurt made from ovine milk of different fat content. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 42, p. 1019–1028, 2007

LAVOR, U. L.; OVÍDIO, L.; IZIDORO, T. B.; PADOVANI, C. R.; PINTO, J. P. A. N.; Qualidade Microbiológica do Leite Cru Produzido na Região de Botucatu - SP e Impactos da Nova Legislação na Qualidade do Produto. In. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006, Goiânia/Go. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006

LEE, J. H.; LEE, S. K.; PARK, K. H.; HWANG, I. K.; JI, G. E. Fermentation of rice using amylolytic *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 50, p.155–161, 1999

LUES, J. F. R.; BOTHA, W. C.; SMIT, E. J.; Ion-exchange HPLC of Cheese-related Organic Acids in Comparison with Reverse-phase HPLC. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 959-965, 1998.

MARSILI, R. T.; OSTAPENKO, H.; SIMMONS, R. E.; GREEN, D. E. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products. **Journal of Food Science**. v. 46, n. 1, p. 52-57, 1981.

MARTINS, L. S. P.; Monitoramento da Produção de Ácidos Orgânicos em Amostra de Leite Fermentado pelos Grãos de Kerfir e do Tiber técnicas Voltamétrica e HPLC. São Carlos- SP , 2006, p.31 p. 116-118, dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo.

MARTINS, M. E. P.; OLIVEIRA, A. N., NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; SANTOS, P. A., NEVES, R.B. Qualidade do Leite Cru Armazenado em Tanques de

Refrigeração por Expansão Direta no Estado de Goiás. In. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006, Goiânia/Go. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006

MELO, A. D. S.; **Experiência Associativa para Aquisição e uso de Tanque de Expansão e Resfriamento de Leite.** Lavras –MG, 2003, p.26, dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras

MULLIN, W. J.; EMMONS, D. B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. **Food Research International.** v. 30, n. 2, p. 147-151, 1997.

ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology**, Elsevier Applied Science, 2º Ed, v. 1, p. 78, 2002

SECHAUD, F., S.; PEGUIN, P.; COULET, R.; BARDELETTI, G. Fast and reliable organic acid determination in fermented milk using an enzyme-electrode based analyzer. **Process Biochem.** v. 12, p. 24-33, 1989.

SILVA, D. C.; SANTOS, W. B. R.; SOUZA, R.; JOBIM, C. C.; ZAMBOM, M.A.; MARCHI, F. E.; SCHIMITT, F., SANTOS, G.T. Qualidade do Leite Fornecido por Pequenos Produtores Rurais de Iguatemi, Distrito de Maringá - Pr. In. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006, Goiânia/Go. II Congresso Brasileiro da Qualidade do leite, 2006

TORMO, M.; IZCO, J. M. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. **Journal of Chromatography A.** v.1033, p.305–310, 2004.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy technology. Principles of milk properties and processes.** Marcel Dekker, p. 37, 2002.

WEBB, B.; JOHNSON, A. H.; ALFRORD, J.; **Fundamentals of Dairy Chemistry**; vi  
Publishing Company, p 394-395, p.780-781, 1974

TORMO, M.; IZCO, J. M. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. **Journal of Chromatography A**. v.1033, p.305–310, 2004.