

**JULIANA CRISTINA SAMPAIO RIGUEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO PELA ADIÇÃO DE LEITELHO EM  
LEITE EM PÓ E LEITE FLUIDO**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

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

T

R572d  
2006

Rigueira, Juliana Cristina Sampaio, 1981-  
Desenvolvimento de metodologia analítica para  
detecção de adulteração pela adição de leite em  
leite em pó e leite fluido / Juliana Cristina Sampaio  
Rigueira. – Viçosa : UFV, 2006.  
xv, 58f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 47-51.

1. Alimentos - Adulteração e inspeção. 2. Leite -  
Inspeção. 3. Leite - Análise. 4. Leite - Controle de  
qualidade. 5. Fosfolipídios. 6. Leite. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.07

**JULIANA CRISTINA SAMPAIO RIGUEIRA**

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO PELA ADIÇÃO DE LEITELHO EM  
LEITE EM PÓ E LEITE FLUIDO

Dissertação apresentada a  
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: 29 de maio de 2006.

---

Prof. José Antônio Marques  
Pereira

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira  
  
(Co-Orientador)

---

Prof. Antônio Fernandes de  
Carvalho

---

Prof.<sup>a</sup> Edimar Aparecida  
Filomeno Fontes

---

Prof. Sebastião C. C. Brandão  
(Orientador)

A Deus, que permitiu que tudo isso fosse possível.  
Aos meus pais, pelo amor incondicional e confiança.  
Aos meus irmãos e sobrinhos, pela convivência e carinho.  
Aos meus amigos e familiares.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela presença e proteção constantes.

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Sebastião César Cardoso Brandão, pela orientação, confiança e ensinamentos.

Aos professores conselheiros, Juraci Alves de Oliveira e José Antônio Marques Pereira, pela atenção e auxílio.

Aos professores participantes da banca, pela atenção e receptividade ao convite.

Ao Professor José Benício Paes Chaves, pela atenção dispensada e contribuição nas análises estatísticas.

Aos estagiários, pela ajuda e participação.

À Lílian, pela amizade, grande apoio e contribuição.

Aos amigos Sérgio e Paula, pela amizade e disposição em ajudar.

A todos os colegas do Laboratório de Análise de Alimentos e DTA, Fabiana, Veridiana, Cláudia, Ana Cláudia, Carmem, Adriana, Maria Patrícia e Thiago, pela convivência e cooperação.

Aos colegas Maurício, Baltazar e Giulliano, pela colaboração.

Ao Laticínios-Escola (UFV-Funarbe) e aos seus funcionários, pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

A todas as indústrias que forneceram amostras de leite, para realização das análises.

Aos meus pais, pela dedicação e estímulo constante.

Aos meus irmãos, pela convivência.

Aos meus sobrinhos, pelo carinho.

Ao Daniel, pela compreensão, carinho e paciência nos momentos difíceis.

Aos amigos e familiares, pelo incentivo.

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

## **BIOGRAFIA**

JULIANA CRISTINA SAMPAIO RIGUEIRA, filha de Paulo Cesar Rigueira e de Ana Maria Sampaio Rigueira, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 16 de setembro de 1981.

Em março de 2000, iniciou na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, o curso de graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios, graduando-se em janeiro de 2004. Ingressou, em março de 2004, no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nessa mesma Universidade, submetendo-se à defesa de tese em maio de 2006.

## CONTEÚDO

LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 - Problemas de adulterações em alimentos .....	3
2.2 - Leiteiro .....	4
2.3 - Membrana do glóbulo de gordura.....	5
2.4 - Lipídeos.....	7
2.5 - Fosfolipídeos.....	9
2.6 - Métodos de análises .....	11
2.6.1 - Determinação espectrofotométrica de fosfolipídeos.....	11
2.6.2 - Métodos de extração da fração lipídica.....	12
2.6.3 - Determinação de fósforo .....	12
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 - Amostras .....	14
3.2 - Metodologia .....	14
3.2.1 - Extração de lipídeos .....	14
3.2.1.1 - Amostras fluidas.....	15
3.2.1.2 - Amostras em pó.....	16
3.3 - Análise de fósforo.....	16



3.3.1 - Calcinação da matéria orgânica.....	16
3.3.2 - Curva de calibração de fósforo.....	17
3.3.3 - Determinação espectrofotométrica.....	17
3.4 - Determinação de fosfolipídeos .....	18
3.5 - Determinação do limite de detecção .....	18
3.6 - Determinação de sólidos totais .....	19
3.7 - Análises estatísticas.....	19
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 - Determinação de lipídeos.....	22
4.2 - Determinação da precisão da metodologia .....	25
4.3 - Determinação de fosfolipídeos totais.....	26
4.4 - Teste de Lilliefors .....	35
4.5 - Determinação do limite de detecção da adição de leite ao leite. ....	36
4.5.1 - Adição de leite fluido em leite fluido desnatado.....	36
4.5.2 - Adição de leite fluido em leite fluido integral .....	37
4.5.3 - Adição de leite em pó em leite em pó desnatado.....	38
4.5.4 - Adição de leite em pó em leite em pó integral.....	39
4.6 - Determinação de sólidos totais .....	40
5 - CONCLUSÃO.....	44
6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
8 - APÊNDICE.....	52

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estimativas da composição do glóbulo de gordura, da membrana do glóbulo de gordura, das partículas lipoprotéicas e sêrum do leite.....	6
Quadro 2 – Composição dos lipídeos do leite de vaca. ....	9
Quadro 3 – Distribuição das classes de fosfolipídeos no leite de vaca e as respectivas massas molares. ....	10
Quadro 4 – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) em leite fluido desnatado (LD), leite fluido integral (LI), leite em pó desnatado (LPD), leite em pó integral (LPI), leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (LTA), leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (LTL) e leite em pó (LTP).....	22
Quadro 5 – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16). ....	24
Quadro 6 – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (n=11). ....	24
Quadro 7 – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) de 30 repetições realizadas em uma única amostra de leite fluido desnatado e uma única amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado.....	26

Quadro 8 – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido desnatado (n=26). .....	27
Quadro 9 – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido integral (n=32). .....	28
Quadro 10 – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite em pó desnatado (n=20). .....	29
Quadro 11 – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite em pó integral (n=23). .....	30
Quadro 12 – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16). .....	31
Quadro 13 – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (n=11). .....	32
Quadro 14 – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) em leite fluido desnatado (LD), leite fluido integral (LI), leite em pó desnatado (LPD), leite em pó integral (LPI), leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (LTA), leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (LTL) e leite em pó (LTP). .....	33
Quadro 15 – Resultado do teste de Lilliefors para cada tipo de leite analisado. .	35
Quadro 16 – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leite em leite fluido desnatado. ....	37
Quadro 17 – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leite em leite fluido integral. ....	38
Quadro 18 – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leite em leite em pó desnatado. ....	39
Quadro 19 – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leite realizadas no leite em pó integral. ....	40

Quadro 20 – Resultados da concentração média de sólidos totais (% m/m), fosfolipídeos totais expressos em mg/100 g leiteiro fluido e em mg/100 g sólidos totais nas amostras de leiteiro fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16). .....	41
Quadro 21 – Resultado da concentração média de sólidos totais (% m/m), fosfolipídeos totais expressos em mg/100 g leiteiro fluido e em mg/100 g sólidos totais nas amostras de leiteiro fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (n=11). .....	42
Quadro 22 – Resultado das concentrações médias de fosfolipídeos totais (mg/100 g sólidos totais). .....	42

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 – Estrutura molecular do fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. .... 9
- Figura 2 - Distribuição normal, sendo  $\mu$  a média e  $s$  o desvio-padrão..... 20

## RESUMO

RIGUEIRA, Juliana Cristina Sampaio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006. **Desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de adulteração pela adição de leite em pó e leite fluido.** Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Conselheiros: Mauro Mansur Furtado e Juraci Alves de Oliveira.

Foi desenvolvida metodologia analítica quantitativa para detectar adulteração de leite em pó e leite fluido por adição de leite em pó, com base na determinação da concentração de fosfolipídeos totais. As amostras foram submetidas à extração de lipídeos pelo método Röese-Gottlieb; calcinação da matéria orgânica; derivatização do fósforo; e análise espectrofotométrica para determinação da concentração de fósforo. A concentração de fósforo foi convertida em fosfolipídeos totais, com base na massa molar da fosfatidilcolina, o fosfolipídeo, presente em maior concentração no leite. Os resultados do coeficiente de variação obtidos em trinta repetições realizadas em uma única amostra de leite fluido desnatado e em uma única amostra de leite em pó proveniente de creme com teor de gordura padronizado com leite desnatado, foram 3,43 e 3,62, respectivamente, ou seja, o método apresentou boa precisão. A concentração média de fosfolipídeos totais nas amostras de leite desnatado e integral, ambos fluido e em pó, somada a três vezes o desvio-padrão, foi o limite padrão máximo recomendado da concentração de fosfolipídeos totais. Este limite foi de 21,66 mg/100 g, 36,19 mg/100 g, 217,38 mg/100 g e 333,05 mg/100 g para leite fluido desnatado, leite fluido integral, leite em pó desnatado e leite em pó

integral, respectivamente. Amostras com concentração de fosfolipídeos totais superior aos valores citados acima podem ser consideradas adicionadas de leite. Estes valores representam uma adição de 2,60 % (m/m) de leite ao leite fluido desnatado, 5,46 % (m/m) ao leite fluido integral, 6,41% (m/m) ao leite em pó desnatado e 5,86 % (m/m) ao leite em pó integral. A metodologia desenvolvida, além de fácil implantação e execução, possui baixo custo quando comparada com o método da Comunidade Européia, que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

## ABSTRACT

RIGUEIRA, Juliana Cristina Sampaio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2006. **Development of analytical method for detection of adulteration by buttermilk addition in milk powdered and milk fluid.** Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. Co-Advisers: Mauro Mansur Furtado and Juraci Alves de Oliveira.

A quantitative analytical method was developed to detect adulteration of powdered milk and fluid milk by buttermilk addition based on total phospholipids concentration. The samples were subjected to lipids extraction by the methodologies of Röese-Gottlieb, phosphorus derivatization, organic matter calcinations, and spectrophotometer analysis to determine phosphorus concentration. Phosphorus concentration was converted to total phospholipids based on the molecular mass of the phosphatidylcholine, a phospholipid present in milk at the highest concentration. The coefficient of variation obtained from thirty repetitions carried out in one single sample of skimmed fluid milk and one single sample of fluid buttermilk derived from cream with fat level standardized by skimmed milk were 3,43 and 3,62, respectively. That is to say, the method showed good accuracy. The maximum limit standard of total phospholipid concentration was recommended on the basis of the mean concentration of total phospholipids from the samples of skimmed and whole milk, both fluid and powdered, added three times the standard deviation. This limit was of 21,66 mg/100 g, 36,19 mg/100 g, 217,38 mg/100 g and 333,05 mg/100 g for skimmed fluid milk, whole fluid milk, skimmed powdered milk, and whole powdered



milk, respectively. Samples with total phospholipid concentrations above these limits could be considered as added of buttermilk. These values represented an addition of 2,60 % (m/m) of buttermilk into skimmed fluid milk, 5,46 % (m/m) into whole fluid milk, 6,41 % (m/m) into skimmed powdered milk and 5,86 % (m/m) to whole powdered milk. The developed method, besides being of easy implementation and execution, has low cost when compared to the European Community method, which uses high performance liquid chromatography (HPLC).

## **1 - INTRODUÇÃO**

As adulterações em alimentos podem ser praticadas com a adição de ingredientes não permitidos, para reduzir custos. O leite pode ser intencionalmente adulterado com uma série de substâncias. Entre elas, podemos citar a água e o soro de leite.

Como as adulterações fraudulentas ocorrem no Brasil e comprometem a qualidade do produto, é cada vez mais importante detectar a introdução no mercado, de produtos adulterados e de qualidade inferior, sejam por razões econômicas ou de saúde pública.

Nos últimos anos, denúncia de adulterações em todos os setores produtivos, incluindo o segmento dos lácteos, tem sido divulgada. Dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, do ano de 2003, revelaram adulterações em 43 % das 74 indústrias analisadas em 13 estados brasileiros, com apreensão de 162,9 toneladas de produtos lácteos fora dos padrões (Jornal do Brasil, 2005).

A legislação brasileira estabelece penalidades para a adulteração do leite pasteurizado, esterilizado e em pó, como forma de manter a qualidade nutritiva original, preservar o conceito de sua pureza como alimento e tornar justa e leal a concorrência entre as diversas indústrias de laticínios. “A alteração de substância alimentícia, modificando-lhe a qualidade ou reduzindo-lhe o valor nutritivo” está prevista no Código Penal Brasileiro, que determina pena de reclusão de 1 a 2 anos e multa para os adulteradores, para quem vende, expõe à venda, tem em

depósito a vender, ou, de qualquer forma, entrega ao consumo a substância alterada (BRASIL, 1998).

Uma das formas de adulteração do leite é a adição de leitelho, um subproduto da fabricação de manteiga, definido pela “European Community Customs Tariff” (Taxas Alfandegárias da Comunidade Européia) como um líquido branco, contendo substâncias protéicas, traços de gordura, fosfatos e algumas vitaminas do leite.

A composição do leitelho é similar à do leite desnatado, com exceção da maior quantidade de proteínas e fosfolipídeos derivados da membrana do glóbulo de gordura (MISTRY et al., 1996), o que dificulta a identificação de adulteração. No entanto, como a maioria dos componentes das membranas dos glóbulos de gordura é liberada para a fase aquosa, durante a inversão de fases do creme, a quantidade de fosfolipídeos totais é de sete a nove vezes maior no leitelho do que no leite desnatado.

Alguns métodos analíticos foram desenvolvidos para a detecção de adulteração de leite por adição de leitelho, como a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna de fase-reversa, método oficial da Comunidade Européia. Porém, no Brasil, ainda não há um método oficial para esta determinação.

As considerações acima enfatizam a necessidade do desenvolvimento de um método sensível e de baixo custo para detectar este tipo de adulteração em leite. Desta forma, este trabalho teve como objetivos: desenvolver uma metodologia analítica para detectar adulteração decorrente da adição de leitelho ao leite desnatado e integral, tanto em pó como fluido, através da determinação espectrofotométrica da concentração de fosfolipídeos totais; propor o estabelecimento de um limite máximo da concentração de fosfolipídeos totais presentes em leite desnatado e integral.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Problemas de adulterações em alimentos

Os alimentos estão sempre vulneráveis a misturas fraudulentas ou adulterações com substâncias de valor inferior. Numa tentativa de coibir ações fraudulentas, a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) estabeleceu padrões de Identidade e Qualidade para alimentos e produtos industrializados. Métodos de avaliação de amostras de alimentos foram desenvolvidos para comparação com tais padrões. Estes métodos, agora aceitos como oficiais ou padrões podem ser divididos em métodos analíticos físicos, químicos, instrumentais, nutricionais, microbiológicos e sensoriais (SINGHAL et al., 1997).

Especificamente em relação à adulteração do leite, a legislação brasileira é clara e objetiva, quando define que somente são considerados leite fluido (pasteurizado ou UHT) e leite em pó aqueles produtos que não sofreram a adição de produtos não permitidos. Desta forma, fica claro que a adição de quaisquer outros produtos, tal como o leite em pó, é proibida por Lei e considerada uma fraude. A adição de leite em pó é econômica e é considerada fraude econômica. A Legislação Federal prevê, além de outras penalidades, o confisco do produto (BRASIL, 1952).

## 2.2 - Leitelho

Denomina-se leitelho o líquido resultante da inversão de fase do creme na fabricação da manteiga. Ele é rico em proteína e sais minerais e pode ser disposto para consumo no estado fresco ou em pó (BRASIL, 1950).

Durante o processo de fabricação da manteiga, o creme é submetido à maturação física, que consiste no seu resfriamento após a pasteurização, com a finalidade de solidificar a gordura, facilitando a inversão de fase e diminuindo, conseqüentemente, a perda de gordura no leitelho (MULVA, 1970).

A maturação biológica é realizada mediante a acidificação do creme, com o objetivo de conferir à manteiga sabor e aroma característicos. Esta acidificação é processada com cultivos de bactérias lácticas produtoras de aroma, adicionadas ao creme na forma de fermento (ADAMIK e SALAZAR, 1976).

Durante a bateção do creme, após o rompimento dos glóbulos de gordura e liberação da gordura líquida, ocorre a inversão de fases (transformação da emulsão de gordura em água, para emulsão de água em gordura) com a conseqüente liberação de fosfolipídeos e proteínas presentes na membrana do glóbulo para a fase aquosa, que é denominada de leitelho (CORREDIG et al., 2003).

A quantidade de manteiga produzida nos Estados Unidos por ano é, em média, de 600 milhões de quilogramas, com a produção de 2 a 2,5 milhões de quilogramas de leitelho em pó. Esta produção de leitelho para utilização como ingrediente na indústria de alimentos tem grande impacto econômico (USDA, 2001). No Brasil, em 2003, a produção de manteiga foi de 78 milhões de quilogramas (EMBRAPA, 2006).

No Brasil, o leitelho é geralmente descartado e, neste caso, é uma grande fonte de poluição ambiental. Entretanto, a utilização de leitelho em pó como ingrediente pode aumentar o valor econômico deste subproduto, além de reduzir o custo com o tratamento de resíduos industriais (MALIN et al., 1994). Há possibilidade de utilizar o leitelho como ingrediente em vários produtos

alimentícios, tais como pães, iogurtes, chocolates, sopas e molhos. Quando usado como ingrediente de alimentos pode contribuir para consistência, sabor, aroma e propriedade emulsificante (Fryksdale (2001), citado por ASTAIRE, 2002).

A utilização do leitelho como ingrediente é atribuída à semelhança de suas propriedades com as do leite desnatado e à presença de substâncias liberadas da membrana do glóbulo de gordura, principalmente fosfolipídeos e proteínas. Caseínas e proteínas do soro constituem uma grande porcentagem do total das proteínas presentes no leitelho (CORREDIG e DALGLEISH, 1998).

A potencial utilização de leitelho em pó como agente emulsificante foi primeiramente demonstrado por CORREDIG e DALGLEISH (1998), usando uma emulsão de óleo de soja (óleo/água). A concentração de 1 % de leitelho em pó foi suficiente para estabilizar uma emulsão de óleo de soja (10 % m/m) a 25 °C. Entretanto, a estabilização diminuiu com o aumento da temperatura.

### **2.3 - Membrana do glóbulo de gordura**

A gordura do leite contribui para as características de aparência, textura, sabor, aroma e estabilidade de produtos derivados de leite, além de ser fonte de energia, ácidos graxos essenciais, vitaminas e vários outros componentes (MILLER et al., 1999).

Os glóbulos de gordura do leite, cujo diâmetro varia de 0,1 µm a 10 µm (JENSEN, 2002), são envolvidos por uma camada protetora conhecida como membrana do glóbulo de gordura (YE et al., 2002).

O tamanho do glóbulo de gordura tem influência crucial na estabilidade e propriedades tecnológicas do leite, sendo que os glóbulos de maior tamanho são mais susceptíveis à coalescência e lipólise durante o bombeamento (WIKING et al., 2003).

A membrana do glóbulo de gordura consiste de uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, triacilgliceróis, fosfolipídeos, colesterol, enzimas e outros componentes (McPHERSON e KITCHEN, 1983; MAHTER, 2000). As

estimativas da composição do glóbulo de gordura e da sua membrana, das partículas lipoprotéicas e sêrum do leite são apresentadas no Quadro 1.

**Quadro 1** – Estimativas da composição do glóbulo de gordura, da membrana do glóbulo de gordura, das partículas lipoprotéicas e sêrum do leite.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade em 1 kg de leite</b>
<b>Glóbulo de gordura</b>	
Glicerídeos	
Triacilgliceróis	40 g
Diglicerídeos	0,1 g
Monoglicerídeos	10 mg
Ácidos Graxos	60 mg
Esteróis	90 mg
Carotenóides	0,3 mg
Vitaminas A, D, E, K	+
Água	60 mg
<b>Membrana do glóbulo de gordura</b>	
Água	+
Proteínas	700 mg
Fosfolipídeos	250 mg
Cerebrosídeos	30 mg
Glicerídeos	+
Ácidos graxos	15 mg
Esteróis	15 mg
<b>Partículas Lipoprotéicas</b>	
Lipídeos	+
Proteínas	+
Enzimas	+
Água	+
<b>Sêrum</b>	
Lipídeos	
Glicerídeos	+
Ácidos graxos	20 mg
Fosfolipídeos	100 mg
Cerebrosídeos	10 mg
Esteróis	70 mg

+ presença

Fonte: Adaptado de WALSTRA et al. (1999).

As propriedades funcionais dos componentes da membrana podem ser atribuídas à sua composição química e propriedades físico-químicas (LEE e SHERBON, 2002). Algumas propriedades de produtos derivados do leite, tais como a estabilidade e a aceitabilidade, são determinadas pelos componentes da

membrana do glóbulo de gordura (CORREDIG e DALGLEISH, 1997; YE et al., 2002).

A composição da membrana do glóbulo de gordura do leite pode ser alterada por vários fatores, tais como variações relacionadas ao animal, ao ambiente e ao processamento. Os fatores relacionados ao animal incluem a dieta, a estação do ano, a presença de bactérias em leite mastístico e o estágio de lactação. O fator ambiental inclui a presença de bactérias no leite pré ou pós contaminado (McPHERSON e KITCHEN, 1983). Os fatores relacionados ao processamento são o resfriamento, a secagem, a agitação, o aquecimento e a homogeneização. Dentre estes fatores, o tratamento térmico do leite pode causar desnaturação de proteínas do soro que interagem com os componentes da membrana, bem como com a *k*-caseína das micelas de caseína (CORREDIG e DALGLEISH, 1996).

A homogeneização causa significativa mudança na composição da membrana do glóbulo de gordura. Ela rompe o glóbulo de gordura, subdividindo-os em glóbulos de menor diâmetro (DARLING e BUTCHER, 1978), os quais são rapidamente cobertos por proteínas do leite, predominantemente caseínas (WASTRA et al., 1999).

## **2.4 - Lipídeos**

A classificação geral dos lipídeos tem como base os seus componentes estruturais e pode ser definida por uma variedade de substâncias, incluindo triacilgliceróis, álcoois (esteróis, tocoferóis), hidrocarbonetos (carotenos), ceras, fosfolipídeos, ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis como A, D, E, K, glicolipídeos e lipoproteínas (FENNEMA, 1996). Todos os lipídeos contêm na molécula carbono, hidrogênio e oxigênio; em algumas classes são encontrados fósforo, nitrogênio e, às vezes, enxofre. Ocorrem, em quase todas as células, animais e vegetais de onde podem ser facilmente extraídos com solventes orgânicos de baixa polaridade.



Os lipídeos mais simples e abundantes, que contêm os ácidos graxos como unidades fundamentais, são os triacilgliceróis, freqüentemente denominados gorduras neutras ou triglicerídeos, que são ésteres do álcool glicerol com três moléculas de ácidos graxos (MORETTO e FETT, 1989).

A manteiga é uma mistura de triacilgliceróis, alguns dos quais possuem ácidos graxos de cadeia curta, com baixos pontos de fusão, e que conferem maciez à manteiga à temperatura ambiente (LENHINGHER, 1995).

A maioria dos lipídeos são derivados ou possuem em sua estrutura ácidos graxos, que são ácidos orgânicos, a maioria de cadeia alquil longa, com mais de doze carbonos. Esta cadeia alquil pode ser saturada, ácidos graxos geralmente sólidos à temperatura ambiente, com exceção dos ácidos graxos de cadeia curta ou instaurada, geralmente líquidos à temperatura ambiente. Os principais ácidos graxos saturados encontrados no leite são o butírico, capróico, caprílico, cáprico, láurico, palmítico, esteárico, mirístico e araquídico e os insaturados são o oléico e linolênico (WILSTER, 1957).

As funções biológicas dos diferentes lipídeos são igualmente diversas. Em muitos organismos, os triacilgliceróis são formas principais de armazenar energia, enquanto os fosfolipídeos e os esteróis compõem metade da massa das membranas biológicas. Outros lipídeos, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham papéis cruciais como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem radiações luminosas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (LEHNINGER, 1995).

As principais classes de lipídeos do leite estão apresentadas no Quadro 2. Nota-se que os triglicerídeos representam cerca de 98 % da composição dos lipídeos do leite. A maioria dos fosfolipídeos encontra-se na membrana do glóbulo de gordura (WASTRA et al., 1999).

## Quadro 2 – Composição dos lipídeos do leite de vaca.

<i>Classe dos lipídeos</i>	<i>Porcentagem</i>
Triglicerídeos	98,3
Diglicerídeos	0,30
Monoglicerídeos	0,03
Ácidos graxos livres	0,10
Fosfolipídeos	0,80
Colesterol	0,30
Ésteres de colesterol	0,02
Carotenóides + Vitamina A	0,002

Fonte: WALSTRA et al. (1999).

### 2.5 - Fosfolipídeos

Os fosfolipídeos, apesar das diferenças estruturais, são todos constituídos de uma região apolar de ácidos graxos e de uma região polar, que contém fosfato e outros grupos polares (MOTTA, 2005).

Dentre os constituintes da gordura do leite, os fosfolipídeos representam uma pequena quantidade, cerca de 0,2 % a 1 %, os quais diferem na estrutura da região polar. As cinco principais classes presentes são: fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), esfingomiéline (EM), que representam cerca de 90 % (m/m) do total, fosfatidilinositol (FI) e fosfatidilserina (FS), constituindo apenas frações 3 % a 7 % do total dos fosfolipídeos (FAGAN e WIJESUNDERA, 2004). As estruturas de dois principais fosfolipídeos, FC e FE estão apresentadas na Figura 1:

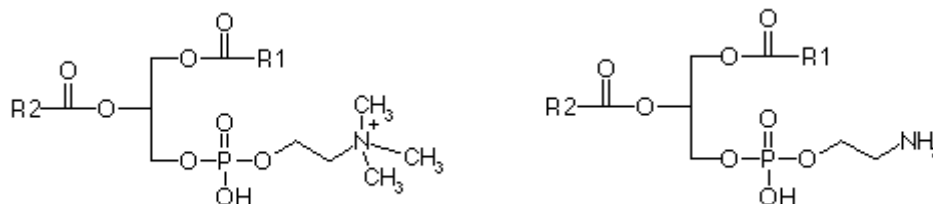


Figura 1 – Estrutura molecular do fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina.

A composição de fosfolipídeos do leite de vaca e as suas respectivas massas molares são apresentados no Quadro 3.

**Quadro 3** – Distribuição das classes de fosfolipídeos no leite de vaca e as respectivas massas molares.

<i>Classes de Fosfolipídeos</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Massa Molar</i>
Fosfatidilcolina	35	764
Fosfatidiletanolamina	32	742
Esfingomiéline	25	770
Fosfatidilinositol	5	855
Fosfatidilserina	3	784

*Fonte: Adaptado de CHRISTIE (1995) e WALSTRA et al. (1999).*

Vários destes fosfolipídeos podem atuar como agentes emulsionantes (compostos que promovem a dispersão coloidal de um líquido em outro) e agentes surfactantes (compostos que reduzem a tensão superficial em uma interface). Os fosfolipídeos exercem essas funções por serem moléculas anfifílicas.

Os fosfolipídeos estão presentes no leite integral, em uma concentração de 20 a 50 mg por 100g de leite. No leite fluido a concentração de fosfolipídeos totais é de sete a nove vezes maior do que no leite fluido desnatado, 120 a 180 mg por 100g de leite fluido contra 15 a 20 mg por 100g de leite fluido desnatado. Estas concentrações podem variar de acordo com os fatores ambientais, condições alimentares, estágio de lactação e condições de saúde dos animais (CHRISTIE et al., 1987).

BITMAN e WOOD (1990) realizaram estudos da composição do leite de vacas em diferentes dias de lactação, verificando que os triacilgliceróis, 96 % a 97 % do total de lipídeos, foram relativamente constantes durante toda a lactação. Fosfolipídeos e colesterol, que representam 1 % e 5 % do total de lipídeos, respectivamente, diminuíram com o avanço da lactação. As cinco principais classes de fosfolipídeos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e esfingomiéline), apesar da diminuição do conteúdo total, as

proporções relativas destas classes mantiveram constantes durante toda a lactação.

A concentração de fosfolipídeos, para produtos em pó, pode ser ainda afetada pelo processamento, incluindo separação do creme, aquecimento, agrupamento dos pequenos glóbulos de gordura e envelhecimento do pó (Walstra e Jenness, 1984, citado por RESMINI et al., 1988).

No leite e derivados, os fosfolipídeos estão concentrados principalmente na membrana do glóbulo de gordura e o restante encontra-se ligado à caseína (CHRISTIE, 1995). Durante o processamento de leite, a membrana do glóbulo de gordura pode ser rompida e os fosfolipídeos ficam, então, associados com a fase aquosa. Durante o processamento da manteiga, a maioria dos fosfolipídeos é liberada para o leitelho (CHRISTIE et al., 1987).

## **2.6 - Métodos de análises**

### **2.6.1 - Determinação espectrofotométrica de fosfolipídeos**

A determinação de fosfolipídeos do leite e derivados envolve diferentes etapas, dentre elas: extração de lipídeos; isolamento da fração de fosfolipídeos de outras classes de lipídeos; calcinação da matéria orgânica; preparo da solução mineral e quantificação do fósforo.

Para a quantificação dos fosfolipídeos totais determina-se, inicialmente, a concentração de fósforo por espectrofotometria e, então, converte-se os valores em equivalentes de fosfolipídeos totais (CZERNIAK e SZLYK, 2003).

Outros métodos foram propostos, tal como o método oficial da Comunidade Européia, que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (RESMINI et al., 1988). Apesar de ser um método sensível e sofisticado, a tecnologia empregada é muito cara, não sendo viável para análise de rotina.

## **2.6.2 - Métodos de extração da fração lipídica**

A extração lipídica é uma determinação importante em estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais dos mais diversos tipos de alimentos e, portanto, deve ser realizada com cautela. Algumas amostras requerem cuidados especiais para a obtenção da fração lipídica, pois fatores como oxidações indesejadas podem influenciar na qualidade final da fração lipídica. O procedimento clássico, no qual a amostra é submetida à extração em uma aparelhagem de vidro (idealizado por Soxhlet em 1879) com refluxo de solventes, por muitas horas, deve ser evitado, já que favorece as reações de peroxidação e de hidrólise (KATES, 1972). Outros métodos para extração lipídica foram propostos, tais como o método de Folch et al. (1956) e Bligh e Dyer (1959). Porém, um procedimento de extração efetivo, que supera amplamente as dificuldades citadas no método do Soxhlet, é o método Røese-Gottlieb, adotado como oficial pela IDF/FIL. O método IDF 1C (1987) é usado para leite fluido e leite em pó e o IDF 9C (1987) para leite em pó e leite em pó.

O procedimento de Røese-Gottlieb tem como base o uso de hidróxido de amônio para solubilizar as proteínas, neutralizar a acidez e reduzir a viscosidade; o uso do álcool para quebrar a emulsão lipídeos-caseína; e a mistura éter etílico e de petróleo para extrair os lipídeos. O éter de petróleo é usado para diminuir a solubilidade das substâncias não lipídicas solúveis em éter etílico (BRASIL, 2003).

## **2.6.3 - Determinação de fósforo**

Para determinação de um elemento mineral deve-se primeiro oxidar o material orgânico presente na amostra, convertendo-o para a forma inorgânica. Amostras contendo lipídeos são mais difíceis de oxidar (KOVACS, 1986).

Dependendo da amostra, a mineralização da matéria orgânica pode ser conduzida pela digestão úmida, onde os compostos orgânicos são oxidados a quente, utilizando ácidos fortes, tal como nítrico e perclórico, ou pela digestão seca, através da queima em mufla à temperatura entre 550 °C a 600 °C (GOMES et al., 2003).

RHEE e DUGAN (1967) verificaram que a concentração de ácido na digestão úmida é crítica para obter-se reprodutibilidade nas determinações de fósforo. O método requer um prolongado período de aquecimento, quando a amostra contém grande quantidade de matéria orgânica.

Estudo realizado por KOVACS (1986), em amostra de lipídeos de cereais para determinação de fósforo, mostrou que a correlação entre a adição e a recuperação de fósforo é mais eficiente quando a digestão seca é usada. O desvio-padrão e o coeficiente de variação foram altos para digestão úmida. O estudo mostrou que a digestão seca fornece resultados mais seguros, especialmente quando amostras são de difícil digestão, como as amostras que contem alta concentração de lipídeos.

Após a oxidação exaustiva da matéria orgânica, o elemento fósforo pode ser determinado por vários métodos espectrofotométricos, muitos dos quais baseados na reação do fósforo com molibdato de amônio, que, em meio ácido e na presença de um agente redutor adequado, produz fosfomolibdato de amônio. A quantidade de fósforo é determinada medindo-se a intensidade de cor azul, que é produzida pela formação de fosfomolibdato. A coloração azul é devida aos óxidos coloidais reduzidos de molibdato. A cor é estável em solução ácida (SILVA e QUEIROZ, 2005).

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA – UFV).

#### **3.1 - Amostras**

As amostras fluidas e em pó de leite desnatado e integral foram adquiridas em supermercados das cidades de Viçosa e Belo Horizonte, Minas Gerais. As amostras de leite fluido foram coletadas em seis indústrias de manteiga e congeladas em frascos de vidro, para posterior utilização. Uma amostra industrial do leite em pó foi obtida para as análises de fosfolípidos totais.

#### **3.2 - Metodologia**

##### **3.2.1 - Extração de lipídeos**

O método utilizado para extração de lipídeos das amostras fluidas e em pó foi o de Röese-Gottlieb (IDF 1C, 1987 e IDF 9C, 1987).

### 3.2.1.1 - Amostras fluidas

As amostras foram previamente aquecidas em banho-maria, com temperatura entre 35 °C e 40 °C durante 10 minutos, submetidas à agitação para uniforme distribuição de lipídeos e resfriadas para 20 °C. As amostras de leite desnatado foram pesadas à temperatura entre 30 °C e 40 °C. Em seguida, foram pesadas exatamente cerca de 10 g, em balança semi-analítica, de cada amostra diretamente nos frascos Mojonnier.

Para assegurar a extração de todo o material lipídico presente nas amostras, o processo foi realizado em duas etapas. Para realizar a primeira extração adicionou-se 2,0 mL de hidróxido de amônia (25 % m/m) e 10,0 mL de etanol (94 % v/v), misturando-se cuidadosamente, sem agitação forte. Adicionou-se 25,0 mL de éter etílico p.a e 25,0 mL de éter de petróleo p.a, agitando vigorosamente por 90 segundos a cada adição. Após a agitação, os frascos foram deixados em repouso durante 20 minutos e, em seguida, foi vertida a fração superior, contendo a mistura de éter no cadinho previamente aquecido em mufla a 550 °C durante 30 minutos, esfriado em dessecador e pesado em balança semi-analítica. Depois de vertida a fração superior, transferiu-se a mistura de éter para banho-maria a 45 °C.

Para realizar a segunda extração, adicionou-se 4,5 mL de etanol (94 % v/v), 15,0 mL de éter etílico p.a e 15,0 mL de éter de petróleo p.a, com o mesmo tempo de agitação da primeira extração. Os frascos foram deixados em repouso durante 20 minutos e, em seguida, a fração superior foi vertida novamente no mesmo cadinho utilizado na primeira extração. Transferiu-se para o banho-maria a 45 °C, para evaporar o éter. Após todo o éter ter sido evaporado, transferiu-se para estufa a  $102 \pm 2$  °C, por 1 hora. Os cadinhos contendo os lipídeos foram resfriados em dessecador e pesados em balança semi-analítica, para reportar o peso dos lipídeos. A operação acima foi repetida até peso constante. A porcentagem de lipídeos das amostras foi expressa segundo a equação:

$$\text{Porcentagem de lipídeos} = \frac{(\text{Peso do cadinho + gordura}) - (\text{Peso cadinho vazio})}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$



### **3.2.1.2 - Amostras em pó**

Foram pesados em balança semi-analítica de 1,00 g a 1,25 g das amostras de leite em pó integral e 1,50 g das amostras de leite em pó desnatado e leite em pó diretamente no frasco de extração. Adicionou-se 10,0 mL de água à temperatura de  $65 \pm 5$  °C nos frascos contendo amostras, agitou-se até a completa dissolução e resfriou-se para 20 °C.

O procedimento de extração de lipídeos do leite em pó e leite em pó foi o mesmo para amostras fluidas, exceto para o leite em pó, ao qual adicionou-se 3,0 mL de hidróxido de amônio (25 % m/m).

## **3.3 - Análise de fósforo**

### **3.3.1 - Calcinação da matéria orgânica**

Aos lipídeos extraídos e pesados, contidos no cadinho, foram adicionados de 2,0 mL a 3,0 mL de clorofórmio e 10,0 mL da solução de etanol 95 % (v/v), adicionado de 5 % de solução saturada de hidróxido de sódio, livre de carbonatos. Para decantar os carbonatos, a solução saturada de hidróxido de sódio foi mantida em repouso por 10 dias.

Os cadinhos foram transferidos para o banho-maria a temperatura entre 70 °C e 80 °C, para evaporar o solvente (AOAC, 1975), e em seguida, colocados em estufa a 60 °C, durante 1 hora, e a 105 °C por mais 1 hora. Depois da retirada da estufa, foram transferidos para a mufla e deixados a 250 °C por 2 horas e 550 °C a 600 °C por 3 horas. Foram adicionadas aos cadinhos 2 a 3 gotas de água oxigenada 10 volumes e levados novamente à mufla por tempo suficiente para ficarem brancas (aproximadamente 1 hora). Em seguida, foram resfriados em dessecador (BRASIL, 2003).

### **3.3.2 - Curva de calibração de fósforo**

A curva de calibração para cálculo da concentração de fósforo foi obtida adicionando-se 1,0 mL, 3,0 mL, 5,0 mL, 7,0 mL e 9,0 mL de solução 5 µg/mL de fósforo, preparada a partir de fosfato de sódio bibásico, no balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, adicionou-se 2 gotas de solução de p-nitrofenol (0,2 % m/v), usado como indicador de pH, gotas de solução de hidróxido de sódio 2 N ou ácido sulfúrico 2 N até neutralização, 2,0 mL da solução de molibdato de amônia (2 % m/v) e 1,0 mL de ácido ascórbico (2 % m/v). O volume foi completado com água destilada, seguida de mistura por inversão, e deixados em repouso por 20 minutos. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro UV mini-1240, Shimadzu, no comprimento de onda de 725 nm.

Para o preparo da solução de molibdato de amônia adicionou-se 500 mL de água destilada, 20,0 g de molibdato de amônio p.a e 1,0 g de subcarbonato de bismuto p.a em um béquer de 1000 mL. A solução foi aquecida e agitada até dissolução completa e, lentamente, adicionou-se 138,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Estando fria, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água destilada. O indicador p-nitrofenol, incolor em meio ácido e amarelo em meio básico, foi preparado, dissolvendo 0,2 g de p-nitrofenol em 100 mL de água destilada. Para preparo do ácido ascórbico foi dissolvido 2,0 g do ácido em 100 mL de água destilada. A validade da solução de ácido ascórbico é de apenas 60 minutos.

### **3.3.3 - Determinação espectrofotométrica**

O fósforo foi determinado usando o método modificado de Fisk e Subbarow (1925), conforme proposto por CHEN et al. (1956).

Após a calcinação das amostras, foram adicionadas 5 a 6 gotas de água destilada e 5,0 mL de solução de ácido nítrico (1+3 v/v). O resíduo foi lavado com água destilada, filtrado e o volume completado para 50 mL. Foram

pipetados 5,0 mL dos filtrados das amostras de leite fluido integral, leite em pó integral e leite em pó desnatado, 10,0 mL dos filtrados das amostras de leite fluido desnatado, 2,0 mL dos filtrados das amostras de leite fluido da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água e leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado e 1,0 mL do filtrado do leite em pó, transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, adicionou-se os reagentes na mesma quantidade usada para obtenção da curva de calibração. A concentração de fósforo foi calculada através da equação da reta obtida na curva de calibração.

### 3.4 - Determinação de fosfolipídeos

A concentração de fosfolipídeo total das amostras foi calculada com base na massa molar da fosfatidilcolina, o fosfolipídeo presente em maior quantidade no leite (CZERNIAK e SZLYK, 2003). A concentração de fosfolipídeos totais em miligrama por 100 g de amostra foi calculada através da seguinte equação:

$$FL_T \text{ (mg/100 g amostra)} = P \text{ (mg /100 g amostra)} \times \frac{PM_{FC}}{PM_P}$$

Em que:  $PM_{FC} = 764 \text{ g/mol}$

$PM_P = 31 \text{ g/mol}$

### 3.5 - Determinação do limite de detecção

O limite de detecção do método para cada tipo de leite foi estabelecido a partir da adição de diferentes concentrações (2, 4, 6, 8) % de leite. Foram realizadas três repetições para o leite fluido desnatado, leite fluido integral, leite em pó desnatado e leite em pó integral.

### 3.6 - Determinação de sólidos totais

Para determinação de sólidos totais as amostras de leite fluido provenientes da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água e leite desnatado foram aquecidas à temperatura na faixa de 30 °C a 40 °C para facilitar a dispersão da gordura, misturadas lentamente para homogeneização e resfriadas para 20 °C a 25 °C. Em seguida pesou-se 2,5 g a 3,0 g das amostras em placas de Petri previamente aquecidas em estufa a  $102 \pm 2$  °C, resfriadas em dessecador por 30 minutos e taradas em balança semi-analítica. As placas foram transferidas para estufa a  $102 \pm 2$  °C por 2 horas, resfriadas por 30 minutos em dessecador e pesadas em balança semi-analítica. Repetiu-se a operação acima até peso constante (IDF 21 A, 1982). A concentração de sólidos totais foi calculada usando a fórmula abaixo:

$$\text{Porcentagem de extrato seco total} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Em que:  $m_0$  = massa (g) da placa de Petri

$m_1$  = massa (g) da amostra + placa de Petri

$m_2$  = massa (g) da amostra seca + placa de Petri

### 3.7 - Análises estatísticas

A determinação da precisão da metodologia foi baseada no coeficiente de variação de 30 repetições realizadas com uma única amostra de leite fluido desnatado e uma única de leite fluido proveniente da bateção industrial de creme padronizado para 40 % de gordura com leite desnatado.

Para determinação da concentração de fosfolípidos totais, foram analisadas amostras de leite fluido desnatado (n=26), leite fluido integral (n=32), leite em pó desnatado (n=20), leite em pó integral (n=23), leite fluido

proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16), leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (n =11) e leite em pó (n=1). Todas as análises físico-químicas das amostras foram realizadas em triplicatas.

Depois de determinada a concentração média de fosfolipídeos totais para cada tipo de leite e leiteiro foi realizado o teste de Lilliefors no SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética) versão 9.0, com o objetivo de verificar a normalidade das concentrações de fosfolipídeos totais determinadas.

O limite máximo da quantidade de fosfolipídeos totais foi proposto com base na concentração média de fosfolipídeos totais das amostras de leite desnatado e integral, ambos fluidos e em pó. Conforme RESMINI et al. (1988), amostras com concentração de fosfolipídeos totais superiores a concentração média das amostras de leite analisadas somada a três vezes o desvio-padrão ( $p < 0,01$ ) podem ser consideradas como adicionadas de leiteiro.

Foi somada a concentração três vezes o desvio-padrão, pois pode-se observar na Figura 2 - B, que a probabilidade de rejeitar uma amostra que não esteja adulterada é menor ( $p < 0,01$ ) quando comparada à média mais duas vezes o desvio-padrão ( $p < 0,05$ ), conforme apresentado na Figura 2 - A.

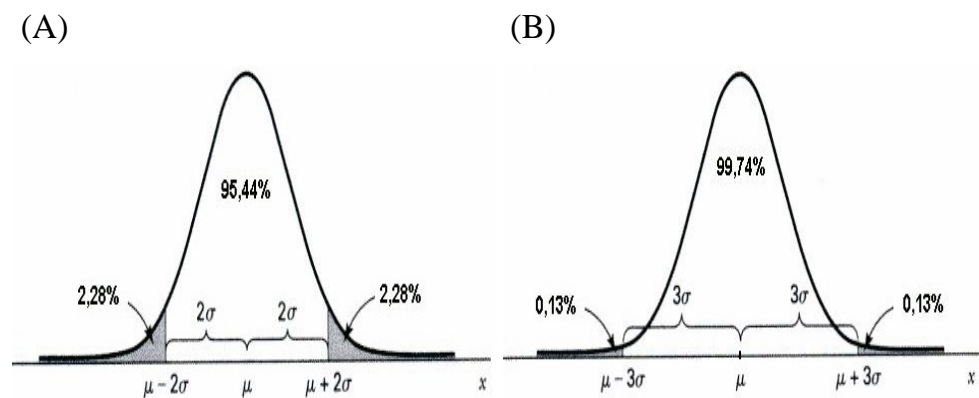


Figura 2 - Distribuição normal, sendo  $\mu$  a média e  $s$  o desvio-padrão.

Os resultados das concentrações de fosfolipídeos totais obtidos nas amostras de leiteiro fluido provenientes da bateção do creme com o teor de

gordura padronizado com água e com leite desnatado foram submetidos ao teste t a um nível de significância de 5 % no SAEG, com o objetivo de verificar se existe diferença significativa entre as médias de concentração de fosfolipídeos totais (mg/100 g de sólidos totais).

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Determinação de lipídeos

As médias dos resultados obtidos na extração de lipídeos pelo método de Röese-Gottlieb para cada tipo de leite e leiteiro analisados encontram-se no Quadro 4.

**Quadro 4** – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) em leite fluido desnatado (LD), leite fluido integral (LI), leite em pó desnatado (LPD), leite em pó integral (LPI), leiteiro fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (LTA), leiteiro fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (LTL) e leiteiro em pó (LTP).

Leite/Leiteiro	n	% Média lipídeos $\pm$ DP	Padrões estabelecidos pela legislação (% m/m)
LD	26	0,15 $\pm$ 0,06	Máximo 0,5
LI	32	3,12 $\pm$ 0,11	Mínimo 3,0
LPD	20	1,32 $\pm$ 0,29	Menor que 1,50
LPI	23	26,37 $\pm$ 0,82	Maior ou igual a 26,0
LTA	16	1,50 $\pm$ 0,86	Máximo 2,0
LTL	11	1,76 $\pm$ 0,97	Máximo 2,0
LTP*	1	9,34 $\pm$ 0,05	—

\* análise em triplicata

Pode-se observar no Quadro 4 que a média das concentrações de lipídeos em % (m/m) nas amostras de leite fluido desnatado, leite fluido integral, leite em pó desnatado e leite em pó integral, encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL 1997a, BRASIL 1997b e BRASIL, 2002).

Na amostra de leite em pó a concentração de lipídeos proveniente da análise em triplicata foi de 9,34 %. RESMINI et al. (1988) fizeram determinações da concentração de lipídeos em 35 amostras de leite em pó, com o objetivo de quantificar fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); verificaram que a concentração de lipídeos variou de 4 % a 11 %.

A concentração média de lipídeos encontrada no leite em pó proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água e leite em pó proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado foram 1,50 % e 1,76 %, respectivamente (Quadro 4). Estes valores médios da concentração de lipídeos estão dentro do limite estabelecido pela legislação, que deve ser, no máximo, 2 % (BRASIL, 1950).

Porém, duas amostras de leite em pó proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água e três amostras de leite em pó proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado apresentam valores acima do limite estabelecido (Quadro 5 e 6).



**Quadro 5** – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16).

<b>n</b>	<b>% lipídeos* ± DP</b>
1	0,81 ± 0,01
2	0,84 ± 0,01
3	3,55 ± 0,01**
4	1,39 ± 0,02
5	1,94 ± 0,01
6	1,56 ± 0,01
7	1,02 ± 0,01
8	1,07 ± 0,01
9	1,30 ± 0,01
10	1,45 ± 0,01
11	0,66 ± 0,01
12	3,45 ± 0,02**
13	1,52 ± 0,04
14	1,53 ± 0,04
15	1,05 ± 0,01
16	0,80 ± 0,01

\* análises em triplicata

\*\* Amostras com concentração de lipídeos acima de 2 %.

**Quadro 6** – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (n=11).

<b>n</b>	<b>Média % lipídeos* ± DP</b>
1	0,88 ± 0,01
2	1,16 ± 0,17
3	2,67 ± 0,02**
4	1,24 ± 0,01
5	1,46 ± 0,01
6	0,85 ± 0,02
7	1,15 ± 0,02
8	1,60 ± 0,07
9	3,51 ± 0,07**
10	1,45 ± 0,02
11	3,43 ± 0,01**

\* análise em triplicata

\*\* Amostras com concentração de lipídeos acima de 2 %.

As concentrações de lipídeos superiores a 2 % em algumas amostras de leite podem ser justificadas pelo processo de fabricação da manteiga, que não foram totalmente controlados. O creme para bateção deve estar com a concentração de gordura entre 36 % e 40 %, com a temperatura de bateção entre 8,9 °C e 11,1 °C, no verão, e entre 11,7 °C e 15,5 °C, no inverno (WILSTER, 1957). Em temperaturas elevadas, a perda de gordura no leite tende a ser maior, fazendo com que a manteiga apresente textura graxenta (corpo fraco) e excesso de água livre. Temperaturas de bateção inferiores a 8,9 °C tende a aumentar o tempo de bateção, porque existe pouca gordura líquida. Neste caso, a manteiga apresenta textura dura e quebradiça, o que irá dificultar a incorporação de água e sal além da tendência da formação de manteiga com grãos pequenos (MULVA, 1970).

Outros fatores podem também estar relacionados à perda de lipídeos no leite, como por exemplo, o creme mantido durante pouco tempo à temperatura de bateção, pasteurização de creme ácido, excesso de creme na batedeira e término antecipado da bateção, ou seja, quando os grãos de manteiga são ainda muito pequenos (MULVA, 1970).

#### **4.2 - Determinação da precisão da metodologia**

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) encontrados nas trinta repetições realizadas em uma única amostra de leite fluido desnatado e uma única amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado são apresentados no Quadro 7.

**Quadro 7** – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) de 30 repetições realizadas em uma única amostra de leite fluido desnatado e uma única amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado.

Leite/ Leiteiro	Concentração média de FL <sub>T</sub> * ± DP	CV (%)
LD	14,88 ± 0,51	3,43
LTL	233,58 ± 8,45	3,62

\* 30 repetições

Podemos observar que as médias encontradas para o LD e LTL foram 14,88 mg/100 g e 233,60 mg/100 g, respectivamente. O coeficiente de variação para o LD e para o LTL foram muito próximos, 3,43 e 3,62, respectivamente e também podem ser considerados baixos. Coeficiente de variação inferior a 5,0 em análises laboratoriais é considerado baixo (ANVISA, 2006).

### 4.3 - Determinação de fosfolipídeos totais

A equação da reta encontrada para curva de calibração usada na determinação da quantidade de fósforo em função da absorbância a 725 nm foi de  $Y = 0,4595X + 0,0024$ , em que Y representa a leitura da absorbância no espectrofotômetro e X a concentração de fósforo em micrograma por mililitro de solução mineral. O coeficiente de regressão linear foi  $R^2 = 0,9999$ .

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das 26 amostras de leite fluido desnatado analisadas variaram entre 12,92 mg/100 g e 19,60 mg/100 g (Quadro 8). O valor mínimo encontrado foi 12,69 mg/100 g e o valor máximo foi 19,97 mg/100 g.

**Quadro 8** – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido desnatado (n=26).

<b>n</b>	<b>Média* ± DP</b>
1	19,60 ± 0,51
2	17,40 ± 0,80
3	14,82 ± 0,26
4	17,22 ± 0,35
5	15,86 ± 0,17
6	16,74 ± 0,68
7	17,34 ± 0,41
8	16,81 ± 0,14
9	18,74 ± 0,60
10	17,18 ± 0,78
11	17,63 ± 0,28
12	16,75 ± 0,53
13	13,68 ± 0,27
14	18,69 ± 0,61
15	16,86 ± 0,10
16	15,79 ± 0,37
17	14,59 ± 0,49
18	15,61 ± 0,27
19	14,48 ± 0,14
20	14,28 ± 0,49
21	14,84 ± 0,17
22	13,21 ± 0,34
23	12,92 ± 0,28
24	16,54 ± 0,48
25	17,06 ± 0,63
26	18,88 ± 0,14

\* análises em triplicata

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das 32 amostras de leite fluido integral analisadas variaram entre 25,47 mg/100 g e 34,72 mg/100 g (Quadro 9). O valor mínimo encontrado foi 24,29 mg/100 g e o valor máximo foi 35,03 mg/100 g.

**Quadro 9** – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido integral (n=32).

<b>n</b>	<b>Média* ± DP</b>
1	29,46 + 0,14
2	30,14 ± 0,14
3	34,62 ± 0,36
4	34,72 ± 0,28
5	29,41 ± 0,28
6	31,09 ± 0,13
7	26,92 ± 0,08
8	27,28 ± 0,14
9	26,69 ± 0,34
10	25,65 ± 0,27
11	29,73 ± 0,41
12	29,91 ± 0,28
13	26,51 ± 0,42
14	26,32 ± 0,15
15	26,97 ± 0,42
16	25,74 ± 0,21
17	27,60 ± 0,21
18	28,51 ± 0,41
19	30,14 ± 0,14
20	28,10 ± 0,14
21	30,00 ± 0,22
22	28,86 ± 0,08
23	26,42 ± 0,21
24	26,88 ± 0,14
25	28,82 ± 0,34
26	29,50 ± 0,21
27	32,59 ± 0,49
28	29,23 ± 0,77
29	25,97 ± 0,98
30	32,22 ± 0,44
31	28,10 ± 0,89
32	25,47 ± 1,06

\* análises em triplicata

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das 20 amostras de leite em pó desnatado analisadas variaram entre 124,40 mg/100 g e 187,51 mg/100 g (Quadro 10). O valor mínimo encontrado foi 122,04 mg/100 g e o valor máximo foi 192,70 mg/100 g.

**Quadro 10** – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite em pó desnatado (n=20).

<b>n</b>	<b>Média* ± DP</b>
1	162,73 ± 4,21
2	169,47 ± 4,43
3	174,26 ± 4,64
4	163,40 ± 3,70
5	169,43 ± 5,32
6	178,20 ± 2,72
7	156,74 ± 4,06
8	187,51 ± 5,04
9	167,59 ± 5,28
10	164,39 ± 2,72
11	177,28 ± 5,42
12	142,56 ± 2,76
13	127,41 ± 2,72
14	129,23 ± 2,68
15	140,70 ± 3,20
16	124,40 ± 2,23
17	130,45 ± 2,82
18	170,63 ± 4,66
19	169,43 ± 3,00
20	176,68 ± 2,59

\* análises em triplicata

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das 23 amostras de leite em pó integral analisadas variaram entre 195,31 mg/100 g e 292,40 mg/100 g (Quadro 11). O valor mínimo encontrado foi 191,19 mg/100 g e o valor máximo foi 295,63 mg/100 g.

**Quadro 11** – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite em pó integral (n=23).

<b>n</b>	<b>Média* ± DP</b>
1	282,28 ± 7,29
2	223,32 ± 8,64
3	233,31 ± 6,71
4	289,86 ± 10,8
5	292,40 ± 3,06
6	272,72 ± 7,37
7	227,41 ± 3,27
8	264,80 ± 8,09
9	241,23 ± 5,83
10	260,40 ± 6,36
11	266,78 ± 3,18
12	260,24 ± 4,84
13	219,95 ± 4,96
14	225,18 ± 6,73
15	225,18 ± 4,31
16	218,00 ± 4,44
17	219,95 ± 5,43
18	195,31 ± 5,09
19	276,62 ± 9,44
20	198,40 ± 4,38
21	201,25 ± 5,84
22	219,00 ± 8,48
23	196,43 ± 6,15

\* análises em triplicata

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das 16 amostras de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água analisadas variaram entre 74,56 mg/100 g e 183,02 mg/100 g (Quadro 12). O valor mínimo encontrado foi 73,65 mg/100 g e o valor máximo foi 183,47 mg/100 g.

**Quadro 12** – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16).

<b>n</b>	<b>Média* ± DP</b>
1	128,85 ± 1,04
2	129,75 ± 0,90
3	183,02 ± 0,78**
4	132,48 ± 1,80
5	136,78 ± 0,39
6	114,45 ± 2,04**
7	111,16 ± 0,20**
8	74,56 ± 1,04**
9	84,30 ± 1,37**
10	122,95 ± 1,22
11	85,10 ± 1,04**
12	130,54 ± 4,43
13	121,25 ± 2,66
14	127,41 ± 3,09
15	111,16 ± 0,71**
16	108,00 ± 2,91**

\* análises em triplicata.

\*\* Amostras com concentração de fosfolipídeos totais (mg/100 g) abaixo de 120 g/100 g de amostra e acima de 180 mg/100 g de amostra (CHRISTIE et al., 1987).

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das 11 amostras de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado analisadas variaram entre 132,46 mg/100 g e 233,23 mg/100 g (Quadro 13). O valor mínimo encontrado foi 131,10 mg/100 g e o valor máximo foi 236,50 mg/100 g.



**Quadro 13** – Concentração média de fosfolipídeos totais expressa em mg/100 g de cada amostra de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (n=11).

<b>n</b>	<b>Média* ± DP</b>
1	183,47 ± 2,04**
2	187,21 ± 3,24**
3	233,23 ± 3,08**
4	174,29 ± 2,57
5	223,04 ± 2,89**
6	154,35 ± 2,32
7	212,15 ± 3,24**
8	185,28 ± 0,40**
9	158,99 ± 2,45
10	132,46 ± 1,80
11	157,06 ± 2,47

\* análises em triplicata.

\*\* Amostras com concentração de fosfolipídeos totais (mg/100 g) acima de 180 g/100 g de amostra (CHRISTIE et al., 1987).

O resultado da concentração média de fosfolipídeos totais expresso em mg/100 g para cada tipo leite e leite fluido analisados são apresentados no Quadro 14.

**Quadro 14** – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) em leite fluido desnatado (LD), leite fluido integral (LI), leite em pó desnatado (LPD), leite em pó integral (LPI), leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (LTA), leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (LTL) e leite em pó (LTP).

<b>Leite/Leitelho</b>	<b>n</b>	<b>Média ± DP</b>
LD	26	16,29 ± 1,79
LI	32	28,87 ± 2,44
LPD	20	159,12 ± 19,42
LPI	23	239,57 ± 31,16
LTA	16	118,86 ± 25,33
LTL	11	181,96 ± 31,12
LTP*	1	1309,62 ± 27,36

\* análise em triplicata

A concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) obtida nas amostras de leite fluido desnatado encontra-se dentro dos valores citados por CHRISTIE et al. (1987), em que a concentração de fosfolipídeos totais variou de 15 a 20 mg/100 g.

A concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) encontrada nas amostras de LTA e de LTL foi aproximadamente 7 e 11 vezes, respectivamente, maior que encontrada no leite fluido desnatado. Os valores encontrados foram próximos àqueles citados por CHRISTIE et al. (1987), em que a concentração de fosfolipídeos totais no leite em pó foi 7 a 9 vezes maior que no leite desnatado.

Nas amostras de leite fluido integral a concentração média de fosfolipídeos totais foi de aproximadamente, 4 e 6 vezes menor que aquela determinada em LTA e LTL, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os resultados obtidos por CHRISTIE et al. (1987) em leite integral analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde foram obtidas concentrações de fosfolipídeos totais variando de 20 a 50 mg/100 g.

Nas amostras de leite em pó integral a concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) foi de 239,57, ou seja, 5,5 vezes menor do que no leite em pó (Quadro 14).

RESMINI et al. (1988) fizeram quantificação de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina em 27 amostras de leite em pó desnatado e 35 amostras de leite em pó, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Devido à indisponibilidade de padrões comerciais de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, as áreas calculadas nos cromatogramas foram convertidas para fosfatidiletanolamina dipalmitol (FEDP) usado como padrão externo.

A variação da concentração de FS e FE expressa em FEDP mg/100 g encontrada por RESMINI et al. (1988) foi de 36,7 a 57,3 nas amostras de leite em pó desnatado e 241,3 a 544,6 nas amostras de leite em pó.

Supondo que a concentração de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina representa de 30 a 35 % da quantidade total de fosfolipídeos totais, a variação de fosfolipídeos totais no leite em pó desnatado é de 112,9 a 176,3 mg/100 g de pó e no leite em pó de 742,5 a 1676,0 mg/100 g de pó. Ou seja, os valores obtidos para leite em pó desnatado e leite em pó (Quadro 14) encontram-se dentro da faixa citada por RESMINI et al. (1988).

Nas amostras de leite em pó desnatado a concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) encontrada foi de 159,12 e na amostra de leite em pó a média da análise em triplicata foi de 1309,62 (Quadro 14). Foi encontrada uma quantidade de fosfolipídeos totais cerca de 8 vezes maior no leite em pó quando comparada ao leite em pó desnatado, confirmando a relação de 8:1 citada por RESMINI et al. (1988), apesar de terem sido usados métodos diferentes para determinação da concentração de fosfolipídeos totais.

Nas amostras de LTA e LTL, os valores da concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g), representados no Quadro 14, foram próximos dos citados por CHRISTIE et al. (1987), em que a concentração de fosfolipídeos totais no leite fluido variou de 120 a 180 mg/100 g. Porém, uma amostra de LTA está acima de 180 mg/100 g e sete estão abaixo de 120 mg/100 g (Quadro 12). Nas amostras de LTL, seis estão acima de 180 mg/100 g (Quadro 13). Essa

concentração de fosfolipídeos totais superior a 180 mg/100 g nas seis amostras de LTL pode ser justificada pela presença de fosfolipídeos no leite desnatado que migram para o leite durante a fabricação da manteiga.

#### 4.4 - Teste de Lilliefors

Os resultados do teste de Lilliefors usado na avaliação da normalidade das concentrações de fosfolipídeos totais determinadas nas análises encontram-se no Quadro 15.

**Quadro 15** – Resultado do teste de Lilliefors para cada tipo de leite analisado.

Variáveis	Valor Calculado
LD	0,099
LI	0,126
LPD	0,174
LPI	0,173

Valor tabelado  $5\% = 0,180$ .

De acordo com os resultados do teste de Lilliefors a um nível de significância de 5 %, a concentração média de fosfolipídeos totais apresenta distribuição normal, pois os valores calculados foram todos menores que os tabelados.

Conforme RESMINI et al. (1988) pode-se considerar que os teores de fosfolipídeos totais das amostras de leite que forem submetidas à análise seguindo a metodologia descrita, que apresentarem resultados acima da concentração média para cada tipo de leite mais três vezes o desvio-padrão ( $p < 0,01$ ), podem ser consideradas como adicionadas de leite.

#### **4.5 - Determinação do limite de detecção da adição de leite ao leite.**

Para determinação do limite de detecção da adição de leite em leite foram realizadas três repetições de diferentes concentrações de leite, com (2, 4, 6, 8) % em leite fluido desnatado, leite fluido integral, leite em pó desnatado e leite em pó integral.

##### **4.5.1 - Adição de leite fluido em leite fluido desnatado**

Os resultados da concentração média de fosfolípidos totais das três repetições realizadas em leite fluido desnatado com adição de (2, 4, 6, 8) % de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado encontram-se no Quadro 16. Assumindo que a média da concentração de fosfolípidos totais para o leite fluido desnatado mais três vezes o desvio-padrão é igual 21,66 mg/100 g, podemos confirmar a presença de leite ( $p < 0,01$ ) quando uma concentração superior de fosfolípidos totais for encontrada. Pelos resultados encontrados, é confirmada a adulteração se 2,60 % (m/m) de leite estiverem presentes no leite fluido desnatado (Quadro 16), ou seja, quando a concentração de fosfolípidos totais for superior a 21,66 mg/100 g amostra. Nenhuma das amostras de leite fluido desnatado analisadas apresentou valor acima de 21,66 mg/100 g (Quadro 8).

**Quadro 16** – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leite em leite fluido desnatado.

% de LTL no LD	mg/100 g amostra	
	Média estimada*	Média real* ± DP
0%	—	17,54 ± 0,57
2%	20,70	19,58 ± 0,93
4%	23,86	22,89 ± 0,41
6%	27,02	25,70 ± 0,42
8%	30,19	27,83 ± 0,62
100%	—	175,66 ± 1,56

\* três repetições.

#### 4.5.2 - Adição de leite fluido em leite fluido integral

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das três repetições realizadas em leite fluido integral com adições de (2, 4, 6, 8) % de leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado encontram-se no Quadro 17. Assumindo que a média da concentração de fosfolipídeos totais para o leite fluido integral mais três vezes o desvio-padrão é igual a 36,19 mg/100 g, podemos confirmar a presença de leite (p < 0,01) quando uma concentração superior de fosfolipídeos totais for encontrada. Pelos resultados encontrados é confirmada a adulteração se 5,46 % (m/m) de leite estiverem presentes no leite fluido integral (Quadro 17), ou seja, quando a concentração de fosfolipídeos totais for superior a 36,19 mg/100 g amostra. Nenhuma das amostras de leite fluido integral analisadas apresentou valor acima de 36,19 mg/100 g (Quadro 9).

**Quadro 17** – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leite em leite fluido integral.

% de LTL no LI	mg/100 g amostra	
	Média estimada*	Média real*± DP
0%	—	28,19 ± 0,52
2%	31,12	30,05 ± 0,79
4%	34,05	32,86 ± 1,09
6%	37,00	35,40 ± 1,33
8%	39,91	38,39 ± 0,80
100%	—	174,64 ± 1,02

\* três repetições.

#### 4.5.3 - Adição de leite em pó em leite em pó desnatado

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das três repetições realizadas em leite em pó desnatado com adição de (2, 4, 6, 8) % de leite em pó são apresentados no Quadro 18. Assumindo que a média da concentração de fosfolipídeos totais para o leite em pó desnatado mais três vezes o desvio-padrão é igual a 217,38 mg/100 g, podemos confirmar a presença de leite em pó ( $p < 0,01$ ) quando uma concentração superior de fosfolipídeos totais for encontrada. Pelos resultados encontrados é confirmada a adulteração se 6,41 % (m/m) de leite em pó estiverem presentes no leite em pó desnatado (Quadro 18), ou seja, quando a concentração de fosfolipídeos totais for superior a 217,38 mg/100 g amostra. Nenhuma das amostras de leite em pó desnatado analisadas apresentou valor acima de 217,38 mg/100 g (Quadro 10).

De acordo com as análises cromatográficas para determinação de fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina em leite em pó desnatado e leite em pó realizadas por RESMINI et al. (1988) foi proposto que 3 % da adição de leite em pó em leite em pó desnatado é considerada como adulteração. Porém os autores sugeriram uma confirmação dos dados com um maior número de análises.

**Quadro 18** – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leite em pó desnatado.

% de LTP no LPD	mg/100 g amostra	
	Média estimada*	Média real*± DP
0%	—	141,05 ± 3,26
2%	164,84	155,00 ± 6,92
4%	188,39	183,66 ± 5,65
6%	212,43	203,31 ± 7,69
8%	236,23	226,90 ± 6,16
100%	—	1330,75 ± 27,33

\* três repetições.

#### 4.5.4 - Adição de leite em pó em leite em pó integral

Os resultados da concentração média de fosfolipídeos totais das três repetições realizadas em leite em pó integral com adição de (2, 4, 6, 8) % de leite em pó são apresentados no Quadro 19. Assumindo que a média da concentração de fosfolipídeos totais para o leite em pó integral mais três vezes o desvio-padrão é igual a 333,05 mg/100 g, podemos confirmar a presença de leite em pó (p < 0,01) quando uma concentração superior de fosfolipídeos totais for encontrada. Pelos resultados encontrados é confirmada a adulteração se 5,86 % (m/m) de leite em pó estiverem presentes no leite em pó integral (Quadro 19), ou seja, quando a concentração de fosfolipídeos totais for superior a 333,05 mg/100 g amostra. Nenhuma das amostras de leite em pó integral analisadas apresentou valor acima de 333,05 mg/100 g (Quadro 11).



**Quadro 19** – Concentração média de fosfolipídeos totais (mg/100 g) para diferentes adições de leiteiro realizadas no leite em pó integral.

% de LTP no LPI	mg/100 g amostra	
	Média estimada*	Média real*± DP
0%	—	271,08 ± 5,76
2%	292,24	284,40 ± 7,14
4%	313,41	300,17 ± 6,75
6%	334,57	328,55 ± 5,45
8%	355,74	346,29 ± 8,27
100%	—	1329,29 ± 22,22

\* três repetições.

#### 4.6 - Determinação de sólidos totais

Como as amostras de leiteiro fluido analisadas foram provenientes da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16) e leite desnatado (n=11), foi determinado o conteúdo de sólidos totais para converter os valores de fosfolipídeos totais dos leitelhos fluidos (mg/100 g amostra) em valores expressos em mg/100 g de sólidos totais. Os resultados das análises de sólidos totais (ST) realizadas em duplicatas do LTA e LTL e os valores de fosfolipídeos totais expressos em mg/100 g de leiteiro fluido e mg/100 g de sólidos totais estão apresentados nos Quadros 20 e 21, respectivamente.

**Quadro 20** – Resultados da concentração média de sólidos totais (% m/m), fosfolipídeos totais expressos em mg/100 g leiteiro fluido e em mg/100 g sólidos totais nas amostras de leiteiro fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com água (n=16).

<b>n</b>	<b>% (m/m) Sólidos Totais *</b>	<b>Fosfolipídeos Totais (mg/100 g leiteiro fluido) **</b>	<b>Fosfolipídeos Totais (mg/100 g sólidos totais)</b>
1	6,12	128,85	2105,39
2	7,04	129,75	1843,04
3	8,79	183,02	2082,14
4	7,23	132,48	1832,37
5	7,28	136,78	1878,85
6	5,24	114,45	2183,21
7	5,01	111,16	2218,76
8	4,62	74,56	1613,85
9	4,83	84,30	1745,34
10	6,09	122,95	2018,88
11	3,75	85,10	2269,33
12	7,94	130,54	1644,08
13	6,63	121,25	1828,81
14	6,78	127,41	1879,20
15	5,25	111,16	2117,33
16	5,06	107,99	2134,19
<b>Média</b>	<b>6,10</b>	<b>118,86</b>	<b>1962,17</b>

\* análises em duplicatas

\*\* análises em triplicatas

**Quadro 21** – Resultado da concentração média de sólidos totais (% m/m), fosfolipídeos totais expressos em mg/100 g leiteiro fluido e em mg/100 g sólidos totais nas amostras de leiteiro fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite desnatado (n=11).

<b>n</b>	<b>% (m/m) Sólidos Totais *</b>	<b>Fosfolipídeos Totais (mg/100 g leiteiro fluido) **</b>	<b>Fosfolipídeos Totais (mg/100 g sólidos totais)</b>
1	8,49	183,47	2161,01
2	8,56	187,21	2187,03
3	10,0	233,23	2332,30
4	8,65	174,30	2015,03
5	9,41	223,04	2370,24
6	7,94	154,35	1943,58
7	8,47	212,15	2504,72
8	8,05	185,28	2301,61
9	7,62	158,99	2086,48
10	6,96	132,46	1903,16
11	7,97	157,05	1970,51
<b>Média</b>	<b>8,38</b>	<b>181,96</b>	<b>2161,43</b>

\* análises em duplicata

\*\* análises em triplicatas

A média da concentração de fosfolipídeos totais (mg/100 g sólidos totais) nos leitelhos fluidos expressa em mg/100 g sólidos totais está apresentada no Quadro 22.

**Quadro 22** – Resultado das concentrações médias de fosfolipídeos totais (mg/100 g sólidos totais).

<b>Leitelho</b>	<b>n</b>	<b>Média ± DP</b>
LTA	16	1962,17 ± 205,43
LTL	11	2161,43 ± 197,13

De acordo com os resultados do teste t a um nível de significância de 5 %, a concentração média de fosfolídeos totais nas amostras de LTA e LTL apresentam diferença significativa, ou seja, o LTL apresenta uma maior concentração de fosfolídeos totais quando comparado ao LTA.

## 5 - CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no trabalho, pode-se concluir que:

1) O método para análise de fosfolipídeos totais apresentou boa precisão, pois os valores obtidos na determinação do coeficiente de variação foram considerados baixos.

2) O limite padrão máximo da concentração de fosfolipídeos totais para o leite fluido desnatado, leite fluido integral, leite em pó desnatado e leite em pó integral foi de 21,66 mg/100 g, 36,19 mg/100 g, 217,38 mg/100 g, 333,05 mg/100 g, respectivamente. Ou seja, amostras que apresentarem concentração de fosfolipídeos totais superiores à média mais três vezes o desvio-padrão podem ser consideradas como adicionadas de leite.

3) Uma adição de 2,60 % (m/m), 5,46 % (m/m), 6,41 % (m/m) e 5,86 % (m/m) de leite no leite fluido desnatado, leite fluido integral, leite em pó desnatado e leite em pó integral, respectivamente, podem ser considerados com concentração de fosfolipídeos totais acima do valor médio somado a três vezes o desvio-padrão.

4) A maior concentração de fosfolipídeos totais presente no leite fluido proveniente da bateção do creme com o teor de gordura padronizado com leite

desnatado, com base no teste t, é devido aos fosfolipídeos presentes no leite desnatado que migram para a fração do leitelho durante inversão de fase do creme para fabricação da manteiga.

## **6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ainda não se tem informação da frequência da adulteração de leite fluido e em pó no Brasil. Porém sabe-se que o leite em pó é produzido principalmente na Europa e nos Estados Unidos, e empresas no Brasil importam este produto. Torna-se necessário que medidas controladas sejam tomadas para evitar que o consumidor não seja lesado, adquirindo leite adicionado de leite em pó ao preço de leite e para que a concorrência entre as empresas seja justa e leal.

Fica a sugestão ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) de estabelecer padrões máximos de fosfolípidos em leite fluido e em leite em pó.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMIK K.; SALAZAR J. **Métodos modernos de fabricação de manteiga**. Universidade Federal de Viçosa, 1976. 141p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso em: jun. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12.ed. Washington: AOAC, 1975.

ASTAIRE, J.C. **Microfiltration and supercritical fluid extraction of buttermilk to concentrate biological lipid messengers**. 2002. 145 p. Thesis (Agriculture Sciences Department) – California Polytechnic State University, San Luis Obispo.

BITMAN, J.; WOOD, D.L. Changes in milk fat phospholipids during lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1208-1216, 1990.

BRASIL. Lei n. 1.283, de 18 de dezembro de 1950, art. 687. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 19 de dezembro de 1950.

BRASIL. Decreto-Lei n. 30691, de 29 de março de 1952. Aprova novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 07 de julho de 1952.

BRASIL a. Portaria n. 369, de 4 de setembro de 1997. Aprova a inclusão de coadjuvante de tecnologia/elaboração no regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de leite em pó. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997.



BRASIL b. Portaria n. 370, de 4 de setembro de 1997. Aprova a inclusão de citrato de sódio no regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite U.H.T (U.A.T). **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997.

BRASIL. Decreto-lei n. 9677, de 2 de julho de 1998. Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra saúde pública, e dá outras providências. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 03 de julho de 1998.

BRASIL. Portaria n. 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os 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. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 08 de outubro de 2002.

BRASIL. Instrução normativa n. 22, 2 de maio de 2003. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, DF, 02 de maio de 2003.

CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1756-1758, 1956.

CHRISTIE, W.W.; NOBLE, R.C.; DAVIES, G. Phospholipids in milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.40, p. 10 -12, 1987.

CHRISTIE, W.W. **Advanced dairy chemistry - 2: Lipids**. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1995. 443 p.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D.G. Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 441-449, 1996.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D.G. Isolates from industrial buttermilk: emulsifying properties of materials derived from the milk fat globule membrane. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4595-4600, 1997.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D.G. Buttermilk properties in emulsions with soybean oil as affected by fat globule membrane – derived proteins. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 476-480, 1998.

CORREDIG, M.; ROESCH, R.R.; DALGLEISH, D.G. Production of a novel ingredient from buttermilk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2744-2750, 2003.

CZERNIAK, S.A.; SZLYK, E. Spectrophotometric determination of total phosphorus in rape seeds and oils at various stages of technological process: calculation of phospholipids and non-hydratable phospholipids contents in rapessed oil. **Food Chemistry**, v. 81, p. 613-619, 2003.

DARLING, D.F.; BUTCHER, D.W. Milk fat-globule membrane in homogenized cream. **Journal of Dairy Research**, v. 45, p. 197-208, 1978.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/04industria/tabela04.22.php>>. Acesso em: fev. 2006.

FAGAN, P.; WIJESUNDERA, C. Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 241-249, 2004.

FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1069 p.

GOMES, J.C.; SILVA, M.H.L.F.; SILVA, C.O. **Análise de alimentos**. 2.ed.rev.ampl. Viçosa: DTA/FUNARBE, 2003. 154 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF 21A. **Milk, cream and evaporated milk**: determination of solids content (reference method). Brussels, 1982. 2 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF 1C. **Milk determination of fat content**: Röse-Gottlieb gravimetric method (reference method). Brussels, 1987. 8 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF 9C. **Dried milk, dried whey and dried butter serum determination of fat content**: Röse-Gottlieb gravimetric method (reference method). Brussels, 1987. 7 p.

JENSEN, R.G. Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 295-350, 2002.

JORNAL DO BRASIL. **Leite adulterado vendido em Brasília**. Disponível em: <<http://www.mj.gov.br/DPDC/clipping/2003/abril/250403.htm>>. Acesso em: ago. 2005.

KATES, M. **Techniques of lipidology isolation, analysis and identification of lipids**. 2.ed. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1972. p. 101-111.

KOVACS, M.I.P. Determination of phosphorus in cereal lipids. **Analytical Biochemistry**, v. 154, p. 420-423, 1986.

LEE, S.J.; SHERBON, J.W. Chemical changes in bovine milk fat membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 555-567, 2002.

LEHNINGER, A.L. **Princípios da bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 179-198.

MALIN, E.L.; BASCH, J.J.; SHIEH, J.J.; SULLIVAN, B.C.; HOLSINGER, V.H. Detection of adulteration of buttermilk powder by gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2199-2206, 1994.

MATHER, I.H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 203-247, 2000.

McPHERSON, A.V.; KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: the bovine milk fat globule membrane its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 50, p. 107-133, 1983.

MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; McBEAN, L.D. **Handbook of dairy foods and nutrition**. 2.ed. Boca. Raton: CRC. Press, 1999. p. 19-21.

MISTRY, V.V.; METZGER, L.E.; MAUBOIS, J.L. Use of ultrafiltered sweet buttermilk in the manufacture of reduced fat Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1137-1145, 1996.

MORETTO, E.; FETT, R. **Óleos e gorduras vegetais (processamento e análise)**. 2.ed. Florianópolis: UFSC, 1989. 179 p.

MOTTA, V.T. **Bioquímica básica: lipídeos e membranas**. Disponível em: <<http://www.laboratorioautolab.com/informed/fulltext/9lipidios.pdf>>. Acesso em: set. 2005.

MULVA, J.L. **Indústria da manteiga**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, 1970. 111 p.

RESMINI, P.; PELLEGRINO, L.; HOGENBOOM, J.A.; SADINI, V.; RAMPILLI, M. Detection of buttermilk solids in skim milk powder by HPLC quantification of aminophospholipids. **Scienza Tecnica Lattiero - Casearia**, v. 39, p. 395-412, 1988.

RHEE, K.S.; DUGAN JR., L.R. The implication of acid concentration in lipids phosphorus determinations. **Analytical Biochemistry**, v. 19, p. 157-165, 1967.

SILVA, J.D.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 169-177.

SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R.; REGE, D.V. **Handbook of indices of food quality and authenticity**. Cambridge England: Woodhead Publishing, 1997. p. 10-20. 561p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **National Agricultural Statistics Service Bulletin**. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/dairy/pmp-bb/>>. Acesso em: out. 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **SAEG - Sistema de análise estatística e genética**. Versão 9.0. Viçosa, MG. 2005.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M.W.; ANEMA, S. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 393-402, 2002.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M.A.J.S. **Dairy technology: principles of milk properties and process**. New York: Marcel Dekker, 1999. Chapter 2, p. 50-71.

WIKING, L.; BJÖRCK, L.; NIELSEN, J.H. The influence of feeds on stability of fat globules during pumping of raw milk. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 797-803, 2003.

WILSTER, G.H. **Practical buttermaking**. 8.ed. Corvallis, Oregon: O.S.C. Cooperative Association, 1957. 256 p.

## **8 - APÊNDICE**

**Tabela 1** - Resultados da absorvância de diferentes concentrações de P ( $\mu\text{g/mL}$ ) para cálculo da curva de calibração.

mL solução 5 $\mu\text{g/mL}$ de fósforo	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Abs 725nm
0	0,0	0,000
1	0,2	0,095
3	0,6	0,276
5	1,0	0,469
7	1,4	0,646
9	1,8	0,826

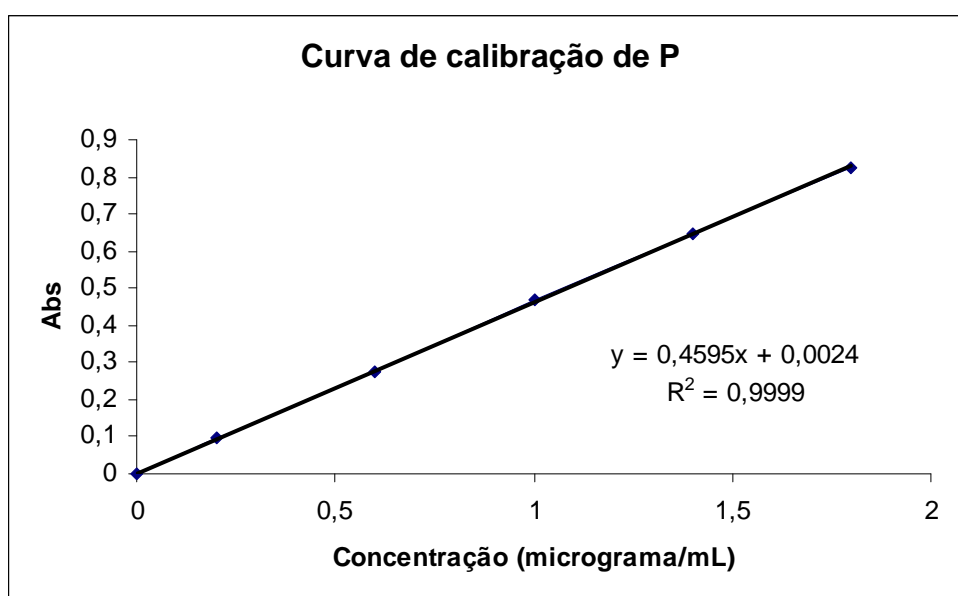


Figura 1 A – Curva de calibração usada na determinação de fósforo.

**Tabela 2** – Concentração de fosfolípidos totais expressa em mg/100 g de cada repetição realizada para uma única amostra de leite fluido desnatado e uma única de leite fluido proveniente da bateção do creme com teor de gordura padronizado com leite desnatado.

<b>Número de repetições</b>	<b>LD</b>	<b>LTL</b>
1	14,66	233,43
2	15,48	227,28
3	15,28	215,43
4	14,73	216,47
5	14,87	226,00
6	15,82	223,22
7	14,66	235,85
8	14,93	226,66
9	15,61	241,27
10	14,12	238,20
11	14,66	238,20
12	14,59	236,50
13	15,14	252,83
14	15,34	244,32
15	15,27	230,07
16	13,64	230,06
17	13,91	225,29
18	14,32	227,15
19	14,73	247,05
20	15,41	230,38
21	15,61	233,45
22	14,80	239,24
23	15,00	237,80
24	15,14	245,03
25	14,46	237,52
26	15,14	235,50
27	15,27	227,65
28	14,59	235,17
29	14,46	231,78
30	14,84	238,57

**Tabela 3** – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite fluido desnatado (n=26).

<b>n</b>	<b>% Média lipídeos* ± DP</b>
1	0,17 ± 0,01
2	0,18 ± 0,01
3	0,21 ± 0,01
4	0,21 ± 0,01
5	0,34 ± 0,01
6	0,16 ± 0,01
7	0,18 ± 0,01
8	0,15 ± 0,01
9	0,19 ± 0,01
10	0,21 ± 0,01
11	0,14 ± 0,01
12	0,13 ± 0,01
13	0,16 ± 0,01
14	0,13 ± 0,01
15	0,15 ± 0,01
16	0,08 ± 0,01
17	0,09 ± 0,01
18	0,07 ± 0,01
19	0,08 ± 0,01
20	0,08 ± 0,01
21	0,10 ± 0,01
22	0,11 ± 0,01
23	0,10 ± 0,01
24	0,15 ± 0,01
25	0,15 ± 0,01
26	0,21 ± 0,01

\* análises em triplicata



**Tabela 4** – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite fluido integral (n=32).

<b>n</b>	<b>% Média lipídeos* ± DP</b>
1	2,98 ± 0,01
2	3,12 ± 0,02
3	3,13 ± 0,02
4	3,09 ± 0,01
5	3,04 ± 0,02
6	3,03 ± 0,02
7	2,94 ± 0,01
8	3,11 ± 0,01
9	3,06 ± 0,02
10	3,04 ± 0,03
11	3,20 ± 0,01
12	3,21 ± 0,01
13	3,22 ± 0,04
14	3,06 ± 0,01
15	3,05 ± 0,01
16	3,02 ± 0,02
17	3,09 ± 0,08
18	3,12 ± 0,01
19	3,31 ± 0,01
20	3,07 ± 0,02
21	3,16 ± 0,01
22	3,06 ± 0,02
23	2,80 ± 0,09
24	3,10 ± 0,01
25	3,30 ± 0,01
26	3,26 ± 0,02
27	3,13 ± 0,01
28	3,14 ± 0,02
29	3,21 ± 0,02
30	3,14 ± 0,03
31	2,93 ± 0,09
32	3,07 ± 0,02

\* análises em triplicata

**Tabela 5** – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite em pó desnatado (n=20).

<b>n</b>	<b>% Média lipídeos * ± DP</b>
1	1,22 ± 0,01
2	1,44 ± 0,01
3	1,79 ± 0,03
4	1,65 ± 0,04
5	1,55 ± 0,02
6	1,82 ± 0,01
7	1,87 ± 0,01
8	1,06 ± 0,01
9	1,53 ± 0,06
10	1,24 ± 0,01
11	1,32 ± 0,01
12	0,98 ± 0,10
13	0,91 ± 0,05
14	1,02 ± 0,01
15	1,04 ± 0,02
16	1,24 ± 0,02
17	1,27 ± 0,04
18	1,18 ± 0,01
19	1,23 ± 0,01
20	1,11 ± 0,01

\* análises em triplicata

**Tabela 6** – Concentração média de lipídeos em porcentagem (m/m) de cada amostra de leite em pó integral (n=23).

<b>n</b>	<b>% Média lipídeos* ± DP</b>
1	26,97 ± 0,13
2	25,82 ± 0,11
3	26,50 ± 0,21
4	26,89 ± 0,07
5	26,53 ± 0,09
6	25,45 ± 0,07
7	25,83 ± 0,11
8	24,62 ± 0,11
9	25,83 ± 0,12
10	27,45 ± 0,45
11	27,55 ± 0,05
12	27,63 ± 0,07
13	25,86 ± 0,02
14	25,80 ± 0,11
15	26,00 ± 0,04
16	25,70 ± 0,04
17	27,86 ± 0,86
18	26,91 ± 0,08
19	27,18 ± 0,12
20	26,00 ± 0,04
21	26,41 ± 0,16
22	26,32 ± 0,08
23	25,48 ± 0,15

\* análises em triplicata