

Comunicação

[Communication]

Índice de CMP em leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais, Brasil, durante os anos de 2011 a 2017

[Caseinomacropéptide index in pasteurized milk retailed in Minas Gerais, Brazil from 2011 to 2017]

P.R. Lobato, J.P.M. Heringer, M.E.R. Fortini, L.F. Ferreira, F.A.C. Feijó, M.O. Leite, M.M.O.P. Cerqueira, C.A.M. Penna, M.R.. Souza, L.M. Fonseca*

Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

A não autenticidade e a má qualidade dos alimentos constituem um problema mundial por razões econômicas e, até mesmo, de saúde pública. O leite, particularmente, é um produto susceptível a fraudes, o que pode acarretar vários problemas, além de lesar o consumidor, que julga estar adquirindo um produto íntegro. O consumo de leite fraudado, principalmente por crianças em fase de crescimento, pode levar a consequências nutricionais danosas (Oliveira *et al.*, 2009; Veloso *et al.*, 2002).

Das adulterações que ocorrem ao leite, a adição de soro de queijo merece destaque, pois, como este é um componente do próprio leite, a sua detecção se torna difícil. A fraude com soro de queijo é comum, fácil de ser realizada, e sua detecção só é possível por testes laboratoriais caros. Além disso, ela pode ser mascarada pela adição de outros ingredientes, como sacarose e cloreto de sódio, o que pode resultar em alguns valores analíticos aparentemente normais.

Essa fraude é facilitada pelo baixo valor comercial do soro, pelo relativamente pequeno aproveitamento em produtos lácteos e pela dificuldade de detecção (Friedrich *et al.*, 2010). Os prejuízos relacionados com fraudes incluem redução do rendimento industrial, diminuição do valor nutricional, alteração da qualidade dos produtos beneficiados, diminuição da vida de prateleira, além do risco à saúde dos consumidores pela possível presença de

determinadas substâncias potencialmente perigosas, como, água oxigenada, formol, etc.

A fraude por adição de soro de queijo ao leite pode ser detectada pela análise do índice de caseinomacropéptideo (CMP), uma porção hidrofílica da κ -caseína, liberada durante a coagulação do leite pela ação da quimosina. Durante a fabricação de queijos, a renina, um agente de coagulação, age sobre a κ -caseína, especificamente entre a ligação dos aminoácidos 105 e 106 (Phe-Met), liberando um macropéptideo hidrofílico contendo 64 aminoácidos (106 a 169), ligado ao ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico. Esse fragmento é conhecido também como glicomacropéptideo e é encontrado no soro de queijo. O termo CMP é usado, pois a κ -caseína contém teores variados de carboidratos e há possibilidade de conter fragmentos com ausência de glicídios. Nesse caso, o péptideo terminal é chamado de caseinomacropéptideo (CMP). O outro fragmento da κ -caseína é denominado de para- κ -caseína (1-105) e consiste na parte hidrofóbica que permanece na massa do queijo. Entretanto, a ação de proteases produzidas por micro-organismos psicrotóxicos pode ter como consequência a ocorrência de resultados de CMP falso-positivos, denominados pseudo-CMP (Oliveira *et al.*, 2009).

Existem diversas técnicas para detecção de adição de soro de queijo ao leite. O teste oficial e aprovado pelo MAPA é o método de determinação do índice de CMP no leite utilizando-se a cromatografia líquida de alta

P.R. Lobato
<https://orcid.org/0000-0003-1672-5025>
J.P.M. Heringer
<https://orcid.org/0000-0003-2937-1895>
M.E.R. Fortini
<https://orcid.org/0000-0001-8935-5817>
L.F. Ferreira
<https://orcid.org/0000-0001-9437-7041>
F.A.C. Feijó
<https://orcid.org/0000-0001-6438-0928>
M.O. Leite
<https://orcid.org/0000-0002-8959-2959>
M.M.O.P. Cerqueira
<https://orcid.org/0000-0002-7287-2161>
C.A.M. Penna
<https://orcid.org/0000-0003-4267-1817>
M.R.. Souza
<https://orcid.org/0000-0001-7071-7304>
L.M. Fonseca
<https://orcid.org/0000-0001-6040-3678>

Recebido em 23 de abril de 2018

Aceito em 3 de maio de 2019

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: leorges@ufmg.br

eficiência (CLAE). Esse método é sensível e rápido, porém requer mão de obra qualificada e equipamentos sofisticados, tornando-se um método de alto custo (Fukuda *et al.*, 2004). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de fraude por adição de soro de queijo ao leite pasteurizado comercializado no estado de Minas Gerais, utilizando-se a determinação do índice de caseinomacropéptido por CLAE.

Durante os anos de 2011 a 2017, 185 amostras de leite pasteurizado foram coletadas no mercado consumidor de 10 mesorregiões do estado de Minas Gerais, abrangendo 51 municípios e 73 marcas comerciais, algumas com diferentes lotes. As mesorregiões incluídas foram Campo das Vertentes, Central Mineira, Metropolitana de Belo Horizonte, Noroeste de Minas, Norte de Minas, Oeste de Minas, Sul e Sudoeste de Minas, Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Vale do Rio Doce e Zona da Mata. A amostragem abrangeu um número maior em mesorregiões de maior densidade populacional e maior volume de leite processado. Foram observados o tipo de serviço de inspeção (federal, estadual e municipal ou não determinado) e o tipo de processador (cooperativa/laticínio de instituição pública ou indústria privada), assim como a sazonalidade (estação chuvosa ou seca). As amostras de leite foram coletadas respeitando-se o período de validade delas, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e enviadas ao Laboratório de Cromatografia da UFMG; quando necessário, foram congeladas até serem submetidas às análises em até, no máximo, duas semanas.

Para a análise do índice de CMP, foram utilizadas as metodologias oficiais, IN nº68 do MAPA (Brasil, 2006; 2013). A análise cromatográfica foi realizada no Laboratório de Cromatografia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, por meio de cromatógrafo líquido (Shimadzu CLASS VP 6.1) com coluna Zorbax GF 250, fluxo de fase móvel de 1,5mL por minuto, com tampão fosfato pH 6,0 e detecção ultravioleta no comprimento de onda de 205nm. Para a curva de calibração, foram preparadas soluções-padrão de CMP que contemplassem, no mínimo, um ponto abaixo de 30mg/L e um ponto acima de 75mg/L em leite fluido integral, isento de fraude, a saber: 15mg/L, 30mg/L, 45mg/L, 60mg/L, 75mg/L e 90mg/L, além de um branco de leite fluido integral

(0mg/L). Em seguida, as amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético, deixadas em repouso por 60 minutos e filtradas em papel de filtro qualitativo. Aproximadamente 20µL de material filtrado foram injetados no cromatógrafo. Foi construído um gráfico de índice de CMP *versus* altura do cromatograma obtido, e calculou-se a reta de regressão linear aceitando-se valores com $R \geq 0,95$.

As amostras foram preparadas adicionando-se, lentamente e sob agitação constante, 10mL de ácido tricloroacético (24%) a 20mL de leite fluido, seguido pelo procedimento descrito anteriormente para o preparo das amostras da curva de calibração. A quantificação do índice de CMP foi comparada ao cromatograma das amostras em relação ao da curva de calibração. O cálculo da concentração de CMP nas amostras foi feito por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão do leite adicionado de CMP, utilizando-se a seguinte equação, obtida pela injeção dos padrões da curva de calibração: $y = ax + b$ (Brasil, 2013; Lasmar *et al.*, 2011),

em que:

x = concentração em % de soro;

y = altura do pico;

a = inclinação da reta;

b = intersecção com o eixo y, ou seja,

% de soro = (altura do pico - b)/a.

Foi realizada a análise estatística descritiva e o teste de hipótese por meio do qui-quadrado, associando-se os fatores e os diferentes níveis de CMP das amostras de leite pasteurizado nas regiões avaliadas, de acordo com os critérios estabelecidos pelo MAPA (Brasil, 2006), a origem do serviço de inspeção (SIF, IMA, municipal ou não determinado) e o processador (cooperativa ou indústria privada) (Sampaio, 2002), utilizando-se o *software* Minitab 16.

Os resultados evidenciaram uma alta ocorrência de índices de CMP fora do padrão, i.e., CMP acima de 30mg/L (Fig. 1), sendo, no período de 2015 a 2017, 25% das amostras não conformes no período chuvoso e 21% no período da seca. Essa diferença de não conformidade em relação às duas ocorrências climáticas se agravou nos anos de 2011 a 2013, em que a concentração de CMP em 39% das amostras avaliadas foi acima de 75mg/L. Entre os fatores a serem considerados nessa diferença está a diminuição

do volume de produção de leite durante o período de seca, que ocorre na maioria das regiões do estado de MG, o que geralmente eleva o preço do leite e a consequente tentativa de fraude por algumas indústrias laticinistas ou produtores. Níveis de CMP na faixa intermediária (entre 31 e 75mg/L) ocorreram

principalmente no período chuvoso, o que pode estar correlacionado não somente à fraude, mas também a uma matéria-prima de qualidade inferior, em que os níveis de pseudo-CMP se elevam devido à ação proteolítica da microbiota contaminante (Recio *et al.*, 1996).

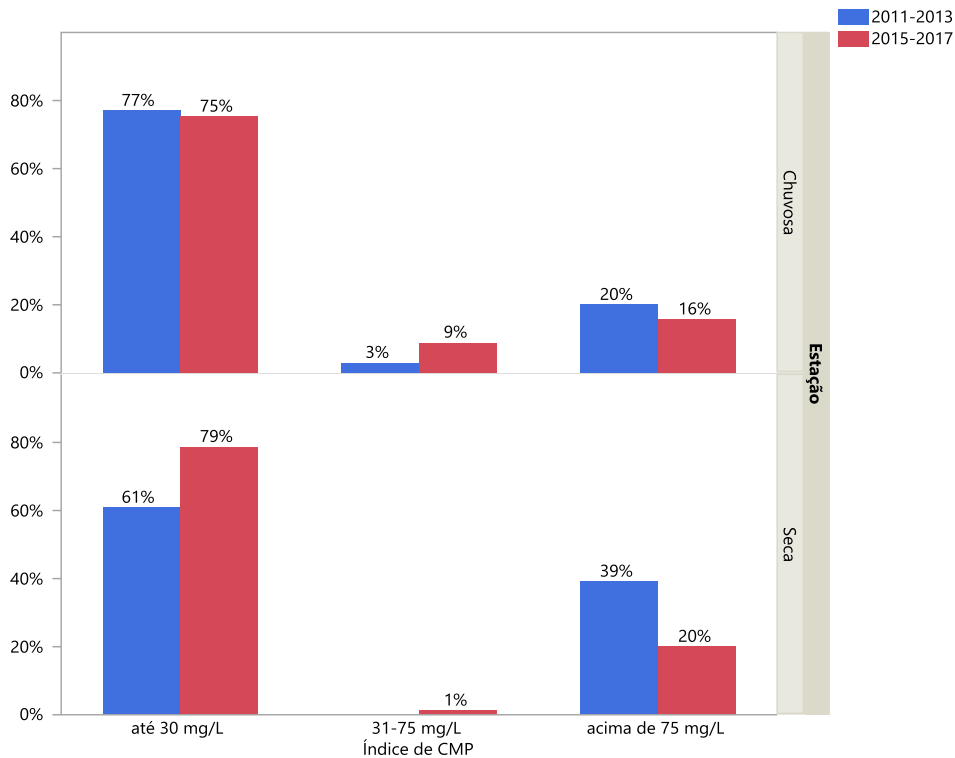


Figura 1. Faixas de caseinomacropeptídeo (CMP) em leite pasteurizado produzido no estado de Minas Gerais, durante os anos de 2011 a 2013 e 2015 a 2017, nas estações chuvosa e seca (n=185).

Não foi encontrada diferença significativa entre as amostras provenientes de cooperativas/empresas públicas e entre aquelas oriundas de indústrias laticinistas privadas. Em ambos os casos, 75% das amostras analisadas foram consideradas dentro do padrão de até 30mg/L, de acordo com a legislação (Brasil, 2006). De acordo com essa normativa, leites que apresentam índices de CMP até 30mg/L podem ser destinados ao consumo direto, enquanto, se os índices forem entre 30 e 75mg/L, esses leites devem ser destinados à produção de derivados lácteos. Leite com valores de CMP acima de 75mg/L deve ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado, tecnicamente, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Brasil, 2006).

O leite fresco apresenta naturalmente um baixo índice de CMP, o qual tende a aumentar com o tempo de armazenamento, devido à ação proteolítica do próprio leite ou de proteases microbianas (Motta *et al.*, 2014; Noni e Resmini, 2005). O congelamento pode retardar essa ação proteolítica e, se a determinação do índice de CMP for realizada em um período de até 30 dias após a coleta, não ocorre interferência significativa nesse índice (Friedrich *et al.*, 2010).

Existem produtos derivados em que a ocorrência de fraude por adição de soro é alta, como o leite em pó. Leite *et al.* (2012) analisaram 125 amostras de leite em pó em 2009 e 2010, provenientes de diversos laticínios do país, por CLAE. As amostras apresentaram níveis CMP

variando de 0 a 1150mg/L. Do total analisado, 73,3% das amostras analisadas estavam aptas para consumo humano, com níveis de CMP até 30mg/L, enquanto 21,8% das amostras apresentaram níveis de CMP variando entre 30 e 75mg/L, e 4,8% das amostras estavam com CMP acima de 75mg/L. Resultados semelhantes de amostras conformes foram encontrados no presente trabalho, entretanto, no presente experimento, o número de amostras contendo CMP acima de 75mg/L foi significativamente maior, i.e., 28,8%.

As amostras com índice de CMP acima de 75mg/L apresentaram valores médios elevados, indicando fraude por adição de soro (Tab. 1). Elevados valores do índice de CMP são correlacionados com essa fraude, entretanto, como a concentração máxima de CMP usada na curva do padrão foi de 90mg/L, valores acima desse índice são estimados, com potenciais desvios de valores da regressão linear (Sampaio, 2002).

Tabela 1. Número de amostras de leite pasteurizado analisadas no estado de Minas Gerais, durante os anos de 2011-2013 e 2014-2017, com índice de caseinomacropéptido (CMP) acima de 75mg/L (n=185)

Estação do ano	Número de amostras acima de 75mg/L	Média (mg/L de CMP)	Valor mínimo (mg/L de CMP)	Valor máximo (mg/L de CMP)
Chuvosa	16	283	80	1167
Seca	23	273	77	859

Quanto ao tipo de inspeção, não houve diferença na ocorrência dos níveis de CMP entre laticínios com inspeção federal ou estadual (P=0,364). Pelo número reduzido de amostras, não foi possível analisar essa diferença com relação às amostras com inspeção municipal ou sem inspeção (Tab. 2). A regulamentação e as ações dos órgãos fiscalizadores de produtos de origem animal incentivaram o aumento do consumo formal de leite no país. Entretanto, a estrutura de inspeção não tem sido suficiente para coibir fraudes em determinados produtos e até mesmo a própria

informalidade. No presente trabalho, nota-se que esse tipo de adulteração ocorreu independentemente do sistema de inspeção.

Esses dados evidenciam a necessidade de intensificação nas ações de fiscalização dos produtos lácteos. Considera-se também a necessidade iminente da atualização e implementação de métodos analíticos alternativos, uma vez que a CLAE envolve um alto custo operacional, equipamento sofisticado e mão de obra qualificada (Ke *et al.*, 2017).

Tabela 2. Faixas percentuais de caseinomacropéptido (CMP) em leite pasteurizado produzido no estado de Minas Gerais, durante os anos de 2011 a 2013 e 2015 a 2017, sob diferentes tipos de inspeção (n=185)

Anos	Inspeção	Estação(n)	Faixa CMP (mg/L)		
			0-30 (%)	31-75 (%)	> 75 (%)
2011-2013	SIF	Chuvosa (27)	74	4	22
		Seca (18)	61	0	39
	IMA	Chuvosa (2)	100	0	0
		Seca (4)	75	0	25
	ND	Chuvosa (6)	83	0	17
		Seca (1)	0	0	100
2015-2017	SIF	Chuvosa (38)	84	8	8
		Seca (51)	82	2	16
	IMA	Chuvosa (12)	75	0	25
		Seca (13)	69	0	31
	SIM	Chuvosa (7)	29	29	43
		ND	Seca (6)	67	0

SIF: Serviço de Inspeção Federal; IMA: Instituto Mineiro de Agropecuária; SIM: Serviços de Inspeção Municipal; ND: não declarado.

Índice de CMP...

Conclui-se que grande parte das amostras de leite pasteurizado apresentaram irregularidades, com valores de CMP acima do permitido pela legislação, isto é, acima de 30mg/L, resultando em 25% do leite pasteurizado considerado impróprio ao consumo humano de acordo com o requerimento legal. A maior parte das amostras não conformes tiveram níveis de CMP acima do

valor limite superior pela legislação, i.e., 75mg/L, com robusta evidência de fraude por adição de soro de queijo ao leite pasteurizado.

Palavras-chave: soro, adulteração, caseinomacropéptido, CMP, qualidade do leite, leite pasteurizado

ABSTRACT

Cheese whey is a nutritious byproduct in the dairy industry, however, due to low commercial value, its use as a milk adulterant is a common practice not easily detected by routine analysis. In Brazil, quantification of caseinomacropéptide (CMP) index, using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), is officially used to investigate illegal cheese whey addition to milk. Milk with CMP index above 30mg/L is considered not suitable for human consumption. The objective of this research was to report the CMP index in 185 samples of pasteurized milk, representing 73 commercial brands produced in 51 counties and ten mesoregions of the state of Minas Gerais, from 2011 to 2013 (58 samples) and 2015 to 2017 (127 samples). CMP index was considered normal (up to 30mg/L) in 75.1% of the samples. However, 21.1% presented CMP index above 75mg/L and 3.8% from 31 to 75mg/L. CMP index above 75mg/L was found in 17.4% of the samples produced during the dry season (April to September) and in 24.7% during the rainy season (October to March). These data point to the need of more efficient monitoring and inspection processes to hinder adulteration with cheese whey addition to milk.

Keywords: whey, adulteration, caseinomacropéptide, CMP, milk quality, pasteurized milk

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 69, de 13 de dez. 2006. Institui Critério de Avaliação da Qualidade do Leite in natura, Concentrado e em Pó, Reconstituídos, com base no Método Analítico Oficial Físico-Químico denominado "Índice CMP", de que trata a Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Brasília: *Diário Oficial da União*, 2006. 1p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Método de Ensaio: Determinação de Índice de CMP (caseinomacropéptido) em leite fluido e leite em pó por CLAE (MET/POA/PL/002 - v.2), 2013. 10p.

FRIEDRICH, M.T.; FRANKEN, R.B.C.; AZEVEDO, M.S. *et al.* Avaliação da estabilidade do leite in natura e UHT quanto ao índice de CMP. *Rev. Cienc. Ex. Aplic. Tecnol. Univ. Passo Fundo*, v.2, p.21-27, 2010.

FUKUDA, S.P.; ROIG, S.M.; PRATA, L.F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *Lait*, v. 84, p.501-512, 2004.

KE, X.; ZHANG, J.; LAI, S. *et al.* Quantitative analysis of cow whole milk and whey powder adulteration percentage in goat and sheep milk products by isotopic dilution-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 409, p.213-224, 2017.

LASMAR, M.M.; LEITE, M.O.; FONSECA, L.M. *et al.* Detection of cheese whey in raw milk preserved with bronopol[®] through high performance liquid chromatography. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1553-1558, 2011.

LEITE, M.O.; OLIVEIRA, M.C.P.P.; FONSECA, L.M. *et al.* Use of caseinomacropéptide index as indicator of adulteration of milk powder in Brazil. *J. Dairy Sci.*, v.95, Suppl.2, p.22, 2012.

MOTTA, T.M.C.; HOFF, R.B.; BARRETO, F. *et al.* Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, v.120, p.498-505, 2014.

NONI, I.D.; RESMINI, P. Identification of rennet-whey solids in "traditional butter" by means of HPLC/ESI-MS of non-glycosylated caseinomacropeptide A. *Food Chem.*, v.93, p.65-72, 2005.

OLIVEIRA, G.B.; GATTI, M.D.S.; VALADÃO, R.C. *et al.* Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. *Rev. Inst. Latic. "Candido Tostes"*, v.64, p.56-65, 2009.

RECIO, I.; LOPEZ FANDINO, R.; OLANO, A. *et al.* Study of the formation of caseinomacropeptides in stored ultra-high-temperature-treated milk by capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, v.44, p.3845-3848, 1996.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3.ed. Belo Horizonte: UFMG/ Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V. O. *et al.* Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quím. Nova*, v.25, p.609-615, 2002.