

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**TESE**

**Determinação de Adulteração por Adição de Leite Bovino em Queijo  
Bubalino**

**Sabrina da Silva Dias**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**DETERMINAÇÃO DE ADULTERAÇÃO POR ADIÇÃO DE LEITE  
BOVINO EM QUEIJO BUBALINO**

**SABRINA DA SILVA DIAS**

*Sob orientação do Professor*  
**D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy**

*e Co-orientação da Professora*  
**D.Sc. Rosana Colatino Soares Reis**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Março, 2012

664

D541d

T

Dias, Sabrina da Silva, 1984-

Determinação de adulteração por adição  
de leite bovino em queijo bubalino /  
Sabrina da Silva Dias - 2012.

95 f. : il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira  
Godoy.

Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Bibliografia: f. 80-95.

1. Tecnologia de alimentos - Teses. 2.  
Leite bubalino - Teses. 3. Queijo - Teses.  
I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-.  
II. Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**SABRINA DA SILVA DIAS**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

TESE APROVADA EM: 26/03/2012

---

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) EMBRAPA  
(Orientador)

---

Marco Antônio Sloboda Cortez (D.Sc.) UFF  
(Membro)

---

Helena Souza Torquillo (D.Sc.) IFRJ  
(Membro)

---

Elisa Cristina Modesto (D.Sc.) UFRRJ  
(Membro)

---

Renata Gualharo Borguine (D.Sc.) EMBRAPA  
(Membro)

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder a graça de alcançar mais este degrau.

Aos meus **pais**, Olindina Francisca da Silva Dias e Jorge José Dias, e **irmão**, Leonardo José da Silva Dias - pelo amor e confiança dedicados todo o sempre. Obrigada por cada dia em que vocês acreditaram que eu conseguiria chegar ao final.

Ao meu marido e amigo de todas as horas, **André Mendes da Cruz**, pela paciência nas horas de ausência, por todo carinho e por me incentivar sempre.

Ao meu orientador, **Ronoel Luiz de Oliveira Godoy**, pela confiança e orientação em cada etapa do trabalho.

À minha co-orientadora, **Rosana Colatino Soares Reis**, pelo incentivo, confiança e auxílio antes e durante a tese.

Ao amigo, **Sidney Pacheco**, pela contínua ajuda e atenção em cada etapa da tese.

Aos meus amigos, **Carolina Cunha, Ana Cristina, Daniel Filisberto, Cláudio Bobeda** pela amizade e pela contribuição em cada ano deste doutorado.

Aos funcionários e amigos do CTAA, **Luzimar, Manuela, Renata** pela paciência e colaboração na parte prática da tese.

A todos os amigos que conquistei nessa fase da minha jornada, que nossa amizade dure para sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos.

*“O que importa não é a vitória, mas o esforço, Não é o talento, mas a vontade, Não é quem você é, mas quem quer ser.”*

*Willian Douglas*

## RESUMO

DIAS, Sabrina da Silva. **Determinação de adulteração por adição de leite bovino em queijo bubalino.** 2012. 95p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O leite de búfala apresenta um alto valor nutritivo e é uma excelente matéria-prima para o preparo de produtos lácteos, apresenta maiores teores de gordura, proteína, extrato seco total e alguns minerais, em relação ao leite bovino. Porém, as flutuações na disponibilidade de leite de espécies diferentes da bovina, e o preço mais elevado em comparação ao leite bovino, fazem surgir o incentivo para a adulteração de queijos tradicionais. A adição fraudulenta de leite de bovino em queijos elaborado com leite bubalino levará a perda nutricional e econômica para o consumidor. No nosso país, nenhuma legislação atualmente relata técnica para essa função, sendo assim, existe a necessidade de se desenvolver uma metodologia prática e confiável para determinação de adulterações desta natureza. Dessa forma, o estudo teve como objetivo otimizar e validar método de ensaio para dosagem de beta-caroteno como forma de determinar adulteração em *mozzarella* elaborada com leite bubalino, uma vez que, segundo a literatura, diferenças fisiológicas do búfalo em relação aos bovinos ocasionam uma maior conversão de carotenóides provenientes da alimentação com forrageiras em retinol, o que levaria a coloração branca dos derivados de origem bubalina, devido à ausência quase total de carotenóides na sua constituição. As análises foram realizadas na Embrapa agroindústria de alimentos no laboratório de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando amostras preparadas somente com leite bubalino e/ou misturadas com leite bovino para identificação e quantificação de beta-caroteno, como marcador de autenticidade, e a quantificação de retinol nesses derivados aos 60 dias e 200 dias após a parição, avaliando se o período de lactação e o teor de gordura poderiam influenciar nos resultados. Para garantir a confiabilidade dos resultados foram realizadas análises dos parâmetros de validação de acordo com os documentos de orientação recomendados por ANVISA e INMETRO, além da verificação da eficiência do método de ensaio utilizando amostras comerciais de queijos. Os resultados de validação para os métodos de ensaio mostraram que os métodos eram seletivos, sensíveis e lineares para as análises de beta-caroteno e retinol. Indicaram não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas quantidades de retinol, beta-caroteno e gordura no queijo e leite, respectivamente, nos períodos de lactação avaliados, não havendo dessa forma influência direta sobre o método de ensaio, e de acordo com os resultados da verificação da eficiência o método se mostrou confiável e eficiente para a determinação de adulteração de queijos elaborados com leite bubalino na região do Rio de Janeiro.

**Palavras-chave:** Leite Bubalino; Pró-vitamina a; Queijo.

## ABSTRACT

DIAS, Sabrina da Silva. **Determination of adulteration for bovine milk addition in bubalino cheese**. 2012. 95p Thesis (Doctor in Sciences and Food Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Buffalo milk has a high nutritional value and is an excellent element for the preparation of dairy products, has higher levels of fat, protein, total solids and some minerals, compared to bovine milk. However, fluctuations in the availability of milk from species other than cattle, and the higher price compared to bovine milk, give rise to the incentive for adulteration of traditional cheeses. The fraudulent addition of bovine milk in cheese made with buffalo milk will lead to nutritional and economic loss to the consumer. In our country, legislation currently no reported technique for this function, therefore, a need exists to develop a practical and reliable determination of such tampering. Thus, the study aimed to optimize and validate the test method for determination of beta-carotene as a way to determine adulteration in *mozzarella* made with buffalo milk, since, according to the literature, physiological differences Buffalo for bovine animals cause a greater conversion of carotenoids from feeding fodder to retinol, which would lead to staining of the white buffalo derivatives of origin, due to the almost complete of carotenoids in their constitution. Analyses were carried out at EMBRAPA Food Technology in the laboratory of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using samples prepared only with buffalo milk and / or mixed with cow milk for identification and quantification of beta-carotene, as a marker of authenticity, and quantification of retinol in these derivatives at 60 days and 200 days after birth, assessing whether the lactation period and fat could influence the results. To ensure reliability of the results of the analyzes were performed validation parameters according to the guidance recommended by ANVISA and INMETRO than verification of the efficiency test method using commercial samples of cheese. The results of the validation to the test methods showed that the methods were selective, sensitive and linear for the analysis of beta-carotene and retinal. Indicated no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the amounts of retinol, beta-carotene and fat in cheese and milk, respectively, measured in periods of lactation, so no direct influence on the test method, and according with the results of verification of the efficiency the method proved reliable and efficient for the determination of adulteration of cheese made with buffalo milk in the region of Rio de Janeiro.

**Key Work:** Bubalino milk; Pro-vitamin A; Cheese



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Valores efetivos para população bubalina no Brasil	4
<b>Figura 2:</b> Esquema de funcionamento básico de um cromatógrafo líquido	15
<b>Figura 3:</b> Comparação do comprimento das fases C <sub>18</sub> monomérica, polimérica e C <sub>30</sub> com comprimento molecular do beta-caroteno	16
<b>Figura 4:</b> Espectro de absorção na região do ultravioleta em 3D (t <sub>R</sub> , comprimento de onda (nm), concentração) de extrato de fígado bovino	18
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do retinol	20
<b>Figura 6:</b> Estrutura química do beta-caroteno e seus isômeros 13- <i>cis</i> -beta-caroteno	21
<b>Figura 7:</b> Absorção de beta-caroteno pelas micelas na mucosa intestinal	25
<b>Figura 8:</b> Transporte pós-absorção do beta-caroteno para o fígado e tecidos extra-hepáticos	26
<b>Figura 9:</b> Clivagem simétrica e assimétrica do beta-caroteno em retinal e apo-carotenóides	27
<b>Figura 10:</b> Delineamento experimental para condução do estudo	30
<b>Figura 11:</b> Búfalos mestiços da Fazenda São Judas Tadeu- Itaguaí, RJ	31
<b>Figura 12:</b> Produtos utilizados para elaboração das amostras de queijo tipo <i>Mozzarella</i>	33
<b>Figura 13:</b> Delineamento experimental para determinação de beta-caroteno nas amostras de queijo bubalino e queijos misturados	33
<b>Figura 14:</b> Delineamento experimental para verificação da eficiência do método utilizando amostras comerciais e preparadas com adição de leite bovino	34
<b>Figura 15:</b> Isolamento do padrão de retinol a partir de coleta no ápice do pico cromatográfico	37
<b>Figura 16:</b> Preparação da coluna cromatográfica abertura para separação do padrão de beta-caroteno	42
<b>Figura 17:</b> Cromatograma de extrato de fígado a 380 nm, com espectros de absorção na região do visível de beta-caroteno, 13- <i>cis</i> -beta-caroteno e 9- <i>cis</i> -beta-caroteno	49
<b>Figura 18:</b> Padrões isolado de extrato de fígado (a): retinol (b) e beta-caroteno (c)	50
<b>Figura 19:</b> Cromatograma para determinação de pureza da solução de retinol isolado de fígado bovino	50
<b>Figura 20:</b> a) Cromatograma (t <sub>R</sub> 4,9 minutos) e espectro de absorção na região do ultravioleta do retinol isolado, b) Cromatograma (t <sub>R</sub> 4,9 minutos) e espectro de absorção na região do ultravioleta do padrão comercial de acetato de retinol hidrolisado	52
<b>Figura 21:</b> a) Espectro de massas do retinol extraído de fígado bovino obtido por CLUE-MS, b) Espectro de massas do padrão comercial de acetato de retinol obtido por introdução direta por bomba de CLUE-MS	53
<b>Figura 22:</b> Proposta para fragmentação de retinol e acetato de retinol após passagem pela fonte de ionização, gerando o pico base m/z 269	54
<b>Figura 23:</b> Curva de calibração elaborada com padrão retinol	55
<b>Figura 24:</b> Gráfico de resíduos dos dados da curva de calibração	56
<b>Figura 25:</b> Cromatograma de extrato de cenoura a 450nm, com espectros de absorção na região do visível de luteína, alfa-caroteno e beta-caroteno	59
<b>Figura 26:</b> Separação do extrato de cenoura em coluna aberta	60

<b>Figura 27:</b> Cromatograma para determinação de pureza da solução de beta-caroteno isolado de cenoura crua	61
<b>Figura 28:</b> Curva de calibração elaborada com padrão de beta-caroteno	61
<b>Figura 29:</b> Gráfico de resíduos dos dados da curva de calibração	63
<b>Figura 30:</b> Extração de beta-caroteno do queijo bubalino (a); Extração de beta-caroteno do queijo bovino (b)	65
<b>Figura 31:</b> Perfil cromatográfico e espectro de absorção na região do visível dos: queijo elaborado somente com leite bubalino (a) e queijo elaborado somente com leite bovino (b)	66
<b>Figura 32:</b> Extração de beta-caroteno do queijo bubalinos misturados com leite bovino, nos tratamentos II (20%), III (50%), IV (80%), V (100%)	67
<b>Figura 33:</b> Cromatograma e espectro de absorção na região do visível do beta-caroteno e 13- <i>cis</i> -beta-caroteno nos queijos adulterados tratamento II (a) e III (b).	69
<b>Figura 34:</b> Cromatograma e espectro de absorção na região do visível do beta-caroteno e 13- <i>cis</i> -beta-caroteno nos queijos adulterados tratamento IV (a) e V (b).	70
<b>Figura 35:</b> Curva-padrão elaborada com leite bovino adicionada aos queijos bubalinos	71
<b>Figura 36:</b> Correlação positiva entre % de adulteração x área de beta-caroteno	71
<b>Figura 37:</b> Carta controle da concentração de beta-caroteno nas amostras comerciais e preparadas com mistura de leite bovino e bubalino.	73
<b>Figura 38:</b> Carta controle da concentração de beta-caroteno dos queijos comerciais elaborados somente com leite bubalino	74

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Conteúdo de aminoácidos no leite de bovino e bubalino	5
<b>Quadro 2.</b> Conteúdo de ácidos graxos do leite de búfala	7
<b>Quadro 3.</b> Variação dos componentes do leite de búfala segundo diferentes autores	8
<b>Tabela 1.</b> Eluição da fase móvel em gradiente durante corrida de 28 minutos	36
<b>Tabela 2.</b> Pontos da curva de calibração com as respectivas concentrações de retinol	39
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros, matriz dos fatores utilizados na determinação da robustez, condições cromatográficas de análise e alternativas na determinação de retinol	39
<b>Tabela 4.</b> Pontos da curva de calibração com as respectivas concentrações de beta-caroteno	43
<b>Tabela 5.</b> Quantidade de gordura no leite bubalino no período de 60 dias e 200 dias de lactação	48
<b>Tabela 6.</b> Valores de concentração teórica e obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), Coeficiente de Variação (%) e resíduos dos valores utilizados para análise de linearidade, faixa de trabalho e precisão do método de ensaio para retinol	55
<b>Tabela 7.</b> Quantidade de retinol em relação ao teste de recuperação (%)	57
<b>Tabela 8.</b> Efeito das condições analisadas em relação à área, tempo de retenção e concentração de retinol	57
<b>Tabela 9.</b> Quantidade de retinol presente nos queijos de origem bubalina ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	58
<b>Tabela 10.</b> Valores de concentração teórica e obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), Coeficiente de Variação (%) e resíduos dos valores utilizados para análise de linearidade, faixa de trabalho e precisão do método de ensaio para beta-caroteno	62
<b>Tabela 11.</b> Quantidade de beta-caroteno em relação ao teste de recuperação (%)	63
<b>Tabela 12.</b> Concentração de beta-caroteno nas amostras de queijo bubalino	64
<b>Tabela 13.</b> Área do beta-caroteno nos tratamentos de I a V.	68
<b>Tabela 14.</b> Concentração de beta-caroteno nas amostras comerciais e misturadas com leite bovino e bubalino	72

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de Ultra Eficiência
DAD	Detector de Arranjo do Fotodiodo
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
IC	ndice Crioscópico
QB1	Queijo de Búfala 1 – animal 1
QB2	Queijo de Búfala 2 – animal 2
QB3	Queijo de Búfala 3 – animal 3
QB4	Queijo de Búfala 4 – animal 4
QB5	Queijo de Búfala 5 – animal 5
AB1	Leite de Búfala 1 – animal 1
AB2	Leite de Búfala 2 – animal 2
AB3	Leite de Búfala 3 – animal 3
AB4	Leite de Búfala 4 – animal 4
AB5	Leite de Búfala 5 – animal 5
DP	Desvio Padrão
UA	Unidade de área dos picos cromatográficos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 OBJETIVO</b>	2
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivo Específico	2
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
3.1 Bubalinocultura	3
3.2 Leite de Búfala	5
3.3 Queijo <i>Mozzarella</i>	9
3.4 Adulteração de Produtos Lácteos	10
3.5 Técnicas de Detecção de Adulterações	11
3.5.1 Métodos imunológicos	11
3.5.2 Métodos baseados em DNA	12
3.5.3 Métodos eletroforéticos	12
3.5.4 Métodos espectroscópicos	13
3.5.5 Métodos cromatográficos	13
3.5.5.1 Cromatografia líquida clássica	14
3.5.5.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)	14
3.5.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	14
3.6 Retinol	19
3.7 Carotenóides	20
3.8 Metabolismo de Carotenóides em Ruminantes	24
3.9 Validação Analítica	27
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
4.1 Elaboração das Amostras	31
4.2 Divisão das Amostras por Período de Lactação	32
4.3 Determinação de Gordura	34
4.4 Procedimento de Extração para Determinação de Retinol	35
4.4.1 Extração de retinol das amostras	36
4.4.2 Parâmetros cromatográficos para isolamento e quantificação de retinol	36
4.4.3 Isolamento de padrão de retinol	36
4.4.4 Parâmetros cromatográficos para identificação do retinol por CLUE-EM	37
4.4.5 Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado	37
4.4.6 Determinação do teor de pureza do isolado de retinol	38
4.4.7 Validação do método de ensaio para determinação de retinol	38
4.4.8 Análises estatísticas	39
4.4.9 Quantificação de retinol	40
4.5 Materiais para determinação de beta-caroteno	40
4.5.1 Extração de beta-caroteno das amostras	40
4.5.2 Parâmetros cromatográficos para determinação de beta-caroteno	41
4.5.3 Isolamento de padrão de beta-caroteno	41
4.5.4 Determinação da pureza do beta-caroteno isolado	42
4.5.5 Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado de beta-caroteno	42
4.5.6 Quantificação de beta-caroteno	42
4.5.7 Validação do método de ensaio para determinação de beta-caroteno	43
4.5.8 Análises estatísticas	44
4.6 Percentual de Adulteração	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	48
5.1 Determinação da Quantidade de Gordura pelo Método Butirométrico	48
5.2 Determinação de retinol	48
5.2.1 Extrato de fígado bovino	48

<b>5.2.2</b>	<b>Quantificação e determinação do teor de pureza do retinol isolado</b>	50
<b>5.2.3</b>	<b>Validação do método de ensaio para determinação de retinol</b>	50
<b>5.2.4</b>	<b>Quantidade de retinol nas amostras</b>	58
<b>5.3</b>	<b>Determinação de Beta-caroteno</b>	59
<b>5.3.1</b>	<b>Extração de beta-caroteno de cenoura crua</b>	59
<b>5.3.2</b>	<b>Isolamento de beta-caroteno a partir de cenoura com coluna aberta</b>	59
<b>5.3.3</b>	<b>Validação do método de ensaio para beta-caroteno</b>	60
<b>5.3.4</b>	<b>Quantidade de carotenóides nas amostras</b>	63
<b>5.4</b>	<b>Percentual de Adulteração</b>	67
<b>5.5</b>	<b>Verificação de Eficiência do Método de Ensaio</b>	72
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	79
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	80

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a criação de búfalos vem se desenvolvendo em larga escala, com crescimento anual de 4,3%, segundo censo do IBGE (2010). Esse rebanho se concentra principalmente na região Norte, com aproximadamente 64% do total, e a região sudeste apresenta em torno de 10% do total de 1.184mil animais.

O principal interesse nesses animais está na exploração leiteira devido às características nos componentes do leite como gordura, maior teor de cálcio e sólidos totais que levam ao aumento do rendimento industrial quando este é utilizado para elaboração de derivados, sendo o principal o queijo *mozzarella*.

Segundo estudos de diferentes autores, a transformação do leite em derivado é mais lucrativa para o produtor, podendo chegar a um aumento de lucro na faixa de 580% entre o preço da venda do leite e o produto pronto.

Devido ao preço diferenciado e as flutuações na disponibilidade do leite bubalino, a presença de fraudes no mercado são incentivadas. Essas fraudes ocorrem principalmente por adição de leite bovino ao leite bubalino, o que leva a perda nutricional e econômica ao consumidor.

Assim, diversos autores, utilizam diferentes técnicas para determinação dessas adulterações como, por exemplo, técnicas imunológicas, técnicas de PCR, eletroforese, espectroscopia de infravermelho e métodos cromatográficos, determinando principalmente proteínas do leite. Porém, apenas a legislação européia determina uma metodologia oficial, que utiliza a determinação de proteína por eletroforese. No nosso país, nenhuma legislação atualmente relata técnica para essa função, sendo assim, existe a necessidade de se desenvolver uma metodologia prática e confiável para determinação de adulterações desta natureza.

Dessa forma, o estudo teve como objetivo otimizar e validar método de ensaio para dosagem de beta-caroteno como forma de determinar adulteração em *mozzarella* elaborada com leite bubalino, uma vez que, segundo a literatura, diferenças fisiológicas do búfalo em relação aos bovinos ocasionam uma maior conversão de carotenóides provenientes da alimentação com forrageiras em retinol, o que levaria a coloração branca dos derivados de origem bubalina, devido à ausência quase total de carotenóides na sua constituição.

Outro ponto a ser pesquisado no estudo está relacionado a quantidade de retinol presente nesses derivados. Uma vez que, este fator fisiológico representaria uma vantagem no consumo de derivados bubalinos, visto que, consumindo a forma ativa de vitamina A haveria maior biodisponibilidade desse nutriente, reduzindo perdas com conversão e facilitando o processo de absorção. Acrescentados mais dados a literatura, em vista da escassez de estudos relacionados a esse tema para espécie de bubalinos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Otimizar e validar método de ensaio para dosagem de beta-caroteno como marcador de autenticidade em queijos do tipo *mozzarella* elaborado com leite bubalino de animais mestiços, assim como, determinar o conteúdo de retinol nesses produtos, em dois períodos de lactação, aos 60 dias e 200 dias após parição.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a quantidade de beta-caroteno em *mozzarella* bubalina por CLAE;
- Avaliar a quantidade de retinol em *mozzarella* bubalina por CLAE;
- Avaliar a variabilidade do teor de gordura no leite de búfala nos diferentes períodos de lactação;
- Analisar se haveria alteração nos componentes lipossolúveis (retinol e beta-caroteno) do leite bubalino em diferentes períodos de lactação;
- Avaliar os parâmetros de validação em relação ao método de ensaio para quantificação de beta-caroteno;
- Avaliar os parâmetros de validação em relação ao método de ensaio para quantificação de retinol;
- Verificar a eficiência de método de ensaio, para a função desejada, através da análise de produtos lácteos comerciais de origem bubalina, bovina e com mistura do leite dessas duas espécies por CLAE.



## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Bubalinocultura

Os búfalos domésticos são originários do continente asiático, apresentam 19 raças distribuídas pelo mundo, incluindo “búfalo do pântano” da raça Carabao destinado principalmente para trabalho e produção de carne, e os “búfalos de rio” das raças Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo, mas comuns no Brasil. Na escala zoológica o búfalo doméstico é agrupado na sub-família *Bovide*, gênero *Bubalus*, espécie *bubalus bubalis*, sendo esta dividida em *bubalus bubalis var. kerebau* denominada “búfalo de pântano” com 48 cromossomos e o *bubalus bubalis sp.* conhecido como “búfalo de rio” com 50 cromossomos (PATIÑO, 2009).

A introdução de búfalos no Brasil data do fim do século XIX, entre 1900 – 1920, onde a raça Carabao foi introduzida na Ilha de Marajó (PA), seguida dos búfalos de origem italiana, da raça Mediterrâneo considerados atualmente raça de patrimônio itálico (PATIÑO, 2009), e desse cruzamento surgiram os búfalos pretos de Marajó, raça semelhante ao búfalo mediterrâneo italiano (ZAVA, 1984).

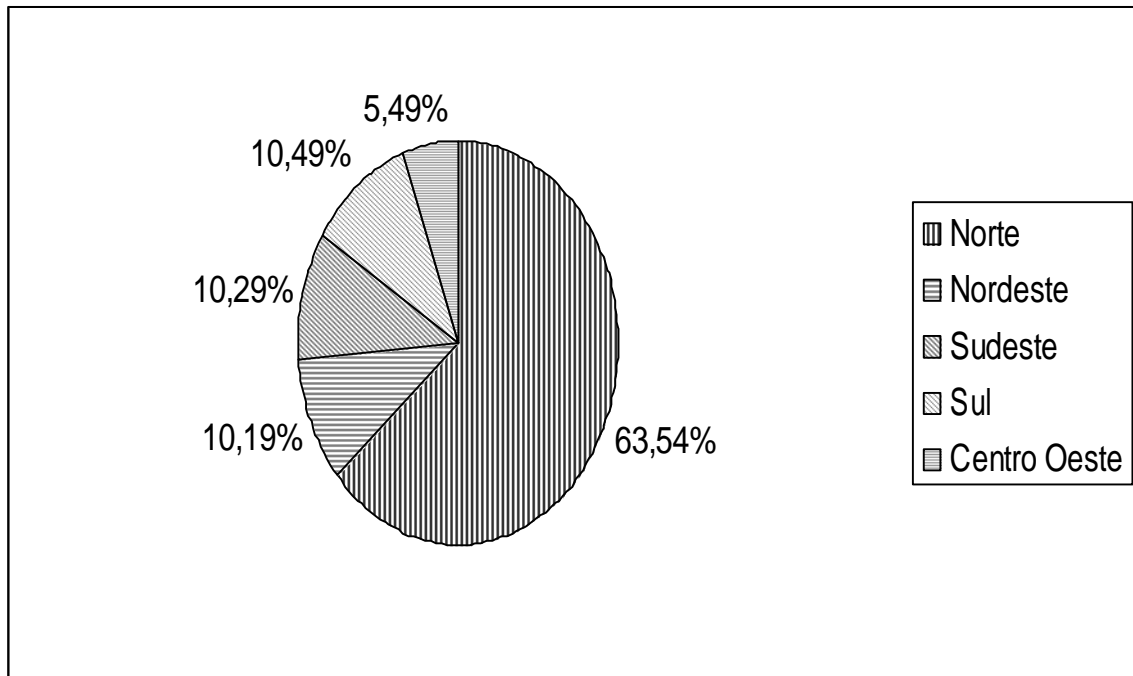
O interesse na criação bubalina encontra-se na exploração leiteira, devido às características físico-químicas do leite e fisiológica do animal que garante aos produtores retorno econômico e comercial, pois apresentam menor custo por litro de leite produzido, com valor de venda superior ao leite bovino, onde a produção é destinada em sua totalidade à produção de queijo *mozzarella*, produto de alto valor de mercado (ARAÚJO et al., 2011; MATTOS, 2007; VIEIRA et al., 2009).

Embora o gado bovino seja o mais representativo na pecuária nacional, tanto para corte como para produção de leite, a bubalinocultura vem rapidamente se difundindo em diversas regiões do país (OLIVIERI, 2004). Segundo Patiño (2009), nos últimos cinquenta anos o crescimento da produção de leite de búfala foi de 301%, enquanto de leite bovino, no mesmo período foi de 59,3%, o de cabra 85% e o de ovelha 54,5%, o que demonstra o crescente interesse dos produtores pela criação de búfalos.

O sistema estatístico oficial relata a quantidade em 1.184.511 milhões animais no ano de 2010 (IBGE, 2010). Segundo esses dados, do total de 1.184 milhões, a região Norte concentra 63,6%, a região Nordeste 10,2%, a região sudeste 10,3 %, região sul 10,5%, e Centro-oeste 5,5% (Figura 1). Sendo o principal estado criador o Pará com 38,6% dos animais, seguido do Amapá com 18,1%. No sudeste, o estado do Rio de Janeiro apresenta 6.168 animais totalizando 0,5% e o estado de São Paulo 71.994 animais com 6,1% (IBGE, 2010). Entre os anos de 2009 e 2010, último censo realizado para produção pecuária municipal, o crescimento anual do bubalinos foi de 4,3% bem maior que crescimento anual de bovino com 2,1%, demonstrando o crescente interesse dos produtores na criação desses animais.

Segundo estudos de Vieira et al., (2009) existem pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfala, que obtém 18,5 mil toneladas de derivados, gerando faturamento de US\$ 55 milhões de dólares aos laticínios e, aproximadamente, US\$17 milhões aos criadores. Esses dados corroboram com o estudo realizado por Seno, Cardoso e Tonhati (2007) avaliando os valores econômicos de produção de bubalinos e concluíram que seria mais vantajoso para o produtor a produção de leite destinado ao sistema de elaboração de queijo *mozzarella* do que a venda do leite para laticínios especializados. Em estudos realizados por Bernardes (2010), o preço recebido pelo produtor por cada litro de leite pode chegar a R\$0,80, em contra partida, o varejo pode receber até R\$ 5,50 por litro desse leite oferecido como derivado, representando um aumento de 587,5% no valor de venda dos

produtos bubalinos. Nesse contexto, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos – ABCB (2011) oferece suporte técnico para melhoria da produção, através da rastreabilidade dos animais e melhoramento genético, auxiliando na organização da cadeia produtiva de leite bubalino, incentivando o marketing (selo 100% pureza), obtendo assim melhor remuneração para os produtores.



**Figura 1:** Valores efetivos para população bubalina no Brasil  
Fonte: Adaptada de IBGE, 2010.

Uma característica que afeta a produção de derivados lácteos é a atividade reprodutiva sazonal dos búfalos. Os animais são relatados pela literatura como poliéstricos estacionais de dias curtos (ARAÚJO et al., 2011; BASTINETO, 2005). Essa característica herdada dos ancestrais provenientes da Índia influencia na época do parto e consequentemente da lactação dos animais.

A variação na quantidade de luz sinaliza para os animais o período favorável para reprodução (fotoperíodo positivo – aumento da fertilidade na primavera e verão), com objetivo de coincidir a época de parto e desmame em estações climáticas favoráveis em relação à temperatura e alimento para os filhotes. Os animais apresentam estacionalidade reprodutiva mesmo em ambientes que ofereçam pequena variação nas quantidades de horas de luz (próximos a linha do equador), provavelmente devido a alterações no suprimento de forragens e conforto térmico. Quanto maior a distância da linha do equador, maior o efeito sobre a reprodutividade dos animais. (ARAÚJO et al., 2001; BASTINETTO et al., 2005.) A concentração de partos nas estações de outono e inverno ocasiona um *défict* na oferta, pois nos períodos de verão, quando há aumento da demanda, a disponibilidade do produto é reduzida, o que pode favorecer os laticínios a recorrer a leites de outras espécies, prejudicando a qualidade do produto final (AMARAL et al., 2005; BERNARDES, 2007; MACEDO et al., 2001; VIEIRA et al., 2009). Uma das alternativas para esse efeito sobre a produtividade são as políticas de intervenção realizada pelas fazendas associadas à Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB) que em associação com universidades e EMBRAPA – Amazônia Oriental, utilizam o programa de desestacionalização para búfalas que manifestam

comportamento estacionário reprodutivo, com planejamento dos acasalamentos, assim como o melhoramento genético dos animais, com objetivo de atender a necessidade de alteração do calendário natural de partos das búfalas para satisfazer a maior demanda comercial de *mozzarella* na primavera e no verão (PROMEMBUL, 2005).

### 3.2 Leite de Búfala

O leite de búfala possui um alto valor nutritivo e é uma excelente matéria-prima para o preparo de produtos lácteos, apresenta maiores teores de gordura, proteína, extrato seco total e alguns minerais, em relação ao leite bovino (VERRUMA, SALGADO, 1994; PALOMINO, SANGAMA, 2002). Por essa razão, a grande importância desse alimento está na transformação em derivados, uma vez que a composição peculiar possibilita um alto rendimento industrial (ARAÚJO et al., 2011; COELHO et al., 2004; OLIVIERI, 2004; VIERA et al., 2009).

As proteínas do leite de búfala são similares às do leite bovino, porém não são idênticas nem estão nas mesmas proporções (Tabela 1). O leite de búfala apresenta uma variação de 3,63 a 5,26%, enquanto que, para o leite bovino, a variação é de 3,25 a 3,90% (FAO, 1991). Estudos relatados sobre a quantidade de aminoácidos mostram que a caseína do leite de búfala possui 25,5% de aminoácidos essenciais a mais que o leite bovino (VERRUMA, SALGADO, 1994). Segundo estudos de Angulo, Noguera, Berduro (2005) essas alterações estão relacionadas às características digestivas da fisiologia diferenciada de bubalinos em relação a bovinos.

**Quadro 1.** Conteúdo de aminoácidos no leite de bovinos e bubalinos.

Aminoácidos (g/g prot.)	Leite	
	Bubalino	Bovino
Lisina	10,30	8,22
Triptofano	1,11	1,48
Treonina	5,66	3,97
Cistina	0,42	0,91
Valina	8,40	5,29
Metionina	3,52	3,02
Isoleucina	7,36	4,50
Leucina	12,61	8,84
Tirosina	4,71	4,44
Fenilalanina	6,22	4,25

Fonte: Verruma, Salgado, 1994.

Em relação a quantidades de proteína, segundo Tonhati, Canaes, Lima (2004), 100g de nitrogênio do leite bubalino equivalem a 89 – 96% de nitrogênio protéico, proveniente de caseína e proteínas do soro, e 4 – 11% de nitrogênio não-protéico, representado por aminoácidos livres, uréia, ácido úrico e produtos do metabolismo do animal. Do total de 100 mL do leite bubalino 77-79% são de caseínas e 21-23% de proteínas do soro, onde as frações  $\alpha$ s1,  $\alpha$ s2,  $\beta$  e  $\kappa$  correspondem a 4%, 6,3%, 35% e 4%, respectivamente, do total dos diferentes tipos de caseínas (AMARAL et al., 2005), sendo qualitativamente semelhantes, porém, quantitativamente diferentes (HUSSAIN et al., 2011).

Segundo estudos de Hussain et al. (2011), a solubilidades das caseínas, bubalina e bovina, são diferentes. A caseína encontrada no leite bovino é mais solúvel que a presente no leite de búfala, alterando suas características reológicas, assim o tempo de coalha da

*mozzarella* bubalina é reduzido devido a melhor ação da quimosina na produção de coalho mais firme e liso. Em exame ao microscópio eletrônico, Ganguli (1979), demonstrou que as micelas de caseína do leite de búfala possuem maior tamanho, susceptibilidade a ação das enzimas, heterogeneidade de composição e componentes minerais contendo mais cálcio e fósforo em relação às da espécie bovina, sendo as micelas de caseína desta última mais opaca.

Verruma, Oliveira, Salgado (1993) encontraram níveis altamente satisfatórios como 91,86% de digestibilidade, 62,77% de NPU (“Net Protein Utilization”) e 68,33% de valor biológico. Já para a observação da porção ingerida do queijo de búfala e não excretada nas fezes *in vitro*, esse mesmo estudo encontrou 93,70% em relação ao extrato seco. Esse aumento na utilização das proteínas, segundo os autores referidos, pode ser devido a alterações realizadas na produção do queijo, melhorando sua digestibilidade.

O leite de búfala é mais rico em certos minerais do que o leite bovino, especialmente em cálcio. Os teores médios de cálcio apresentados pelo leite de búfala e bovino são 1,88 e 1,30g por 100g de extrato seco, respectivamente (VERRUMA, SALGADO, 1993), sendo que este conteúdo está na sua maior parte na forma coloidal.

Das vitaminas presentes no leite de búfala, a vitamina A é a que apresenta maior destaque, não só pela quantidade, mas pela coloração acentuadamente branca que refere ao leite, devido à ausência quase total de pigmentos carotenóides que são responsáveis pela coloração amarela nos produtos elaborados com o leite de bovino (AMARAL et al., 2005; COELHO et al., 2004; FAO, 1991; MATTOS, 2007; VERRUMA, SALGADO, 1994). De acordo com Fonseca (1986), mesmo que as búfalas consumam altas doses de caroteno, não ocorrem mudanças na cor do leite, embora os valores de vitamina A no leite de búfala possam ser iguais ou levemente superiores aos encontrados no leite bovino. Segundo estudos de Palomino, Sangana, (2002) o leite bubalino só apresenta resíduos de carotenóides devido ao processo de conversão de carotenóides em vitamina A operar de forma mais eficaz que no leite bovino, de acordo com o que será sugerido posteriormente.

O teor de sólidos totais do leite de búfala é bem maior do que o de bovino, com uma média de 16% para o leite de búfala e por volta de 12% para o leite de bovino (SHALASH, 1988). Para Neves (1985), houve uma variação de 18 a 20% que se deve principalmente ao elevado teor de gordura no leite de búfala. Devido à elevada quantidade de gordura e de sólidos totais no leite de búfala em relação ao de bovino, o valor calórico do bubalino é superior ao bovino, variando de 100 a 114,4 Kcal por 100g (FERRARA, INTRIERI, 1975), possuindo em média 30 a 40% a mais de calorias (VERRUMA, 1990).

Esses valores são importantes para a indústria láctea, pois afetam diretamente o rendimento do produto, significando lucro para empresa ou produtor (COELHO, 2004).

Em função do teor de extrato seco total do leite, para a elaboração do queijo *Mozzarella* são necessários 5,5 litros de leite para a obtenção de um quilo de queijo (CITRO, 1981; NEVES, 1985). Em trabalhos citados por Bonassi et al. (1982), o queijo *Mozzarella* de leite de búfala obteve rendimento superior em relação ao elaborado com leite de bovino. Da mesma forma, Rossi (1977) mostrou que o rendimento do queijo com leite bovino foi de 13 a 15% e com leite de búfala de 20 a 25%, devido ao elevado teor de sólidos totais e de gordura.

Entre os componentes do leite de búfala, a gordura é a que apresenta maior variação percentual. Os valores mais frequentemente encontrados oscilam entre 5,5-8,5% (FERRARA, INTRIERI, 1975, VERRUMA, SALGADO, 1994), valores altos quando comparados com a média para o leite bovino integral de 3,4% (SILVEIRA et al., 1989). Ainda, segundo Palomino, Sangana, (2002) a concentração de gordura no leite bubalino corresponde ao dobro do leite bovino, com percentuais 7,5% e 3,5%, respectivamente.

Para Ferrara e Intrieri (1975), o tamanho do glóbulo de gordura do leite de búfala oscilou entre 3,5 e 7,5 nm e adquire maiores dimensões nos estágios mais avançados de

lactação. Já Neves (1985) relata uma variação entre 4,1 a 4,8 nm, enquanto que o leite bovino situa-se entre 3,6 e 4,0 nm.

O colesterol está presente em quantidades pequenas e variáveis nos leite bovino e bubalino, havendo aumento marcante no final da lactação. Segundo estudos realizados por Prasad e Pandita (1990), os resultados apresentados foram 16 e 20 mg de colesterol em 100mL de leite de búfala e bovino, respectivamente.

A gordura do leite de búfala apresenta teores de ácidos graxos saturados ao redor de 64% (TONHATI, CANAES, LIMA, 2004), com maiores concentrações de ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) (VERRUMA, SALGADO, 1994), sendo uma vantagem para saúde, já que o ácido graxo C18:0 são considerados ácidos graxo neutro, não afetando os níveis séricos de colesterol em humanos, conforme demonstrado na tabela 2. Os ácidos graxos insaturados constituem 36% do total, como exemplo, o ácido oléico (C18:1), linoléico e palmitoléico (TONHATI, CANAES, LIMA, 2004; VERRUMA, SALGADO, 1994).

**Quadro 2.** Conteúdo de ácidos graxos do leite de búfala.

Ácidos Graxos	%
C6:0 capríco	0,99
C8:0 caprílico	0,55
C10:0 cáprico	1,06
C12:0 laurico	1,74
C14:0 mirístico	8,66
C15:0 pentadecanoico	1,25
C16:0 palmítico	32,58
C18:0 esteárico	16,67
C20:0 araquídico	0,30
C14:1 miristoleico	0,38
C16:1 palmitoleico	1,82
C18:1n9 oleico	29,97
C18:2n6 linoleico	2,30
C18:3n3 linolênico	0,32
C20:1n9 cis-11 eicosenoico	0,31
Ácidos graxos insaturados (AGI)	35,69
Ácidos graxos saturados (AGS)	64,35
Colesterol	0,026mg.g-1

Fonte: Tonhati et al., 2004.

Segundo a FAO (1991), o teor de lactose no leite bubalino pode variar de 4,40 a 5,07%, sendo que Rossi (1977), em estudos feitos na Itália, apresentou valores similares em torno de 4,60%. Neves (1985) afirma que o teor de lactose do leite de búfala é de 5,66%, Coelho (2004), avaliando o teor de lactose para a Bacia Leiteira do Estado de São Paulo, encontrou valores de 5,02%.

Em relação as características físico-químicas, uma vez que ocorrem diferenças nos componentes principais do leite bubalino, ocorrem mudanças peculiares em relação a essas características nos bubalinos. Segundo estudos de Cunha Neto (2003) e Teixeira, Bastineto, Oliveira, (2005), a densidade do leite de búfala varia conforme os meses de lactação, com níveis entre 1,025 e 1,047 g/mL, segundo a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011) para o leite bovino os valores de densidade variam de 1,028 a 1,034 g/mL. Em relação ao pH, segundo Cunha Neto (2003) o pH variou de 6,41 a 6,97, com acidez entre 20° a 22,3°D para o leite bubalino. Já para Teixeira, Bastineto, Oliveira, (2005) os valores de acidez encontrados são menores, com valores de 14° a 20°D, Palomino, Sangama, (2002) relatam valores de pH

entre 13-18°D, devido ao elevado teor de caseína. Para o leite bovino, os valores encontrados por González (2001) estão na faixa de 10-17°D e o pH entre 6,6 – 6,9. O Índice Crioscópico (IC) oscila entre -0,531 e -0,548°c (CUNHA NETO, 2003) e para o bovino de -0,512°C a -0,531°C (BRASIL, 2011).

Segundo a Resolução SAA - 3, de 10 de janeiro de 2008 (SÃO PAULO, 2008) que regulamenta as normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para aprovação, funcionamento e re-aparelhamento dos estabelecimentos destinados a leite e produtos lácteos considera-se normal que o leite de búfala *in natura* contenha:

- Teor de Gordura Mínimo de 4,5%;
- Acidez (°D) entre 14-23°D;
- pH entre 6,40 e 6,90;
- Extrato Seco Desengordurado (E.S.D.) com no mínimo 8.57%;
- Densidade a 15°C de 1,028 e 1,034
- Índice Crioscópico entre -0,520 e -0,570

Os valores encontrados sobre a composição do leite de búfala são variados (Tabela 3), pois condições de clima, estação do ano, alimentação, raça, manejo, número de lactações, época do parto, e quantidade de leite produzido influenciam na obtenção do produto final (AMARAL et al., 2005; TONHATI et al., 2004; VERRUMA, SALGADO, 1994). Por exemplo, o comportamento reprodutivo sazonal das búfalas reserva para o outono a época de monta e conseqüentemente o verão para estação de parição, alterando a composição e quantidade de leite produzido nestas distintas épocas do ano (AMARAL et al., 2005).

**Quadro 3.** Variações dos componentes do leite de búfala segundo diferentes autores.

Componentes	Leite Bupalino %	Leite Bovino %
Gordura	7.10 <sup>1</sup>	3.80 <sup>1</sup>
	8.16 <sup>2</sup>	3.68 <sup>2</sup>
	6.85 <sup>6</sup>	-
	12,4 <sup>3</sup>	4,00 <sup>3</sup>
	6,83 <sup>4</sup>	-
	4.50 <sup>1</sup>	3.80 <sup>1</sup>
Proteína	4.77 <sup>4</sup>	-
	4,01 <sup>5</sup>	-
	4,23 <sup>6</sup>	-
	6,03	3,5
Cálcio	1.88 <sup>2</sup>	1.30 <sup>2</sup>
Fósforo	0.90 <sup>2</sup>	0.90 <sup>2</sup>
Vitamina A (retinol)	61,28µg <sup>2</sup>	55,65 µg <sup>2</sup>
Lactose	4.83 <sup>4</sup>	4.74 <sup>4</sup>

Fonte: Adaptada de VERRUMA, OLIVEIRA, SALGADO 1993<sup>1</sup>; VERRUMA, SALGADO, 1994<sup>2</sup>; PALOMINO, SANGAMA, 2002<sup>3</sup>, COELHO et al., 2004<sup>4</sup>, AMARAL, 2005<sup>5</sup>, ARAÚJO et al., 2011<sup>6</sup>.

Essas características do leite de búfala comprovam sua potencialidade na utilização tanto para o consumo *in natura* quanto para matéria-prima na elaboração de produtos lácteos que podem variar conforme a cultura de cada região. No Brasil são produzidos queijos tradicionalmente feitos com o leite de búfala, como o queijo *Mozzarella*, queijos nacionais como o Marajoara, o Provolone, a Ricota, Coalho, Queijo minas e o Mascarpone. Cada tipo de queijo requer uma técnica de produção específica sendo que, quando processados a partir do leite de búfala, geralmente apresentam maior rendimento. Além dos queijos, também são

elaborados outros produtos lácteos com o leite bubalino, como o iogurte e o doce de leite (TEIXEIRA et al., 2005).

### 3.3. Queijo *Mozzarella*

O queijo *mozzarella* é um produto de origem italiana que apresenta formatos irregulares (retangulares, esféricos, periformes ou ovóides), com pesos variáveis de poucos gramas até vários quilogramas; de coloração branca, não maturado, consumido puro ou fazendo parte de inúmeros pratos quentes e frios, sanduíches, pizzas e saladas (VALLE et al., 2004). Segundo Fox, Guinee (1987), a produção inicial de queijos de massa filada era concentrada no sul da Itália, região da Campana – perto de Nápoles e na Sicília, utilizando-se frequentemente o leite da espécie bubalina como matéria-prima.

A *mozzarella* é um queijo do grupo de massa filada, apresentando a propriedade de formar fios, em determinadas condições de pH e acidez, quando parte do cálcio é eliminada do complexo fosfocaseinato, caracterizando o processo de desmineralização da coalhada. Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o queijo tipo *mozzarella* é o produto obtido a partir do leite pasteurizado, de massa filada e não prensada, entregue ao consumo até cinco dias após a fabricação, devendo apresentar-se com formato variável, entre cilíndrico chato e paralelepípedo, peso de 15g a 4 kg, crosta fina, consistência de massa semi-dura, textura compacta e fechada, cor branco-creme e homogênea (BRASIL, 1952).

Na tecnologia tradicional, o leite cru integral é inoculado com coalho e cultura *starter* natural para alcançar pH de 5,3 a 5,4 para que a massa possa ser filada (MONTEIRO et al., 2007). Para este tipo de produto utilizam-se culturas termófilas contendo *Streptococcus thermophilus* e bacilos lácticos como *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ou *Lb. helveticus* (PERRY, 2004). Outro ingrediente indispensável é o cloreto de cálcio, utilizado em leite pasteurizado, com objetivo de repor parte do cálcio precipitado pelo tratamento térmico da pasteurização, sendo imprescindível para que ocorra a coagulação, aumentando sua firmeza e consequentemente facilitando a filagem. O coalho adicionado pode ser de origem animal, proveniente do estômago de alguns mamíferos, renina, ou sintetizado por *Aspergillus niger* var. *awamori*, quimosina, cuja função é hidrolisar a ligação phe105-met106 da  $\kappa$ -caseína provocando a coagulação do leite (MONTEIRO et al., 2007). Esta coagulação se origina de modificações físico-químicas da  $\kappa$ -caseína como liberação da fração terminal da  $\kappa$ -caseína, o glicomacropéptido, redução da carga superficial da micela o que irá diminuir o grau de hidratação das micelas, diminuindo a repulsão entre micelas e a interação caseína-água, com o correspondente aumento da atração entre micelas, aumentando assim a sensibilidade de agregação da para- $\kappa$ -caseína, formando então a coalhada (VARNAM, SUTHERLAND, 1995).

A acidificação da massa é uma etapa muito importante e deve ser cuidadosamente controlada, pois a conversão da dicálcio-paracaseína em monocálcio-paracaseína, dará a elasticidade adequada ao queijo (SILVA et al., 1999).

A filagem consiste em tratar amostras da coalhada com água quente, formando fios e moldando repetidamente a massa (SILVA et al., 1999).

Após a filagem moldam-se os queijos na forma de bolas ou outra forma desejada, e, em seguida, são colocados em água à 10° C. As salgas dos queijos são realizadas em salmoura à 17% por aproximadamente 30 minutos, de acordo com peso e tamanho, e após secagem, acondicionados em embalagens plásticas e mantidos sob refrigeração à temperatura de  $\pm 8^{\circ}$  C (VERRUMA-BERNARDI et al., 2000).

Autores como Ferrara, Intrieri (1975), Bonassi et al., (1982) e Verruma, Oliveira, Salgado (1993) mencionam que o percentual de umidade nesse tipo de queijo oscila entre 38 e 48%. Para Castaldo (1960), a *mozzarella* da Itália possui umidade em torno de 57%. A legislação do estado de São Paulo estabelece um valor máximo de umidade de 58% para esse produto (SÃO PAULO, 1992).

O queijo *mozzarella* pode ser encontrado em líquido de conservação (que contém sal e ácido cítrico), em embalagem plástica a vácuo, ou com atmosfera modificada (com nitrogênio e dióxido de carbono), sendo que essas duas últimas apresentações aumentam o período de validade comercial do produto (TEIXEIRA et al., 2005).

### 3.4. Adulteração de Produtos Lácteos

O que define uma fraude, segundo Oetterer (2008), são as atuações de fatores circunstanciais ou deliberadamente provocados que, incidindo sobre os alimentos isoladamente ou em combinação, desmerecem os alimentos comercialmente e provocam prejuízos ao consumidor de ordem biológica e econômica, além de serem antiéticos e conflitarem com a legislação bromatológica. Esses procedimentos são ocasionados muitas vezes pelo valor agregado de algum dos componentes do alimento, ou até do produto na íntegra.

As flutuações na disponibilidade de leite de espécies diferentes da bovina, e o preço mais elevado em comparação ao leite bovino, fazem surgir o incentivo para a adulteração de queijos tradicionais (PERES, VELOSO, DIAS, 2012). A adição fraudulenta de leite de bovino em queijos que deveriam apenas conter leite de búfala poderá levar a uma perda nutricional e a uma perda econômica para o consumidor.

São considerados matérias-primas ou produtos fraudados aqueles que apresentem “modificações espontâneas ou propositais” de natureza física, química ou biológica que alterem características sensoriais, sua composição intrínseca, comprometendo seu valor nutritivo. Assim o produto pode ser considerado adulterado quanto tenha sido empregada substância de qualquer qualidade, tipo ou espécie diferente das expressas na formulação original (BRASIL, 1952).

A garantia de que o consumidor está comprando o que descreve o rótulo do produto em termos de qualidade microbiológica, química, física e econômica, é fiscalizado pelo Código de Defesa do Consumidor. Com esse código o consumidor ganha proteção à vida e à saúde, contra a publicidade enganosa e abusiva, garantia de indenização, bem como o acesso à justiça e à informação (BRASIL, 1990).

O Código Penal Brasileiro especifica a definição de adulteração no capítulo III “Dos crimes contra a saúde pública”, no artigo 272, “Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substâncias de produtos alimentícios destinados ao consumo, tornando-o nocivo a saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo”, com pena de reclusão, de 4 a 8 anos e multa (CONSTITUIÇÃO FEDERAL, 2007).

O Ministério da Agricultura (MAPA), Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Código de Defesa do Consumidor respaldam o consumidor na hora de exigir as características dos produtos oferecidos no comércio do país. A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 259, de 20 de setembro de 2002, o Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, e Portaria nº 157, de 19 de agosto de 2002, determinam os componentes presentes nos rótulos das embalagens de produtos de origem animal e lácteos. A rotulagem deve estar de acordo com a elaboração do produto, sua origem, peso, marca, denominação de venda, sendo obrigatórios a lista de ingredientes, a validade e o lote. Dessa forma a lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990, que se refere ao código de defesa do consumidor, ampara o consumidor de possíveis alterações provocadas pelo produtor na rotulagem, levando à interpretações duvidosas quanto



aos componentes originais, sendo um direito básico do consumidor, a informação clara, adequada, com especificações corretas da quantidade e qualidade do produto, além da proteção contra a publicidade enganosa no produto final.

A prática de mistura de leites para a produção de queijo tipo *mozzarella* prejudica os consumidores, pois, estas podem chegar a 78% de leite bovino em 22% de leite bubalino (DIAS, 2009). O consumo de produtos lácteos de caprinos, ovinos e bubalinos, além de representarem uma iguaria especial, em relação às características sensoriais, como aroma e sabor, apresentam relação com razões nutricionais, econômicas e religiosas.

Para garantir a autenticidade desses produtos, existem inúmeros trabalhos que relatam os resultados positivos da utilização de técnicas imunológicas, PCR, eletroforese, espectroscópicos, e cromatográfico, utilizando como marcadores de autenticidade, principalmente, proteínas do soro e caseínas.

### 3.5 Técnicas de Detecção de Adultrações

#### 3.5.1 Métodos imunológicos

Diversos métodos imunológicos, para detecção de frações de caseína bovina, podem ser encontrados na literatura. No início dos anos 70, o desenvolvimento de técnicas imunológicas que utilizavam a enzima como marcador tornou esses testes aplicáveis a alimentos (VELOSO et al., 2008).

A técnica imunológica está baseada na presença de antígenos e anticorpos em uma amostra, no caso, frações específicas de proteínas do leite bovino. Como anticorpos, são utilizados os monoclonais, (células homogêneas derivadas de uma célula produtora de anticorpos, onde todos os anticorpos possuem a mesma especificidade necessária para um antígeno), ou policlonais (clones de células únicas propagadas em meio de cultura com uma única especificidade), altamente específicos, que ao reagirem formam um complexo antígeno-anticorpo precipitado (BENJAMINI, 2002).

Embora haja outras técnicas para análise de adultração baseada na determinação de proteínas, o método imunológico ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent assay* ou Ensaio de Imunoabsorção ligado à enzima) mantém-se como alternativa viável devido a sua simplicidade, baixo tempo de elaboração, especificidade e sensibilidade (BORKOVÁ, SNÁSELOVÁ, 2005), além de não requerer equipamentos especializados (ASENSIO et al., 2008). Para Richter et al., (1997), o ELISA indireto apresenta sensibilidade de 1 - 10% em leite ou queijo.

Existem duas variações para o teste ELISA, segundo Asensio et al., (2008): o ELISA indireto, utilizando dois anticorpos, um específico ao antígeno e outro conjugado à enzima. Neste, o segundo anticorpo dará a reação enzimática, que quando presente poderá ser observada e quantificada por diferentes técnicas. Na segunda forma mais utilizada, o ELISA sanduíche, o antígeno é colocado entre dois anticorpos, para detecção e captura do anticorpo e um dos anticorpos estará conjugado com a enzima para que possa ser analisada a formação do complexo, por técnicas como cromatografia, fluorescência e densitometria. Dessa forma, os testes ELISA podem apresentar resultados de forma qualitativa e quantitativa.

Os testes imunológicos são baseados, principalmente, na caseína como antígeno, devido a estabilidade a tratamentos térmicos, o que possibilita a utilização destes em análises de produtos lácteos pasteurizados. As principais frações da caseína analisadas são as  $\beta$ -caseína, -caseína,  $\alpha_2$  - caseína,  $\kappa$  - caseína e a imunoglobulina IgG (RICHTER et al., 1997; HURLEY, et al., 2004; HAZA et al., 1999; HAASNOOT et al., 2004). O limite de detecção desses marcadores pode detectar até 0,1% de antígeno bovino em leite de outras espécies (HURLEY, et al., 2004).

### 3.5.2 Métodos baseados em DNA

A técnica de PCR (*Polymerase chain Reaction* ou Reação em cadeia da polimerase) baseia-se na análise de DNA, amplificando fragmentos de DNA mitocondrial de células somáticas, leucócitos, células mamárias e  $\beta$  - caseína, permitindo detectar e amplificar pequenos fragmentos de DNA (REALE et al., 2008).

É possível extrair DNA de produtos lácteos processados utilizando este como substrato para amplificação por PCR da sequência de DNA da fração de caseína a ser analisada. São utilizados *primers* (Oligonucleicos específicos), codificando a sequência do gene desejado, amplificando e identificando por eletroforese (VELOSO, 2002). Essa técnica possibilita que sequências de DNA sejam multiplicadas em milhões de cópias, facilitando sua análise genética, aumentando a sensibilidade, especificidade e analisando um grande número de amostras simultaneamente. Esse processo se assemelha ao processo de replicação de células vivas (EMBRAPA, 2007).

Essa técnica apresenta sensibilidade alta, de acordo com Feligini et al., (2005), no nível de 0,5% de mistura de espécies, podendo chegar a 0,1% de limite de detecção, para Masková, Paulicková (2006) essa sensibilidade não ultrapassa o limite de 1% de mistura. Sua alta sensibilidade e especificidade na análise de adulterações compensam o preço alto da técnica, sendo amplamente utilizada na Europa.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na ampliação desses fragmentos de DNA como: Multiplex PCR (BOTTERO et al., 2003; LÓPEZ-CALLEJA et al., 2005; BANIA et al., 2001; REALE et al., 2008), Simplex-PCR (BOTTERO et al., 2003), SSCP- PCR (*Single-Stranded Conformation Polymorphism, analysis*) (PLATH, KRAUSE, EINSPANIER, 1997; BANIA et al., 2001), Duplex PCR (REA et al., 2001; MAFRA et al., 2004), *SYBR-Green Real-Time- PCR* (FELLIGINI et al., 2005) e RFLP -PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTTERO et al., 2003; BANIA et al., 2001).

### 3.5.3 Métodos eletroforéticos

A eletroforese vem do grego "transporte por eletricidade", onde as proteínas migram submetidas a um campo elétrico, as cargas positivas e negativas são atraídas para seus pólos contrários correspondentes e assim sendo possível sua separação e identificação. Além de sua carga, sua forma, tamanho e associação com outros íons, podem alterar sua mobilidade (SILVA, 2001).

Essa técnica apresenta alta sensibilidade, porém com percentuais distintos conforme o tipo, segundo Egito et al.,(2006), o método Uréia-PAGE (Gel de poliacrilamina contendo uréia) pode detectar em torno de 2,5% de adição de leite bovino em outras espécies e 1% de leite misturado através do método de IEF (*Isoelectric Focusing* ou Focalização Isoelétrica). Dennis (1998), utilizando EC (Eletroforese Capilar) relata limite de detecção de fraude ao redor de 2,5%, empregando o modo de separação Ureia-PAGE e Borková, Snaselová (2005), através de IEF, relataram a possibilidade de detecção de 0,5% e 1% de adição de leite por fraude. Esta diferença de sensibilidade está no tipo de separação das proteínas nos diferentes meios, dessa forma o objetivo da separação indicará o tipo de eletroforese selecionado.

O método de Uréia-PAGE separa por diferença na carga elétrica e o SDS- PAGE (Gel de Poliacrilamida com sódio dodecil sulfato) por tamanho da molécula, esses dois tipos podem separar por grupos de proteínas e variações genéticas (EGITO et al., 2006; AMIGO et al., 1991). Na IEF, os diferentes pontos isoelétricos, onde a carga dos compostos é nula, determinam a individualidade das caseínas em gradiente de pH desejado. Sendo este um método oficial para a União Européia, onde a EC 213/2001, anexo XV, especifica a

metodologia para identificação de adulteração analisando caseína de leite bovino, podendo ser utilizada em produtos lácteos processados e crus (EUROPEIAN COMMISSION, 2001).

### 3.5.4 Métodos espectroscópicos

Uma nova técnica para determinação de proteínas se apresentou como alternativa para análise na indústria de alimentos. A espectroscopia de infravermelho pode ser utilizada para identificação de componentes do alimento, assim como sua quantificação, tendo a vantagem de ser um método rápido, podendo chegar a 400 amostras/h, com custo moderado de equipamentos, facilidade de preparação da amostra, podendo ser realizada muitas vezes no alimento íntegro (RODRIGUEZ-OTERO et al., 1997; PAPPAS et al., 2008).

Este método analisa vários parâmetros ao mesmo tempo, podendo separar proteína, caseína e proteína do soro (QIAOQIAN et al., 1999), lipídios, lactose, cinzas, entre outros (BARBANO et al., 1987), além de verificar vários tipos de adulteração, como no relato González-Martin et al., (2007) analisaram o percentual de adição de leite de diferentes espécies ao longo de seis meses de maturação, sendo possível detectá-los com segurança, após este período, se mostrando uma alternativa no combate a adulteração de queijos maturados.

A técnica para análise das matérias-primas de diferentes espécies se baseia nos diferentes picos espectrais apresentados pelas proteínas das distintas espécies após sofrerem isolamento, com alteração de pH, dessa forma uma análise estrutural dos grupos funcionais presentes em determinadas regiões do espectro, a partir de seus perfis característicos, podem ser quantificados através de curvas analíticas (RODRIGUEZ-OTERO et al., 1997).

### 3.5.5 Métodos cromatográficos

Vários estudos relatam a utilização da cromatografia líquida como forma de determinação de adulteração em produtos lácteos, analisando principalmente, as diferentes formas das proteínas presentes no leite bovino e de outras espécies, determinando a presença de frações da caseína ou proteínas do soro, como alfa- lactoalbumina e beta- lactoglobulina.

Em estudos realizados por Borvoká, Snaselová (2005), os autores utilizaram a CLAE de fase reversa com finalidade de identificar e quantificar a presença de proteínas do soro,  $\beta$ - lactoglobulina e  $\alpha$ - lactoalbumina, como detecção da origem do leite adicionado na quantidade mínima de 2%, utilizando coluna Chrompack P300, e detector UV/Vis a 205 nm.

Mayer (2005) utilizou a cromatografia líquida de troca iônica para separar proteínas do leite, como a  $\alpha_{s1}$ - caseína e para-k-caseína, em leites e queijos frescos, utilizando detector UV/vis a 280 nm, com coluna Shodex IEC CM 825 (8mm x 75mm) Waters<sup>®</sup>.

Enne et al. (2005) utilizou a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para analisar  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, utilizando coluna C4 (250mm x 4,6mm x 5 $\mu$ m) e detector UV/vis para identificar adição fraudulenta de 0,5% de leite bovino em queijo *mozzarella* de leite bubalino.

A cromatografia líquida pode identificar não só proteínas e aminoácidos, mas também, pigmentos, como carotenóides, e vitaminas, como retinol. A utilização desses compostos como marcadores da autenticidade em derivados lácteos é uma área pouco explorada, e que apresenta promissor futuro, como será apresentado neste estudo.

A cromatografia líquida em coluna divide-se em: cromatografia clássica, utilizando coluna de vidro sob pressão atmosférica, onde o fluxo da fase móvel movimentava-se devido a força da gravidade (cromatografia em coluna aberta); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que utiliza colunas metálicas com partículas esféricas porosas entre 3 a 5 $\mu$ m e diâmetro interno entre 3,0 a 4,6mm (VICHENEWSKI, 2006; DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998), e a partir de 2004, a utilização da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) que

utiliza colunas com diâmetro interno entre 1,0 a 2,1 $\mu$ m, com partículas menores que 2 $\mu$ m e pressão acima de 100MPa (MALDANER, JARDIM, 2009).

#### 3.5.5.1 Cromatografia líquida clássica

A cromatografia clássica ou de coluna aberta pode ser utilizada para separação e purificação de produtos naturais, ou preparação desses compostos para outras técnicas cromatográficas, por exemplo, isolamento de padrões para CLAE. As fases estacionárias mais utilizadas são sílicas e aluminas (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998; VICHENEWSKI, 2006), em alguns casos óxido de magnésio, sílica de magnésio, carvão, dextranas e polímeros de estireno, com partículas entre 63 a 200 $\mu$ m (VICHENEWSKI, 2006). A utilização do óxido de magnésio, segundo Vichenevski (2006), pode ser realizada para separação de carotenóides e porfirinas. Essas fases estacionárias são adicionadas a tubos de vidro, na posição vertical, aberto na extremidade superior e, que, afunilam na extremidade inferior e terminam em uma torneira que permite o controle de saída da fase móvel utilizada na separação. Antes de ser adicionada à coluna de vidro, a fase estacionária deve ser aquecida para dessorção da água, ou seja, sua ativação a temperatura em torno de 200°C por duas horas. O processo de separação baseia-se na atividade adsorvente e polaridade da fase estacionária, e nas características de solubilidade e baixo ponto de ebulição do solvente escolhido como eluente.

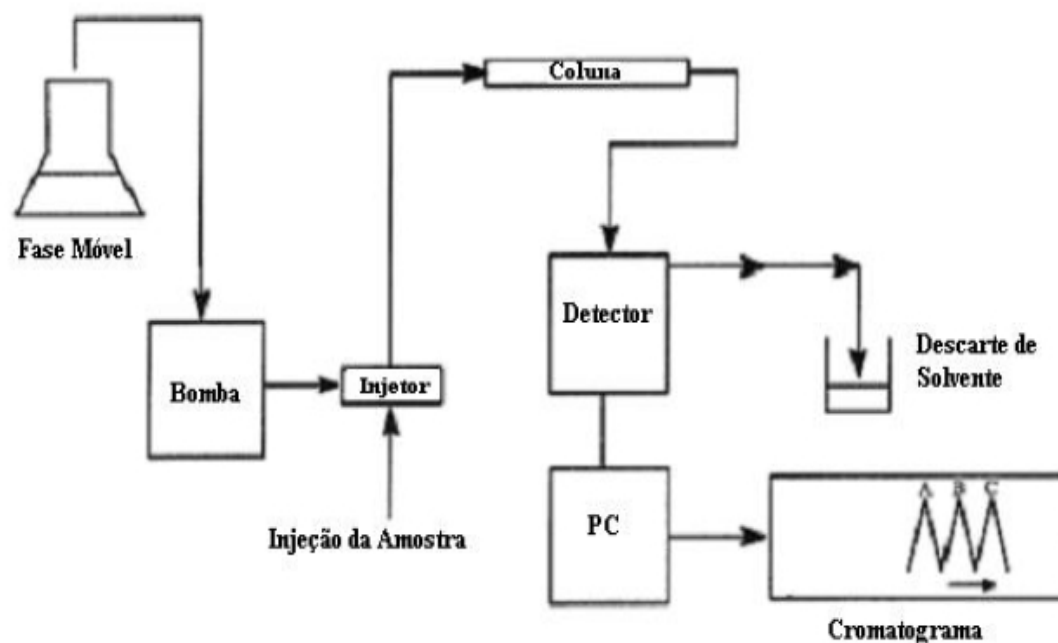
#### 3.5.5.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

A técnica por CLUE baseia-se na diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária, aumentando a rapidez e seletividade, sem comprometer o desempenho cromatográfico. Com esse objetivo no ano 2000, as partículas que recheavam as colunas cromatográficas tornaram-se esféricas e mais porosas, com tamanhos de 2,5 $\mu$ m, tornando mais rápida as separações. Com a diminuição das partículas o número de pratos teóricos poderia chegar a 25000 pratos/15cm, (MALDANER, JARDIM, 2009; LANÇAS, 2010), com o aumento do número de pratos teóricos há um aumento de sítios ativos disponíveis para separação dos compostos, aumentando o tempo de retenção, separando melhor os analitos, aumentando a seletividade, isto é, a distinção entre os picos.

Devido a diminuição das partículas e redução no tamanho das colunas, o diâmetro interno precisou ser reduzido para 1,0 a 2,1 $\mu$ m, para minimizar o efeito da alta pressão sobre o solvente, e a utilização de filtro com poros menores para reduzir o risco de entupimento e resistir as altas pressões (MALDANER, JARDIM, 2009). Assim, surgiram as colunas para utilização nessas condições, as colunas Zorbax (*Eclipse Densely Bonded – XDB* e a *StableBond-SB*) e as Acquity UPLC BEH. Exigência da técnica que não permitia a utilização das colunas tradicionais da cromatografia líquida de alta eficiência, devido a alta pressão necessária no CLUE.

#### 3.5.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os componentes básicos de um cromatógrafo líquido são: solvente, bomba, injetor, coluna, detector e o programa do computador, conforme representado pela figura 2.



**Figura 2:** Esquema de funcionamento básico de um cromatógrafo líquido  
 Fonte: ROSA, 2005

Os solventes utilizados nesta técnica devem ser de alta pureza, e podem ser bombeados em modo isocrático, utilizando um único solvente ou percentuais constantes de solventes, ou em modo gradiente, onde ocorrem variações nos percentuais ou quantidades de solventes na constituição da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica, em muitos casos melhorando a separação dos compostos químicos da mistura.

As colunas utilizadas na CLAE podem ser divididas de duas formas: as colunas de fase normal e as de fase reversa, baseando-se na polaridade dessas fases em relação a fase móvel.

Na cromatografia líquida de fase normal, a fase estacionária, normalmente de sílica, apresenta-se mais polar que a fase móvel, e na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária, comumente utilizando sílica modificada quimicamente, apresenta-se apolar devido à incorporação de grupos orgânicos apolares ou grupos alquilas, e utilizando fase móvel mais polar (PRADO, FARIA, PADILHA, 2005; TONHI et al., 2002).

A sílica é um polímero inorgânico, resistente, amorfo e com alta porosidade. A presença de grupos silanóis em sua superfície permite a modificação química, com intuito de produzir novos materiais, com versatilidade de funções. Dependendo do tipo de ligação entre o suporte e a cadeia, essas fases mostram maior estabilidade a alta temperatura, variações de pH e dissolução pela fase móvel (JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006).

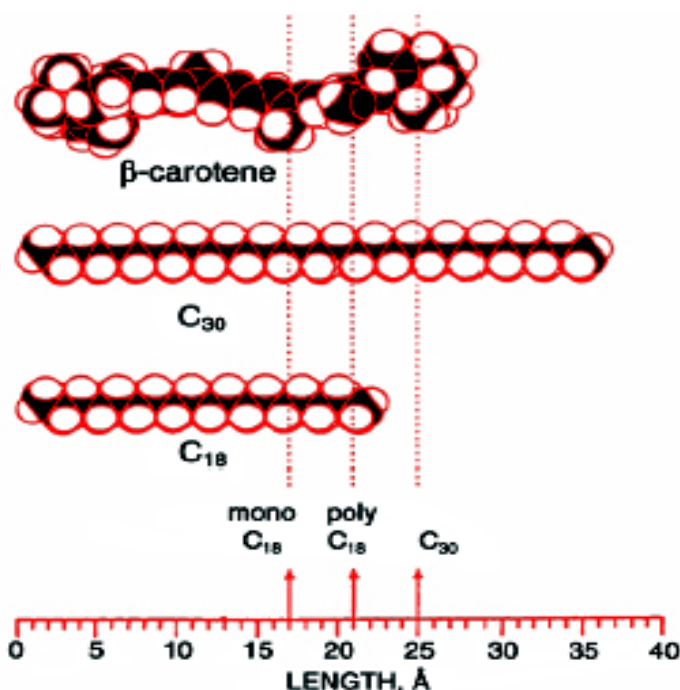
A fase reversa é muito utilizada devido a utilização de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, facilidade de empregar eluição em gradiente, maior rapidez das análises, com grande variedade de tamanho das partículas, formas e tamanhos dos poros, entre outras (PRADO, FARIA, PADILHA, 2005; MALDANER, COLLINS, JARDIM, 2010; McCALLEY, 1999; TONHI et al., 2002).

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) foi descrita como técnica mais eficiente para determinação de retinol e seus isômeros (TANUMIHARDJO, PENNISTON, 2002; ESCRIVÁ et al., 2002; MENDONZA et al., 2003; BREEMEN et al., 1998), utilizando eluição isocrática ou gradiente, com solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, e hexano, ou a mistura desses, como fase móvel, utilizando

colunas  $C_{18}$  (HEUDI et al., 2004; LI et al., 2005; MENDONZA et al., 2003) ou  $C_{30}$  (BREEMEN et al., 1998). A fase reversa pode ser utilizada com a mesma eficiência para separação de carotenóides. Segundo estudos de Azevedo-Meleiro, Rodriguez-Amaya (2004), Sentanin, Rodriguez-Amaya (2007), Guarantini et al., (2009) e Lacker, Stronschein, Albert (1999), entre outros, com fase móvel composta por solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, acetato de etila, éter metil-*terc*-butílico em eluição gradiente ou isocrática, utilizando colunas de fase reversa  $C_{18}$  monomérica ou  $C_{30}$ .

Das colunas recheadas com sílica quimicamente modificada podem ser encontradas as colunas  $C_{18}$ ,  $C_8$ ,  $C_4$ ,  $C_3$  e  $C_1$  (PATTO, TAVARES, PEREIRA, 2009). As mais utilizadas para análises de compostos apolares são as colunas  $C_{18}$ , que se apresentam na forma monomérica ou polimérica. Segundo Collins, Jardins e Guimarães (2006) e Ohta et al., (2000), quando existe um grupo silano monofuncional, existe apenas uma única forma de ligação entre a molécula do agente sililante e a superfície da sílica, formando uma fase monomérica, isolada, com estrutura do tipo “escova”, os grupos ativos estão dispostos quase perpendicularmente à superfície da sílica. Na polimérica ocorre reação do reagente sililante em todas as direções formando uma rede tridimensional sobre a superfície do suporte, apresentando uma forte tendência a “reconhecer” moléculas de forma mais seletiva que as colunas monoméricas.

Com surgimento da coluna  $C_{30}$  pode-se obter maior seletividade e resolução na identificação de isômeros *cis/trans* de substâncias como os carotenóides que apresentam estrutura com 40 carbonos, melhorando a quantificação e identificação desses compostos e seus isômeros. A empresa YMC co. LTDA criou esta fase estacionária especialmente para análise de carotenóides, sendo designada “ $C_{30}$  Carotenoid”, mas pode ser utilizada também na identificação de compostos retinóides, tocoferóis e seus isômeros (LANE, WEBB, ACUFF, 1997).



**Figura 3:** Comparação do comprimento das fases  $C_{18}$  monomérica, polimérica e  $C_{30}$  com o comprimento molecular do beta-caroteno

Fonte: [http://ymc.co.jp/en/columns/ymc\\_carotenoid/](http://ymc.co.jp/en/columns/ymc_carotenoid/).

Segundo Sander, Shapless, Pursch (2000) o tamanho das moléculas de carotenóides ( $\pm 30$  Å), quando comparadas com o tamanho das moléculas da fase estacionária  $C_{18}$  monomérica ou polimérica ( $\pm 21$  Å) apresentam pouca interação, dificultando a separação dos isômeros. Já nas colunas  $C_{30}$  ( $\pm 150$  Å), conforme representado pela figura 3, haveria interações mais extensas com a fase estacionária, melhorando a separação dos isômeros. A preparação da fase estacionária com uma extensão da carga de carbonos aumenta o tempo de retenção do analito, devido a uma maior força de interação entre as moléculas de carotenóides e as da coluna  $C_{30}$ .

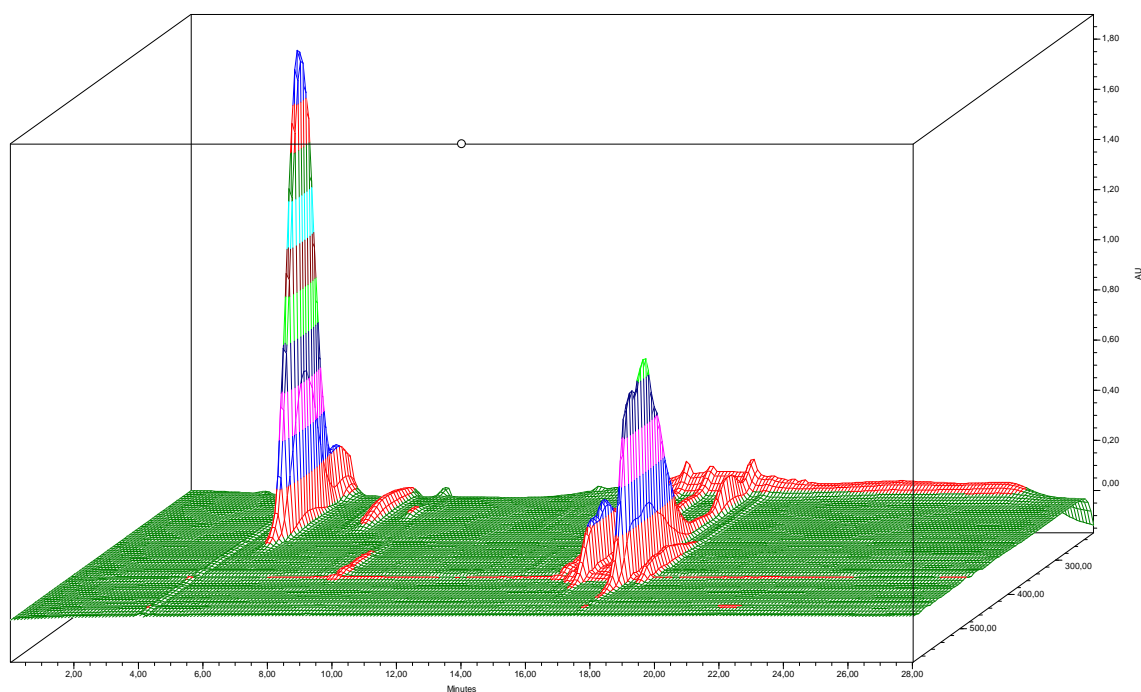
Estudos realizados por Ohta et al., (2000); Sander, Shapless, Pursch (2000); Lacker, Strohschein, Albert (1999) e Strohschein et al., (1997) indicam que o comprimento da cadeia alquil ligada à fase estacionária contribui para separação dos compostos devido à diferença na retenção, podendo separar isômeros *cis/trans*.

A detecção das substâncias separadas no cromatógrafo pode ser realizada por diversos tipos de detectores: detectores por fluorescência, por índice de refração, eletroquímicos, absorvância no infravermelho, de radioatividade, absorvância no ultravioleta e no visível (UV-Visível), e espectrômetro de massas. A escolha dependerá das características físicas e físico-químicas da amostra, da sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão do detector em relação ao analito, e se a detecção é destrutiva ou não destrutiva.

Os detectores UV-Visível medem a absorção da radiação pelas amostras, convertendo uma mudança de concentração na fase móvel num sinal, nas regiões do ultravioleta, visível e/ou infravermelho do espectro eletromagnético em um dado comprimento de onda ( $\lambda$ ), e devem ser utilizado em amostras que possuem cromóforos. A resposta será seletiva, uma vez que só serão detectadas amostras que absorvam naquele comprimento de onda específico (CASS, DEGANI, 2009; ROCHA, TEIXEIRA, 2004; JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006; CIOLA, 1998). Os equipamentos podem emitir luz ultravioleta através de lâmpada de deutério (190-600nm) e na região do visível através de lâmpada de tungstênio (350-900nm).

Existem três grupos de detectores UV-Visível: fotométricos, funcionam em um ou dois comprimentos de onda fixos, os espectrofotômetros, que operam em comprimento de onda variável, permitindo escolher o comprimento de onda mais adequado para cada análise, e os por arranjos de fotodiodos que detectam vários comprimentos de onda simultaneamente, podendo realizar “varreduras” na região do UV-Vis. O detector de arranjo fotodiodo consegue obter espectros tridimensionais mostrando absorvância, comprimento de onda e tempo de retenção, e é possível selecionar o comprimento de onda máximo e armazenar o espectro de absorção de cada pico, melhorando a detectabilidade, permitindo identificar qualitativamente compostos por comparação com padrões ou bibliotecas de espectro já analisados, e auxiliar na identificação de amostras desconhecidas no seu melhor comprimento de onda (Figura 4) (CASS, DEGANI, 2009; JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006).

Na literatura estudos realizados por Albála-Hurtado et al. (1997), Choi et al. (2004), Herrero-Barbudo et al. (2005), entre outros, mostram a utilização do detector de arranjo de fotodiodos para identificação de retinol. Estudos de Azevedo-Meleiro, Rodriguez-Amaya (2004), Sentanin, Rodriguez-Amaya (2007) e Pacheco (2009) utilizam o mesmo tipo de detector para identificação de carotenóides.



**Figura 4:** Espectro de absorção na região do ultravioleta em 3D ( $t_R$ , comprimento de onda (nm) e concentração) de extrato de fígado bovino

O detector de espectrometria de massas analisa amostras fornecendo informações da massa molar e sobre a estrutura do analito. Esse detector permite confirmar a presença do analito devido aos dados de massa molar e estrutural, e tem a vantagem de ser altamente seletivo, permitindo identificar picos sobrepostos e avaliar a presença de interferentes no pico, entre outras (JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006). Apresenta três etapas principais: após separação pela coluna cromatográfica, o analito passa pela fonte de ionização e ocorre à produção de íons com diferentes cargas elétricas (transformação de uma espécie neutra em solução, em íon numa fase gasosa), depois esses íons passam pelo analisador de massas e são analisados em relação à massa/carga ( $m/z$ ), dessa forma o detector de íons determina a intensidade da corrente de íons e esses dados são captados pelo programa de aquisição e processamento de dados (MORAES, LAGO, 2003; JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006).

As fontes de ionização, atualmente, mais utilizadas acopladas a CLAE ou CLUE são: ionização por *eletrospray* ou eletronebulização (da sigla em inglês ESI), ionização química à pressão atmosférica (da sigla em inglês APCI), fotoionização à pressão atmosférica (da sigla em inglês APPI), e fonte de impacto eletrônico (da sigla em inglês EI) (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008). Quando o analito dissolvido na fase móvel passa através de um capilar em alta voltagem, ocorre a formação de pequenas gotas carregadas (*spray* ou formação de nebulização) que sofrem dessolvatação ao se deslocarem no sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo. Com a dessolvatação, o tamanho das partículas é reduzido até o ponto em que as forças de repulsão vencem a tensão superficial e microgotas com 10% do tamanho das gotas são originadas pela chamada "explosão coulômbica" (fissão da gota inicial), onde as gotículas possuem uma razão massa/carga menor (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008; MORAES, LAGO, 2003; CROTTI et al., 2006).

Segundo Moraes e LAGO (2003) a dessolvatação do íon ocorre a temperatura relativamente baixas, porém, muitas vezes ocorrem mudanças na estrutura e carga das



espécies em solução, porque, frequentemente, a substância está estabilizada devido a camada de solvatação. À medida que o analito é dessolvatado, tende a realizar processos que levem a redução de sua carga. Segundo Crotti et al., (2006) durante a ionização por “electrospray” podem ser geradas moléculas protonadas/desprotonadas e moléculas cationizadas ou anionizadas, formando um *spray* de partículas carregadas.

Depois de formado, o íon alcança a região do capilar ou cone de amostragem que tem um orifício muito pequeno ( $\mu\text{m}$ ), passando por um sistema de baixa pressão. Na região entre o cone de amostragem e o *skimmer* pode ocorrer dissociação induzida por colisão, devido ao campo elétrico que provoca colisão entre os íons formados e o gás secante ( $\text{N}_2$ ). Essas colisões podem levar a rearranjos intramoleculares e fragmentação do analito (MORAES, LAGO, 2003).

Em seguida, os íons são levados ao analisador de massas, que podem ser de diferentes tipos, quadrupolo, analisador de tempo de voo - *Time-of-Flight Analyser*, *Ion-trap*, triplo quadrupolo, etc. (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008), que separam os íons por diferentes mecanismos, onde, lentes carregadas com carga oposta ao do capilar ou criando campos eletromagnéticos, conduzem os íons ao detector de massas em diferentes velocidades em relação a massa e a carga elétrica ( $m/z$ ), em quantidade suficiente para que possa gerar uma corrente de íons perceptível para o detector, gerando sinais elétricos que são processados pelo programa do computador.

Em estudos de Azevedo-meleiro, Rodriguez-Amaya (2004) e Li et al., (2005) foram utilizados detectores de massa com fonte ESI+ para identificação de carotenóides e retinol, respectivamente. Heudi et al., (2004) e estudos de Oliver et al., (2000) relatam a utilização de fonte APCI para identificação dessas substâncias em relação a  $m/z$ .

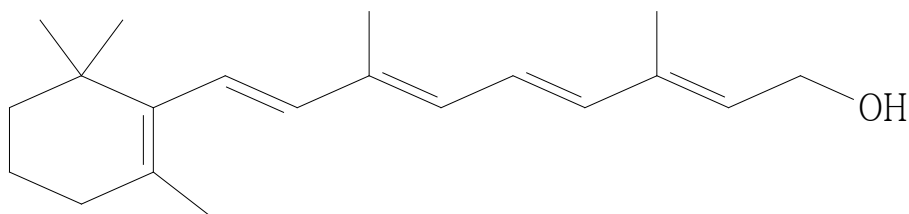
### 3.6 Retinol

O retinol ( $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ ), apresenta nome químico de (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol, de massa molar  $286 \text{ g mol}^{-1}$  (CHOI et al., 2004), (figura 5), solúvel em solventes orgânicos e lipídios, com absorvância em comprimento de onda de 325nm (O'NEIL, 2006), apresenta função sobre a visão, crescimento, desenvolvimento embrionário, e funções imunológicas, sendo encontrado somente em fontes de origem animal, como o fígado, óleo de fígado de peixes, leites integrais e derivados, ovos e carnes de aves. Na visão o retinol participa da formação de pigmentos fotossensíveis, como a rodopsina, que transmite ao nervo ótico as diferentes absorções de luz e a adaptação ao escuro. No crescimento normal, o retinol e seus metabólitos, agem na ativação de receptores para regulação de vários genes que codificam proteínas estruturais, enzimas, proteínas da matriz celular e receptores (BURTIS, BRUNS, 2008; KRAUSE, 2005; MAJCHRZAK, FABIAN, ELMADFA, 2006; WYS, 1995).

Os retinóides são compostos sensíveis a luz, calor e  $\text{O}_2$ , ligado fortemente a proteínas, insolúvel em soluções aquosas, apresentando isômeros geométricos, podendo sofrer processo de fotoisomerização (WYS, 1995). Podem ser encontrados isômeros *cis/trans* como all-*trans*-retinol, 13-*cis* – retinol, 9,11-*cis*-retinol, 9,13-*cis*-retinol e 9-*cis*-retinol (PANFILI, MANZI, PIZZOFERRATO, 1994). A presença de compostos de configuração *cis* reduz o efeito vitamínico do retinol (ESCRIVÁ et al., 2002), por exemplo, a isomerização do all-*trans*-retinol a 13-*cis*-retinol reduz para 75% o potencial vitamínico da substância (PANFILI, MANZI, PIZZOFERRATO, 1994). Devido às características químicas do retinol, presença de duplas ligações conjugadas, a substância apresenta absorvidade molar em comprimento de onda na região do ultravioleta, por isso é possível a identificação, de maneira seletiva e sensível, utilizando detector de arranjo fotodiodo (WYS, 1995; BREEMEN et al., 1998;

TANUMIHARDJO, PENNISTON, 2002; MENDONZA et al., 2003; HEUDI et al., 2004; LI et al., 2005).

O processo de extração é utilizado como pré-tratamento das amostras devido a complexidade das matrizes alimentícias, pois a ação de interferentes sobre a coluna cromatográfica poderia reduzir sua vida útil e interferir nas análises, principalmente de amostras com pequenas concentrações de analito. Nestes casos, uma etapa de hidrólise alcalina com hidróxido de potássio (KOH) em solução de metanol ou etanol, e adicionada de antioxidante, como por exemplo, 2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT), benzeno-1,2,3-triol (pirogalol) ou ácido ascórbico deve preceder as análises cromatográficas. Na extração líquido-líquido ocorre partição da amostra em duas fases imiscíveis, sendo normalmente um solvente aquoso e outro orgânico, como éter de petróleo, éter etílico, hexano, ou a mistura desses solventes (WYS, 1995, TANUMIHARDJO, PENNISTON, 2002; PANFILI, MANZI, PIZZOFERRATO, 1994; ALBALÁ-HURTADO et al., 1997; CHOI et al., 2004), para separação da ligação do retinol com proteínas e gorduras (HEUDI et al., 2004). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração e o ponto de ebulição do solvente orgânico deve ser levado em consideração, uma vez que, é necessária sua evaporação para concentração do analito. Esse tipo de extração apresenta as vantagens de ser simples, pode ser utilizado apenas funil de separação ou tubos de centrifuga, pode ser utilizado um grande número de solventes, com ampla faixa de solubilidade e seletividade, e nesse processo há desnaturação de proteínas que poderiam interferir na vida útil da coluna (CASS, DEGANI, 2009; QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001).



**Figura 5:** Estrutura química do retinol

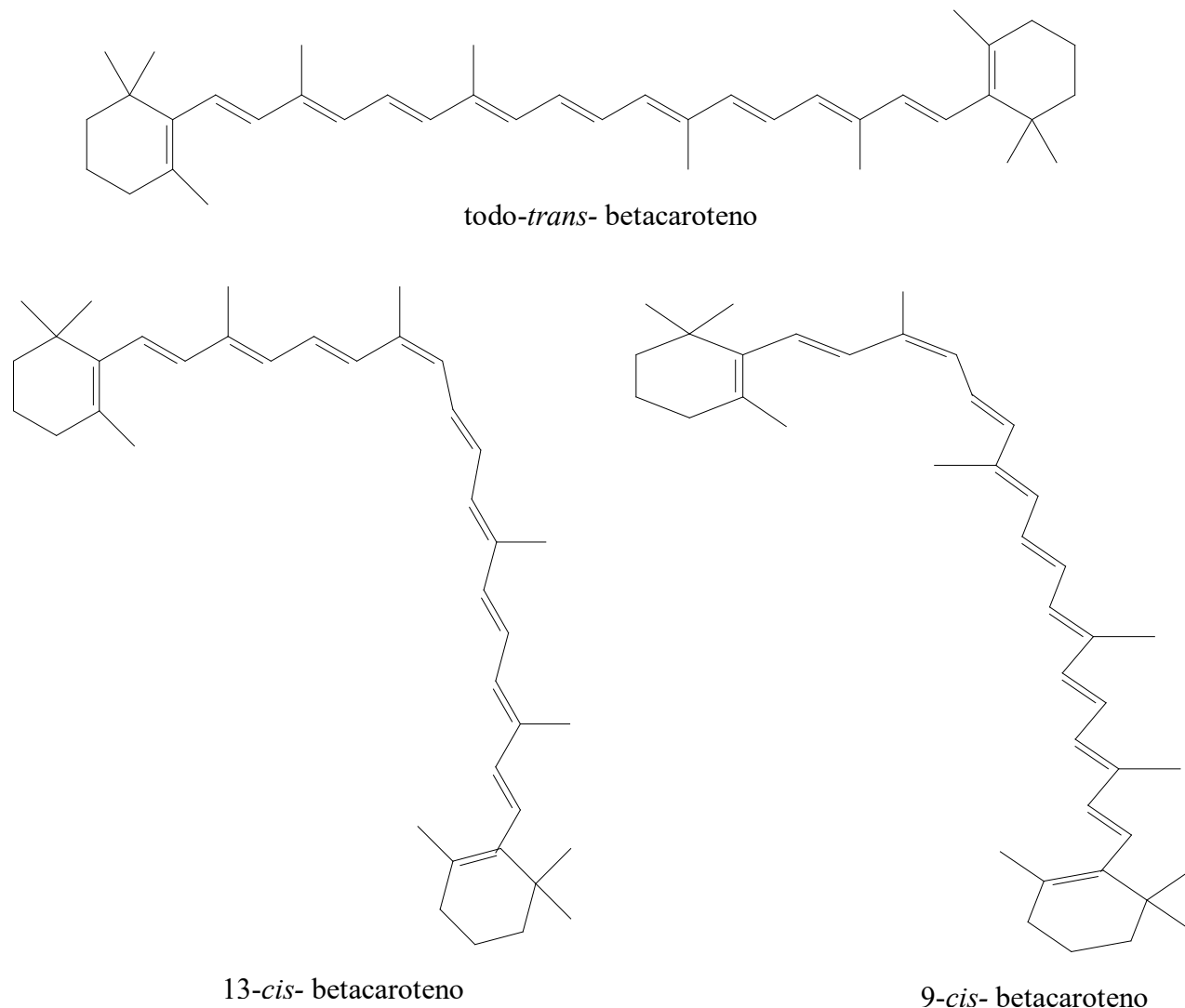
### 3.7 Carotenóides

Os carotenóides são um grupo de pigmentos naturalmente presentes em plantas, algumas formas de algas, bactérias, fungos e leveduras. Os animais são incapazes de produzi-los, assim, dependem da alimentação, de como ocorre a absorção e a conversão em vitamina a, deposição e/ou alteração desses durante o metabolismo, para sua obtenção (SU et al., 2002; GUARANTINI et al., 2009; QUIRÓS, COSTA, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004.)

Os carotenóides presentes em alimentos são compostos tetraterpenóides (C<sub>40</sub>) com oito cadeias isoprenóide (C<sub>5</sub>) unidas em sequência (figura 6). A cadeia carbônica simétrica pode apresentar um grupo cíclico, anel β-ionona, no final da cadeia em uma ou ambas as extremidades, podendo ser acíclico (licopeno), monocíclico (γ-caroteno) ou bicíclicos (α e beta-caroteno), apresentando grupos metílicos laterais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA E KIMURA, 2004; OLIVER, PALOU, 2000; SU et al., 2002).

Existem mais de 600 carotenóides isolados e caracterizados de fontes naturais, não incluindo as formas *cis* e *trans* (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; SU et al., 2002), sendo os mais comuns α-caroteno, beta-caroteno, luteína, zeaxantina, licopeno e criptoxantina (SU et al., 2002). Alterações químicas como ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de

duplas ligações, extensão da cadeia, rearranjo, isomerização e introdução de O<sub>2</sub>, ou a combinação dessas reações podem originar uma infinidade de estruturas (RODRIGUES-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004; SU et al., 2002).



**Figura 6:** Estrutura química do beta-caroteno e seus isômeros 13-*cis*-beta-caroteno e 9- *cis*-beta-caroteno

As moléculas de carotenóides possuem um sistema de duplas ligações conjugadas que constituem o grupo cromóforo responsável pela cor que proporcionam aos alimentos. O aumento de ligações conjugadas resulta em maiores bandas de absorção em maiores comprimentos de onda, e, neste caso, os carotenóides tornam-se mais vermelhos. Um cromóforo de sete ou mais duplas ligações conjugadas confere a capacidade de absorver a luz na região visível, atribuindo-lhes colorações do amarelo ao vermelho (PASSOS, 2007; PACHECO, 2009). As duplas ligações podem ocorrer na forma *cis* ou *trans*, sendo a forma *trans* mais frequentemente encontrada na natureza.

O sistema de duplas ligações conjugadas oferece a esses compostos além do grupo cromóforo, que diferencia os compostos em reação ao comprimento de onda, a função de antioxidante no organismo. Esse sistema ocasiona a possibilidade de reagir com radicais que causam peroxidação lipídica e espécies reativas de O<sub>2</sub>, como o O<sub>2</sub> singlete (SU et al., 2002; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). O mecanismo de ação antioxidante pode ser efetuado de duas formas: os carotenóides sequestram o O<sub>2</sub> e transferem energia de excitação do O<sub>2</sub> singlete para eles, resultando na formação de carotenóide tripleto, que pode retornar ao seu estágio não excitado após dissipar energia em excesso na forma de calor, ou através do processo de reação química entre o O<sub>2</sub> singlete e o carotenóide resultando em destruição irreversível do carotenóide. As 11 duplas ligações conjugadas do beta-caroteno oferecem a máxima função desses compostos (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008). O efeito desses antioxidantes para a saúde está relacionado à redução no risco de doenças cardiovasculares, doenças crônicas não degenerativas, câncer, degeneração macular e catarata (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; OLIVER, PALOU, 2000; SU et al., 2002).

A presença do anel β-ionona confere atividade pró-vitaminica aos carotenóides, como por exemplo, α-caroteno, beta-caroteno e β-criptoxantina, encontrados em vegetais verde escuros, assim como em vegetais e frutas de polpa alaranjada (CHAGAS, et al., 2003, OLSON, 1988, BURTIS, BRUNS, 2008, KRAUSE, 2005). Aproximadamente trinta carotenóides possuem atividade pró-vitamina A, sendo o mais importante precursor o beta-caroteno, devido à formação de duas estruturas de retinol durante seu metabolismo no organismo. Quando ingeridas essas fontes são hidrolisadas no intestino humano pela enzima β-caroteno 15,15'-dioxigenase em retinol e ésteres, e transportadas pelos quilomícrons para o fígado onde são armazenados frequentemente esterificados com um ácido graxo (normalmente ácido palmítico) e chamados de retinil palmitato (BURTIS, BRUNS, 2008; BEITUNE et al., 2003).

Sua capacidade de reagir com radicais, pode causar alterações durante o processamento e estocagem dos alimentos. Oxidações durante o armazenamento dependem das condições de estocagem, como a presença de O<sub>2</sub>, exposição à luz, presença de metais, agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Durante o descascamento ou preparação física do alimento pode ocorrer oxidações enzimáticas que levam a perda da atividade vitamínica e da intensidade da coloração, com o surgimento de apocarotenóides ou a isomerização de compostos *trans* em *cis* (AZEVEDO-MELEIRO, RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

Devido a sua importância para a saúde a análise de carotenóides deve ser realizada no intuito de identificar os diferentes carotenóides e seus isômeros, observar possíveis alterações durante o processamento e estocagem, informando o valor nutritivo dos alimentos que contenham essas substâncias.

As etapas do processo de análise compreendem: preparação da amostra, extração, separação com solventes, hidrólise alcalina e lavagem, concentração e evaporação do solvente, separação cromatográfica, identificação com detectores UV/vis (arranjo fotodiodo) e quantificação dos compostos.

As análises de carotenóides apresentam fatores que dificultam sua realização, como por exemplo, natureza variável das matrizes alimentícias, suscetibilidade dos carotenóides a isomerização e oxidação durante a análise ou estocagem da amostra, perdas físicas ocorridas no processo, separação cromatográfica incompleta, onde os compostos coeluem, identificação equivocada e erros de quantificação. Para isso alguns cuidados básicos devem ser tomados, como, exclusão de O<sub>2</sub> utilizando atmosfera de N<sub>2</sub>, proteção da incidência de luz com vidraria âmbar, proteção de temperaturas elevadas, proteção de contato com ácidos, emprego de solventes de alta pureza, isentos de impurezas (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

Durante a preparação da amostra deve-se garantir a transformação homogênea de amostra representativa, para isso, são realizadas operações físicas como redução do tamanho por corte ou auxílio de misturadores (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

Na etapa de extração é realizada com solventes orgânicos polares ultrapuros como acetona, tetrahydrofurano (THF), clorofórmio, e a mistura desses solventes (SU et al., 2002; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; QUIRÓS, COSTA, 2006). Devido ao conteúdo de água presente na matriz alimentícia, deve ser utilizado solventes miscíveis em água na tentativa de facilitar a separação do complexo proteína-carotenóide e prevenir formação de emulsão (SU et al., 2002; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004). A utilização de celite, durante a extração, facilita a desintegração e subsequente filtração.

O filtrado deve ser separado da água, utilizando solventes imiscíveis em água, como éter de petróleo, hexano, éter etílico, ou a mistura desses solventes. Depois de adicionado o solvente e o filtrado, a água é colocada aos poucos pelas laterais do funil de separação, para evitar a formação de emulsão, removendo os resíduos de acetona (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004).

O próximo passo usado tradicionalmente é a saponificação ou hidrólise alcalina. Essa etapa é efetiva para a remoção de clorofila, lipídios saponificáveis, e outros interferentes que poderiam prejudicar a separação ou a vida útil da coluna. Normalmente a saponificação é realizada com solução de KOH etanólica ou metanólica em concentrações que variam entre 10 a 60 (%m/v) a temperatura ambiente (OLIVER, PALOU, 2000). Após a saponificação o material é lavado para remover o reagente alcalino e como os carotenóides são imiscíveis em água, ficam na fração de éter de petróleo ou hexano (RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). O uso de antioxidantes, como, 2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT), benzeno-1,2,3-triol (pirogalol) e ácido ascórbico é recomendada para reduzir ou evitar a oxidação e isomerização (QUIRÓS, COSTA, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004, OLIVER, PALOU, 2000). O extrato etéreo deve ser filtrado com sulfato de sódio anidro para retirada de qualquer presença de água e concentração com fluxo de N<sub>2</sub>.

A identificação de carotenóides por detectores UV/vis e espectrofotômetro pode ser realizada devido à presença do grupo cromóforo que permite sua identificação através do espectro de absorção na região do visível. O espectro no UV/vis é usado como primeira identificação de carotenóides. Perda ou mudança de cor durante o período de análises pode ser devido a degradação e modificação estrutural. Essa diferença na coloração permite monitorar a separação com coluna aberta, técnica clássica para quantificação de carotenóides. Vários trabalhos apresentam as estruturas dos espectros de absorção em diferentes solventes, pois, o tipo de solvente utilizado altera a absorção espectral do composto. O coeficiente de absorção ( $A^{1\%}_{1\text{ cm}}$ ) dos carotenóides pode ser utilizado para calcular a concentração em diferente solvente, baseados na lei de Lambert-Beer. Por exemplo, b-caroteno em clorofórmio apresenta comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em 461nm e  $\epsilon= 2396$ , em etanol ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 450 nm e  $\epsilon= 2620$ , e éter de petróleo 450nm e  $\epsilon= 2592$  (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A separação cromatográfica é realizada por CLAE em fase reversa com colunas C<sub>18</sub> polimérica ou monomérica e cada vez mais, com colunas C<sub>30</sub> polimérica, em modo de eluição isocrática ou gradiente, a temperatura constante entre 33°-35°C, com fase móvel de metanol, acetonitrila, metil-*tert*-butílico, hexano, THF, ou a mistura desses solventes, levando em consideração a polaridade, viscosidade, volatilidade e toxicidade dos solventes escolhidos para fase móvel (QUIROS, COSTA, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004).

Em estudos realizados por Azevedo-Meleiro, Rodriguez-Amaya (2004) analisando carotenóides em frutas tropicais, foi utilizado acetona e celite para extração, éter de petróleo para separação do extrato, e saponificação com solução de KOH etanólica. Em CLAE-DAD, utilizando coluna C<sub>18</sub> monomérica (150mm x 4,6 mm, 3 $\mu$ m), com fase móvel de acetonitrila,

metanol e acetato de etila, em modo de eluição gradiente, com tempo de corrida de 63 minutos. Sentanin e Rodriguez-Amaya (2007) analisando mamão e pêssego utilizando para extração acetona e celite, separação com éter de petróleo e saponificação com KOH metanólico 10%, usando como antioxidante BHT, e sistema cromatográfico CLAE-DAD com coluna C<sub>18</sub> monomérica (150mm x 4,6 mm, 3 µm), com fase móvel de metanol, acetonitrila, acetato de etila, em modo de eluição isocrático, com tempo de corrida de 63 minutos. Guarantini et al. (2009) analisando algas utilizou CLAE-DAD com coluna C<sub>30</sub> (250mm x 4,6mm, 5 µm), com fase móvel metanol, água, acetato de amônio como fase A e como fase B metanol, água e metil-*terc*-butílico, em modo de eluição gradiente, com tempo de análise de 68 minutos. Lacker, Strohschein e Albert (1999), analisando diversos vegetais utilizou CLAE-DAD com coluna C<sub>30</sub> (250mm x 4,6 mm, 3 µm), como fase móvel de metanol e metil-*terc*-butílico com tempo de análise de 80 minutos. Olives Barba et al. (2006) analisando diversos vegetais, utilizou CLAE-DAD com coluna C<sub>18</sub> (300mm x 2mm, 10 µm), com fase móvel de metanol e acetonitrila e para saponificação KOH metanólico (40:60, v/v). Esses estudos demonstram a utilização da técnica de CLAE-DAD como uma das principais utilizadas para determinação de carotenóides em matrizes alimentícias.

### 3.8 Metabolismo de Carotenóides em Ruminantes

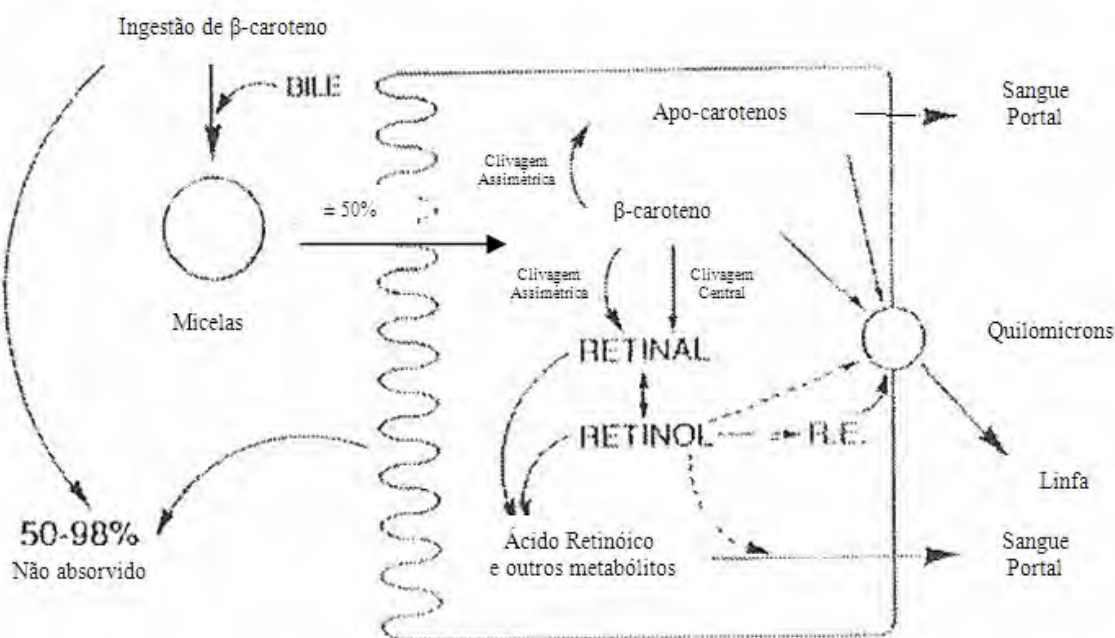
Os animais ruminantes apresentam em sua fisiologia um estômago com quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. No aparelho digestivo ocorrem os fenômenos responsáveis pela digestão, como, mastigação, deglutição, regurgitação, atividade de glândulas digestivas liberando enzimas produzidas pelo animal e a atividade microbiana característica dos animais ruminantes herbívoros (CUNNINGHAN, 2004).

Porém nos bubalinos ocorrem diferenças fisiológicas específicas quando comparados aos bovinos, o que poderia explicar a menor concentração de carotenóides nos bubalinos. O trato gastrointestinal é semelhante anatomicamente à espécie bovina, porém, com modificações no volume e proporção de cada segmento. O comprimento total para os búfalos de rio (2n=50) é de aproximadamente 60 metros, onde o volume do complexo rúmen-retículo compreende cerca de 88% do volume total. Dessa forma os animais apresentam frequência ruminal maior, o que determina diminuição na taxa de passagem com aumento do tempo de retenção e ação da microbiota sobre as forrageiras ingeridas na alimentação. Além de apresentarem papilas ruminais mais desenvolvidas, aumentando a superfície de absorção dos produtos da digestão (BASTINETTO et al., 2005; ÂNGULO, NOGUERA, BERDUGO, 2005; FRANZOLIN, ALVES, 2011).

O processo de maior interesse na digestão é a atividade da microbiota ruminal. A finalidade da microflora é a degradação das forrageiras aproveitando os nutrientes, potencializando a absorção de nutrientes para produção de energia, manutenção corporal e produtividade, melhorando a eficiência alimentar dos ruminantes. A microbiota ruminal é constituída principalmente de bactérias, protozoários e fungos. Alterações na população desses microrganismos estão relacionadas com alterações na alimentação e espécie animal (KOZLOSKI, 2009; ALVIMDUQUE et al., 2010; CUNNINGHAN, 2004). Os búfalos possuem um maior número de bactérias, fungos e uma menor população de protozoários ciliados que os bovinos. Essa característica permite uma degradação mais eficiente da parede celular de forrageiras e as proteínas provenientes da dieta, por essa razão, os búfalos mesmo alimentados com pastagem de baixa qualidade onde predominam sistemas de pastoreio extensivo com forrageiras nativas, esses animais uma conversão mais eficiente de energia. (ÂNGULO, NOGUERA, BERDUGO, 2005; FRANZOLIN, ALVES, 2011).

Os lipídios ingeridos pelos ruminantes se apresentam principalmente na forma de ésteres de glicerol, podendo ser separados em três classes: lipídios de reserva – triglicerídeos,

lipídios das folhas – galactolipídios e fosfolipídios, e uma mistura de outras estruturas moleculares solúveis em éter – ceras, carotenóides, clorofila, etc. Após a ingestão, esses lipídios são hidrolisados por lipases associadas à membrana celular microbiana, liberando glicerol, galactose, e uma mistura de ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados (KOZLOSKI, 2009). A incorporação e a utilização desses lipídios pelas bactérias ruminais é nula ou insignificante, assim a quantidade de lipídios que chega ao intestino delgado dos animais representa o somatório dos lipídios alimentares com os de origem microbiana. Ao longo do intestino por ação dos sais biliares e fosfolipídios ocorre a passagem destes para as micelas permitindo sua absorção, que pode ocorrer por difusão passiva, segundo esquema apresentado pela figura 7.

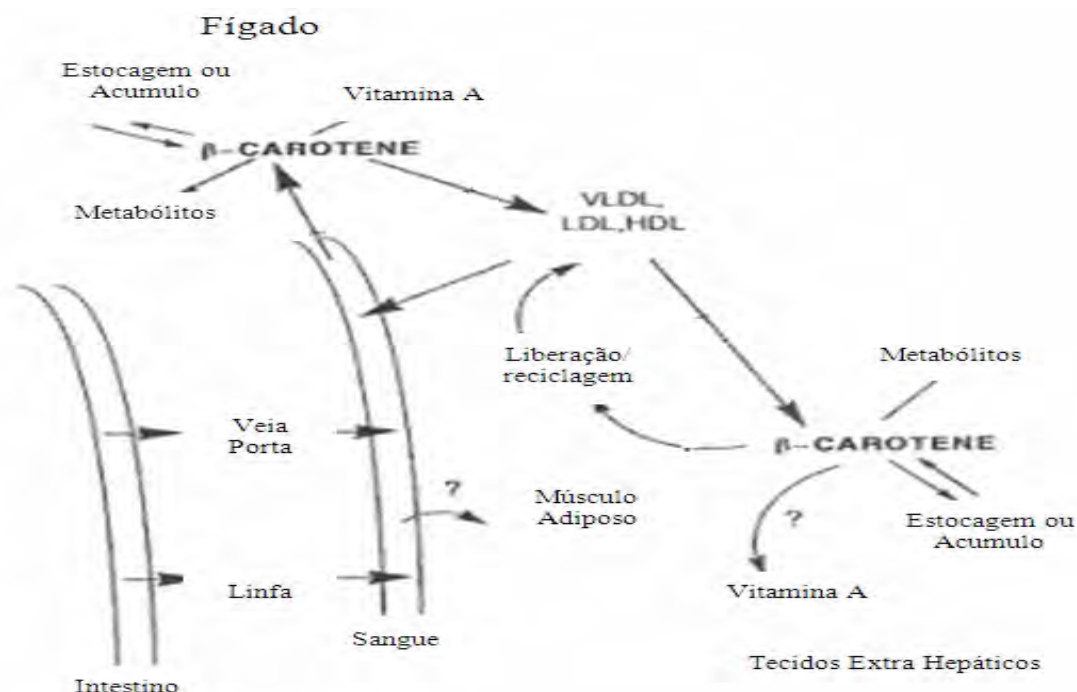


**Figura 7:** Absorção de beta-caroteno pelas micelas na mucosa intestinal  
Fonte: ERDMAN et al., 1993.

Em alguns casos os triglicerídeos podem sofrer ação das lipases pancreáticas, liberando ácidos graxos e monoglicerídeos para serem absorvidos. Os lipídios absorvidos são transportados em associação com lipoproteínas de baixa densidade produzidas nos enterócitos dos animais, principalmente LDL (*Low-density Lipoprotein*) e VLDL (*Very Low-Density Lipoprotein*), e em pequena quantidade nos quilomícrons, circulando pelos vasos linfáticos até alcançar os tecidos de armazenamento (ERDMAN et al., 1993; YANG et al., 1992). Em mamíferos como os bovinos e os furões (*Mustela putorius furo*), os carotenóides são absorvidos intactos, sendo, estes animais, utilizados muitas vezes como modelo nos estudos do metabolismo de carotenóides (ERDMAN et al., 1993; POOR et al., 1991; BIERER et al., 1993). Em estudos realizados por Yang et al. (1992) onde os autores pesquisaram a concentração de carotenóides e retinol no plasma, tecido adiposo e fígado de ovelhas, cabras e bovinos observaram que as concentrações de carotenóides em ovelhas e cabras não foram detectadas no plasma nem no tecido adiposo, sendo encontrada mínimas concentrações no fígado, o que não correspondia com os resultados encontrados em bovinos, que apresentavam grandes quantidades de beta-caroteno nos três tecidos analisados. Uma das hipóteses para a não detecção de beta-caroteno nos tecidos extra-hepáticos seria o desenvolvimento de

mecanismos de depósito seletivo, onde o beta-caroteno quando requisitado seria convertido a retinol no fígado e transportado para o tecido alvo.

Nos tecidos periféricos, fígado e músculo, a lipoproteína lipase (LPL), presente na superfície das células do endotélio capilar mediante ação da insulina, capta a VLDL e hidrolisa os triglicerídeos liberando monoglicerídeos e ácidos graxos livres para serem absorvidos pelas células, sendo depois reconvertidos a triglicerídeos e armazenados nas células teciduais. O destino destes substratos dependerá do tipo de tecido e condição metabólica do animal, nos estados de jejum, alimentação ou lactação, como representado pela figura 8 (KOZLISKI, 2009; FURR, CLARK, 1997; BAUCHART, 1992).

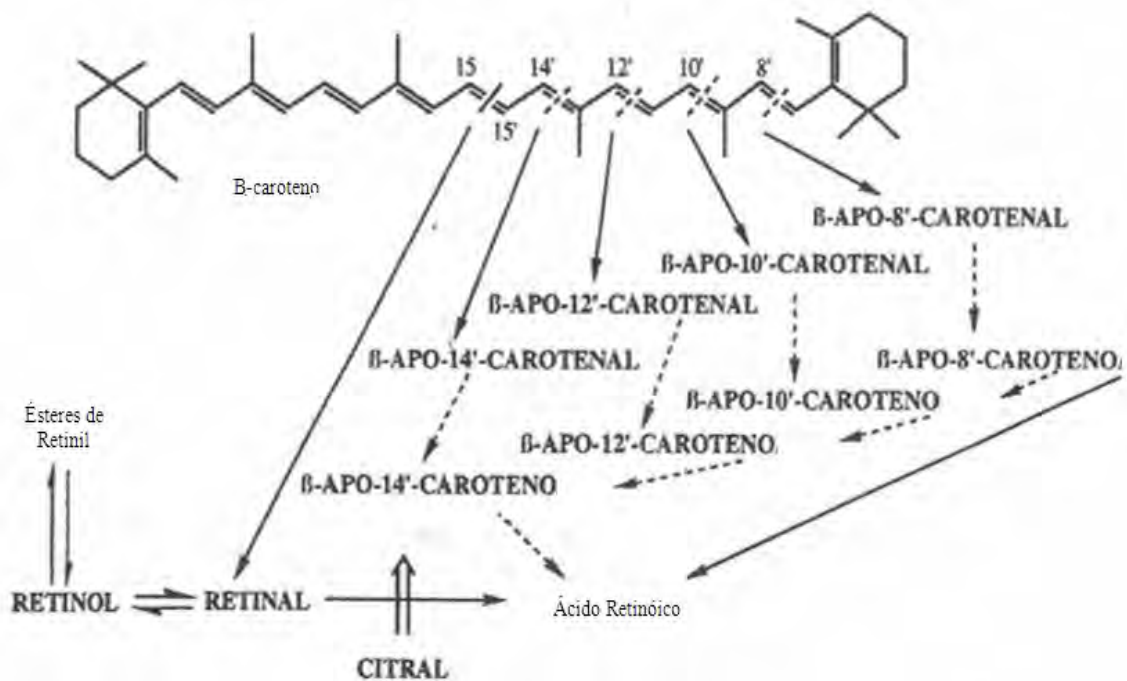


**Figura 8:** Transporte pós-absorção do beta-caroteno para o fígado e tecidos extra-hepáticos  
Fonte: ERDMAN et al., 1993.

Em relação, especificamente aos carotenóides, a degradação pode variar dependendo do tipo de carotenóide. Segundo Nozière et al. (2006) e Furr e Clark (1997), por exemplo, a luteína pode não sofrer degradação pelo metabolismo dos ruminantes, enquanto o beta-caroteno é degradado em concentrações variáveis. Essas alterações podem ocorrer por interações entre os diferentes carotenóides. Nos estudos de Krinsky et al. (1993) e Erdman et al. (1993), a degradação do beta-caroteno em duas moléculas de retinal ocorre via enzima  $\beta$ -caroteno-15-15'-monoxigenase presente nos enterócitos, causando uma hidrólise da cadeia alifática ao nível da dupla ligação central (15-15'), que em animais como ovelhas e cabras apresentam maior atividade que em bovinos, sendo convertidos em diversas apo-carotenóides, como exemplificado na figura 9.

Segundo Andriquetto et al. (2002), a conversão máxima de carotenóides em bovinos encontra-se em torno de 50%, e o mecanismo que parece ocorrer é a oxidação terminal, passando pelo beta apo-8-carotenal e seus ácidos como etapa intermediária. A maior conversão dos carotenóides com atividade de pró-vitamina A em retinol, em caprinos, ovinos e possivelmente em bubalinos, explicaria a diferenciação da coloração do leite entre essas espécies, sendo os níveis séricos, no fígado e nos tecidos subcutâneos de carotenóides muito menores do que em bovinos.





**Figura 9:** Clivagem simétrica e assimétrica do beta-caroteno em retinal e apo-carotenóides  
 Fonte: Krinsky et al., 1993.

As alterações nas concentrações plasmáticas e no leite do teor de carotenóides podem variar por diferenças individuais, como raça, espécie, tipo de forrageira na alimentação, estágio de maturação fisiológica do animal, uso de suplementação e etapa da lactação, sendo o colostro mais rico em vitamina A do que o leite no final da lactação (NOZIÉRE et al., 2006).

### 3.9 Validação Analítica

A validação surgiu como uma forma de assegurar a aplicabilidade e alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório, estabelecendo os limites dos parâmetros por meio de estimativas (Ribeiro et al., 2008). Essa etapa do desenvolvimento analítico garante a confiabilidade em relação às informações geradas sobre um analito.

Esse processo garante às agências reguladoras que o método e os sistemas desenvolvidos são adequados ao uso pretendido. No Brasil há duas agências credenciadas para verificar a competência de laboratórios de ensaio: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através da Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003, e o INMETRO através do Documento de Orientação DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2010. Esses documentos são guias de orientação que sugerem estratégias a serem seguidas, sendo aberto a interpretações (PEREZ, 2010; CASSIANO et al., 2009).

Segundo Ribani et al. (2004), a validação pode ser dividida em duas etapas distintas: a validação intralaboratorial (*in house validation*) que compreende as etapas de validação realizadas dentro de um único laboratório, para validar um método novo que tenha sido desenvolvido no local, ou ainda, sendo utilizado como etapa preliminar do desenvolvimento de uma metodologia, sem verificar a reprodutibilidade. O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho, assim como, um estudo interlaboratorial observando como a metodologia se comporta em uma matriz em vários laboratórios.

Torna-se necessário a avaliação dos parâmetros as serem seguidos, assim como devem ser determinadas à faixa de concentração do analito e as características da amostra. As figuras

de mérito devem ser baseadas no uso pretendido, no documento de orientação utilizado, e na quantidade de analito disponível na amostra.

A primeira parte do processo é o planejamento, onde ocorre a definição da aplicação do método, objetivo e escopo do método, seguido da definição das figuras de mérito, critérios de aceitação e tratamento estatístico (INMETRO, 2010).

Segundo os documentos de orientação da ANVISA e INMETRO, a metodologia analítica deverá ser avaliada segundo:

**Seletividade:** A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Segundo Perez (2010) a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Dessa forma um método seletivo deve apresentar capacidade de quantificar o analito de interesse sem interferência de metabólitos, produtos de degradação, ou compostos com propriedades químicas similares.

**Linearidade e Faixa de trabalho:** A faixa de trabalho escolhida deve cobrir a faixa de aplicação para qual o método de ensaio é pretendido. A curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito. Segundo INMETRO (2010) a curva deve conter no mínimo 5 concentrações conhecidas do analito, com número de replicatas próximo ao utilizado usualmente no laboratório. A linearidade é verificada a partir da equação da regressão linear, através dos coeficientes  $a$  e  $b$  e o coeficiente de correlação  $r$ . Este parâmetro permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA (2003) recomenda que o coeficiente de correlação seja igual a 0,98 e o INMETRO (2010) um valor acima de 0,90. Ao final da elaboração da curva o gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito, deve ser verificada em relação a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, para isso pode ser utilizado o teste de *Grubbs* ou de resíduo Jackknife, e teste de Cochran ou teste de Brown-Forsythe, respectivamente. Para verificação da linearidade frequentemente é utilizada a análise de variância (ANOVA) na regressão (INMETRO, 2010).

**Precisão:** a precisão mede a proximidade entre os resultados apresentados por uma mesma amostra. Segundo ANVISA (2003), essa medida pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) de uma série de repetições da mesma amostra em diferentes concentrações, também conhecido como coeficiente de variação (CV%). O valor máximo de desvio aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia, a concentração, o analito, o tipo de matriz, e a finalidade do método, porém, não se admitindo valores superiores a 15%.

**Exatidão:** Segundo INMETRO (2010) esta análise pode ser realizada através de análise de tendência/recuperação, sendo a exatidão avaliada matematicamente através da tendência. Basicamente os métodos determinam a relação entre o valor de uma concentração observada e de uma concentração esperada, sendo o resultado expresso em percentual. Para isso podem ser realizados ensaios utilizando matriz isenta do analito de interesse adicionada com a substância a ser analisada, normalmente usando padrões do analito, em três concentrações distintas, relacionadas com os pontos mínimo, médio e máximo da curva de calibração. As amostras adicionadas devem ser analisadas da mesma forma que a matriz do analito sendo observadas as quantidades medidas após o ensaio em relação à concentração adicional do padrão.

**Limite de detecção:** O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada por um procedimento

experimental. Existem três formas distintas de estimar o limite de detecção: método visual, método sinal: ruído, e método matemático baseado na curva de calibração. No método da relação sinal: ruído, utilizado no método de ensaio, há comparação do sinal analítico obtido contendo concentrações baixas de analito com o sinal de uma amostra do branco. Considera-se aceitável uma relação sinal: ruído de 5:1 a 3:1 (INMETRO, 2010).

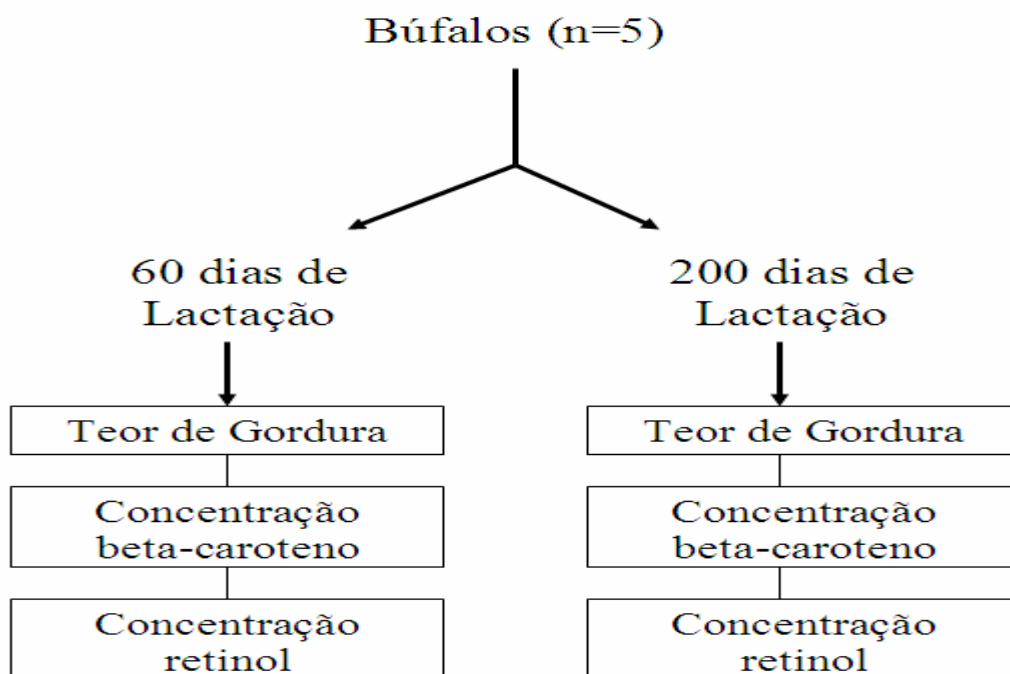
**Limite de quantificação:** Segundo ANVISA (2003) o limite de quantificação corresponde à menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Na rotina dos laboratórios, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, onde há perda de precisão quando ocorrem medições em níveis de concentração menores.

**Robustez:** A robustez mede a sua suscetibilidade de um método analítico diante de pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina, sem alterar sua exatidão e precisão. Para determinar a robustez de um método o INMETRO (2010) recomenda o teste de *Youden*, nesse teste avalia-se e ordena-se a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada variação. São realizados oito ensaios com uma combinação fatorial de efeitos e verifica-se qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentam variação (VALCÁRCEL; RÍOS, 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de amostras

As análises de retinol, beta-caroteno e gordura foram realizadas em amostras de leite e queijos tipo *mozzarella* elaborados com leite bubalino e/ou misturados com leite bovino, conforme representado pelo esquema de delineamento experimental (figura 10).



**Figura 10:** Delineamento experimental para condução do estudo

As coletas de amostras de leite bubalino foram realizadas em propriedade particular situada no município de Itaguaí, região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, com coordenadas geográficas latitude 22°51'7'' sul e longitude 43°46'30'' oeste.

A região é caracterizada por clima tropical, com estação seca de junho a outubro com média de precipitação pluviométrica de 53,8mm e estação chuvosa de novembro a abril com média pluviométrica de 150,3mm, e média de temperatura anual de 19,3°C a 29,3°C. O rebanho da propriedade totalizava 30 animais mestiços (figura 11), não podendo indicar a origem dos cruzamentos devido a ausência de informações zootécnicas, sendo selecionados cinco animais (n=5), que se apresentavam em período de lactação no início do estudo. Os búfalos eram criados em sistema de exploração semi-extensivo, alimentados com pastagem com predominância de *Brachiaria brizantha*, complementada na época seca com guandu (*Cajanus cajan (L.) Millsp.*).

O leite bovino utilizado para adição na elaboração de queijos misturados foi adquirido de propriedade particular, situado no município de Seropédica, região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, com coordenadas geográficas latitude 22° 44' 38'' sul, longitude 43° 42' 28'' oeste. A região caracterizada como clima tropical subúmido, com temperatura média 22,7°C. Os animais eram alimentados com pastagem com predominância de *Brachiaria brizantha*, em sistema extensivo.

As coletas foram divididas em dois períodos de lactação, aos 60 dias após parição – julho/2010 e 200 dias após parição – janeiro/2011, onde os animais apresentavam período de lactação total de 270 dias, as datas foram escolhidas para representação do pico (maior volume de leite) e do declínio (menor volume de leite) desses animais. As ordenhas eram realizadas no horário da manhã e a tarde, com bezerro ao pé, sendo as coletas realizadas no período matinal, após limpeza do úbere com água e sabão, desprezando o primeiro jato, coletado em balde e transferido para frascos de polipropileno foscos com capacidade para 5L, transportados em isopor contendo gelo até a Planta 1 da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos para elaboração dos queijos tipo *Mozzarella*, desse total de 5L, foram retirados 40mL e transportados para o Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas – LAAB, no Instituto de Tecnologia da UFRRJ, para determinação do percentual de gordura.



**Figura 11:** Búfalos mestiços da Fazenda São Judas Tadeu – Itaguaí, RJ

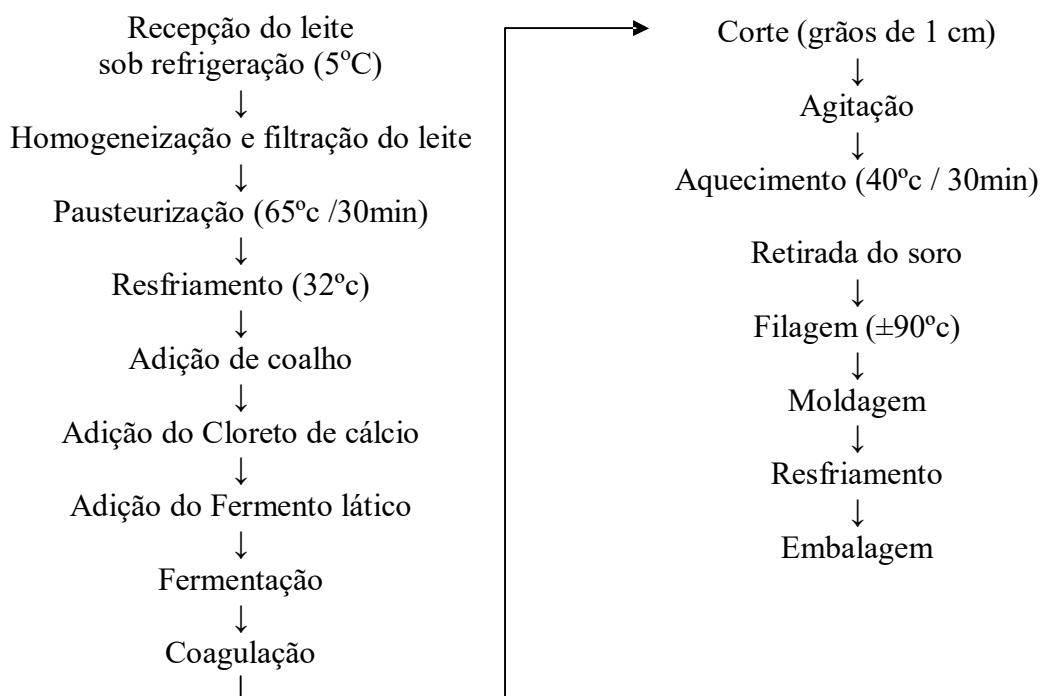
#### **4.1 Elaboração das amostras**

Após o transporte para a EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, os leite foram submetidos a homogeneização e filtração em peneiras com furos de 0,25mm, seguido de pasteurização a temperatura de 65°C por 30 minutos, sendo a etapa monitorada com termômetro digital para fins alimentícios (-50°C a 150°C) modelo TE-300, marca Instrutherm, sendo preparadas em seguida, amostras de queijo tipo *mozzarella* através de metodologia tradicional, sendo as etapas do processo descritas no fluxograma 1. Os ingrediente utilizados (figura 12) foram: fermento láctico adquirido na cidade de Juiz de Fora (MG) do tipo termofílico TCC 20® (Chr Hansen), contendo *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, coalho líquido (força: 1:3.000), da HA-LA do Brasil, Chr. Hansen ind. e comércio LTDA® utilizado nas proporções indicadas pelo fabricante (7 a 9mL do coagulante para cada 10 litros de leite), cloreto de cálcio solução 40% (p/v) adquirido no comércio da cidade de Juiz de Fora (MG) da empresa Macalé® – produtos para laticínios, sendo utilizado conforme indicação do fabricante (50mL da solução para 100L de leite). Os cinco queijos preparados em cada período de lactação (60 dias e 200 dias) foram

acondicionados em embalagens plásticas e mantidos sob congelamento até momento de análise.

#### 4.2 Divisão das amostras por período de lactação

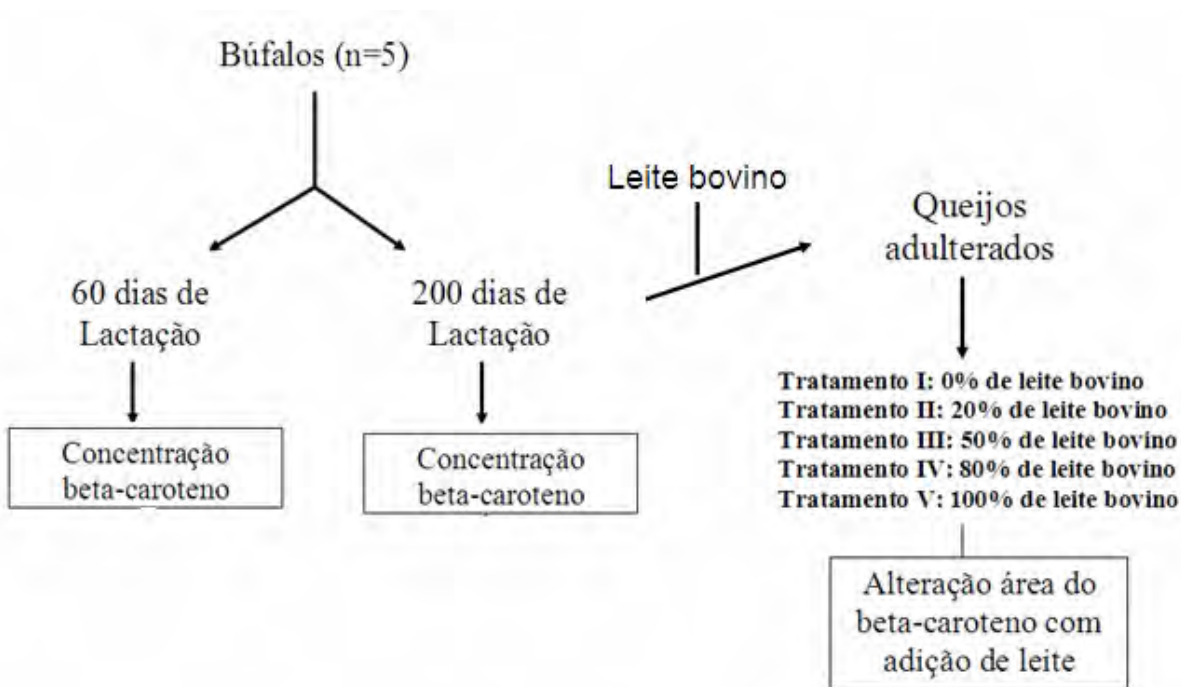
Os queijos preparados com a técnica descrita acima foram separados em dois grupos: grupo dos queijos elaborados somente com leite bubalino de cada animal aos 60 dias de lactação (n=5) e 200 dias de lactação (n=5), e o grupo dos queijos elaborados com adição de leite bovino ao leite bubalino de 200 dias, nas seguintes proporções 0% (tratamento 1), 20% (tratamento 2), 50% (tratamento 3), 80% (tratamento 4) e 100% (tratamento 5), para verificação da variação da concentração de beta-caroteno nesses produtos, correspondendo aos queijos misturados, conforme representado pela figura 13.



**Fluxograma 1.** Fluxograma de elaboração da *mozzarella*



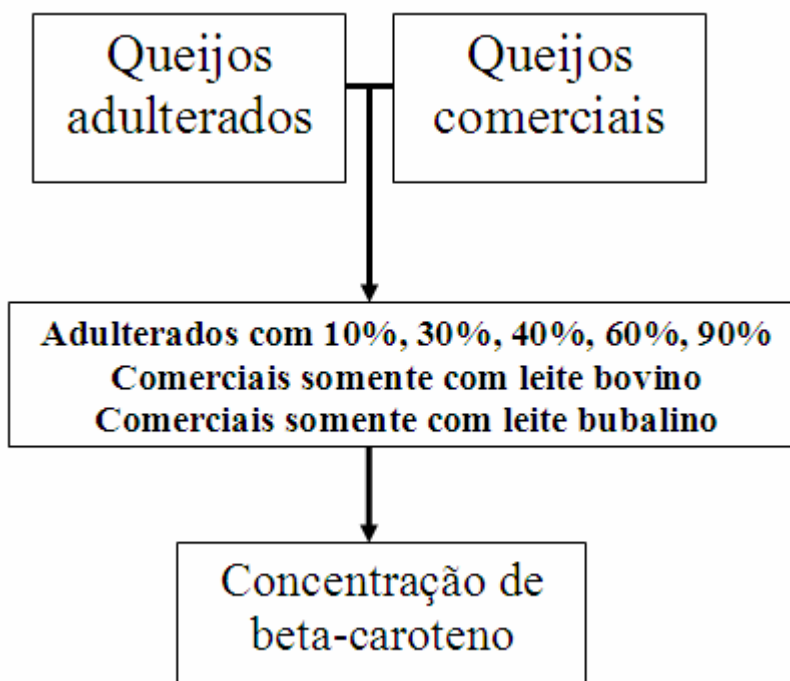
**Figura 12:** Produtos utilizados para elaboração das amostras de queijo tipo *mozzarella*



**Figura 13:** Delineamento experimental para determinação de beta-caroteno nas amostras de queijo bubalino e queijo misturado

Após a validação do método, que será descrita posteriormente, foram adquiridas amostras comerciais para verificação da eficiência do método. De um total de quinze amostras (figura 14), cinco eram marcas comerciais com rotulagem indicando como ingrediente somente leite bubalino, quatro marcas comerciais com ingrediente somente leite bovino, e

para complementar a quantidade de amostras foram preparados seis queijos misturados tipo *Mozzarella* elaborados conforme técnica especificada anteriormente. As amostras de queijos comerciais foram dos tipos *mozzarella*, queijo minas frescal, e ricota fresca. Essas amostras foram adquiridas em três pontos de coletas localizados na zona oeste na cidade do Rio de Janeiro. A preparação de queijos misturados e a aquisição de queijos de outros tipos foi necessária devido à pequena diversidade de queijos elaborados somente com leite de búfala disponíveis no comércio.



**Figura 14:** Delineamento experimental para verificação da eficiência do método utilizando amostras comerciais e preparadas com adição de leite bovino

### 4.3 Determinação do Percentual de Gordura

O processo de determinação do percentual de gordura foi realizado no Laboratório Analítico de Alimentos e Bebidas – LAAB, no Instituto de Tecnologia da UFRRJ.

Segundo a Instrução Normativa IN nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006), que oficializa os métodos analíticos para controle de leite e produtos lácteos, o método para determinação quantitativa de lipídios deve ser realizada através do método butirométrico para leite fluído, que se baseia no ataque seletivo da matéria orgânica por meio de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) p.a, com exceção da gordura, sendo estes componentes separados por centrifugação, auxiliada pelo álcool amílico ( $C_5H_{12}O$ ), que modifica a tensão superficial.

Os materiais utilizados para as análises de gordura foram: solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) VETEC® com densidade 1,820 a 20°C e álcool isoamílico ( $C_5H_{12}O$ ) VETEC® com densidade 0,81 a 20°C, centrifuga de Gerber, banho-maria, butirômetro de Gerber para leite com rolha, pipeta volumétrica de 1, 10 e 11 mL, e densímetro.

A solução de ácido sulfúrico com densidade 1,820 foi preparada com ácido sulfúrico p.a com densidade 1,840. Foram adicionados 925mL do ácido sulfúrico p.a sobre 125mL de água em proveta de vidro, lenta e cuidadosamente para evitar que esta respingasse. A proveta



foi acondicionada em banho de gelo, utilizando os equipamentos de proteção individuais (EPI) necessários, luvas grossa, óculos e jaleco de algodão. Deixou-se esfriar até 20°C e a densidade foi conferida com densímetro.

Após a preparação da solução de ácido sulfúrico foram adicionados 10mL da solução, 11 mL da amostra de leite fluido homogeneizada e 1mL de álcool isoamílico diretamente ao copo do butirômetro e fechado com rolha, tomando os cuidados necessários e com a utilização dos EPIs. O material foi agitado para promover mistura dos líquidos, em seguida, foi centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm e transferido para banho-maria a 65°C para auxiliar na dissolução da amostra, o processo de centrifugação e banho-maria foram repetidos três vezes para garantir maior dissolução da amostra. Os resultados foram obtidos por leitura da porcentagem de gordura da amostra, diretamente na escala do butirômetro.

Cada amostra dos cinco animais foi analisada em triplicata nos períodos de 60 dias e 200 dias de lactação, de acordo com o representado pela figura 10 mencionada anteriormente. Os dados dos diferentes períodos de lactação foram analisados estatisticamente através de teste T ( $p < 0,05$ ) para determinação de diferença entre as variâncias dois períodos.

#### 4.4 Procedimento de extração para determinação de retinol

As análises de retinol nos queijos tipo *Mozzarella* elaborados com 60 dias e 200 dias foram realizadas no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

As análises seguiram método descrito por Campos (2005), que analisou retinol em leite humano, dessa forma, a utilização do método necessitou de modificações para a matriz analisada, assim, devido a consistência do produto foram utilizadas 15g ao invés de 25mL, outras alterações estão relacionadas ao tipo de coluna cromatográfica utilizada, a fase móvel, fluxo e tempo de corrida. Neste estudo a coluna C<sub>30</sub> foi utilizada ao invés da coluna C<sub>18</sub>, pois, segundo estudos mencionados na revisão de literatura esta coluna apresenta melhor resolução e seletividade na identificação e quantificação de isômeros *cis/trans*, e a fase móvel utilizada foi metanol e éter metil-*terc*-butílico em gradiente ao longo de 28 minutos, com fluxo de 0,83mL/min ao invés de metanol 100% com fluxo de 0,5mL/min e corrida de 8,5min., essas alterações nas condições cromatográficas foram necessárias por motivos operacionais e pelas amostras utilizadas apresentarem possível presença de beta-caroteno. Nessas condições de análise, ambos os compostos, retinol e beta-caroteno, poderiam ser identificados e quantificados.

Os materiais utilizados para as análises de retinol foram: Hidróxido de potássio (KOH) P.A. - Tedia®, benzeno-1,2,3-triol (Pirogalol) grau P.A. ACS VETEC®, éter etílico grau cromatográfico Tedia®, éter de petróleo (30°-60°C) grau cromatográfico Tedia®, metanol grau cromatográfico Tedia®, éter metil-*terc*-butílico grau cromatográfico Tedia®, etanol grau cromatográfico Tedia®. Filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,45µm Millipore®, Acetato de retinol (Sigma Aldrich®).

Os equipamentos utilizados: evaporador rotativo modelo Rotaevaporador-RE- Buchi®, Cromatógrafo líquido de alta eficiência modular Waters® composto por bomba 600, com degaseificador de solvente em linha, injetor automático 717 *plus* e detector com arranjo de fotodiodos modelo 996, com sistema de aquisição de dados com *software* Empower®. Espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu®. Cromatógrafo líquido de ultra-eficiência Acquity – Waters® acoplado a detector de Espectrometria de massas Synapt - Waters® (MS- APCI/Q-TOF).

#### 4.4.1 Extração de retinol das amostras

Foram pesados 15g da amostra de queijo tipo *mozzarella* elaborado somente com leite bubalino aos 60 dias e 200 dias, triturado com *mixer*, pesado em balança analítica utilizando erlenmeyer de 250mL, adicionando em seguida, 50mL de solução de hidróxido de potássio:pirogalol:metanol 20:1:79 (%m/m/v), para hidrólise alcalina durante 3h, em repouso, ao abrigo de luz. As análises foram realizadas em duplicata.

O produto da hidrólise foi colocado em funil de separação e extraído com 100mL de solução de éter de petróleo:éter etílico 20:80 (%v/v), em duas etapas com porções de 50mL. A fase etérea contendo material hidrolisado foi lavada com 200-300mL de água milliQ, com medição utilizando fita de pH até pH neutro. O extrato foi filtrado com funil de vidro contendo lã de vidro e camada de aproximadamente 3cm de sulfato de sódio anidro, sendo recolhido em balão de fundo redondo âmbar de 250mL, em seguida seca em rotaevaporador sob pressão reduzida, em banho-maria a 35°C e ressuspensão em 5mL de etanol grau cromatográfico.

O material ressuspensionado com etanol foi filtrado através de membrana PVDF 0,45µm, sendo em seguida, separada uma alíquota de 1mL para análise por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) e 1mL para leitura de absorvância no espectrofotômetro as 325nm.

#### 4.4.2 Parâmetros cromatográficos para isolamento e quantificação do retinol

As condições cromatográficas foram otimizadas no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Para as análises foi utilizada coluna YMC C<sub>30</sub> Carotenoid (250 x 4,6 mm x 3µm), a 33 °C, com eluição gradiente de metanol:éter metil-*terc*-butílico(%v/v), segundo tabela 1, fluxo 0,8 mL/min. O volume injetado foi de 15µL e o tempo total de análise foi de 28 minutos.

**Tabela 1:** Eluição da fase móvel em gradiente durante corrida de 28 minutos

Minutos	% Metanol	% éter metil- <i>terc</i> -butílico
Inicial	80	20
0,5	75	25
15,0	15	85
15,05	10	90
16,50	10	90
16,55	80	20
28,00	80	20

#### 4.4.3 Isolamento de padrão de retinol

A obtenção de padrão foi realizada através de isolamento do retinol de fígado bovino, em virtude desta matriz ser excelente fonte, segundo a literatura. Amostra fresca pesando 100g foi adquirida no comércio da cidade do Rio de Janeiro, transportada em isopor com gelo, embalado com plástico, até o Laboratório de Cromatografia Líquida da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos para realização dos procedimentos de extração conforme metodologia descrita anteriormente para quantificação em queijo do tipo *mozzarella*.

Para o isolamento do padrão de retinol a partir de fígado bovino, o material foi coletado na saída do detector DAD, após separação cromatográfica, no ápice do pico cromatográfico, em cada uma das dez injeções, conforme apresentado na figura 15.



**Figura 15:** Isolamento do padrão de retinol a partir da coleta no ápice do pico cromatográfico

#### 4.4.4 Parâmetros Cromatográficos para identificação do retinol por CLUE-EM

Para caracterização da presença do retinol no material extraído de fígado bovino foi utilizado sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massa de alta resolução (CLUE-EM *Acquity-Synapt*). As condições cromatográficas para o CLUE foram: eluição isocrática com fase móvel de solução de acetonitrila:água:ácido fórmico 80:20:0,1(%v/v/v), fluxo  $0,2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , coluna Waters® *Acquity BEH C<sub>18</sub>* ( $1,7\mu\text{m}$ ,  $1,0 \times 50\text{mm}$ ), a temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , volume de injeção de  $5\mu\text{L}$ .

Para o EM foi utilizada fonte de ionização química a pressão atmosférica em modo positivo (APCI+) nas seguintes condições: temperatura de sonda  $300^\circ\text{C}$ , corrente de corona 4mA, voltagem do cone (skimmer) 22V, temperatura da fonte  $120^\circ\text{C}$ , volume do gás de dessolvatação 400L/h.

A caracterização do espectrômetro de massas do retinol e a otimização dos parâmetros a serem utilizados na fonte de íons foi realizada através de comparação com padrão comercial de acetato de retinol, que foi utilizado para otimizar os parâmetros da fonte (skimmer, corrente de corona, fluxo e temperatura do gás de dessolvatação) de forma a obter a melhor sensibilidade. O acetato de retinol foi solubilizado em solução de metanol:éter metil-*terc*-butílico 90:10(%v/v), e introduzida por inserção direta no EM através de uma bomba de seringa (*syringe pump*).

#### 4.4.5 Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado

O retinol isolado foi quantificado por espectrofotometria na região do ultravioleta, utilizando como branco etanol grau cromatográfico em 325nm. A leitura de absorvância (Abs) foi utilizada na equação:

$$\text{Concentração } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = (\text{Abs} \times 10^4)/\epsilon,$$

onde absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do etanol em 325nm = 1780.

#### 4.4.6 Determinação do teor de pureza do isolado de retinol

A determinação da pureza do retinol foi realizada por CLAE utilizando uma alíquota de 2 mL de retinol isolado, seco sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo foram adicionados 100µL de etanol, em seguida o *vial* foi agitado em vortex por 10 segundos. Com auxílio de micro-pipeta a solução obtida foi transferida para *vial* com redutor de volume e levada para análise cromatográfica. Segundo método descrito por Pacheco (2009), o cálculo da pureza está relacionado com a área do pico de retinol em porcentagem relativa a soma das áreas de todos os picos presentes, de acordo com a equação:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Área do pico de interesse (retinol)} \times 100}{\text{Área de todos os picos}}$$

#### 4.4.7 Validação do Método de Ensaio para Determinação de Retinol

A validação do método de ensaio foi realizada segundo orientação da resolução da ANVISA RE nº899, de 29 de maio de 2003 e pelo INMETRO-CGCRE-008 de fevereiro de 2010. Os parâmetros de validação utilizados para o método de ensaio do retinol foram: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e robustez.

A seletividade do método de ensaio foi determinada para garantir que o pico de resposta apresentando na análise corresponde ao composto de interesse, no método de ensaio em questão, o retinol. Para isso, o material isolado de fígado bovino foi injetado nas condições cromatográficas citadas anteriormente para determinação do tempo de retenção, espectro de absorção na região do ultravioleta por detector de arranjo de fotodiodo e o espectro de massas. Para confirmação desses parâmetros (tempo de retenção, espectro de absorção na região do UV e espectro de massas) foi utilizado padrão hidrolisado de acetato de retinol (C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>). Foram adicionados a 100µL de padrão comercial de acetato de retinol em *erlenmeyer*, 100 µL solução de KOH:Metanol 10:90(%m/v) para hidrólise do grupo acetato, deixando em repouso por 3h ao abrigo de luz.

Para determinação da linearidade, faixa de trabalho e precisão do método de ensaio preparou-se curva analítica com sete pontos, conforme tabela 2, segundo concentração da substância de interesse na matriz estudada. Os resultados de áreas apresentados pelas diferentes concentrações da curva de calibração foram analisados através de teste de Grubs, para determinação de valores aberrantes, teste de Cochran para verificação da homocedasticidade das variâncias, e para determinação da linearidade da regressão foi utilizado ANOVA fator único. Os resultados apresentados pela curva de calibração foram avaliados através da estimativa do coeficiente de variação (CV%), para determinação da precisão do método em estudo e a exatidão através da determinação dos valores teóricos e obtidos e do desvio padrão dos resultados em cada ponto da curva de calibração.

O limite de detecção foi determinado através da relação sinal:ruído, para isso foram preparadas soluções de diluições a partir da solução mãe com concentração 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> de retinol. Para alcançar a menor concentração de retinol que indicava relação sinal: ruído 5:1, foi necessária diluição 1:85 da solução mãe com etanol absoluto. Esse material diluído foi analisado por CLAE nas mesmas condições que as amostras, e a partir desses resultados pôde-se considerar a menor concentração que pode ser detectada de forma distinta do ruído pelo equipamento.

O limite de quantificação foi representado pelo primeiro ponto utilizado na curva de calibração, uma vez que, esse valor corresponde à menor concentração esperada na amostra,

0,5 µg.mL<sup>-1</sup>. Segundo INMETRO (2010) a utilização do ponto de menor concentração da curva de calibração pode ser realizada se a exatidão, comparação entre o valor teórico e obtido, estabelecendo como critério de aceitação desvio padrão ≤0,2, e a precisão (CV<15%).

**Tabela 2.** Pontos da curva de calibração com as respectivas concentrações de retinol

Ponto de Calibração	Concentração µg/mL
1	0,5 µg .mL <sup>-1</sup>
2	1 µg .mL <sup>-1</sup>
3	2 µg .mL <sup>-1</sup>
4	4 µg .mL <sup>-1</sup>
5	6 µg .mL <sup>-1</sup>
6	8 µg .mL <sup>-1</sup>
7	10 µg .mL <sup>-1</sup>

Para determinação da recuperação, utilizou-se como branco, matriz de caseína hidrolisada da marca DIFCO™. Após análise em duplicata do branco, para comprovação da isenção de retinol, foi adicionada à matriz as concentrações de 0,5 µg .mL<sup>-1</sup>, 4,0 µg .mL<sup>-1</sup> e 10 µg .mL<sup>-1</sup> da solução estoque de padrão de retinol (4,72 µg.mL<sup>-1</sup> com 99% de pureza), sendo ressuspensionado com 1mL de etanol absoluto.

Com objetivo de verificar a robustez do método de ensaio foi utilizado teste de *Youden* (INMETRO, 2010). Consiste em um teste que determina a sensibilidade do método de ensaio frente a pequenas e específicas variações, para indicar qual o tipo de influência cada uma das variáveis tem sobre o resultado final. As variáveis selecionadas estão indicadas na tabela 3, assim como a matriz das variações utilizadas para as análises. Os resultados foram analisados utilizando ANOVA fator único (p<0,05).

**Tabela 3.** Parâmetros, matriz dos fatores utilizados na determinação da robustez, condições cromatográficas de análise e alternativas na determinação de retinol

Parâmetros Cromatográficos	Condições Cromatográficas de análise	Condições Cromatográficas alternativas	Ensaio Aleatórios							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura	A - 33°C	a - 34°C	A	A	A	A	a	a	a	a
Concentração de metanol inicial	B - 80%	b - 82%	B	B	b	b	B	B	b	b
Fluxo	C - 0,8	c - 0,83	C	c	C	c	C	c	C	c
Equipamento	D - Modular	d - Alliance	D	D	d	d	d	d	D	D
Coluna - YMC C <sub>30</sub>	E - Lote 1 - 0697141261	e - Lote 2 - 0752351011	E	e	E	e	e	E	e	E
Metanol - Tedia	F - Lote 1 -609507	f - Lote 2 -705322	F	f	f	F	F	f	f	F
M-ter.butyl - Tedia	G - Lote 1 - 1003151	g - Lote 2 - 1008364	G	g	g	G	g	G	G	g
		Resultado.	s	t	u	v	w	x	y	z

#### 4.4.8 Análises Estatísticas

Segundo orientação ANVISA e INMETRO as análises estatísticas utilizadas para cada parâmetro foram diferenciadas, porém pode-se agrupar em ANOVA fator único (p<0,05), teste de Grubbs para valores discrepantes, teste de Cochran para homocedasticidade, coeficiente de variação (CV%), e teste de *Youden*. Os coeficientes de variação (CV%) analisados não devem exceder 15%.

#### 4.4.9 Quantificação de retinol

Para determinação da concentração de retinol nas amostras de queijo bubalino por CLAE foi utilizada a equação:

$$\text{Concentração } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{\mu\text{g}/\text{mL} \times \text{volume final} \times 100}{\text{massa}}$$

Sendo,  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obtido através do cálculo da curva de calibração.

#### 4.5 Materiais para Determinação de Beta-caroteno

As análises de beta-caroteno nos queijos tipo *Mozzarella* elaborados com 60 dias e 200 dias, nos queijos misturados com leite bovino nos tratamentos I, II, III, IV, V, e nos queijos comerciais e misturados, foram realizadas no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, utilizando a mesma técnica, descrita a seguir, para todas as amostras em duplicata.

Os materiais utilizados para extração do beta-caroteno foram: acetona grau cromatográfico - Tedia<sup>®</sup>, Celite 545 - Tedia<sup>®</sup>, éter de petróleo (30°-60°C) grau cromatográfico Tedia<sup>®</sup>, hidróxido de potássio (KOH) P.A. - Tedia<sup>®</sup>, metanol grau cromatográfico Tedia<sup>®</sup>, éter metil-*terc*-butílico grau cromatográfico Tedia<sup>®</sup>, 2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT) - Tedia<sup>®</sup>, Óxido de magnésio P.A. (MgO) - Merck<sup>®</sup>, sulfato de sódio anidro P.A. (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)- VETEC<sup>®</sup>.

Os equipamentos utilizados: cromatográfico líquido de alta eficiência modular Waters<sup>®</sup> composto por bomba 600, com degaseificador de solvente em linha, injetor automático 717 *plus* e detector com arranjo de fotodiodos modelo 996, com sistema de aquisição de dados com *software* Empower<sup>®</sup>. Espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu<sup>®</sup>.

##### 4.5.1 Extração de beta-caroteno das amostras

Segundo técnica de Rodriguez-Amaya (2001) adaptada por Pacheco (2009), foram pesados 15g de queijo tipo *mozzarella*, sendo macerados com auxílio de graal, pistilo e 3g celite e extraídos com 20-50mL de acetona grau cromatográfico. O material foi filtrado, a vácuo, em funil de vidro com placa sinterizada conectado a kitassato de 500mL. O material macerado foi re-extraído duas vezes até ficar incolor, repetindo o volume de acetona. O extrato do kitassato foi transferido para funil de separação de 500mL contendo 40-50mL de éter de petróleo. A mistura foi lavada com 200-300mL água miliQ, a fase inferior, aquosa, foi descartada com auxílio de béquer. O procedimento foi repetido 2-3 vezes.

O extrato etéreo foi adicionado a erlenmeyer âmbar de 125 mL recebendo solução saponificante de KOH:Metanol 10:90 (%p/v) em volume igual ao do extrato etéreo, reagindo por 16 horas protegido de luz e O<sub>2</sub>. Após as 16 horas, a mistura foi transferida para funil de separação de 500mL contendo 40-50mL éter de petróleo e lavada com 200-300mL de água miliQ, a fase inferior, aquosa, foi descartada com auxílio de béquer de 250mL. O procedimento foi repetido de 2-3 vezes. O extrato etéreo foi filtrado com funil de vidro contendo lã de vidro e camada de aproximadamente 3 cm de sulfato de sódio anidro. O filtrado foi recolhido em balão volumétrico âmbar de 10mL, sendo avolumado com éter de petróleo, se necessário.

O conteúdo do balão foi submetido a leitura no espectrofotômetro a comprimento de onda de 450nm para determinação de carotenóides totais, utilizando como branco éter de petróleo grau cromatográfico. Após processo de extração e saponificação, foi retirada alíquota de 2mL do extrato etéreo para concentração com auxílio de fluxo de nitrogênio até *secura* e

ressuspendido para 100µL de acetona, com auxílio de micro-pipeta o material ressuspendido foi transferido para *vial* com redutor de volume e levado para análise cromatográfica.

#### 4.5.2 Parâmetros cromatográficos para determinação de beta-caroteno

As condições cromatográficas foram desenvolvidas no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos utilizando Coluna YMC C<sub>30</sub> Carotenoid (250 x 4,6 mm x 3µm), a 33 °C, com eluição em gradiente de éter metil terc-butilico:metanol, seguindo a mesma variação que na determinação de retinol, fluxo 0,8 mL/min, o volume injetado foi de 15µL e o tempo total de análise foi de 28 minutos.

#### 4.5.3 Isolamento de padrão de beta-caroteno

A obtenção de padrão foi realizada segundo metodologia descrita por Pacheco (2009), através de isolamento do beta-caroteno de cenoura (*Daucus carota L.*) crua descascada, em virtude desta matriz ser excelente fonte, segundo a literatura. Para isso, foram pesados 15g de cenoura triturada com *mixer*, em balança analítica, sendo macerado em graal com pistilo e 3 g de celite e extraído com 20-50mL de acetona. O material foi filtrado com funil de placa sinterizada conectado a kitassato de 500mL. O material filtrado foi extraído duas vezes, utilizando igual volume de acetona. O filtrado foi adicionado a funil de separação de 500mL e lavado com 200-300mL de água miliQ. O extrato etéreo foi coletado com funil de vidro contendo lã de vidro e camada de aproximadamente 3cm de sulfato de sódio anidro. O filtrado foi recolhido em balão de fundo redondo âmbar de 250mL e colocado no rotaevaporador sob pressão reduzida, a temperatura ambiente, até *secura* e ressuspendido em 3mL de éter de petróleo grau cromatográfico.

Para preparação da coluna cromatográfica aberta (figura 16) foi utilizado óxido de magnésio e celite medidos em volume iguais (1:1) e misturados para homogeneizar as partículas. O material homogêneo foi colocado em estufa a 110°C por 4 horas para ativação da fase estacionária. Após esse período na estufa o material foi colocado no dessecador até redução da temperatura, em torno de 70°C. Foi colocada pequena quantidade de lã de vidro no fundo do tubo de vidro para evitar saída da fase estacionária, e com auxílio de funil para sólido, a mistura de óxido de magnésio e celite foram transferidos para coluna até 2/3 da altura, compactando com bastão de vidro. O tubo de vidro foi conectado a kitassato com rolha e ligado no vácuo por 1 hora para auxiliar na compactação. Na parte superior da coluna foi colocado 1 cm de sulfato de sódio anidro.

Com auxílio de pipetador automático o volume total do extrato etéreo (3mL) foi colocado no topo da coluna, sobre camada de sulfato de sódio anidro. Após completa absorção do líquido, o vácuo foi religado e adicionado 50mL da solução de éter etílico:éter de petróleo 2:98 (%v/v), mantendo gotejamento de ±2 gotas/segundo, para não deixar secar a superfície.

Após a separação da banda do carotenóide de interesse, no caso o beta-caroteno, parou-se a eluição da fase móvel até *secura*, a coluna foi retirado do vácuo e a banda de interesse foi cuidadosamente raspada com espátula de aço inox, descartando a parte inicial e a final da banda, recolhendo só o meio da faixa a fim de obter maior pureza. O material raspado foi colocado em funil com placa sinterizada conectado a kitassato de 500mL, ligado a vácuo, e extraído com 20-50mL de acetona. O filtrado foi coletado com frasco de vidro usando funil, lã de vidro e sulfato de sódio anidro, e levado para análise do grau de pureza.



**Figura 16:** Preparação da coluna cromatográfica aberta para separação do padrão de beta-caroteno

Fonte: PACHECO, 2009

#### 4.5.4 Determinação da pureza do beta-caroteno isolado

Para determinação da pureza foi realizada através de análise por CLAE, onde uma alíquota de 100 $\mu$ L do material em acetona grau cromatográfico foi transferida para *vial* com redutor de volume e levado para análise cromatográfica. O cálculo da pureza está relacionado com a área do pico de retinol em porcentagem relativa a soma das áreas de todos os picos presentes, de acordo com a equação:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Área do pico de interesse (beta-caroteno)}}{\text{Área de todos os picos}} \times 100$$

#### 4.5.5 Quantificação espectrofotométrica do padrão isolado de beta-caroteno

A banda de separação contendo beta-caroteno foi extraída e quantificada em carotenóides totais através de espectrofotômetro a 450nm, utilizando como branco, éter de petróleo grau cromatográfico. A leitura de absorvância (Abs) foi utilizada na equação:

$$\text{Concentração } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = (\text{Abs} \times 10^4) / \epsilon,$$

onde absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do éter de petróleo em 450nm = 2592.

#### 4.5.6 Quantificação de beta-caroteno

Para determinação da concentração de beta-caroteno nas amostras de queijo tipo *mozzarella* e das marcas comerciais por CLAE foi utilizada as equações:



$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g/g}) = \frac{(A \times V \times f \times \text{Repe})}{A^{1\%}_{1\text{cm}} \times m}$$

Onde:

A= leitura de absorvância

V= volume balão

Repe = repetitividade da leitura de absorvância

f= Fator de correção do volume ( $10^4$ )

$A^{1\%}_{1\text{cm}} = 2592$

m=massa da amostra

$$\text{Beta-caroteno}(\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{(C_s(\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{Volume ressuspensão})}{1000} \times \frac{(\text{vol. Final (balão)})}{\text{vol. secagem}} \times 100$$

**Massa**

Onde:

$C_s$  = valor fornecido de *software* (Amount)

#### 4.5.7 Validação do método de ensaio para determinação de beta-caroteno

Os parâmetros de validação utilizados para método de ensaio do beta-caroteno foram: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação.

Para análise da seletividade, o padrão de beta-caroteno isolado de cenoura foi injetado nas condições cromatográficas citadas anteriormente para determinação do tempo de retenção, espectro de absorção na região do ultravioleta por detector de arranjo de fotodiodo. Para confirmação desses parâmetros (tempo de retenção e espectro de absorção na região do visível) foi utilizado trabalho realizado por Pacheco (2009), analisando cenoura crua nas mesmas condições cromatográficas e com mesmos equipamentos.

A determinação da faixa de trabalho foi realizada através de análise do queijo misturado com 50% de leite bovino e 50% de leite bubalino. A quantidade de beta-caroteno encontrada na amostra representava o ponto médio da curva de calibração que variava de  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , conforme apresentado na tabela 4.

**Tabela 4:** Pontos da curva de calibração com as respectivas concentrações de beta-caroteno

Ponto de Calibração	Concentração $\mu\text{g}/\text{mL}$
1	$0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
2	$0,8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
3	$1,4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
4	$2,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
5	$2,6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
6	$3,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
7	$4,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Para determinação da linearidade e precisão do método de ensaio preparou-se curva analítica com sete pontos. Os resultados de áreas apresentados pelas diferentes concentrações da curva de calibração foram analisados através de teste de Grubs, para determinação de valores aberrantes, teste de Cochran para verificação da homocedasticidade das variâncias, e para determinação da linearidade da regressão foi utilizado ANOVA fator único. Os

resultados apresentados pela curva de calibração foram avaliados através da estimativa do coeficiente de variação (CV%), para determinação da precisão do método em estudo e a exatidão através da determinação dos valores teóricos e obtidos e do desvio padrão dos resultados em cada ponto da curva de calibração.

O limite de detecção do equipamento foi determinado através da relação sinal:ruído 5:1, utilizando os dados do trabalho de Pacheco (2009).

O limite de quantificação foi representado pelo primeiro ponto utilizado na curva de calibração, uma vez que, esse valor corresponde à menor concentração esperada na amostra,  $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Segundo INMETRO a utilização do ponto de menor concentração da curva de calibração pode ser realizada se a exatidão, comparação entre o valor teórico e obtido, estabelecendo como critério de aceitação desvio padrão  $\leq 0,2$ , e a precisão (CV < 15%).

Para determinação da recuperação, utilizou-se como branco, amostra de queijo elaborado somente com leite bubalino. Após análise em duplicata do branco, para comprovação da isenção de beta-caroteno, foi adicionada à matriz as concentrações de  $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  da solução padrão de beta-caroteno isolado de cenoura.

#### 4.5.8 Análises Estatísticas

Segundo orientação ANVISA e INMETRO as análises estatísticas utilizadas para cada parâmetro foram diferenciadas, porém pode-se agrupar em ANOVA fator único ( $p < 0,05$ ), teste de Grubbs para valores discrepantes, teste de Cochran para homocedasticidade, coeficiente de variação (CV%) não devem exceder 15%.

#### 4.6 Percentual de Adulteração

Os queijos preparados com percentuais de 0%, 20%, 50%, 80% e 100% de leite bovino em bubalino, foram analisados conforme metodologia descrita para extração e condições cromatográficas de carotenóides. Esse material foi utilizado para determinação da adulteração nos queijos bubalinos com leite bovino, através da determinação da área de beta-caroteno presente nas amostras.

Os dados foram analisados através de teste de Grubbs, teste de Cochran, ANOVA fator único e Teste T ( $p < 0,05$ ). Para determinação da correlação entre os queijos adulterados com diferentes percentuais de leite bovino, verificando se havia correlação linear entre as duas variáveis (Percentual de adulteração x Concentração de beta-caroteno) foi utilizada a Correlação de Pearson, variando ( $r \neq 0$ ) de 1 (correlação positiva) a -1 (correlação negativa), onde  $r(x_i, x_j) = s(x_i, x_j) / (s(x_i) \times s(x_j))$ .

Para verificação da eficiência do método de ensaio foi utilizada como referência o “Guia para controle da qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos” (ANVISA/REBLAS, 2007) e para os cálculos de incerteza o documento NIT-DICLA-021 (INMETRO, 2007). No documento ANVISA/REBLAS, o item 6.6.2.2 relata os objetivos e técnicas para avaliação de métodos analíticos e performance analítica, neste item, a verificação da performance deve monitorar o desempenho do método sob as condições de análise de rotina, levando em consideração a composição da amostra, equipamento, reagentes, condições ambientais e laboratoriais, observando se o desempenho do método é estatisticamente consistente, em relação a precisão, exatidão e incerteza esperada para o método. E o documento NIT-DICLA-021 relata os requisitos para expressão da incerteza de medição.

Os quinze queijos (comerciais e os preparados com os percentuais 10%, 30%, 40%, 60%, 70%, 90%) foram analisados de acordo com a metodologia descrita anteriormente,

preparando a partir desses valores carta controle para verificação de desvios dos parâmetros representativos do método onde Limite Superior de Controle (LSC)=  $X+3xDP$  e Limite Inferior de Controle (LIC) =  $X - 3xDP$ , verificando se o processo é estatisticamente estável, com pontos no gráfico distribuídos aleatoriamente próximo a linha média sem que haja tendência crescente, decrescentes, ciclos ou misturas. Foi realizada também a determinação da precisão ( $CV\% < 15\%$ ) e exatidão ( $DP \leq 0,2$ ).

A determinação da incerteza do método foi calculada através da determinação da incerteza padrão do tipo A associada ao valor de média de cada análise à probabilidade 95%, segundo a equação:

$$u = DP/\sqrt{n}$$

A incerteza combinada foi calculada através dos cálculos de incerteza das variáveis que influenciariam na quantificação de carotenóides totais e na análise do perfil cromatográfico por CLAE. Dessa forma, baseado na equação de carotenóides totais, as variáveis eram: absorvância (A), volume do balão (V), massa da amostra (m) e repetitividade da leitura espectrométrica (Repe). No cálculo de beta-caroteno por CLAE ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) as variáveis eram: concentração obtida pelo *software* ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Cs), volume do balão (V), repetitividade da medida cromatográfica (Repe), massa da amostra (m) e fator de correção do volume (f).

A equação para cálculo da incerteza combinada ( $u_c$ ) de todas as fontes de incerteza para o cálculo de carotenóides totais e do cálculo de beta-caroteno ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) é:

$$u_c (\text{Carotenóides Totais}(\mu\text{g}/\text{g})) = \sqrt{(u^2(A) + u^2(V) + u^2(m) + u^2(\text{Repe}))}$$

$$u_c (\text{beta-caroteno } (\mu\text{g}/\text{mL})) = \sqrt{(u^2(\text{Cs}) + u^2(V) + u^2(m) + u^2(f) + u^2(\text{Repe}))}$$

Onde, para calcular  $u^2$  foram usados os coeficientes de sensibilidade ( $c_i$ ) e o  $\mu(x)$  de cada variável, segundo as equações abaixo:

Quantificação de carotenóides totais:

$$\begin{aligned} c_i(A) &= (V \times 10^4 \times \text{Repe}) / (2592 \times m) \\ c_i(V) &= (A \times 10^4 \times \text{Repe}) / (2592 \times m) \\ c_i(m) &= - (A \times V \times 10^4 \times \text{Repe}) / (2592 \times m^2) \\ c_i(\text{Repe}) &= (A \times V \times 10^4) / (2592 \times m) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \mu(A) &= U_{\text{espectrofotômetro}}/k \\ \mu(V) &= \sqrt{(U_{\text{balão}}/k)^2} \\ \mu(m) &= (U_{\text{pesagem}}/k)^2 + (U_{\text{tara}}/k)^2 \\ \mu(\text{Repe}) &= \text{CV de amostragem escolhida} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} u^2(A) &= c_i(A) \times \mu(A) \\ u^2(V) &= c_i(V) \times \mu(V) \\ u^2(m) &= c_i(m) \times \mu(m) \\ u^2(\text{Repe}) &= c_i(\text{Repe}) \times \mu(\text{Repe}) \end{aligned}$$

Onde:

U = Incerteza expandida do espectrômetro – calibração do equipamento (2010);

$k = (\sqrt{3})$  – incerteza com distribuição de probabilidade retangular, usada quando se conhece apenas os valores máximos e mínimos de variação de equipamentos;

$U_{\text{balão}}$  = Incerteza do balão volumétrico 10mL – calibração do fornecedor (2010);

$U_{\text{pesagem}}$  = Incerteza da pesagem da balança analítica – calibração do equipamento (2010);

$U_{\text{tara}}$  = Incerteza da pesagem da balança analítica – calibração do equipamento (2010);

$CV$  = Coeficiente de variação de amostra escolhida

Concentração de beta-caroteno na amostra:

$$c_i(\text{Cs}) = (\text{V} \times \text{f} \times \text{Repe})/\text{m}$$

$$c_i(\text{V}) = (\text{Cs} \times \text{f} \times \text{Repe}) / \text{m}$$

$$c_i(\text{m}) = -(\text{Cs} \times \text{V} \times \text{f} \times \text{Repe})/\text{m}^2$$

$$c_i(\text{repe}) = (\text{Cs} \times \text{V} \times \text{f})/\text{m}$$

$$c_i(\text{f}) = (\text{Cs} \times \text{V} \times \text{Repe})/\text{m}$$

$$\mu(\text{Cs}) = (\text{S}/\text{B}_1) \times \sqrt{(1/\text{p}) + (1/\text{n}) + ((\text{C}_1 - \text{C})/\text{Sxx})^2}$$

$$\text{S} = \sum_{j=1}^{n-2} [\text{A}_j - (\text{B}_0 + \text{B}_1 \times \text{C}_j)]^2 / \text{n} - 2$$

$$\text{Sxx} = \sum_{j=1}^{n-2} (\text{C}_j - \text{C})^2$$

$$\mu(\text{V}) = \sqrt{(\text{U}_{\text{balão}}/k_1)^2}$$

$$\mu(\text{m}) = c_i(\text{m}) \times \mu(\text{m})$$

$$\mu(\text{Repe}) = \text{CV de medida cromatográfica escolhida}$$

$$\mu(\text{f}) = (\text{U}_{\text{pipeta 1}}/k)^2 \times (\text{U}_{\text{pipeta 2}}/k_2)^2$$

$$u^2(\text{Cs}) = c_i(\text{Cs}) \times \mu(\text{Cs})$$

$$u^2(\text{V}) = c_i(\text{V}) \times \mu(\text{V})$$

$$u^2(\text{m}) = c_i(\text{m}) \times \mu(\text{m})$$

$$u^2(\text{Repe}) = c_i(\text{Repe}) \times \mu(\text{Repe})$$

$$u^2(\text{f}) = c_i(\text{f}) \times \mu(\text{f})$$

Onde:

$\text{S}$  = Desvio padrão residual;

$\text{B}_1$  = coeficiente angular da equação da reta;

$k_1 = \sqrt{3}$ ;

$k_2 = 2$  - fator de abrangência padronizado, em comparações de resultados de mesma grandeza;

$\text{p}$  = número de medições para determinar  $\text{C}_0$

$\text{n}$  = número de medições para a curva;

$\text{C}_0$  = ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) da medida cromatográfica escolhida

$\text{C}/$  = média do ponto da curva mais próximo de  $\text{C}_1$

$\text{Sxx}$  = incerteza da regressão linear

$\text{CV}$  = Coeficiente de variação de medida cromatográfica escolhida do ponto da curva;

A incerteza expandida do método de ensaio nas análises de rotina foi calculada segundo equação:

$$U = u_c \times k$$

Onde:

$u_c$  = Incerteza combinada da equação;

k = fator de abrangência padronizado de aproximadamente 95% (k =2)

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando planilha *Microsoft Excel* para essa função.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da Quantidade de Gordura pelo Método Butirométrico

As quantidades de gordura nos períodos de lactação aos 60 dias e aos 200 dias estão representadas na tabela 5.

**Tabela 5:** Quantidades de gordura no leite bubalino nos períodos de 60 dias e 200 dias de lactação.

Amostra de Leite	60 dias Gordura (%)	200 dias Gordura (%)
AB1	6,17±0,29	5,30±0,26
AB2	4,13±0,15	5,50±0,26
AB3	5,30±0,30	7,63±0,15
AB4	6,17±0,29	5,50±0,3
AB5	4,77±0,12	>8,00±0,0

Resultados apresentados como média±desvio padrão.

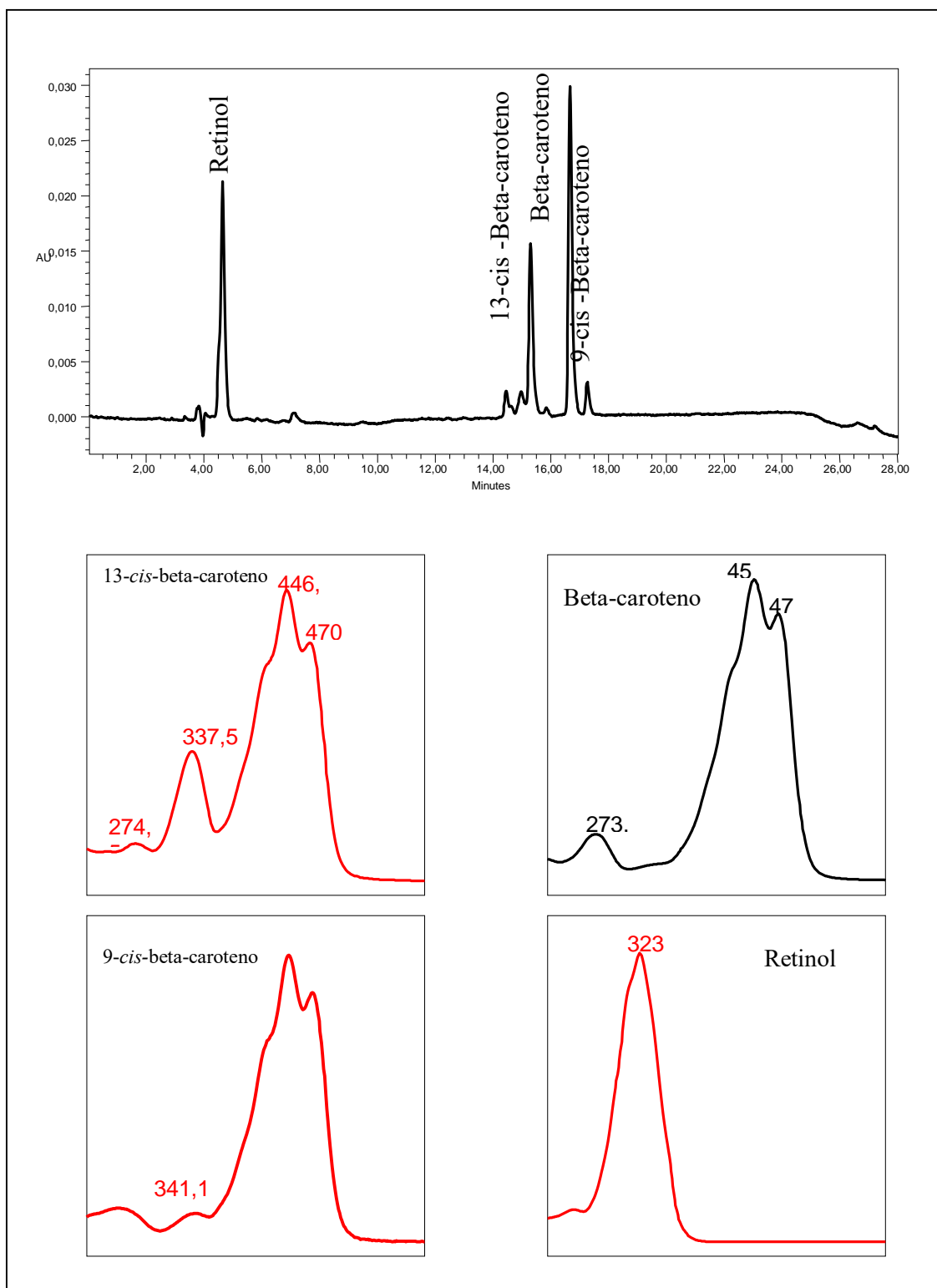
AB1 a AB5 – Leite bubalino do animal 1 a Leite bubalino do animal 5

Segundo Teste T student, não houve diferença estatística entre o período de 60 dias e 200 dias após a parição  $T_{calc} (0,00) < T_{tab} (2,05)$  a nível de  $\alpha=0,05$  para o teor de gordura do leite bubalino. Os valores encontrados, variando de 4,13% a 6,17% aos 60 dias de lactação e de 5,30% e maior que 8,0% foram semelhantes aos encontrados por estudos de Amaral et al., (2005), com valores de 7,59%, Fernandes, (2004) com valores médios de 6,0%, Coelho et al.,(2004) com 6,83% e Rosa et al.,(2007) com 5,1% a 8,7%, Macedo et al., (2001), 6,00 a 7,65%. As variações das quantidades dos componentes principais do leite como proteínas, carboidratos, e gorduras podem ser modificadas devido à raça, o tipo de manejo, estágio de lactação, o clima e a alimentação. Sendo a característica de comportamento reprodutivo sazonal, onde ocorre concentração dos partos no período de inverno e outono, responsável por variações nos componentes do leite bubalino. A maior oferta de alimentos no período chuvoso (novembro a abril), coincidindo com o período de 200 dias após a parição e o efeito da concentração do leite no final da lactação poderiam explicar o comportamento das quantidades numéricas de gordura nos leites nos diferentes períodos de lactação (ARAÚJO et al., 2011).

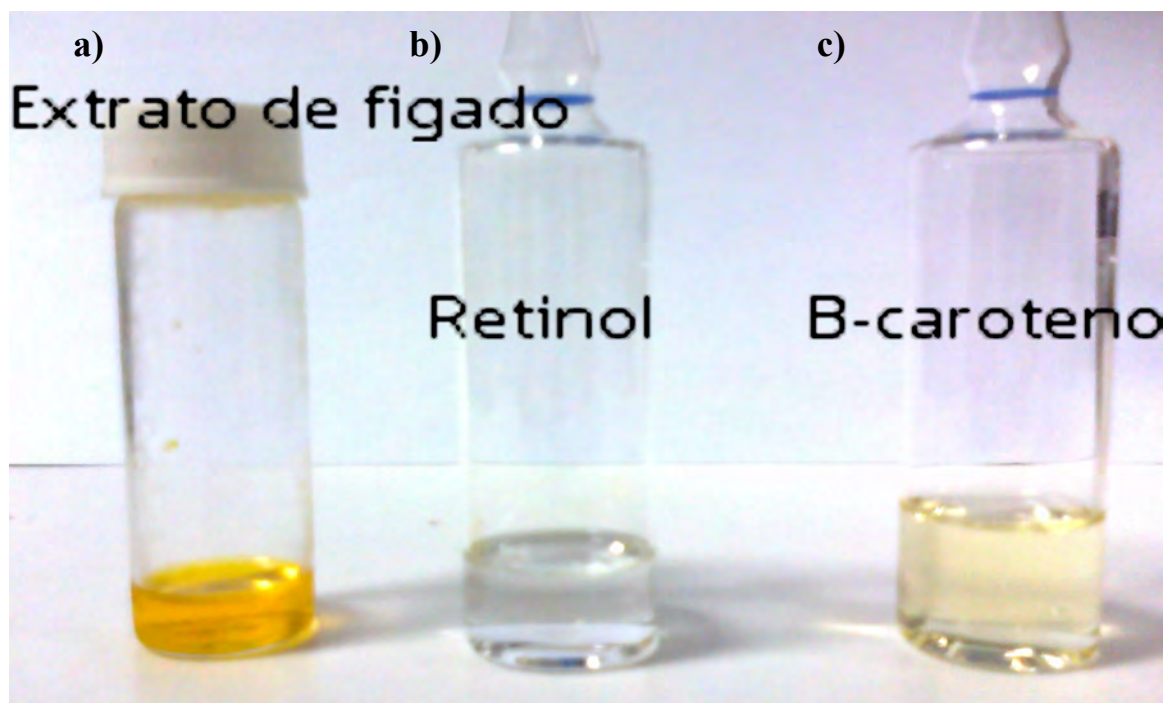
### 5.2 Determinação de Retinol

#### 5.2.1 Extrato de fígado bovino

O extrato de fígado bovino apresentou cromatograma a 380nm representado pela figura 10, para facilitar a visualização de todos os compostos identificados da amostra. A partir dos tempos de retenção e dos espectros de absorção na região do visível pode ser observado a presença de beta-caroteno, 13-cis-beta-caroteno, 9-cis-beta-caroteno e retinol (figura 17). Utilizando esse extrato foi possível isolar retinol e beta-caroteno (figura 18), porém a concentração deste último era baixa, dificultando sua utilização como padrão para as análises de validação, por isso, foi utilizada a matriz cenoura crua para obtenção do padrão de beta-caroteno. O padrão isolado foi armazenado sob refrigeração em ampola em atmosfera de nitrogênio para evitar possíveis oxidações.



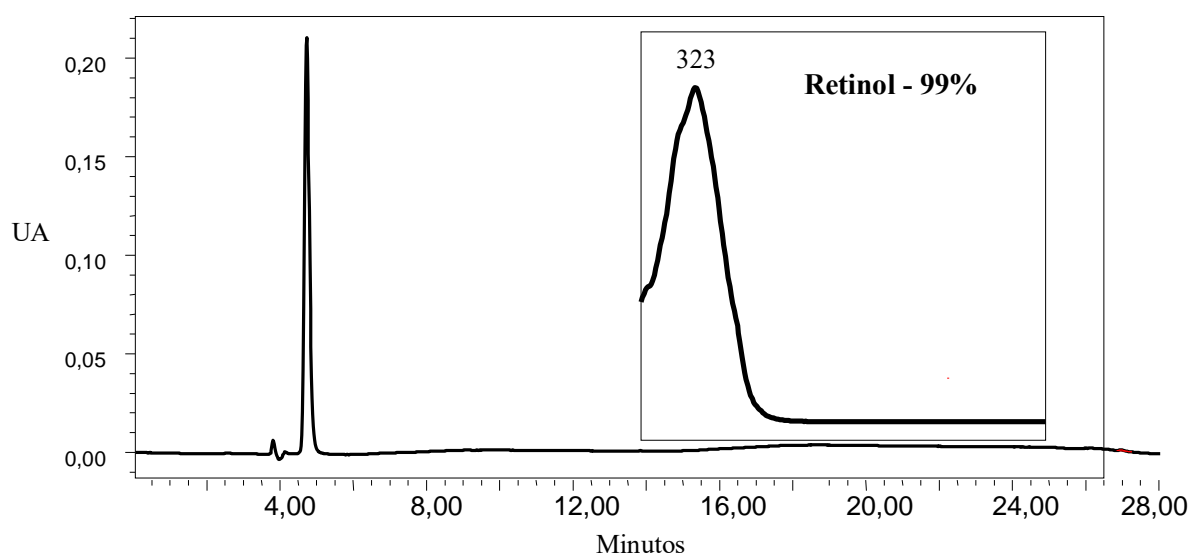
**Figura 17:** Cromatograma de extrato de fígado a 380nm, com espectros de absorção na região do visível de beta-caroteno, 13-cis-beta-caroteno e 9-cis-beta-caroteno



**Figura 18:** Padrões isolados de extrato de fígado (a), retinol (b) e beta-caroteno (c)

### 5.2.2 Quantificação e determinação do teor de pureza do retinol isolado

Após o isolamento foi calculada a concentração de retinol com relação a absorvidade molar e a leitura obtida no espectrofotômetro a 325nm, apresentando valores de concentração de  $1,18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do retinol isolado. Após as injeções do extrato de fígado bovino foram obtidos 4 mL de solução de retinol com pureza de 99% (figura 19), correspondendo a concentração total de  $4,72\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , material suficiente para futuras análises cromatográficas.



**Figura 19:** Cromatograma para determinação de pureza da solução de retinol isolado de fígado bovino



De acordo com os resultados apresentados pelo material isolado do fígado bovino, foi possível a obtenção de padrão de retinol com 99% de pureza, captado de fonte natural, demonstrando que a técnica utilizada possibilita a preparação de padrão analítico para utilização em análises de cromatografia líquida de alta eficiência. Esse processo garante a qualidade das análises em relação ao padrão utilizado, reduzindo o risco de comprometimento do material por condições inadequadas de transporte e manuseio, além de minimizar os custos dos procedimentos analíticos e a interferência de impurezas provenientes do processo de produção de padrão comercial.

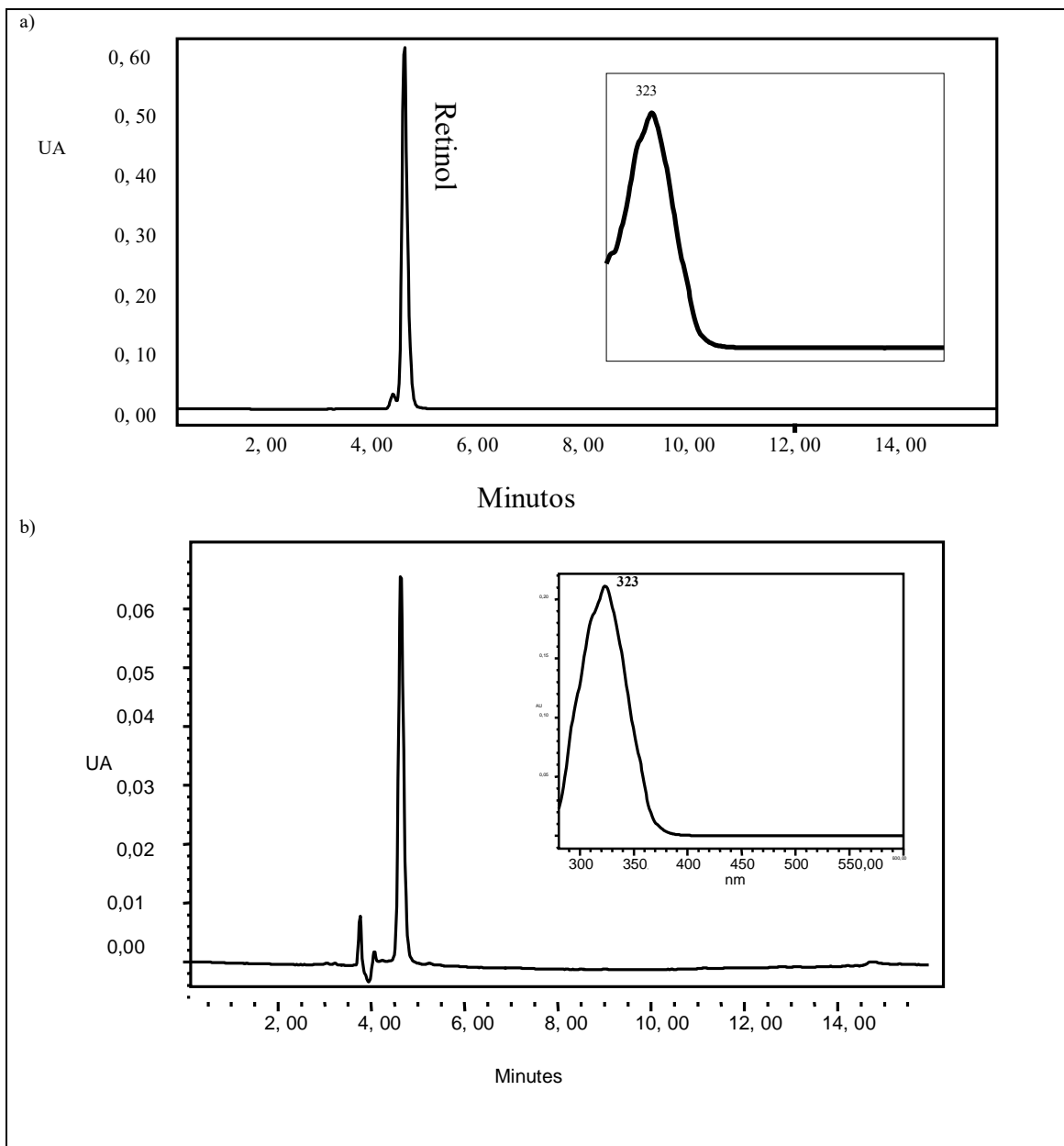
### 5.2.3 Validação do método de ensaio para determinação de retinol

Na determinação da seletividade, o padrão de retinol, com pureza de 99%, isolado de fígado bovino, apresentou perfil cromatográfico e espectro de absorção na região do ultravioleta a 325nm, representado na figura 20a. Para comparação foi utilizado, nos mesmos parâmetros cromatográficos, padrão comercial de acetato de retinol hidrolisado (figura 20b).

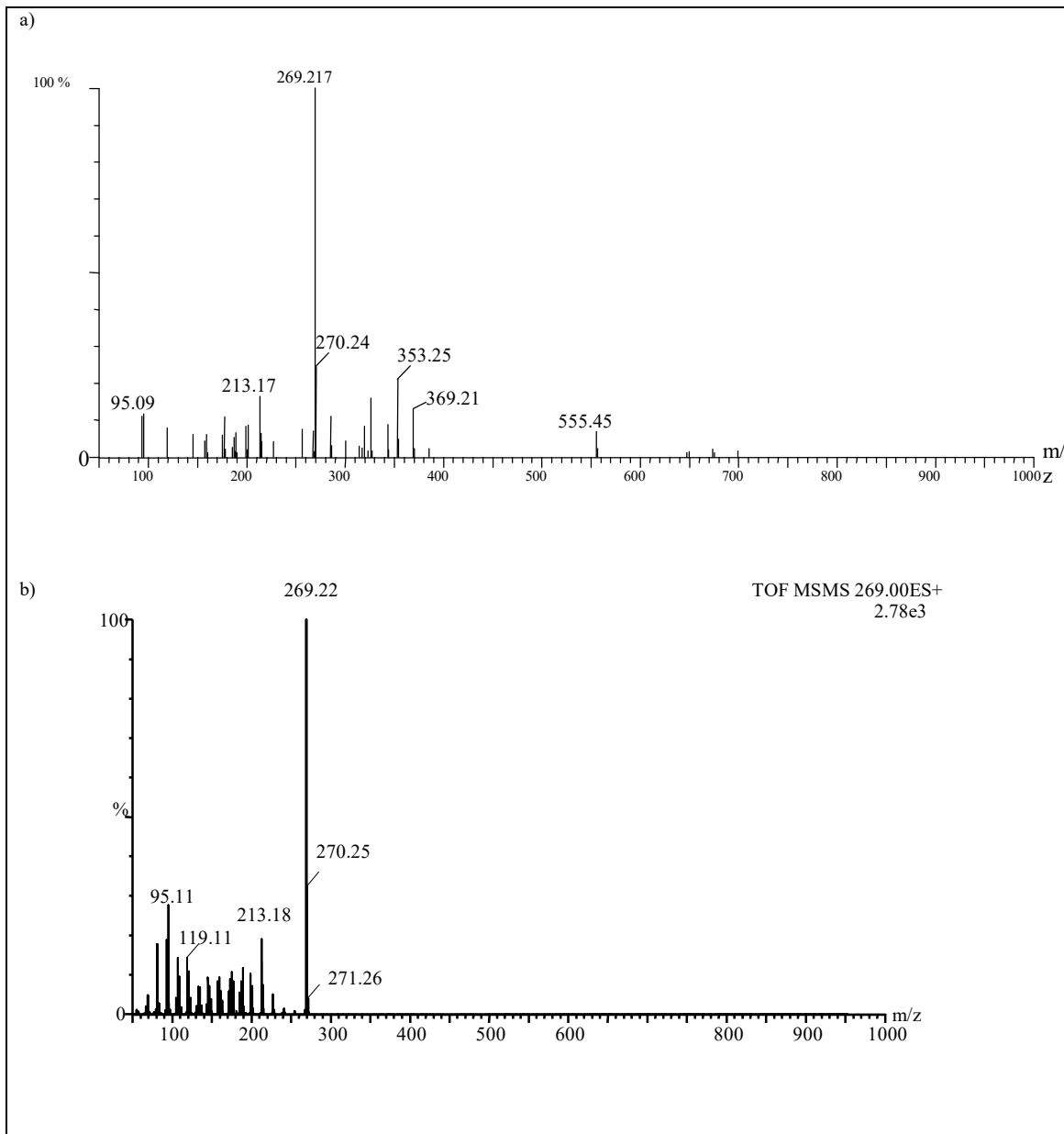
Em estudos realizados por Rodriguez-Delgado et al., (2002) e Fávoro et al., (2003), determinando retinol por CLAE-DAD, o espectro de absorção na faixa de comprimento de onda de 250 a 400 nm foi semelhante ao pico máximo de absorção encontrado no padrão de retinol isolado de fígado bovino.

A análise por CLUE-MS comprovou a presença de retinol no material isolado de fígado bovino, como mostrado na figura 21a. O espectro de massas apresenta o pico base a  $m/z$  269, que caracteriza a estrutura do retinol.

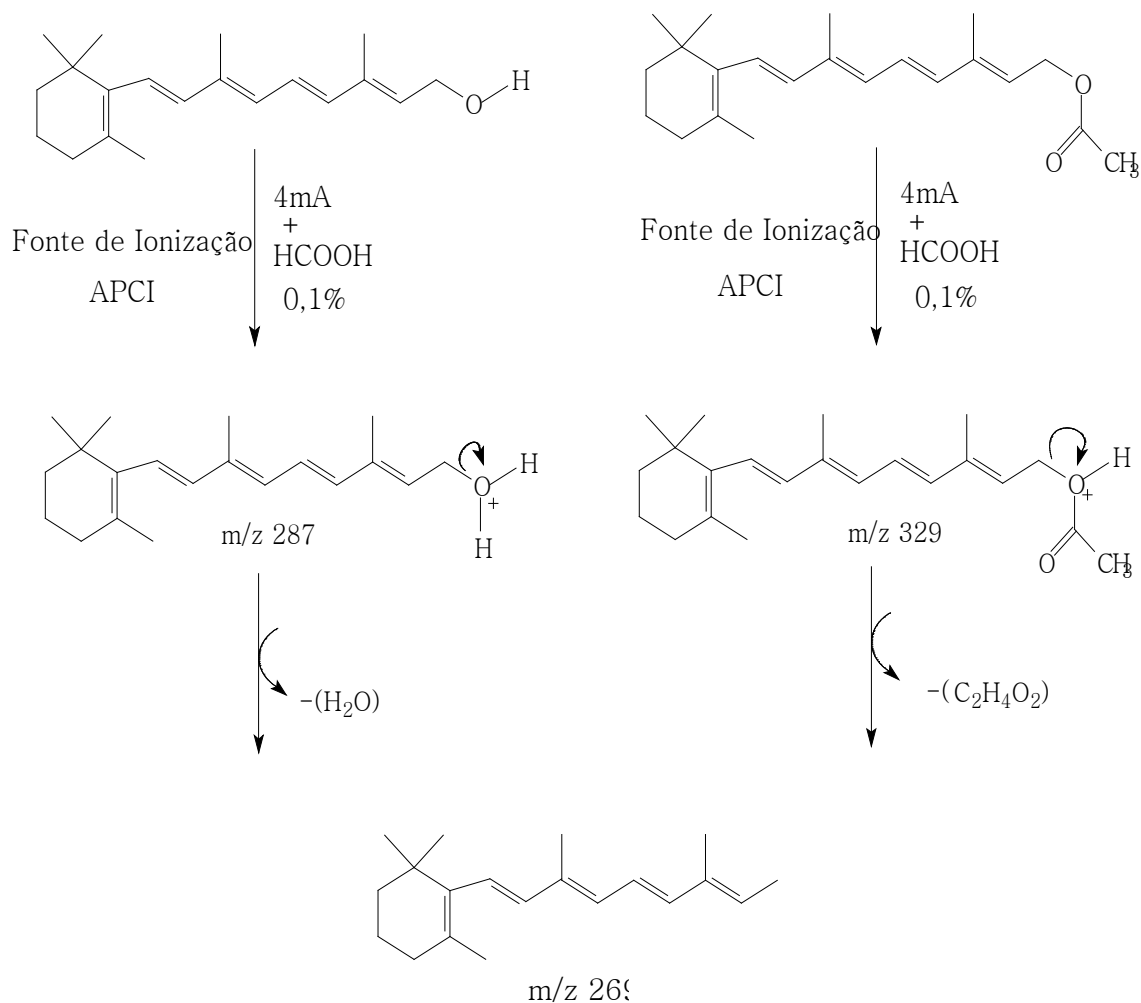
O espectro de massas do retinol isolado por CLAE foi comparado com espectro do padrão comercial de acetato de retinol (Figura 21b). O mecanismo de formação do íon  $m/z$  269 nos dois compostos está proposto na figura 22. Nesse processo, íon protonado  $m/z$  287 sofre desidratação ( $-H_2O$ ), gerando um fragmento positivo com pico base a  $m/z$  269, ( $[M+H]-H_2O]^+269$ ). Na molécula protonada  $m/z$  329 ocorre uma reação de mecanismo similar, mas que leva a perda de ácido acético ( $-C_2H_4O_2$ ), formando outro íon  $m/z$  269 ( $[M+H]-C_2H_4O_2]^+269$ ). Esses processos geram espectros de massa iguais para ambos os compostos. Os mesmos resultados podem ser observados no trabalho de Breemen et al., (1998), onde a identificação do retinol nas amostras foi feita com base na presença do pico base  $m/z$  269 por APCI. O mesmo íon foi observado em estudo realizado por Heudi, et al., (2004) por fonte APCI e por Li et al., (2005) por ESI+ analisando retinol em fórmulas infantis enriquecidas.



**Figura 20:** a) Cromatograma ( $t_R$  4,9 minutos) e espectro de absorção na região do ultravioleta do retinol isolado, b) Cromatograma ( $t_R$  4,9 minutos) e espectro de absorção na região do ultravioleta do padrão comercial de acetato de retinol hidrolisado



**Figura 21:** a) Espectro de massas do retinol extraído de fígado bovino obtido por CLUE-EM, b) Espectro de massas do padrão comercial de acetato de retinol obtido por introdução direta por bomba de CLUE-EM



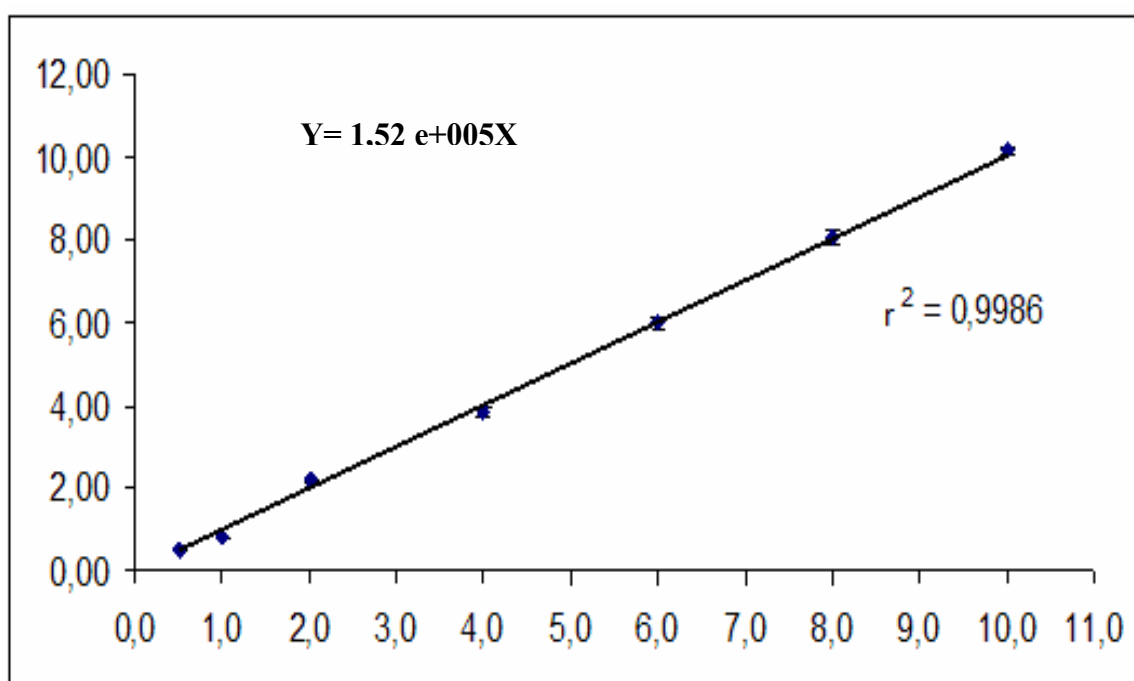
**Figura 22:** Proposta para fragmentação de retinol e acetato de retinol após passagem pela fonte de ionização, gerando o pico base m/z 269

Os resultados da linearidade, faixa de trabalho e precisão são apresentados na tabela 6. Os resultados estatísticos de linearidade estavam de acordo com os critérios da ANVISA e INMETRO. O teste estatístico de Grubs não identificou valores aberrantes, o teste de Cochran demonstra que as variâncias da curva são homogêneas,  $C_{\text{calc}} (0,378) < C_{\text{tab}} (0,561)$  e segundo análise de ANOVA fator único não houve diferença significativa entre os pontos,  $F_{\text{calc}}(0,381) < F_{\text{tab}}(2,096)$ , representando linearidade da regressão na faixa de trabalho estudada. Avaliando a precisão pelo coeficiente de variação (CV%) a cada nível de concentração, o resultado se mostrou satisfatório com valores abaixo de 3,5%, onde ANVISA recomenda valores abaixo de 15%. A exatidão pode ser observada através dos valores de concentração teórica e obtida, com critério de aceitação para o método de ensaio utilizado de  $DP \leq 0,2$ .

A curva analítica, representada pela figura 23, apresenta valor de  $r^2=0,9986$ , com expressão matemática  $Y= 1,52 \text{ e}+005X$ , resultado satisfatório segundo critérios do INMETRO e ANVISA, que recomendam que os valores de  $r^2$  estejam o mais próximo de 1,0, resultando em menor dispersão dos resíduos e menor incerteza dos coeficientes de regressão.

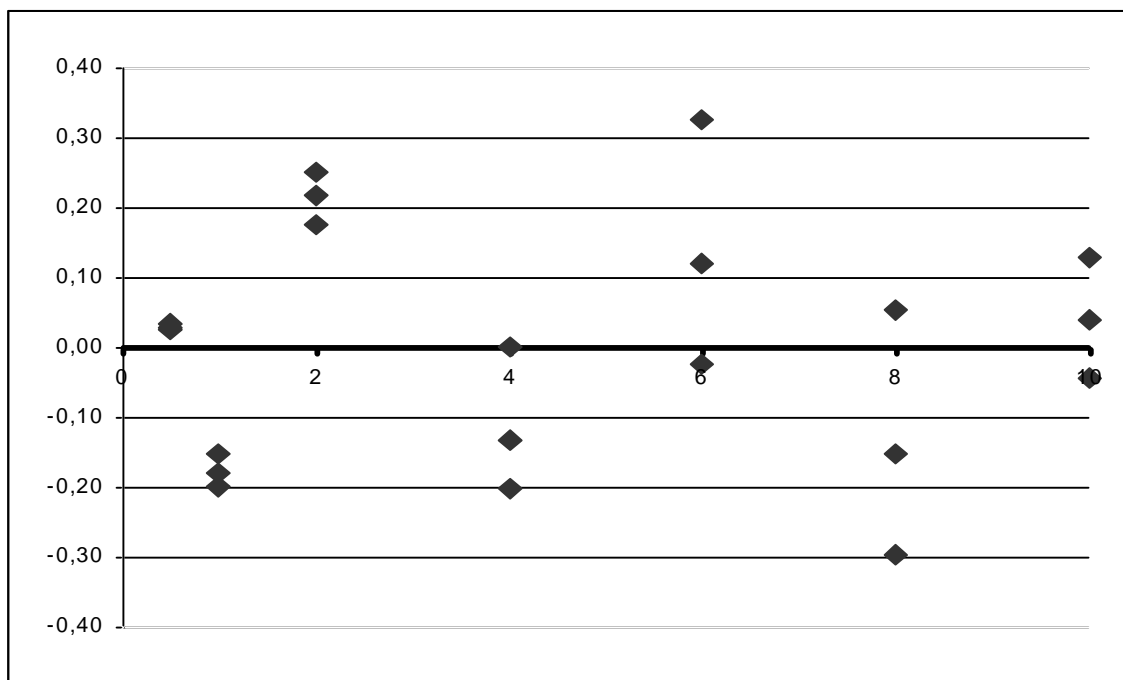
**Tabela 6.** Valores de concentração teórica e obtida ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), Coeficiente de variação (%) e resíduo dos valores utilizados para análise de linearidade, faixa de trabalho e precisão do método de ensaio para retinol

Conc Teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Conc. Obtida ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	média±Desvio padrão	CV%	resíduo
0,5	0,496	0,5±0,005	1,00	0,03
	0,505			0,03
	0,497			0,03
1,0	0,791	0,79±0,024	3,04	-0,18
	0,772			-0,20
	0,819			-0,15
2,0	2,194	2,19±0,038	1,74	0,22
	2,227			0,25
	2,151			0,17
4,0	3,854	3,87±0,103	0,10	-0,13
	3,784			-0,20
	3,986			0,00
6,0	5,971	6,14±0,175	2,85	-0,02
	6,114			0,12
	6,320			0,32
8,0	8,056	7,87±0,175	2,22	0,05
	7,852			-0,15
	7,708			-0,30
10,0	10,140	10,05±0,087	0,87	0,13
	9,967			-0,05
	10,051			0,04



**Figura 23:** Curva de calibração elaborada com padrão retinol

O gráfico de resíduo das variâncias não apresentou tendência, sendo distribuídos de forma aleatória, conforme apresentado na figura 24.



**Figura 24:** Gráfico de resíduos dos dados da curva de calibração

Para o limite de detecção foram preparadas duplicatas da diluição 1/85 de retinol a partir da solução mãe contendo  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O pico apresentado por esta diluição se distinguia do ruído numa relação de 5:1. A concentração de retinol neste pico era de  $55 \text{pg mL}^{-1}$ , correspondendo à menor concentração de retinol que pode ser detectada de forma distinta do ruído pelo equipamento.

Para determinação do limite de quantificação foram utilizados os valores obtidos para o menor ponto de concentração da curva,  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a média e o desvio padrão nessa concentração em análise foi de  $0,5 \pm 0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$  indicando exatidão da análise, com precisão representada pelo CV% de 1,00. Dessa forma, determinou-se como limite de quantificação o ponto de menor concentração de padrão de retinol, atendendo aos critérios de recomendação do INMETRO.

As análises de recuperação foram realizadas utilizando como branco caseína hidrolisada devido à dificuldade de encontrar fontes lácteas de origem animal isentas de retinol. Segundo critério de aceitação da ANVISA, os níveis de recuperação estão de acordo com a norma, que aceita variação entre 80% a 120%. Os valores encontrados variaram entre 80 e 103% de recuperação do retinol, conforme apresentado na tabela 7, demonstrando a eficiência da extração do retinol no método de ensaio.

**Tabela 7.** Quantidade do retinol em relação ao teste de recuperação (%)

Concentração teórica ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentração obtida ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV%
0,50	0,42	84,98	80,49 $\pm$ 6,35	7,89
	0,38	76,00		
4,00	3,25	81,19	82,40 $\pm$ 1,74	2,11
	3,35	83,65		
10,00	10,34	103,42	103,00 $\pm$ 0,61	0,59
	10,26	102,55		

A robustez para o método de ensaio foi calculada avaliando-se o efeito de cada parâmetro cromatográfico através da diferença entre as médias dos valores das condições de análise e a média dos valores das condições alternativas. Calculou-se também o desvio padrão e o CV% para os resultados obtidos, conforme apresentado na tabela 8. O teste ANOVA fator único realizado não mostrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os efeitos das variações dos parâmetros cromatográficos testados, indicando que nenhum deles influencia significativamente o método de ensaio, já que  $F_{\text{calc}} (1,31) < F_{\text{tab}} (3,55)$ . Assim, o método de ensaio pode ser considerado robusto.

**Tabela 8.** Efeito das condições analisadas em relação à área, tempo de retenção e concentração de retinol

Relação entre condições de análise e alternativas	Parâmetros Avaliados	Efeito sobre a área	Efeito sobre o $t_R$	Efeito sobre a concentração
A/a	Temperatura (A=33°C; a = 34°C)	6713,75	0,04	0,00
B/b	Concentração de metanol inicial (B=80%; b=82%)	3527,25	0,00	0,02
C/c	Fluxo (C=0,8; c=0,83)	7103,75	0,09	0,01
D/d	Equipamento (D= modular; d=Alliance)	76407,75	0,64	0,55
E/e	Coluna - YMC C30 (E= lote 1; e=lote 2)	9401,25	0,18	0,02
F/f	Metanol – Tedia® (F=lote 1; f=lote 2)	20335,75	0,18	0,09
G/g	M-ter.butil – Tedia® (G=lote 1. g = lote 2)	10765,75	0,04	-0,11
	Desvio padrão	43306	0,37	0,30
	CV%	6,88	8,28	7,32

#### 5.2.4 Quantidade de retinol nas amostras

A quantificação de retinol nas amostras de queijos bubalinos, utilizando o método de ensaio validado, variou entre  $24,54 \pm 0,58 \mu\text{g}/100\text{g}$  a  $62,58 \pm 0,50 \mu\text{g}/100\text{g}$ , conforme apresentado na tabela 9.

**Tabela 9:** Quantidade de retinol presente nos queijos de origem bubalina ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )

Amostra de Queijo	60 dias Retinol ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	200 dias Retinol ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
QB1	$31,16 \pm 1,23$	$31,51 \pm 0,29$
QB2	$32,61 \pm 1,00$	$54,54 \pm 5,16$
QB3	$36,68 \pm 0,69$	$45,37 \pm 0,59$
QB4	$35,48 \pm 4,14$	$62,58 \pm 0,50$
QB5	$24,54 \pm 0,58$	$45,20 \pm 6,11$

Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.  
QB1 a QB5 – Queijo bubalino do animal 1 a Queijo bubalino do animal 5

Para as análises de retinol, segundo Teste T, não houve diferença estatística entre o período de 60 dias e 200 dias após a parição  $T_{\text{calc}}(0,00) < T_{\text{tab}}(2,17)$  a nível de  $\alpha=0,05$ . Na literatura não é possível encontrar trabalhos sobre a determinação de retinol em amostras de leite ou derivados lácteos bubalinos. Demonstrando a importância de estudos relacionados a esse tema, uma vez que o consumo desses produtos vem despertando o interesse dos consumidores.

A presença de maior conversão de carotenóides em retinol pelos bubalinos representa uma vantagem para saúde humana, uma vez que, o consumo de carotenóides com função pró-vitáminica apresenta uma baixa bioconversão, em muitos casos, devido as características estruturais dos carotenóides e a complexidade da matriz alimentícia. Para absorção desses compostos, a célula vegetal precisa ser rompida, por ação mecânica e enzimática dos dentes, estômago e duodeno, se o carotenóide estiver ligado a proteínas ou lipídeos deve ser liberado para posterior ação das enzimas intestinais convertendo-os em moléculas de retinol, o que não acontece na mesma proporção para todos os carotenóides gerando perdas na conversão. Outro fator que altera a absorção é a formação de micelas necessárias para absorção de materiais lipídicos, a estrutura do beta-caroteno afeta a quantidade de carotenóides incorporados às micelas lipídicas, restringindo a utilização de alguns carotenóides, em virtude de uma preferência na incorporação do beta-caroteno na forma *trans* (COSTA et al., 2001; YUYAMA et al., 2009). Segundo Yuyama et al., (2009), a absorção de carotenóides é de somente 20-50%, sendo a presença de isômeros ou a clivagem assimétrica um fator de diminuição da biodisponibilidade, em estudos de Olson, (1994) menos de 50% dos carotenóides ingeridos são absorvidos, salvo em casos de hipovitaminose. A presença do retinol, vitamina A pré-formada, facilita a absorção na mucosa intestinal, sendo absorvido por difusão simples, e cerca de 70 a 90% são absorvidos (YUYAMA et al., 2009), não havendo perdas de conversão, nem a presença de isômeros com função vitamínica menor.

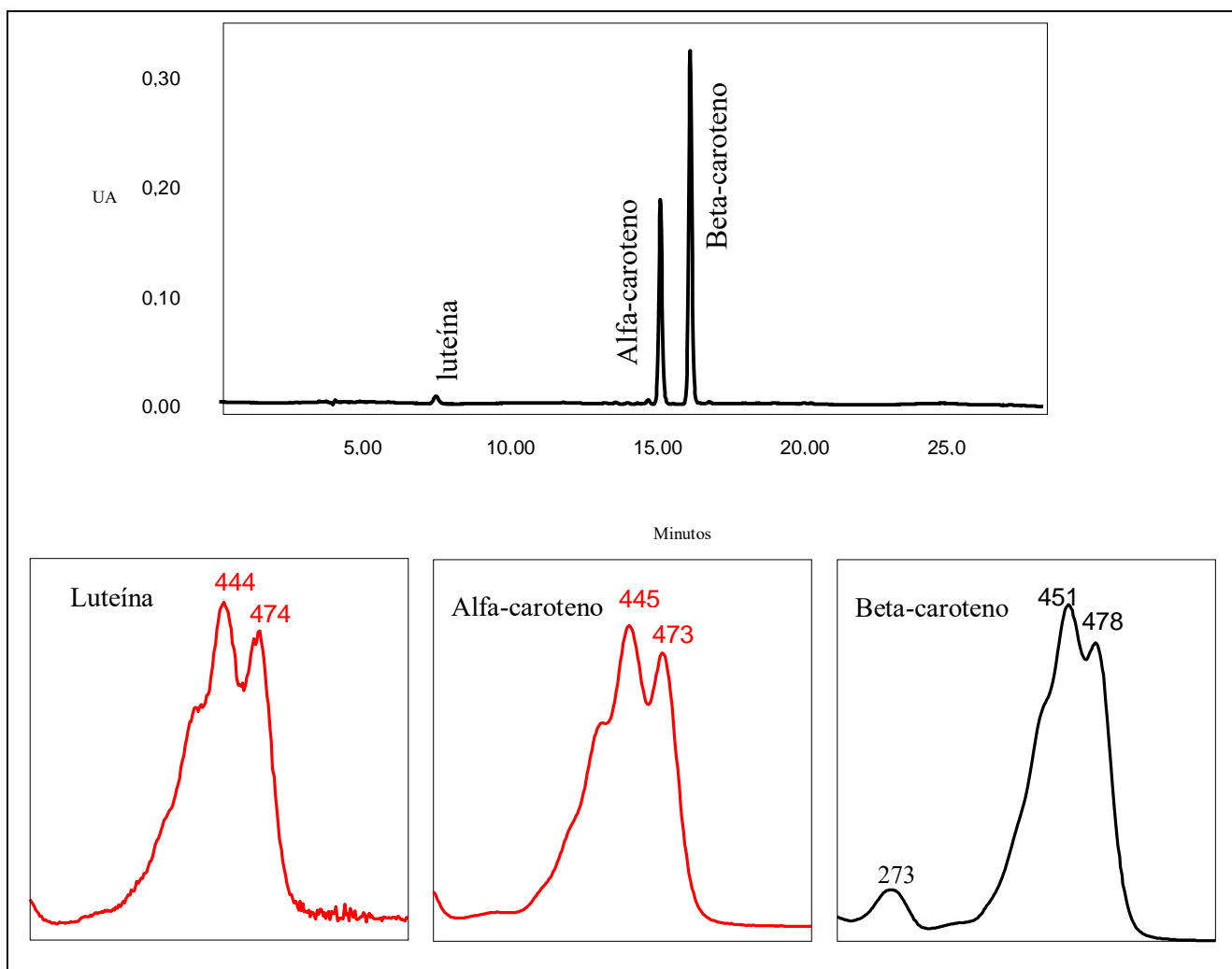


## 5.3 Determinação de Beta-caroteno

### 5.3.1 Extração de beta-caroteno de cenoura crua

O beta-caroteno isolado da cenoura crua apresentou o cromatograma indicado pela figura 21, os espectros de absorção na região do visível dos compostos estão também representados nesta figura, sendo confirmada a presença de luteína, alfa-caroteno e beta-caroteno.

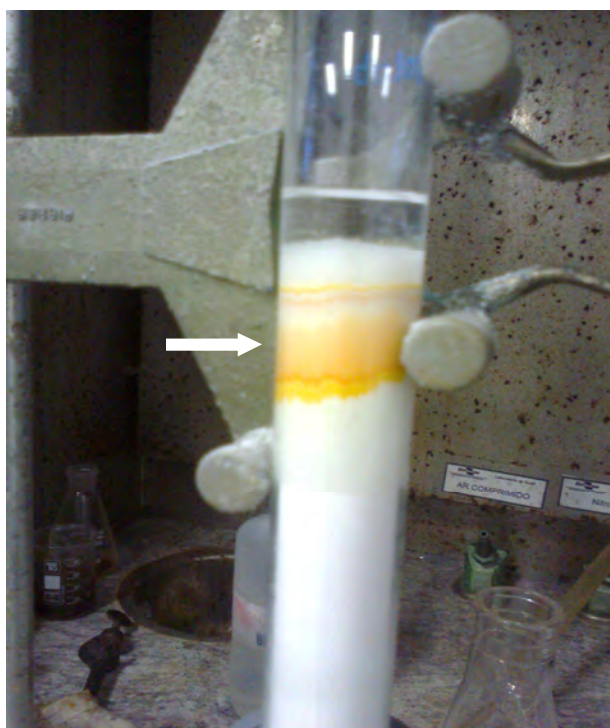
O material separado em coluna aberta pode ser visualizado na figura 25. O isolamento a partir de fonte natural teve o mesmo objetivo do isolamento de padrão de retinol de fígado bovino, garantia da qualidade das análises em relação ao padrão utilizado, redução dos riscos de comprometimento do material e a interferência de impurezas provenientes do processo de produção de padrão comercial.



**Figura 25:** Cromatograma do extrato de cenoura a 450nm, com espectros de absorção na região do visível de luteína, alfa-caroteno e beta-caroteno

### 5.3.2 Isolamento de beta-caroteno a partir de cenoura com coluna aberta

Após separação da banda de beta-caroteno da coluna aberta, o material extraído com acetona foi levado para injeção cromatográfica, apresentando cromatograma apresentado na figura 26. A partir desses dados foram analisadas a área do beta-caroteno em relação a área de todos os picos, indicando a pureza do padrão de 94,04%. O material foi adicionado a balão volumétrico de 100 mL, e de acordo com os cálculos de carotenóides totais, apresentava concentração de 2,22 $\mu$ g/mL, com massa total de 889,61  $\mu$ g de beta-caroteno, esse material foi adicionado a ampolas e seco, totalizando 12 ampolas, cinco ampolas com 11  $\mu$ g e sete ampolas com 22,2  $\mu$ g de beta-caroteno. Esse material foi armazenado sob congelamento (-18°C) até momento das análises de validação.



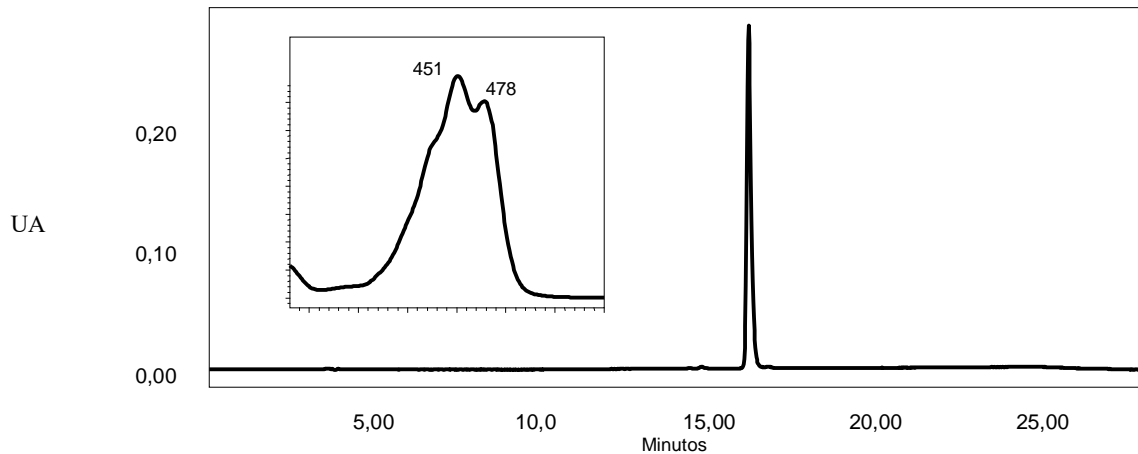
**Figura 26:** Separação do extrato de cenoura em coluna aberta

### 5.3.3 Validação do método de ensaio para beta-caroteno

A seletividade do método foi determinada através da análise cromatográfica do padrão de beta-caroteno isolado, comparando dados da literatura, em relação a tempo de retenção e espectro de absorção na região do visível. No material isolado de cenoura crua o tempo de retenção foi de 15,6 minutos e picos máximos do espectro de absorção 451 e 478 (figura 27), nos estudos de Pacheco (2009), utilizando mesma metodologia e equipamentos, o tempo de retenção do beta-caroteno foi de 15,7 minutos e picos máximos do espectro de absorção 451 e 478. Em trabalho de Rodriguez-Amaya (2001), demonstrando os comprimentos de onda máximos e mínimos do carotenóides em diferentes solventes, o pico máximo de absorção do beta-caroteno em acetona era de 452 e 478.

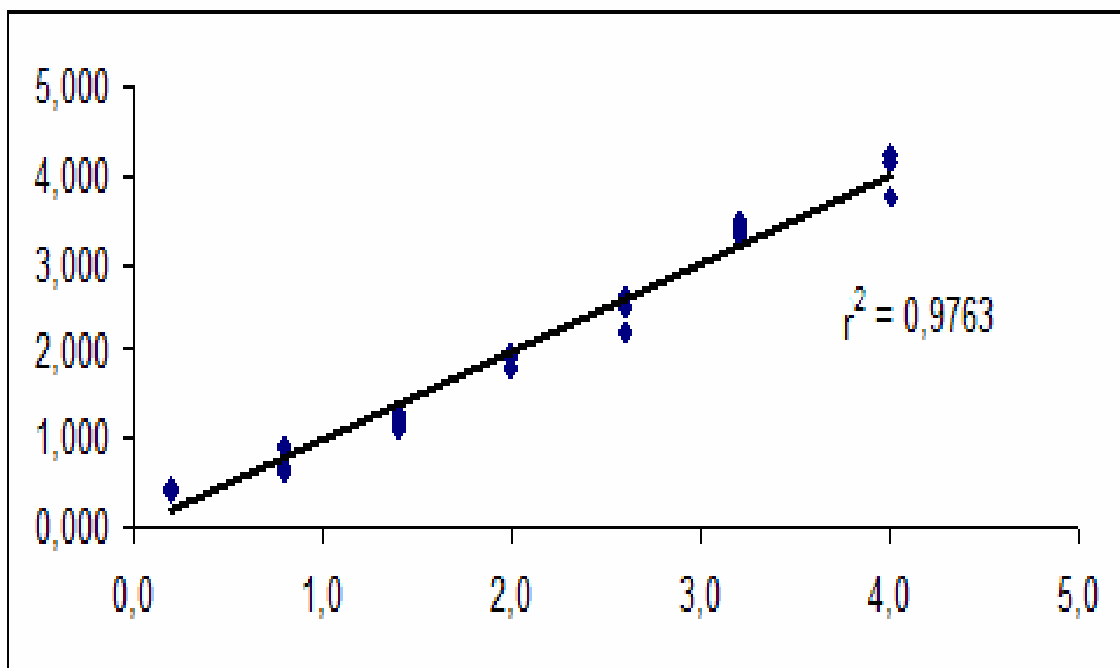
Os resultados da linearidade, faixa de trabalho e precisão são apresentados na tabela 10. Os resultados estatísticos de linearidade estavam de acordo com os critérios da ANVISA e

INMETRO. O teste estatístico de Grubs não identificou valores aberrantes, o teste de Cochran demonstra que as variâncias da curva são homogêneas,  $C_{calc} (0,482) < C_{tab} (0,561)$  e segundo análise de ANOVA fator único não houve diferença significativa entre os pontos,  $F_{calc}(0,369) < F_{tab}(2,091)$ , representando linearidade da regressão na faixa de trabalho estudada. Avaliando a precisão pelo coeficiente de variação (CV%) a cada nível de concentração, o resultado se mostrou satisfatório com valores abaixo de 8,8%, onde ANVISA recomenda valores abaixo de 15%. A exatidão pode ser observada através dos valores de concentração teórica e obtida, com critério de aceitação para o método de ensaio utilizado de  $DP \leq 0,2$ .



**Figura 27:** Cromatograma para determinação de pureza da solução de beta-caroteno isolado de cenoura crua

A curva analítica, representada pela figura 28, apresenta valor de  $r^2=0,9763$ , com expressão matemática  $Y=1,22e+006X-3,77e+005$ , resultado satisfatório segundo critérios do INMETRO e ANVISA, que recomendam que os valores de  $r^2$  estejam o mais próximo de 1,0, resultando em menor dispersão dos resíduos e menor incerteza dos coeficientes de regressão.



**Figura 28:** Curva de calibração elaborada com padrão de beta-caroteno

**Tabela 10.** Valores de concentração teórica e obtida ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), Coeficiente de variação (%) e resíduo dos valores utilizados para análise de linearidade, faixa de trabalho e precisão do método de ensaio para beta-caroteno

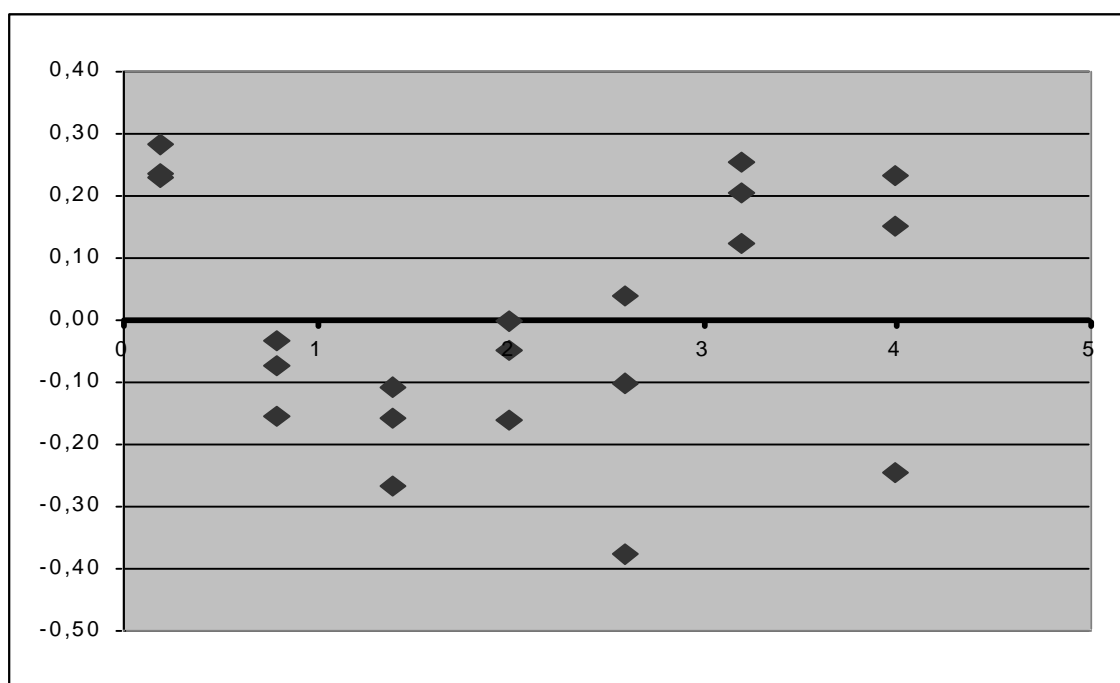
Conc. Teórica ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Conc. Lida ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	média±Desvio Padrão	CV%	resíduo
0,2	0,413	0,43±0,028	6,64	0,21
	0,458			0,26
	0,405			0,20
0,8	0,626	0,69±0,06	8,78	-0,17
	0,746			0,15
	0,705			-0,09
1,4	1,227	1,21±0,081	6,73	-0,17
	1,117			-0,28
	1,276			-0,12
2,0	1,828	1,92±0,082	4,27	-0,17
	1,941			-0,06
	1,988			-0,01
2,6	2,491	2,45±0,200	8,62	-0,11
	2,217			-0,38
	2,632			0,03
3,2	3,319	3,39±0,067	1,98	0,12
	3,402			0,20
	3,452			0,25
4,0	4,234	4,05±0,200	6,29	0,24
	3,758			-0,24
	4,152			0,15

O gráfico de resíduo das variâncias não apresentou tendência, sendo distribuídos de forma aleatória, conforme apresentado na figura 29.

Para o limite de detecção foram utilizados os dados apresentados por Pacheco (2009), através de análise por relação sinal:ruído 5:1, onde após injeção do padrão de beta-caroteno, o equipamento obteve picos com tamanho aproximado de cinco vezes o sinal do ruído da linha de base. Assim, o limite de detecção do equipamento foi de  $0,012\mu\text{g}/\text{mL}$  de beta-caroteno nestas análises.

Para determinação do limite de quantificação foram utilizados os valores obtidos para o menor ponto de concentração da curva,  $0,2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a média e o desvio padrão nessa concentração em análise foi de  $0,425\pm 0,028\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  indicando exatidão da análise,  $DP \leq 0,2$ , com precisão representada pelo  $CV\% \leq 6,64$ . Dessa forma, determinou-se como limite de quantificação o ponto de menor concentração de padrão de beta-caroteno, atendendo aos critérios de recomendação do INMETRO.

As análises de recuperação foram realizadas utilizando como branco amostra de queijo elaborado somente com leite bubalino, uma vez que as amostras apresentavam concentrações mínimas da substância. Segundo critério de aceitação da ANVISA, os níveis de recuperação estão de acordo com a norma, que aceita variação entre 80% a 120%. Os valores encontrados variaram entre 82 e 110% de recuperação do beta-caroteno, conforme apresentado na tabela 11, demonstrando a eficiência da extração do beta-caroteno no método de ensaio.



**Figura 29:** Gráfico de resíduos dos dados da curva de calibração

**Tabela 11:** Quantidade do beta-caroteno em relação ao teste de recuperação (%)

Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ )	Concentração obtida ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	CV%
0,2	0,17	85,0		
	0,16	80,0	82,5 $\pm$ 3,54	4,71
2,0	2,22	111,0		
	2,21	110,5	110,8 $\pm$ 0,35	0,35
4,0	3,98	99,5		
	3,80	95,0	97,3 $\pm$ 3,18	3,60

### 5.3.4 Quantidade de carotenóides nas amostras

Durante o processo de extração pode-se observar diferenças na coloração do extrato etéreo, conforme apresentado na figura 30.

Essa alteração na coloração do extrato etéreo é devido às características químicas da substância analisada, como mencionado anteriormente, o beta-caroteno apresenta coloração amarelada devido à presença de cromóforo na estrutura tetraterpenóide (RODRIGUES-AMAYA, 2008).

Nas análises, a concentração de beta-caroteno nas amostras variou de 1,00 $\pm$ 0,01 a 1,05 $\pm$ 0,00  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (tabela 12). Segundo Teste T, não houve diferença estatística entre o período de 60 dias e 200 dias após a parição ( $T_{\text{calc}}(2,02) < T_{\text{tab}}(2,10)$ ) a nível de  $\alpha=0,05$ , sendo assim, pode-se deduzir que o período de lactação não influenciaria nas concentrações de carotenóides nos queijos elaborados somente com leite bubalino.

**Tabela 12:** Concentração de beta-caroteno nas amostras de queijo bubalino

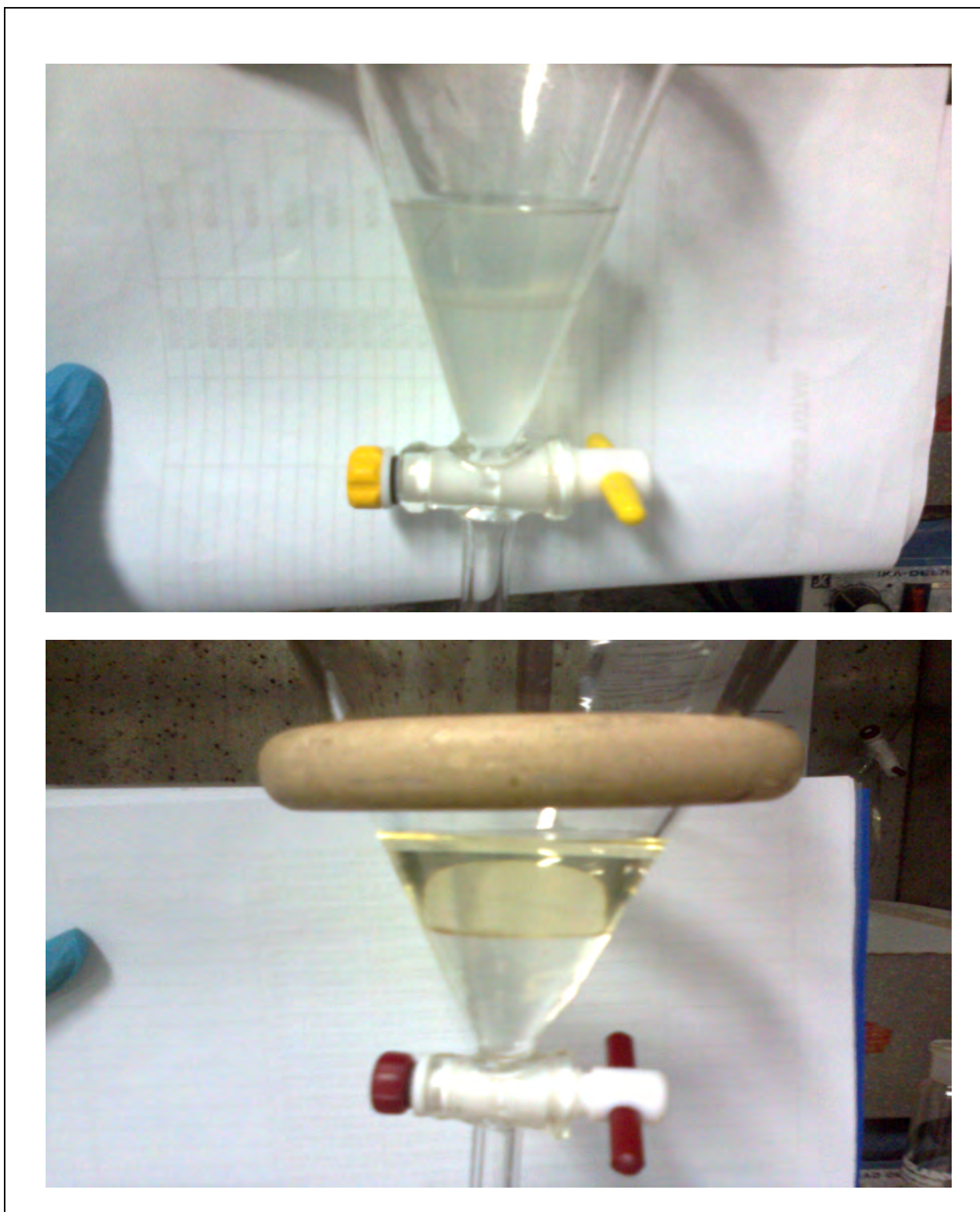
Amostra de Queijo	60 dias Beta-caroteno ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	200 dias Beta-caroteno ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
QB1	1,05 $\pm$ 0,00	1,03 $\pm$ 0,01
QB2	1,04 $\pm$ 0,00	1,05 $\pm$ 0,01
QB3	1,03 $\pm$ 0,04	1,05 $\pm$ 0,00
QB4	1,05 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,01
QB5	1,00 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,02

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

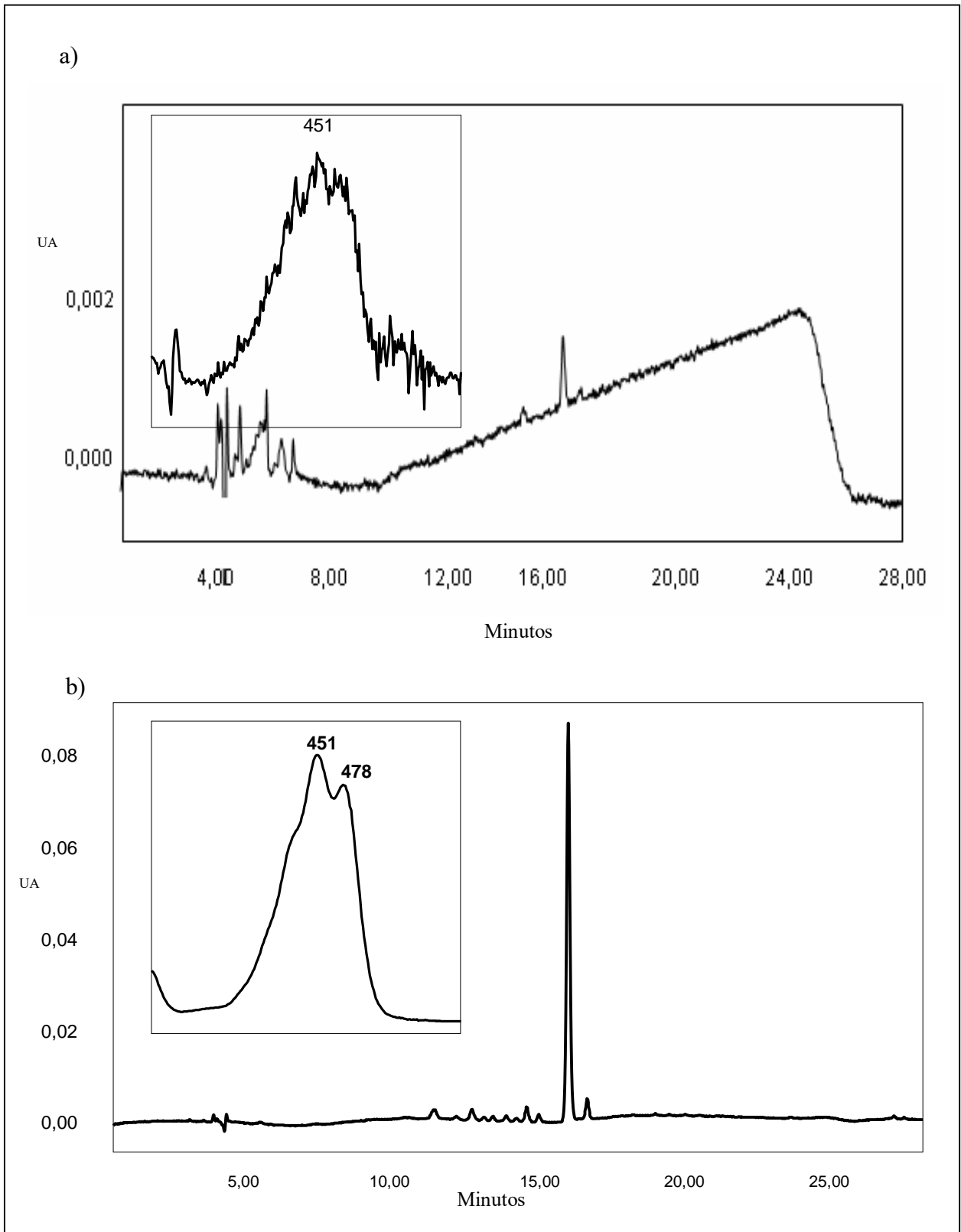
QB1 a QB5 – Queijo bubalino do animal 1 a Queijo bubalino do animal 5

A presença de carotenóides em mínimas concentrações no queijo bubalino corrobora o que vem sendo indicado pela literatura, que os bubalinos conseguem converter, quase em sua totalidade, os carotenóides provenientes de sua alimentação em retinol, possivelmente devido a sua diferenciação fisiológica e sua flora intestinal diferenciada, com número maior de bactérias e fungos que apresentam uma degradação mais eficiente da parede celular das forrageiras, dessa forma tendo mais acesso a esses pigmentos, além de que, segundo Andriguetto et al. (2002), a conversão máxima de carotenóides em bovinos encontra-se em torno de 50%, e o mecanismo que parece ocorrer é a oxidação terminal, passando pelo beta apo-8-carotenal e seus ácidos como etapa intermediária. A maior conversão dos carotenóides com atividade de pró-vitamina A em retinol, em caprinos, ovinos e possivelmente em bubalinos, explicaria a diferenciação da coloração do leite entre essas espécies, sendo os níveis séricos, no fígado e nos tecidos subcutâneos de carotenóides muito menores do que em bovinos.

Dessa forma, a utilização da determinação de carotenóides, principalmente de beta-caroteno, poderia ser empregada na determinação de adulteração de queijo *mozzarella* de leite de búfala com leite bovino, uma vez que, a presença de carotenóides em concentrações elevadas poderia indicar a adição de leite bovino na preparação dos queijos bubalinos. Os perfis cromatográficos das amostras bubalinas e bovinas comprovam a distinção entre as espécies, conforme apresentado na figura 31.



**Figura 30:** a) Extração de beta-caroteno do queijo bubalino, b) Extração de beta-caroteno do queijo bovino

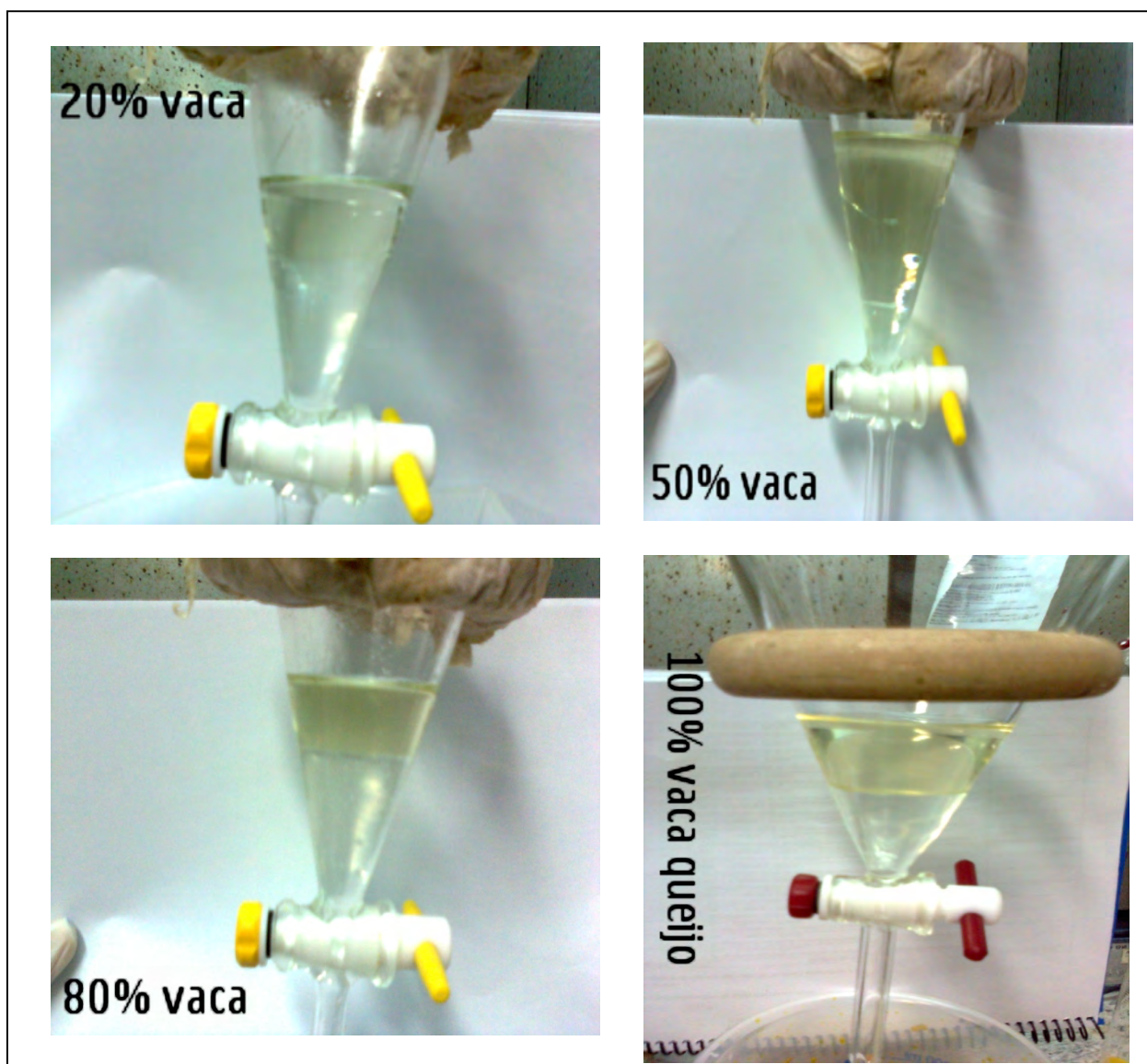


**Figura 31:** Perfil cromatográfico e espectro de absorção na região do visível dos: queijo elaborado somente com leite bubalino (a) e do queijo elaborado somente com leite bovino (b)



## 5.4 Percentual de Adulteração

Com objetivo de determinar o perfil cromatográfico dos queijos *mozzarella* adulterados com diferentes concentrações de beta-caroteno foram preparados cinco tratamentos com 0%, 20%, 50%, 80% e 100% de leite bovino adicionado ao leite bubalino. No processo de extração a diferença de coloração entre as amostras pode ser observada na figura 32.



**Figura 32:** Extração de beta-caroteno dos queijos elaborados com leite bubalino misturado ao leite bovino, nos tratamentos II (20%), III (50%), IV (80%), V (100%)

A quantificação da concentração de carotenóides nos queijos adulterados (tratamento II, III e IV), somente com leite bubalino (tratamento I) e somente com leite bovino (tratamento IV) pode ser observada na tabela 13. Através de análise estatística por teste de Grubbs, não há valores aberrantes entre os grupos ( $G_{calc}(1,11) < G_{tab}(1,72)$ ), no teste de Cochran ( $C_{cal}(0,94) > C_{tab}(0,68)$ ) indicando não haver homogeneidade entre as variâncias do

grupo. O teste de ANOVA fator único entre os grupos ratificou a diferença entre eles,  $F_{cal}(20,29) > F_{tab}(4,19)$ , indicando diferença estatística em relação a área de beta-caroteno.

**Tabela 13:** Área do pico de beta-caroteno nos tratamentos de I a V.

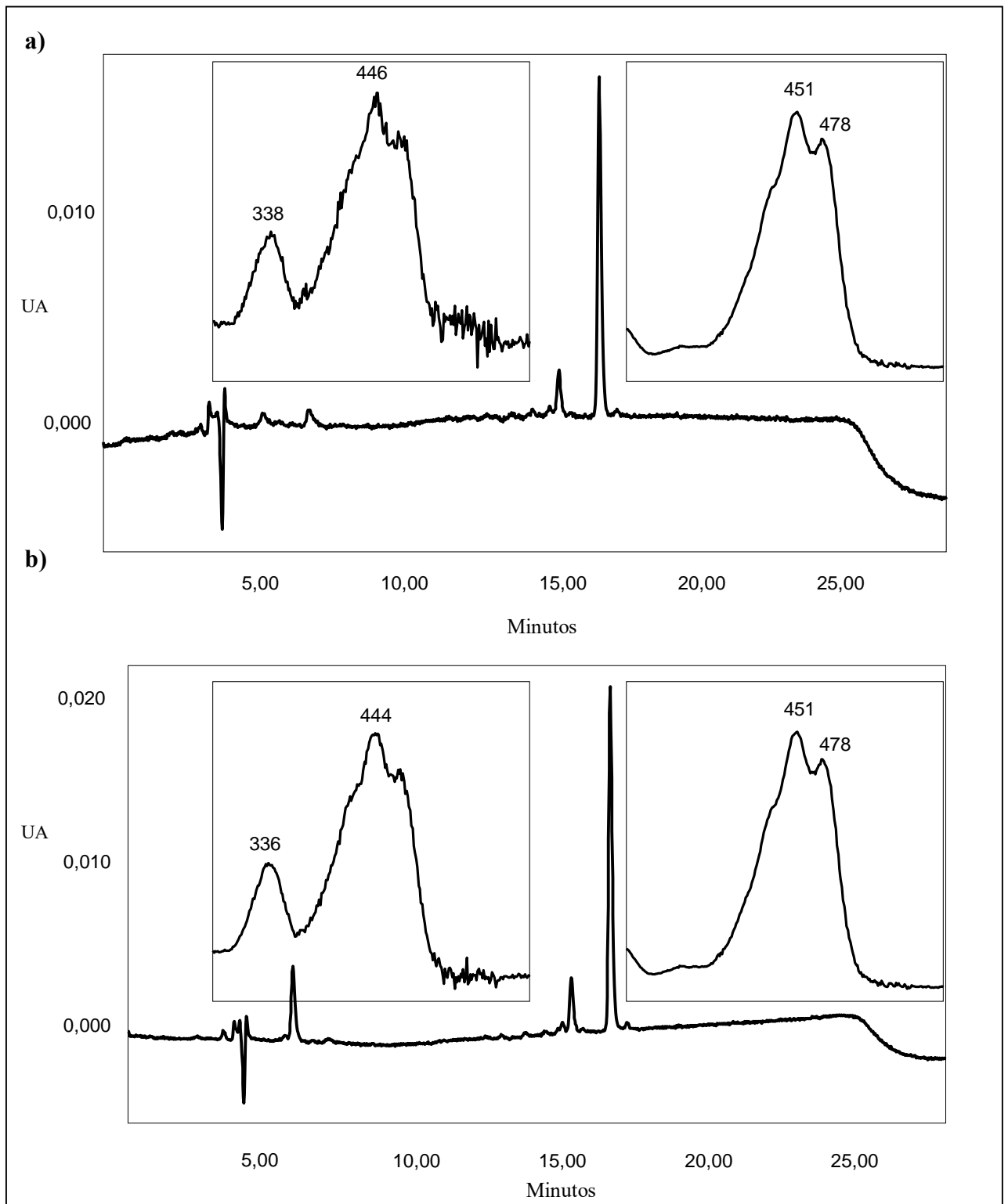
Adição de leite bovino (%)	Tratamento	Área corrigida pela massa (UA)	Média±DP (UA)
0% leite bovino	Tratamento I	365,95	367,24 <sup>a</sup> ±26,54
	Tratamento I	341,36	
	Tratamento I	394,40	
20% leite bovino	Tratamento II	6684,90	6949,42 <sup>a</sup> ±491,01
	Tratamento II	7515,98	
	Tratamento II	6647,39	
50% leite bovino	Tratamento III	12268,89	12586,89 <sup>a</sup> ±740,20
	Tratamento III	12058,83	
	Tratamento III	13432,96	
80% leite bovino	Tratamento IV	22564,55	22735,75 <sup>b</sup> ±148,40
	Tratamento IV	22827,76	
	Tratamento IV	22814,94	
100% leite bovino	Tratamento V	37700,68	38701,69 <sup>b</sup> ±3554,13
	Tratamento V	35755,38	
	Tratamento V	42648,96	

As médias seguidas por letras diferentes na vertical, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

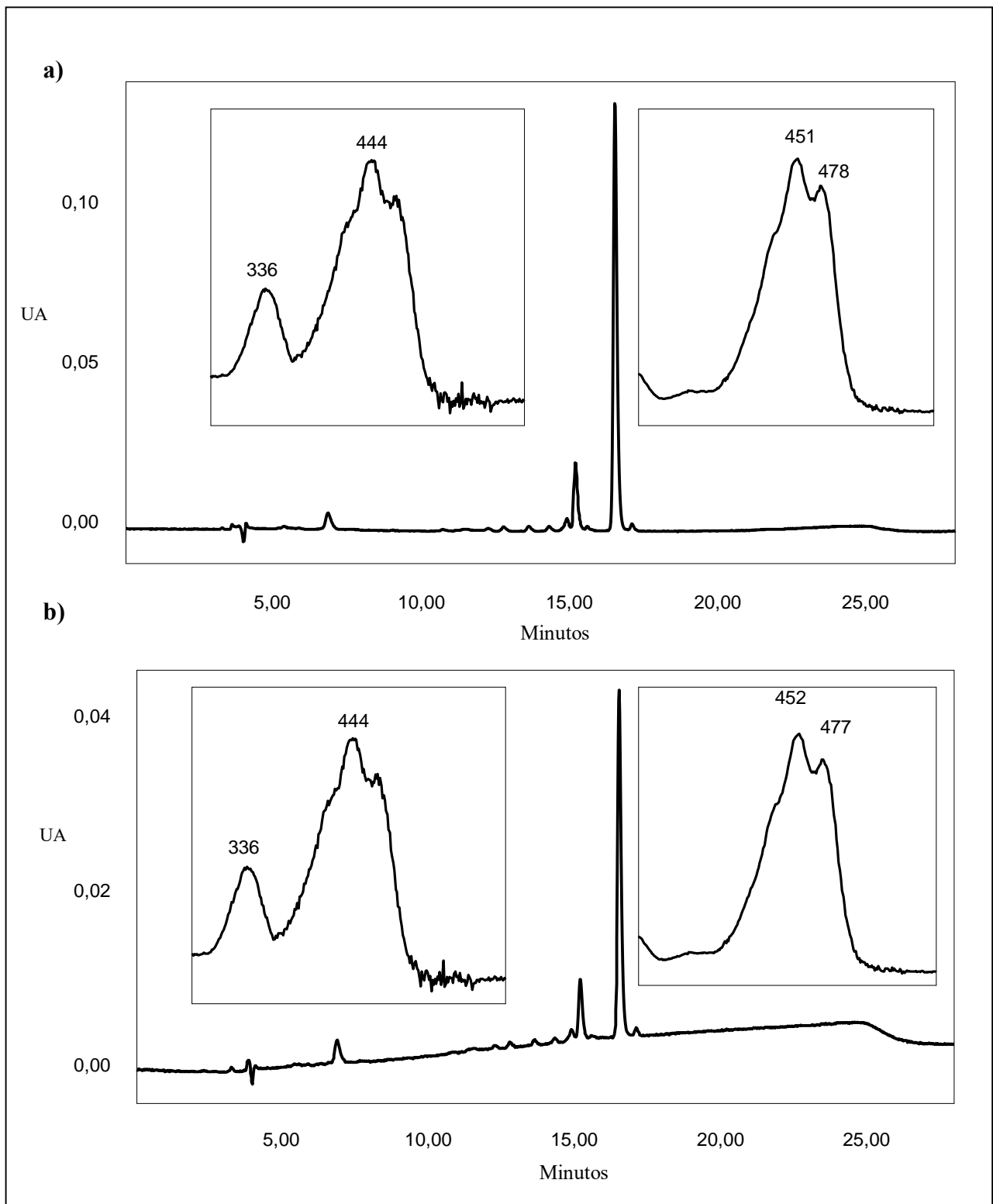
A adição de 20% de leite bovino na preparação dos queijos aumentou a área do pico de beta-caroteno, após a correção pela massa, de 367,24AU para 6949,42AU, correspondendo a um aumento de dezenove vezes na área do beta-caroteno e com o aparecimento do pico de 13-*cis*-beta-caroteno, conforme apresentado nas figuras 33 e 34. Dessa forma, um aumento de 1% no teor de beta-caroteno e o surgimento do pico de 13-*cis*-beta-caroteno no perfil cromatográfico poderia sugerir a suspeita de adição de leite bovino na elaboração do queijo *mozzarella*, uma vez que as áreas dos queijos elaborados somente com leite bubalino com 60 dias e com 200 dias de lactação variaram de 239,67AU a 570,16AU, dados que não apresentaram diferença significativa, segundo teste T, conforme mencionado anteriormente.

Assim, com os dados obtidos pelos queijos dos tratamentos I, II, III, IV, V, foi possível preparar uma curva-padrão construída com leite bovino adicionado aos queijos bubalinos. A figura 35 mostra a equação da reta ( $Y = 351,52X - 1307,6$ ) e o  $r^2 = 0,9261$ , a partir desta equação poderiam ser calculados os valores de percentuais de adição de leite bovino nos queijos adulterados.

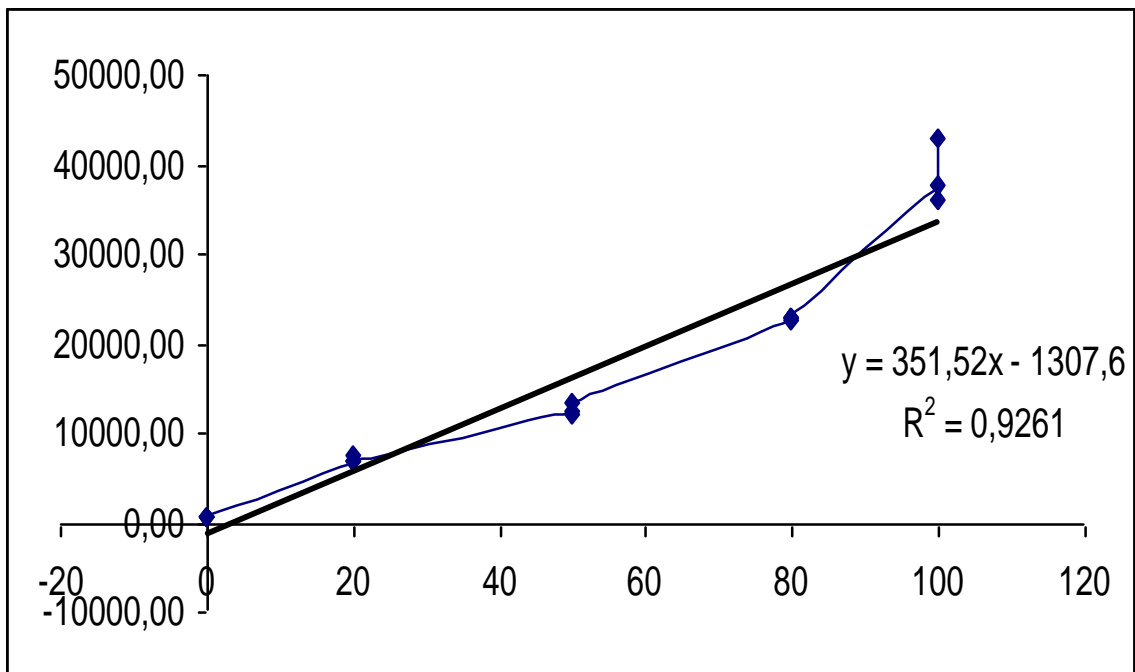
O teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) avaliando as diferenças mínimas entre as médias (DMS) das áreas corrigidas pela massa, representando o valor mínimo para existir diferença estatística entre uma média e outra, (DMS=25377,07) confirmou diferença estatística entre os queijos do tratamento I e V, assim houve diferença estatística entre os queijos elaborados somente com leite bubalino (0%) e somente com leite bovino (100%). Houve diferença estatística entre o tratamento II e V, e os tratamentos III e V. A partir desses valores de área pode-se observar que a adição de leite bovino na preparação de queijo *Mozzarella* de leite de búfala altera significativamente a concentração de beta-caroteno no queijo.



**Figura 33:** Cromatograma e espectro de absorção na região do visível do beta-caroteno e 13-*cis*-beta-caroteno nos queijos adulterados tratamento II (a) e III (b)

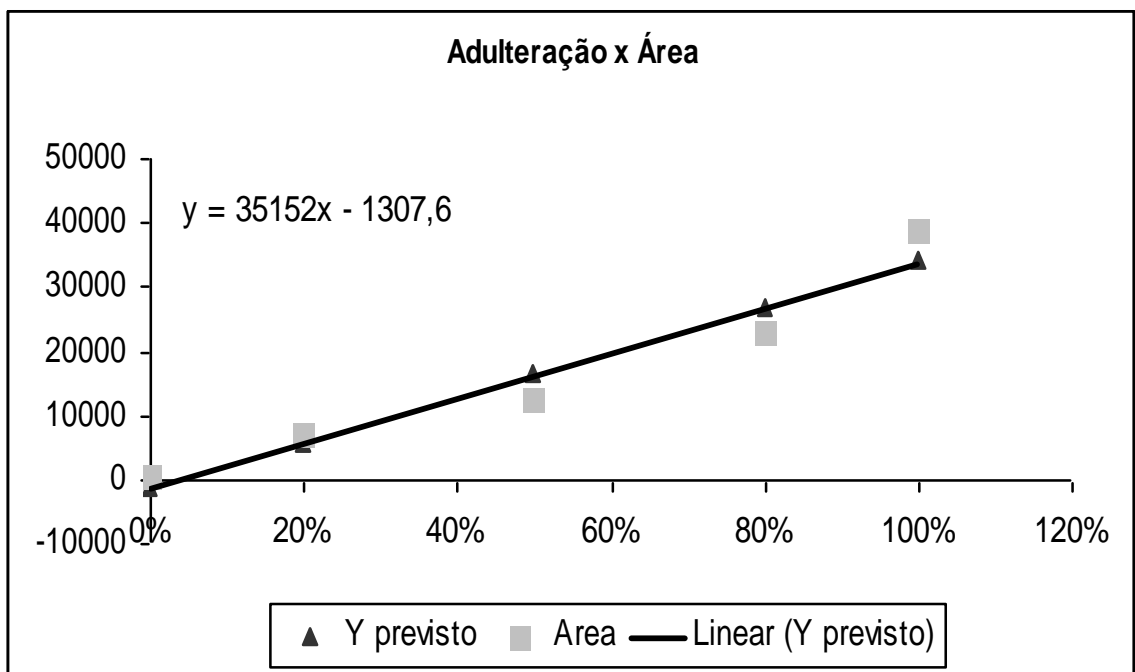


**Figura 34:** Cromatograma e espectro de absorção na região do visível do beta-caroteno e 13-*cis*-beta-caroteno nos queijos adulterados tratamento IV (a) e V (b)



**Figura 35:** Curva-padrão elaborada com leite bovino adicionada aos queijos bubalinos

Correlacionando a área de beta-caroteno com o aumento do percentual de adulteração de leite bovino em leite bubalino na elaboração dos queijos através da correlação de Pearson, foi observada uma correlação positiva (correlação=0,96), indicando que o aumento do percentual de mistura aumentaria a área de beta-caroteno nos queijos, conforme apresentado na figura 36, onde os triângulos pretos representam a probabilidade de variação na área respeitando a equação da reta e os quadrados cinzas os valores obtidos na área de beta-caroteno das amostras, indicando que as duas variáveis crescem conjuntamente em uma relação linear positiva ( $r^2=0,92$ ).



**Figura 36:** Correlação positiva entre % de adulteração x área de beta-caroteno

## 5.5 Verificação de Eficiência do Método de Ensaio

Foram avaliadas quinze amostras de queijos, sendo seis preparados com adição de leite bovino em diferentes percentuais e nove queijos comerciais adquiridos conforme descrito na material e métodos. Os dados obtidos foram colocados em cartas controle para verificação de tendências no desempenho do método, assegurando assim o controle estatístico do processo.

Em relação aos valores obtidos (tabela 14), a precisão, exatidão e incerteza ( $u$ ) do método de ensaio foram mantidas, com  $CV\% < 8,57$  e  $DP \leq 0,2$ .

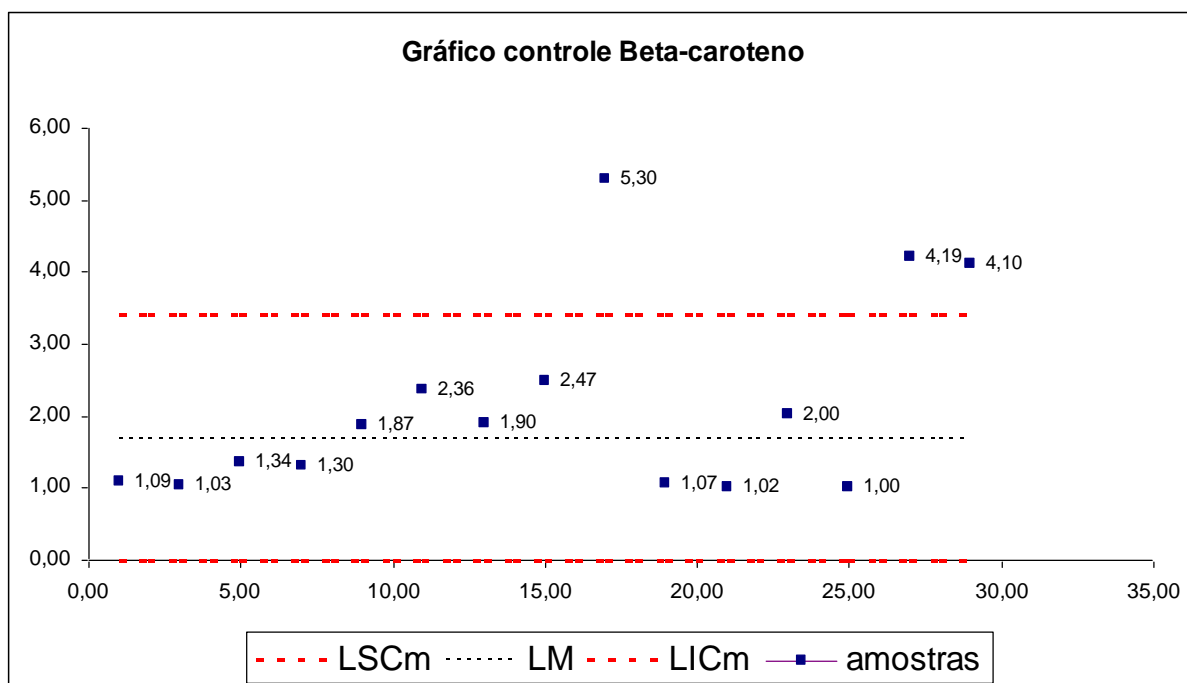
**Tabela 14:** Concentração de beta-caroteno nas amostras comerciais e elaboradas com mistura de leite bovino e bubalino

Amostra	Beta-caroteno ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	Media	$u$	CV%
BM1	1,10			
BM2	1,08	1,09 $\pm$ 0,02	0,01	1,69
BF1	1,05			
BF2	1,01	1,03 $\pm$ 0,03	0,02	2,45
QM101	1,31			
QM102	1,30	1,30 $\pm$ 0,01	0,07	0,43
QM301	1,41			
QM302	1,27	1,34 $\pm$ 0,10	0,00	7,69
QM401	1,91			
QM402	1,83	1,87 $\pm$ 0,06	0,04	3,20
QM601	2,01			
QM602	1,78	1,90 $\pm$ 0,16	0,09	8,57
QM701	2,27			
QM702	2,45	2,36 $\pm$ 0,12	0,11	5,17
QM901	2,50			
QM902	2,45	2,47 $\pm$ 0,04	0,03	1,63
GM1	5,56			
GM 2	5,04	5,49 $\pm$ 0,10	0,07	1,75
BD M1	1,07			
BDM2	1,06	1,07 $\pm$ 0,00	0,00	0,27
BDR1	1,00			
BDR2	1,03	1,02 $\pm$ 0,02	0,02	2,08
BNR1	1,99			
BNR2	2,02	2,00 $\pm$ 0,02	0,02	1,09
BDQM1	1,02			
BDQM2	0,99	1,00 $\pm$ 0,02	0,02	2,19
VMB1	4,03			
VMB2	4,36	4,19 $\pm$ 0,24	0,17	5,65
BNM1	4,11			
BNM2	4,10	4,10 $\pm$ 0,01	0,00	0,17

Amostras entre QM101 a QM902 – queijos preparados com mistura de leite bovino em leite bubalino em diferentes proporções; Amostras BM, BF, GM, BDM, BDR, BNR, BDQM, VMB, BNM correspondem as amostras comerciais em duplicata.

A carta controle elaborada com as concentrações de beta-caroteno nos queijos 0%, 20%, 50%, 80% e 100% apresentou como limite médio (LM) 1,68 $\mu\text{g}/100\text{g}$  e desvio padrão

0,570 e a partir desses dados foram calculados os limite superior de controle (LSC= 3,390) e limite inferior de controle (LIC= -0,030) variando seis desvios padrões da média. Os valores de concentração de beta-caroteno nas amostras comerciais e preparadas com diferentes percentuais de mistura foram plotados no gráfico controle, conforme apresentando na figura 37, demonstrando que não há tendência do método, com valores distribuídos aleatoriamente no gráfico.

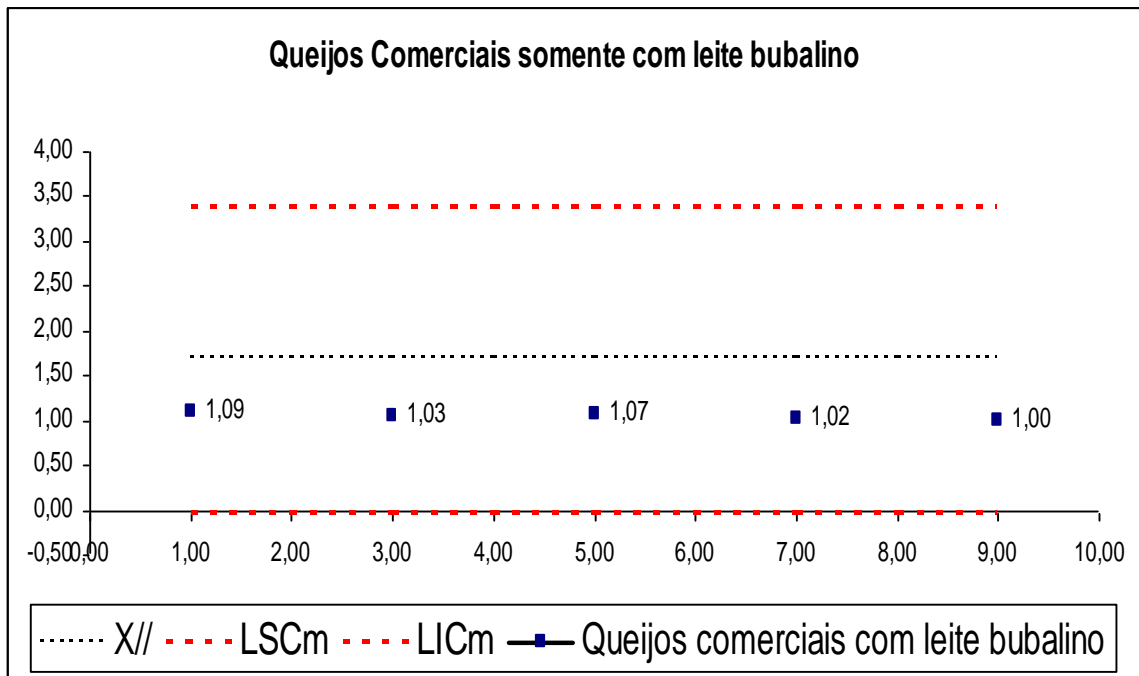


**Figura 37:** Carta controle da concentração de beta-caroteno nas amostras comerciais e preparadas com mistura de leite bovino e bubalino

A utilização do gráfico controle, pressupondo que o método de ensaio é estatisticamente estável frente a variações de amostragem, permite detectar desvios nos parâmetros do processo, fornecendo informações sobre variações (variações conhecidas, controláveis ou reduzidas) identificando e priorizando as causas das variações da qualidade (LIMA et al., 2006).

As amostras comerciais que indicavam ser somente com leite bubalino obtiveram valores de concentração de beta-caroteno semelhantes aos encontrados nos queijos bubalinos preparados, variando de  $1,00 \pm 0,02$  a  $1,09 \pm 0,02$ . Segundo ANOVA fator único não houve diferença estatística entre as amostras comerciais somente com leite bubalino e as amostras de 60 dias e 200 dias ( $F_{cal}(0,34) < F_{tab}(3,35)$ ). Na figura 38 os valores de concentração de beta-caroteno nas amostras comerciais elaboradas somente com leite bubalino foram representadas na carta utilizando os mesmos valores de LM, LSC e LIC, indicando que os valores não apresentavam tendência e a disposição dos pontos era aleatória, confirmando não haver variações durante o desenvolvimento do método de ensaio.

Para o cálculo de incerteza combinada em relação às variáveis das equações de quantificação de carotenóides totais e concentração de carotenóides na amostra, os valores de  $u_c$  carotenóides totais foi de  $0,001 \mu\text{g}/100\text{g}$  e incerteza expandida de  $0,002 \mu\text{g}/100\text{g}$  e  $u_c$  concentração de beta-caroteno de  $8,79 \mu\text{g}/100\text{g}$  e incerteza expandida de  $17,58 \mu\text{g}/100\text{g}$ .



**Figura 38:** Carta controle da concentração de beta-caroteno dos queijos comerciais elaborados somente com leite bubalino

Os cálculos foram realizados através dos valores descritos abaixo:

$c_i(A) = (10 \times 10^4 \times 0,0680)/(2592 \times 15,5034)$ , para cada medida de verificação da eficiência, no final foi calculada a média desses valores sendo adicionado a cálculo de  $u_c$  (Carotenóides Totais).

$c_i(V) = (0,0680 \times 10^4 \times 0,0680)/(2592 \times 15,5034)$ , para cada medida de verificação da eficiência, no final foi calculada a média desses valores sendo adicionado a cálculo de  $u_c$  (Carotenóides Totais).

$c_i(m) = - (0,0680 \times 10 \times 10^4 \times 0,0680)/(2592 \times 240,355)$ , para cada medida de verificação da eficiência, no final foi calculada a média desses valores sendo adicionado a cálculo de  $u_c$  (Carotenóides Totais).

$$c_i(\text{Repe}) = (0,0680 \times 10 \times 10^4)/(2592 \times 15,5034)$$

$$\mu(A) = (0,006/1,73)^2$$

$$\mu(V) = \sqrt{(0,0054/1,73)^2}$$

$$\mu(m) = (((0,0002/2)^2) + ((0,0002/2)^2))^2$$

$\mu(\text{Repe}) = \text{Desvio padrão (Repe total)} (0,00006) / \text{média de absorvância da amostra escolhida} (0,0680)$

$$u_c (\text{Carotenóides Totais } (\mu\text{g/g})) = \sqrt{u^2(A) + u^2(V) + u^2(m) + u^2(\text{Repe})}$$

$$u_c (\text{Carotenóides Totais}) = \sqrt{(0,1693 \times 0,003468)^2 + (0,0012 \times 0,003468)^2 + (0,0007 \times 0,00000020)^2 + (0,1692 \times 0,001)^2}$$



$$u_c (\text{Carotenóides Totais}) = 0,00123103 \mu\text{g/g}$$

$$U(\text{ carotenóides Totais } (\mu\text{g/g})) = u_c \times k$$

$$U(\text{ carotenóides Totais } (\mu\text{g/g})) = 0,00123103 \times 2$$

$$U(\text{ carotenóides Totais } (\mu\text{g/g})) = 0,00246206 \mu\text{g/g}$$

$$c_i(\text{Cs}) = (10 \times 20 \times 1) / 15,5034$$

$$f = 2000 \mu\text{L}(\text{pipeta 1}) / 100 \mu\text{L}(\text{pipeta 2}) = 20$$

$$c_i(\text{V}) = (0,385 \times 20 \times 1) / 15,5034$$

$$c_i(\text{m}) = -(0,385 \times 10 \times 20 \times 1) / 240,355$$

$$c_i(\text{repe}) = (0,385 \times 10 \times 20) / 15,5034$$

$$c_i(\text{f}) = (0,385 \times 10 \times 1) / 15,5034$$

$$\mu(\text{Cs}) = (S/B_1) \times \sqrt{(1/p) + (1/n) + ((C_1 - C)/S_{xx})^2}$$

$$S^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n-21} [A_j - (B_0 + B_1 \times C_j)]^2}{n - 2}$$

$$S = \sqrt{([\text{Área 1} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 0,2)] + [\text{Área 2} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 0,2)] + [\text{Área 3} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 0,2)] + [\text{Área 4} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 0,8)] + [\text{Área 5} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 0,8)] + [\text{Área 6} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 0,8)] + [\text{Área 7} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 1,4)] + [\text{Área 8} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 1,4)] + [\text{Área 9} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 1,4)] + [\text{Área 10} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 2,0)] + [\text{Área 11} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 2,0)] + [\text{Área 12} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 2,0)] + [\text{Área 13} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 2,6)] + [\text{Área 14} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 2,6)] + [\text{Área 15} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 2,6)] + [\text{Área 16} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 3,2)] + [\text{Área 17} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 3,2)] + [\text{Área 18} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 3,2)] + [\text{Área 19} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 4,0)] + [\text{Área 20} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 4,0)] + [\text{Área 21} - ((-3,77 \times 10^5 + 1,22 \times 10^6) \times 4,0)]) / 19}$$

$$S = 270582,9319$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^{n-21} (C_j - C)^2$$

$$S_{xx} = [3 \times (0,2 - 1,10)^2 + 3 \times (0,8 - 1,10)^2 + 3 \times (1,4 - 1,10)^2 + 3 \times (2,0 - 1,10)^2 + 3 \times (2,6 - 1,10)^2 + 3 \times (3,2 - 1,10)^2 + 3 \times (4,0 - 1,10)^2]$$

$$S_{xx} = 50,61$$

$$\mu(\text{V}) = \sqrt{(0,0054/1,73)^2}$$

$$\mu(\text{m}) = (((0,0002/2)^2) + ((0,0002/2)^2))^2$$

$$\mu(\text{Repe}) = \text{Desvio padrão do 3º ponto da curva (0,0819) / media concentração de beta-caroteno obtida (1,2)}$$

$$\mu(f) = (1,00/2)^2 \times (0,083/2)^2$$

$$u_c (\text{beta-caroteno } (\mu\text{g}/100\text{g})) = \sqrt{(u^2(Cs) + u^2(V) + u^2(m) + u^2(f) + u^2(\text{Repe}))}$$

$$u_c (\text{beta-caroteno } (\mu\text{g}/100\text{g})) = \sqrt{(12,90039604 \times 0,228326355)^2 + (0,496665248 \times 0,003468)^2 + (-0,32035892 \times 0,000000020)^2 + (4,966652476 \times 0,068)^2 + (0,248332624 \times 0,00043)^2}$$

$$u_c (\text{beta-caroteno } (\mu\text{g}/100\text{g})) = 8,79074807 \mu\text{g}/100\text{g}$$

$$U(\text{beta-caroteno } (\mu\text{g}/100\text{g})) = u_c \times k$$

$$U(\text{beta-caroteno } (\mu\text{g}/100\text{g})) = 8,79074807 \times 2$$

$$U(\text{beta-caroteno } (\mu\text{g}/100\text{g})) = 17,58149614 \mu\text{g}/100\text{g}$$

Segundo VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia), a incerteza é um parâmetro que mensura a dispersão dos valores de uma medição, definindo o intervalo em que se encontra o “valor verdadeiro” (GONÇALVES, ANTONIASSI, 2010), dessa forma, os valores reduzidos de incerteza das medições de beta-caroteno em nos queijos de origem bubalina, aumentam a confiabilidade do método proposto.

Esses resultados comprovam que o método de ensaio proposto pode ser utilizado como forma de determinação de adulteração em produtos elaborados com leite de búfala, uma vez que, não há variações significativas de beta-caroteno nos produtos bubalinos e a adição de pequenas quantidades de leite bovino nos diferentes tipos de queijos altera significativamente as áreas e concentrações de beta-caroteno.

De acordo com o documento da União Européia EC 213/2001, uma metodologia adequada para determinação de adulteração deve ser sensível e específica para o analito em questão, podendo detectá-lo mesmo em pequenas concentrações no produto, assim, o limite de detecção de 1% foi determinado como valor de mistura que o método proposto deve conseguir determinar. Conforme mencionado anteriormente, o limite de detecção do aparelho para determinação de beta-caroteno foi de 0,012 $\mu\text{g}/100\text{g}$ , a presença do pico de 13-*cis*-beta-caroteno e a diferença da área que poderia ser utilizada para suspeita de adulteração na margem de 1%, satisfaz as recomendações da Comissão européia, porém, estudos realizados por Feligini et al., (2005), Bottero et al., (2003) e Brescia et al., (2004) rebatem a recomendação de limite de detecção de 1%, pois, segundo esses autores, a adição de leite bovino em derivados lácteos de outras espécies não teria valor prático, sendo improvável economicamente que o produtor adicione quantidades tão mínimas, a detecção dessas quantidades de misturas poderiam ser uma contaminação cruzada involuntária, e não uma adulteração premeditada. Ainda segundo Brescia et al., (2004), um método para determinação de adulteração não precisaria ter limites de detecção tão baixos, contanto que fosse um método rápido, simples e que permita análises de um número elevado de amostras ao mesmo tempo, requisito que o método proposto conseguiria atender.

As técnicas de determinação de marcadores de autenticidade em derivados lácteos utilizando diversas metodologias estão bem estabelecidas e validadas na literatura científica. Essas metodologias podem ser divididas em dois grandes grupos: determinação da composição de gordura: através de análises de cromatografia gasosa para determinação do perfil de ácidos graxos; e determinação da composição de proteínas, baseada nas diferentes proteínas do leite (proteínas do soro, beta-lactoglobulina e alfa-lactoalbumina, e as porções da caseína  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\kappa$  – caseína). A grande diversidade de queijos com diferentes características

microbiológicas e bioquímicas pode afetar a repetibilidade das análises, podendo ser aplicada a uma variedade de queijo e não para outra (VELOSO et al., 2002).

As técnicas para determinação das proteínas são mais utilizadas, como por exemplo, determinação da  $\alpha_{s1}$ -caseína, para- $\kappa$ -caseína, beta-lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina por cromatografia líquida (Mayer et al., 2005; Borková, Snaselová, 2005; Enne et al., 2005) apresentam fatores relacionados à genética e a tecnologia de obtenção dos leites que podem influenciar na determinação de adulteração.

As caseínas dos leites bovino e caprino, por exemplo, foram analisadas por Botaro et al., (2007) e Bonvillani, Renzo, Tiranti (2000) indicando haver polimorfismo genético nessas proteínas que levariam a alterações na estrutura primária das proteínas, resultando em alterações nas propriedades físico-químicas do leite. Essa expressão de genes de polimorfismo está relacionada a alterações da micela de caseína, e conseqüentemente, às propriedades tecnológicas do leite, como a estabilidade das micelas, sendo possível determinar essas alterações genéticas em todas as porções de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\kappa$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e nas proteínas do soro (beta-lactoglobulina e alfa-lactoalbumina).

Segundo estudos de Sgarbieri (2005) dentro das porções de caseína existem diversas variantes genéticas:  $\alpha_{s1}$  ( $\alpha_{s0}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s3}$ ,  $\alpha_{s4}$ ,  $\alpha_{s5}$ ) variantes A, B, C, D; caseína  $\beta$  variantes A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B, C, D; caseína  $\kappa$  variantes A, B; caseína  $\gamma$  ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ) variantes A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B, A<sub>1</sub> ou A<sub>2</sub> ou A<sub>3</sub>, B, e A<sub>1</sub> ou A<sub>2</sub> ou A<sub>3</sub>, B, respectivamente para a caseína  $\gamma$ . Essas variantes genéticas são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na sequência da cadeia polipeptídica. Moraes et al., (2009) e Silva et al., (2007) encontraram, também, polimorfismo em caprinos, nas porções  $\alpha_{s1}$  e  $\kappa$  de caseína. Dessa forma, essas variações poderiam influenciar métodos de determinação de adulteração como testes imunológicos, eletroforéticos, cromatográficos baseados na determinação de proteínas, PCR, pois, são associados com diferenciação de proteínas por eletroforese em gel, podendo gerar falsos-positivos.

Outro fator observado por Calvo et al. (1989) que poderia causar alteração nos dados com apresentação de falso-positivo nos ensaios imunológicos, eletroforéticos e cromatográficos para identificação de proteínas do soro, seria o tratamento térmico utilizado na preparação dos derivados de leite. Este autor, estudando o efeito térmico na determinação de adição de leite bovino em leite caprino e ovino relatou que o tratamento térmico a 90°C/30s poderia afetar ensaios imunológicos na determinação do percentual da mistura de leite bovino. Douglas et al. (1981), afirmou também, que proteínas do soro poderiam ser afetadas pelo tratamento térmico, dificultando identificação por eletroforese em gel. Sendo inclusive, uma recomendação do documento da União Européia EC 213/2001 a sua não utilização para determinação de adulteração de produtos lácteos com soro de leite bovino tratados pelo calor, uma vez que esse processo poderia afetar a estabilidade das proteínas.

No caso da determinação de beta-caroteno, segundo estudos realizados por Abranches et al., (2008) e Correia et al., (2008), o tratamento térmico realizado na preparação dos derivados lácteos, bovino e provavelmente de bubalinos, não ocasionaria alterações significativas no teor desse composto, desde que após a pasteurização rápida (72°-75°C/15s) ou o processamento UHT (120°- 150°C/2-3s) o leite fosse armazenado protegido de O<sub>2</sub> e luz.

A técnica de cromatografia gasosa que determina a composição de ácidos graxos pode ser utilizada, porém, é pouco eficiente quando os produtos são adulterados com leite desnatado. As misturas detectadas pelo método, são baseadas na diferenciação do teor ou razão de ácidos graxos, contudo, não existem estudos sobre a proporção de ácidos graxos do leite bubalino em comparação com leite bovino.

A utilização da CLAE-DAD para determinação de carotenóides em produtos de origem bubalina, mostrou-se uma técnica segura, rápida e simples, para a determinação da autenticidade desses derivados lácteos, podendo auxiliar os órgãos de inspeção sanitária,

tornando-se uma alternativa para assegurar a confiabilidade dos ingredientes utilizados na preparação de produtos lácteos a partir de leite de búfala, além de contribuir com a literatura brasileira com dados de quantificação de retinol e beta-caroteno nesses produtos, uma área escassa de trabalho com essa finalidade.

## 7 CONCLUSÃO

A otimização do método de ensaio para determinação de adulteração em produtos lácteos de origem bubalina utilizando o beta-caroteno como marcador de autenticidade mostrou ser, a partir dos resultados obtidos no processo de validação e verificação da eficiência, uma técnica eficiente e confiável para o controle de adulterações em queijos elaborado com leite bubalino na região do Rio de Janeiro.

Para garantir a integridade dos resultados, os parâmetros de validação, seletividade, precisão, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação foram avaliados, assim como, a eficiência do método foi determinada através de carta controle e avaliação da incerteza do método, indicando através dos resultados que o método proposto é eficiente para a função desejada.

A avaliação das quantidades de gordura no leite bubalino de animais mestiços, de retinol e beta-caroteno nas amostras de queijo bubalino elaborados com leite desses bubalinos, não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) nas diferentes épocas de lactação, aos 60 dias e 200 dias após parição, reduzindo a variabilidade e influencia sobre o método de ensaio.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB - Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. **Padrão racial**. Disponível em <[www.bufalo.com.br](http://www.bufalo.com.br)>. Acessado em: 15/10/2011.

ABRANCHES, M.V.; DELLA LUCIA, C.M.; SARTORI, M.A.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. *Alimentos e nutrição*, v.19, n.2, p. 207-217, 2008.

ALBALÁ-HURTADO, S.; NOVELLA-RODRIGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 778, p. 243-246, 1997.

AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N.da; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite de búfalas: composição. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte. V.29, n.2, p.106-110, 2005.

ALVIMDUQUE, A.C. LANES, E.C.M.; LOPES, F.C.F. Estudos dos principais microorganismos do rúmem. *Artigos sobre manejo rural*. Disponível em: <[www.portaluralsoft.com/manejo/manejoExibe.asp?id=155](http://www.portaluralsoft.com/manejo/manejoExibe.asp?id=155)>. Acessado em 15 set. 2010.

AMIGO, L.; RAMOS, M.; MARTIN-ALVAREZ, P.J. Effect of technology parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *Journal Dairy Science*, v.74, p. 1482-90, 1991.

ANDRIGUETTO, J.M. et al., **Nutrição Animal: As bases e os fundamentos da nutrição animal**, Ed.1, São Paulo: Nobel, 2002. 389 p.

ÂNGULO, R.A.; NOGUERA, R.R.; BERDUGO, J.A. El búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) un eficiente utilizador de nutrientes: aspectos sobre fermentación y digestión ruminal. *Livestock Research for Rural Development Guidelines*, v.17, n.6, 2005.

ANVISA, SENAI. **Seleção, uso e interpretação de programas de ensaios de proficiência (EP) por laboratórios**. Brasília. 46 p.2000.

ANVISA/REBLAS. **Guia para o controle da qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do Pará**. Julho, p.46, 2007.

ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., MARTÍN, R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, v.19, n.1, p. 1-8, 2008.

ARAÚJO, T.P.M.; RANGEL, A.H.N.; SOARES, A.D.; LIMA, T.C.C.; LIMA JÚNIOR, D.M.; NOVAES, L.P. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanques de resfriamento. *Agropecuária Científica no Semi-árido*, v.7, n.1, p.01-05, 2011.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food*

**Composition and Analysis**, v.17, p. 385-396, 2004.

BANIA, J.; UGORSKI, M.; POLANOWSKI, A.; ADAMCZYK, E. Application of polymerase chain reaction for detection of goat's milk adulteration by milk of cow. **Journal of Dairy Research**, v.68, p. 333-336, 2001.

BAUCHART, D. Lipid absorption and transport in ruminants. **Journal Dairy Science**, v. 76, p. 3864-3881, 1992.

BEITUNE, P.E.; DUARTE, G.; MORAIS, E.N.; QUINTANA, S.M.; VANNUCCHI, H. Deficiência de vitamina A e associações clínicas: revisão. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.53, n.4, 2003.

BIERER, T. L., et al., Transport of Newly-Absorbed Beta-Carotene by the Preruminant Calf. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 691, n. 1, p. 226-228, 1993.

BARBA, A.I.O.; HURTADO, M.C.; MATA, M.C.S.; RUIZ, V.F.; TEJADA, M.L.S. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. **Food Chemistry**, v.95, p. 328-336, 2006.

BARBANO, D.M.; DELLAVALLE, E. Rapid method for determination of milk casein content by infrared analysis. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1524-1528, 1987.

BASTINETTO, E. **Aspectos Econômicos as Criação de bubalinos em Minas Gerais**. II Simpósio Mineiro de Buiatria, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2005.

BENJAMINI, E. **Imunologia**. Editora Guanabara Koogan S.A. 4 Edição, pp 288, 2002.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v. 31, n.3, p.293-298, 2007.

BERNARDES, O. **Bubalinocultura no Brasil e no mundo: sua importância para o agronegócio**. I Simpósio da Cadeia Produtiva da bubalinocultura. Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia – FMVZ, Botucatu, SP, Brasil, 2010.

BONASSI, I. A.; CARVALHO, J.B.C.; VILLARES, J.B. Utilização do leite de búfala como matéria-prima para a elaboração do queijo *Mozzarella*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.32, n.4. p.903-912, 1982.

BONVILLANI, A.G.; RENZO, M.A.; TIRANTI, I.N. Genetic polymorphism of milk protein loci in argentinian Holstein cattle. **Genetics na Molecularbiology**, v,23, n.4, p. 819-823, 2000.

BORKOVÁ, M.; SNÁSELOVÁ, J. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. **Czech Journal Food Science**, v. 23, n. 2, p. 41-50, 2005.

BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R.; AQUINO, A.A.; FERNANDES, R.H.R.; GARCIA, J.F.; SANTOS, M.V. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.5, p. 747-753, 2007.

BOTTERO, M.T., CIVERA, T., NUCERA, D., ROSATI, S., SACCHI, P., TURI, R.M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 277-282, 2003.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1952. Seção 1, p. 10785.

BRASIL. CONGRESSO NACIONAL. Código de Defesa do Consumidor. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Instrução Normativa Nº 62, Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 30 de Dezembro de 2011.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC Nº 259. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, 23 de setembro de 2002.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. Regulamento Técnico Metrológico estabelecendo a forma de expressar o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré-medidos. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, 20 de agosto de 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; RE nº899 de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da saúde: Brasil 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa Nº 68. Oficializa os métodos Físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 de dezembro de 2006.

BREEMEN, R.B.V.; NIKOLIC, D.; XU, X.; XIONG, Y.; LIESHOUT, M.V.; WEST, C.E.; SCHILLING, A.B. Development of a method for quantitation of retinol and retinyl palmitate in human serum using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.794, p. 245-251, 1998.

BRESCIA, M.A.; MAZZILLI, V.; SGARAMELLA, A.; GHELLI, A.; FANIZZI, F.P.; SACCO, A. <sup>1</sup>H NMR Characterization of milk lipids: A comparison between cow and buffalo milk. *Journal of the American Oil chemists' Society*, v.81, n. 5, p. 431 – 436, 2004.

BURTIS, A.C., BRUNS, E. D. **TIETZ - Fundamentos de Química Clínica**, 6a ed., Ed. Elsevier : Rio de Janeiro, 2008.

CALVO, M.M.; AMIGO, L.; OLANO, P.J.; MARTIN e M.RAMOS. Effect of thermal treatments on the determination of bovine milk added to ovine or caprine milk. **Food Chemistry**, n. 32, p. 99-108, 1989.



CÂMARA, M.C.C.; MARINHO, C.L.C.; GUILAM, M.C.; BRAGA, A.M.C.B. A produção acadêmica sobre rotulagem de alimentos no Brasil. **Revista Panamericana de Saúde pública**, v. 23, n. 1, p. 52-58, 2008.

CHAGAS, M.H.C.; FLORES, H.; CAMPOS, F.A.C.S.; SANTANA, R.A.; LINS, E.C.B. Teratogenia da vitamina A. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v.3, n.3, p. 247-252, 2003.

CAMPOS, J.M. **Perfil dos níveis de vitaminas A e E em leites de doadoras primíparas e múltiparas em bancos de leite humano**. 2005. 74f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC – Fundamentos, estratégia e validação**. São carlos: EduFSCar, 77p., 2009.

CASSIANO, N.M., BARREIRO, J.C., MARTINS, L.R.R., OLIVEIRA, R.V., CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v.32, p.1021-1030, 2009.

CASTALDO, M.C., La bufala ed el suo tipico prodoto: “La *Mozzarella*”, **Revista di Zootecnia**, v. 32, n. 7/8,. p.203-208, 1960.

CHOI, Y.H., KIM, H.K., WILSON, E.G., ERKELENS, C., TRIJZELAAR, B., VERPOORTE, R. Quantitative analysis of retinol and retinol palmitate in vitamin tablets using <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica acta**, v. 512, p. 141-147, 2004.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC. São Paulo: Ed. Blucher, p. 179, 1998.

CITRO, V. Del latte di bufala un tipico prodotto locale “la *Mozzarella*”. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v.32, n.4. p.263-270, 1981.

COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L.D. E CORASSIN, C.H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas por meio de analisadores automatizados, **Ciência Animal Brasileira** v. 5, n. 3, p. 167-170, 2004.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos da cromatografia. São Paulo: Ed. Unicamp, p. 453, 2006.

CONSTITUIÇÃO FEDERAL. **Código Penal. Código de Processo Penal**. Organização Luiz Flávio Gomes, 9 Ed. Ver., ampl., e atual. SP. Editora Revista dos Tribunais, RT minicódigos, 2007.

CORREIA, L.F.M.; FARAONI, A.S.; PINHEIRO-SANT’ANA, H.M. Efeitos do processamento de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p. 83-85, 2008.

COSTA, M.A.L.; ORTEGA-FLORES, C.I.; PENTEADO, M.DV.C. Interação dos isômeros todo-trans, 9-*cis* e 13-*cis* do beta-caroteno na bioconversão desses em vitamina A. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, p. 19-25, 2008.

CROTTI, A.E.M.; VESSECHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v.29, p. 287-291, 2006.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 596 p.

CUNHA NETO, O.C.da. **Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura**. Dissertação (mestrado) 2003. p.71. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo.

DIAS, S.S. **Avaliação da Qualidade e Autenticidade de derivados de leite de búfala encontrados no varejo do Rio de Janeiro**. 2009. 56p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

DIMENSTEIN, R.; MELO,C.U.; GARCIA,L.R.S.; LIRA,L.Q. Quantificação do retinol em leite de cabra e sua importância na alimentação infantil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n. 3, p.415-418, 2010.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n.7, 1998.

DENNIS, M.J. Recent developments in food authentication. **Analyst**, v. 123, p. 151R-156R, 1998.

DOUGLAS, F.W.; GREENBERG, R.; FARRELL, JR, H.M.; EDMONDSON, L.F. Effects of ultra-high-temperature pasteurization on milk proteins. **Food Agriculture Food Chemistry**, v. 29, n. 1, p.11-15,1981.

EGITO, A.S., ROSINHA, G.M.S., LAGUNA, L.E., MICLO, L., GIRARDER, J.M., GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; v. 58, n.5, p. 932-939, 2006.

EMBRAPA. **Búfalos: O produtor pergunta e a EMBRAPA responde**. Editor – técnico: José Ribamar Felipe Marques. EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém – Pará. Coleção 500 perguntas, 500 repostas, 176p. 2000.

EMBRAPA. **Fundamentos teórico-prático e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase** [Recurso Eletrônico]. São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/publicacaogratis/e-books/LVFundDNA.pdf>. 2007. Acessado em: 21/10/2008.

ENNE, G.; ELES, D.; FONDRINI, F.; BONIZZI, I.; FELIGINI, M.; ALEANDRI, R. High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water buffalo *Mozzarella*: comparison with results from raw milk and cheese matrix. **Journal of Chromatography A**, v.1094, p. 169-174, 2005

ERDMAN, J. W., BIERER, T. L. and ERIC T. GUGGER Absorption and Transport of Carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 691, n. 1, p. 76–85, 1993.

ESCRIVÁ, A.; ESTEVE, M.J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.947, p. 313-318, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. EC 213/2001 Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. **Official Journal of the European Communities** 2001; 44:L.37/1 - L37/99.

FAO. **O búfalo**. Brasília: Ministério da Agricultura; São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1991. 320p. (FAO, Produção Animal e Saúde, 4).

FÁVARO, R.M.D., IHA, M.H., BIANCHI, M.L.P. Liquid chromatography determination of geometrical retinol isomers and carotene in enteral feeding formulas. **Journal of Chromatography A**, v.1021, p.125-132, 2003.

FERNANDES, S.A.A. **Levantamento exploratório da produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de búfalas em cinco fazendas do estado de São Paulo**. 2004. 84f. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

FELIGINI, M., BONIZZI, I., CURIK, V. C., PARMA, P., GREPPI, G.F., ENNE, G. Detection of Adulteration in Italian *Mozzarella* Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers. **Food Technology Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 91-95, 2005.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P. Italian Cheeses. In : FOX, P.F. (Ed) **Cheese : Chemistry, physics and microbiology**. New York: Elsevier Applied Science, 1987. v.2, cap. 7, p 221-255.

FERRARA, B.; INTRIERI, F. Características e emprego do leite de búfala. **Zootecnia**, v.13, n.1. p.25-50, 1975.

FONSECA, W. **O búfalo: sinônimo de carne, leite manteiga e trabalho**, 4. ed. São Paulo: Ícone, 1986. 84p.

FRANZOLIN, R.; ALVES, T.C. Aspectos da Nutrição de Búfalos. II simpósio da Cadeia produtiva da bubalinocultura. Botucatu, SP. Anais.. Disponível em: [http://www.fmvz.unesp.br/andrejorge/IISCPBubalino\\_2011\\_CD-ROM/II\\_SCPB\\_RaulFranzolin.pdf](http://www.fmvz.unesp.br/andrejorge/IISCPBubalino_2011_CD-ROM/II_SCPB_RaulFranzolin.pdf). Acesso em 26 de jan 2012.

FURR, H.C.; CLARK, R.M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **Journal Nutrition Biochemistry**, v.8, p. 364-377, 1997.

GANGULI, N.C. Tecnologia de la leche de búfala. **Revista Mundial de Zootecnia**, v.30, p.2-10, 1979.

GUARANTINI, T.; CARDOZO, K.H.M.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C<sub>30</sub> reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.20, n.9, p. 1609-1616, 2009.

GONÇALVES, E.B.; ANTONIASSI, R. Incerteza em resultados analíticos e verificação da conformidade de qualidade de alimentos. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.30, n.4, p. 917-927, 2010.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição Bioquímica do Leite e Hormônios da Lactação. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. p.72. 2001.

GONZÁLEZ- MARTÍN, I., HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M., MORÓN - SANCHO, R., SALVADOR- ESTEBAN, J., VIVAR- QUINTANA, A., REVILLA, I. Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheese with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, p.191-196, 2007.

HAASNOOT, W., SMITS, N.G.E., KEMMERS-VONCKEN, A.E.M., BREMER, M.G.E.G. Fast Biosensor immunoassays for the detection of cow's milk in the milk of ewes and goats. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 322-329, 2004.

HAZA, A.I., MORALES, P., MARTÍN, R., GARCÍA, T., ANGUITA, G., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. Detection and Quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. **Journal of the Science of food and agriculture**, v.79, p. 1043-1047, 1999.

HERRERO-BARBUDO, M.C.; GRANADO-LORENCIO, F.; BLANCO-NAVARRO, I.; OLMEDILLA-ALONSO, B. Retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A and E-fortified dairy products commercialized in Spain. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 521-526, 2005.

HEUDI, O.; TRISCONI, M.J.; BLAKE, C.J. Simultaneous quantification of vitamins A, D<sub>3</sub> and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1022, p. 115- 123, 2004.

HULSHOF, P.J.M.; ROEKEL-JANSEN, T.V.; BOVENKAMP, P.V.; WEST, C.E. Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in the Netherlands. **Journal of food composition and analysis**, v.19, p. 67-75, 2006.

HURLEY, I.P., COLEMAN, R.C., IRELAND, H.E., WILLIAMS, H.H. Measurement of bovine IgG by indirect Competitive ELISA as a means of detection milk adulteration. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 543-549, 2004.

HUSSAIN, I; BELL, A.E.; GRADISON, A.S. Comparison of the rheology of *Mozzarella*-type curd made from buffalo and cow's milk. **Food Chemistry**, n. 128, p. 500-504, 2011.

IBGE – **Pesquisa Agropecuária Municipal**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=22&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acessado em 03/12/2011.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOC-CGCRE-008, fevereiro, 20p. 2010.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Expressão de Incerteza de Medição. NIT-DICLE-021, agosto, 30p. 2007.

ISHIMOTO, E.Y.; NACIF, M.A.L. Propaganda e marketing na informação nutricional. **Brasil Alimentos**, n. 11, p. 28-33, 2001.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. IN: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos da cromatografia. São Paulo: Ed. Unicamp, p. 453, 2006.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2009, 216 p.

KRAUSE. **Food, Nutrition & Diet therapy**, Ed. 11. New York: NY, USA, 2005

KRINSKY, N.I.; WANG, X.; TANG, G.; RUSSEL, R.M. Mechanism of carotenoid cleavage to retinoids. **Annals New York Academy of Science**, v. 691, n.1, p. 167-176, 1993.

LACKER, T.; STROHSCHNEIN, S.; ALBERT, K. Separation and identification of various carotenoids by C<sub>30</sub> reversed-phase high-performance coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.854, p. 37-44, 1999.

LANÇAS, F.M. O renascimento das partículas superficialmente porosas (“core shell particles”) em HPLC. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n.2, p. 47-54, 2010.

LANE, J.R.; WEBB, L.W.; ACUFF, R.V. Concurrente liquid chromatography separation and photodiode array detection of retinol, tocopherols, all-*trans*-a-caroteno, all-*trans*-b-caroteno and the mono-*cis*- isomers of b-carotene in extracts of human plasma. **Journal of chromatography A**, v. 787, p. 111-118, 1997.

LI, H.; TYNDALE, S.T.; HEATH, D.D.; LETCHER, R.J. Determination of carotenoids and all-*trans*-retinol in fish eggs by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 49-56, 2005.

LI, X-Q; MESSMER, M. Comparison of model monomeric and polymeric alkyl stationary phases on silica using sum-frequency spectroscopy, **Journal of chromatography A**, v.984, p.19-28, 2003.

LIMA, A.A.N.; LIMA, J.R.; SILVA, J.L.; ALENCAR, J.R.B.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; LIMA, L.G.; ROLIM-NETO, P.J. Aplicação do controle estatístico de processo na indústria farmacêutica. **Revista Ciência Farmacêutica Básica aplicada**, v.27, n. 3, p.177-187, 2006.

LÓPEZ-CALLEJA I, GONZÁLEZ -ALONZO I, FAJARDO V, RODRÍGUEZ, MA, HERNÁNDEZ PE., GARCÍA T, MARTÍN R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and *Mozzarella* cheese. **International Dairy Journal**, v.15, p. 1122-1129. 2005

LOURENÇO, R.M.S. **Influência da Suplementação de retinol palmitato sobre os níveis de vitamina A do leite de puérperas saudáveis**. Dissertação (mestrado). 2005. p.98.Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MAcCALLEY, D.V. Comparison of the performance of conventional C<sub>18</sub> phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v.844, p. 23-28, 1999.

MACHADO, J.G.C.F; SCLACO, A.R. **Estratégias de marketing em laticínio: um estudo em empresas da região de Tupã/SP**. XLIV congresso da sociedade brasileira de economia e sociologia rural, Fortaleza- Ceará. "Questões agrárias, educação no campo e desenvolvimento. Disponível em: [www.sober.org.br/palestras/5/855.pdf](http://www.sober.org.br/palestras/5/855.pdf). acessado em 28/12/2009, as 20:02.

MACEDO, M.P.; WECHSLER, F.S.; RAMOS, A.A.; AMARAL, J.B.; SOUZA, J.C.; RESENDE, F.D., OLIVEIRA, J.V. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça mediterrâneo no oeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n. 3, p. 1084-1088, supl. 1, 2001.

MAFRA, I.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FARIA, M.A.; OLIVEIRA, B.P.P. A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 4943-4947, 2004.

MAJCHRZAK, D.; FABIAN, E.; ELMADFA, I. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. **Food Chemistry**, v.98, p. 704-710, 2006.

MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v.33, n.7, p. 1559-1568, 2010.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, 2009.

MASKOVÁ, E.; PAULOCKOVÁ, I. PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. **Czech. J. Food Sci.**, v. 24, n. 3, p. 127-132, 2006.

MATTOS, B.C. Aspectos qualitativos do leite bubalino. **Pubvet**, v.1, n.9, Ed.9, art. 166, 2007.

MAYER, H.K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal**, v. 15, p.595-604, 2005.

MENDONZA, B.R.; PONS, S.M.; BARGALLÓ, A.I.C.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 197-202, 2003.

MONTEIRO, A.A.; PIRES, A.C.dos S.; ARAÚJO, E.A. **Tecnología de Produção de Derivados de Leite**. Ed. UFV. Viçosa, MG, 81p., 2007.

MORAES, E.F.; OLIVEIRA, A.E.T.; WISCHRAL, A.; GOMES FILHO, M.A. Polimorfismo genético da  $\alpha_{s1}$  e da  $\kappa$ -caseína em cabras. *Ciência veterinária Tropical*, v. 12, n. 1/2/3, 2009.

MOSKOVÁ E, PAULICKOVÁ I. PCR-Based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. *Czech Journal Food Science*, v. 24, n. 3, p.127-32, 2006.

MORAES, M.C.; LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*, v.26, n.4, p. 556-563, 2003.

MORAIS, F.L.de. **Carotenóides: Características Biológicas e Químicas**. Monografia (especialização). Curso de Pós-graduação de Qualidade em Alimentos IV. 2006. 70f. Universidade de Brasília.

NEVES, N.L.B. Caracterização e implantação de uma política para o leite. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. **Contribuição da bubalinocultura para a produção leiteira**. Piracicaba: FEALQ, 1985. p.37-46

NILES, R.M. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of câncer. *Nutrition*, v.16, n.11/12, p. 1084-1090, 2000.

NOZIÈRE, P.; GROLIER, P.; DURAND, D.; FERLAY, A.; PRADEL, P.; MARTIN, B. Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cows' plasma and milk changes in forage and feeding level. *Journal Dairy Science*, v.89, p. 2634-2648, 2006

OETTERER, M. Aula: Alimentos: **Leis, Definições e Composição**. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. São Paulo. 2008. <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Legislacao%20Alimentos.pdf>

OLIVER, J. ; PALOU, A. Chromatography determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, n. 881, p. 543-555, 2000.

OLIVES BARBA, A.I.; HURTADO, M.C.; MATA, M.C.S.; RUIZ, V.F.; TEJADA, M.L.S. Application of UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, v. 95, p. 328-336, 2006.

OLIVIERI, D. de A. **Avaliação de qualidade microbiológica de amostras de mercado de queijo mussarela, elaborado a partir de leite de búfala (*bubalus bubalis*)**. 2004. 71f. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, Universidade de São Paulo.

OLSON, J.A. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. *The Journal of Nutrition*, p. 105-108, 1988.

OLSON, J.A. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure and Applied Chemistry*, v.66, n.5, p. 1011-1016, 1994.

OHTA H.; SAITO, Y.; NAGAE, N.; PESEK, J.J.; MATYSKA, M.T.; JINNO, K. Fullerenes separation with monomeric type C<sub>30</sub> stationary phase in high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, v.883, p. 55-66, 2000.

O'NEIL, M.J. **The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**, 14aed. Ed. Hardcover: USA, 2006.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. 2009. 114f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, T.L.M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos – Uma abordagem analítica. *Química Nova*, v.27, n.1, p. 96-105, 2004.

PALOMINO, P.A.H.; SANGAMA, E.D. Elaboración de queso mozzarella a partir de leche de *bubalus bubalis* (Ganado bubalino). *Revista Amazônica de Investigación Alimentaria*, v.2, n.2, p. 19-30, 2002.

PANFILI, G.; MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tocopherols, carotenes, and retinol and its geometric isomers in italian cheeses. *Analyst*, v. 119, p. 1161- 1165, 1994.

PAPPAS, C.S.; TARANTILES, P.A.; MOSCHOPOULOU, E.; MOATSOU, G.; KANDARAKIS, I. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry*, v.106, p. 1271-1277, 2008.

PASSOS, R. dos. **Extração e Caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aqüicultura**. Tese (doutorado)- Programa de Pós-graduação em ciências dos Alimentos 2007. p. 88. Universidade Federal de Santa Catarina.

PATIÑO, E.M. El búfalo. **Leche bubalina: Producción mundial. Comparación con la leche bovina. Alimentos funcionales derivados de la leche**. Faculdade de Ciências Veterinárias. Universidade Nacional del Nordeste. Disponível em: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar). Acessado em 28/03/12.

PATTO, D.C.S.; TAVARES, V.F.; PEREIRA, C. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência. *Fármacos e medicamentos*, n. 60, p. 34-42, 2009.

PERES, A.M.; VELOSO, A.C.; DIAS, L.A. **Autenticidade de queijos tradicionais: Aplicação de sensores no seu Estado**. Disponível em: [www.ancras.pt/pdf/autenticqueijo.pdf](http://www.ancras.pt/pdf/autenticqueijo.pdf). Acessado em 08/06/2012.

PLATH A, KRAUSE, I., EINSPANIER, R. Species Identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Z Lebensm Unters Forsch A*, v. 205, p. 437-441, 1997.



PRADO, A.G.S.; FARIA, E.A.; PADILHA, P.M. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 544-547, 2005.

PRASAD, R.; PANDITA, N.N. Cholesterol content of milk and its fractionation during processing. **Indian Journal Dairy Science**, v.43, n.2.1990. p.190-193.

PEREZ, M.A.F. Validação de métodos analíticos: como fazer? Por que ela é importante? **Boletim de Tecnologia e desenvolvimento de embalagens**. ITAL, v.22, n.3, p. 1-9, 2010.

POOR, C. L., et al.,  $\beta$ -Carotene concentrations in tissues of pre-ruminant calves following a single oral dose of  $\beta$ -carotene. **FASEB J.** v.5, n.5, 1991.

PRASAD, R.; PANDITA, N.N. Cholesterol content of milk and its fractionation during processing. **Indian Journal Dairy Science**, v.43, n.2, p.190-193, 1990.

PROMEMBUL. **Programa de Melhoramento Genético dos Bubalinos – Manual do usuário**. Programa da FMVZ-UNESP-BOTUCATU/ABCB/EMBRAPA. Botucatu, SP, p.27, 2005.

PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n.2, p. 293-300, 2004.

QUEIROZ, A.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química nova**, v.24, n.1, p. 68-76, 2001.

QIAOQIAN, L.; PUHAN, Z. Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry. **Analytica Acta**, v. 393, p. 227-234, 1999.

QUIRÓS, A.R.B.; COSTA, H.S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 97-111, 2006.

REA, S., CHIKUNI, K., BRANCIARI, R., SANGAMAYYA, R.S., RANUCCI, D., AVELLINI, P. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex - PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making *mozzarella* cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 689-698, 2001.

REALE S, CAMPANELLA A, MERGIOLI A, PILLA F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. **Journal of dairy Research**, v.75, p.107-112, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n.1, p. 164-171, 2008.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química nova**, v.27, n.5, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. OMNI Research. ILSI Human Nutrition Institut. Washigton, D.C., p.71, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides – Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Ministério do Meio ambiente: Brasília, D.F., 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. **Harvest Handbook for Carotenoid análisis**. Washigton D.C.: HavestPlus, 58p., 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p. 641-647, 2000.

RODRIGUEZ—DELGADO, M.A.; DÍAZ-FLORES ESTÉVEZ, J.F.; DÍAZ-FLORES ESTÉVEZ, F.; Calzadilla, C.H.; Romero, C.D. **Journal of Pharm. and Biomed. Analysis**, v. 28, p. 991, 2002.

RODRIGUEZ-OTERO, J.L.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. Análisis of dairy produtcs by near infraredspectroscopy: A review. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2815-2819, 1997.

ROSA, J.S. **Desenvolvimento de um método rápido pata análise de vitamina c por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica**. 2005. 108f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ROSA, B.R.T.; FERREIRA, M.M.G.; AVANTE, M.L.; ZANGIROLAMI-FILHO, D.; MARTINS, I.S. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IV, n.8, 2007.

ROSSI, G. **Manuale di tecnologia casearia**. Bologna: Agricole, 684p. 1977.

RICHTER W, KRAUSE I., GRAF C, SPERRER I., SCHWARZER C, KLOSTERMEYER H. An indirect competitive ELISA for the detection of cow's milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine  $\gamma$  - caseins. **Z Lebensm Unters Forsch A**, v.204, p. 21-26, 1997.

SANDER, L.C.; SHARPLESS, E.; PURSCH, M. C<sub>30</sub> stationary phases for the nalysis of food by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.880, p. 189-202, 2000.

SÃO PAULO (Estado). Código Sanitário: Decreto nº 12342, de 27 de setembro de 1978: Regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado de Saúde (revisto e atualizado até dezembro de 1990). 5 ed. São Paulo: **Imprensa Oficial do Estado**, 1992 Decreto nº 12486, de 20 de outubro de 1978: aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas.

SÃO PAULO (Estado). Código Sanitário: Resolução SAA - 3, de 10-1-2008. Normas técnicas sobre as condições higiênico-sanitárias mínimas necessárias para aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos destinados a leite e produtos lácteos. **Diário Oficial**, Poder Executivo, Estado de São Paulo, Seção I.

SENO, L.O.; CARDOSO, V.L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p. 2016-2011, 2007.

SENTANIN, M.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de carotenóides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.13-19, 2007.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*. V. 8, n.1, p. 43-56, 2005.

SILVA, A.A.; ADRIÃO, M.; JIMENEZ, G.C.; SANTOS, M.C.R.; WISCHRAL, A.; AFONSO, J.A.B. Estudo do polimorfismo genético da  $\alpha_{s1}$ -caseína em cabras, no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Science Animal Science*, v.29, n.3, p. 255-259, 2007.

SILVA, C.L.S.P. Eletroforese Bidimensional: Princípios e Aplicações. **Ciências Agrárias e Saúde**, v. 2, n.1, p. 74-8, 2001.

SILVA e RAMOS, E.O.T.; PANETTA, J.C.; ISHIZUKA, M.M. Efeito microbiciocida da fase de filagem, durante a fabricação de “*Mozzarella*” elaborado com leite de búfala. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p.28-34, 1999.

STROHSCHHEIN, S.; SCHLOTTERBECK, G.; RICHETER, J.; PURSCH, M.; TSENG, L.H.; HANDEL, H.; ALBERT, K. Comparison of the separation of *cis/trans* isomers of tretinoin with different stationary phases by liquid chromatography-nuclear magnetic resonance coupling. **Journal of chromatography A**, v, 765, p. 207-214, 1997.

SU, Q.; ROWLEY, K.G.; BALAZS, N.D.H. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 781, p. 393-418, 2002.

TANUMIHARDJO, S.A.; PENNISTON, K.L. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. **Journal of Lipid Research**. v. 43, p. 350-355, 2002.

TEIXEIRA, L.V.; BASTINETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 29, n.2, p.96-100, 2005.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDINS, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseada em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química nova**, v.25, n.4, p. 616-623, 2002.

TONHATI, H.; CANAES, T.de S.; LIMA, A.L.F. **Fatores que afetam a contagem de células somáticas e suas relações com a composição e produção de leite de búfalas**. Disponível em: <http://www.spmv.org.br/conpavet2004/palestras%20-%20resumos/palestra%20buiatria%20Tonhati-celula%20somatica%20leite.doc>. Acessado em 26/05/2009.

VALCÁRCEL, M.; RIOS, A. **La calidad em los laboratórios analíticos**, Ed. Reverté, s.a. Barcelona, 2<sup>a</sup>ed. 426p., 2002.

VALLE, J.L.E.; CAMPOS, S.D. da S.; YOTSUYANAGI, K. SOUZA, G. de, Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo Mozzarella. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 24, n.4, p.669-673, 2004.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos:Tecnología, Química y Microbiología**. Editora Acribia. Serie 1, Alimentos básicos, p.291-363, 1995.

VELOSO A.C.A. Detecção de Adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

VELOSO, A.C.A.; TEIXIERA,N.; FERREIRA, I.M.; FERREIRA, M.A. Metodologia de Dosamento das proteínas do leite. **Boletim de Biotecnologia**, p. 19-31, 2008.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M. Avaliação química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v.51, n.1., p.131-137,1994.

VERRUMA, M.R. **Avaliação Nutricional do leite de búfala** - Seminários em ciências e tecnologia de alimentos. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros” - Piracicaba - SP, 1990.p.35-41.

VERRUMA, M.R.; OLIVEIRA, A.J.; SALGADO, J.M. Avaliação química e nutricional do queijo *Mozzarella* leite de búfala. **Scientia Agricola**, v.50, n.3, p.444-450, 1993.

VERRUMA-BERNARDI; DAMÁSIO, M.H.; VALLE, J.L.E.; OLIVEIRA, A.J. de. Elaboração do queijo Mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, 2000.

VICHENEWSKI, W. Cromatografia por adsorção. IN: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos da cromatografia. São Paulo: Ed. Unicamp, p. 453, 2006.

VIEIRA, M.C.; CAVICHIOLO, J.R.; FACHINI, C.; LISERRE, A.M.; SOUZA, K.B.; RODRIGUES, C.F.C.; VAN DENDER, A.G.F. Viabilidade econômica da implantação de uma unidade industrial para a produção de mozzarella e de massa coagulada, fermentada e congelada de leite de búfala. **Informações Econômicas**, v.39, n.10, 2009.

WANG, Y.; CHANG, W.Y.; PRINS, G.S.; VAN BREEMEN, R.B. Simultaneous determination of all-*trans*, 9-*cis*, 13-*cis* retinoic acid and retinol in rat prostate using liquid chromatography - mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 8, p. 882-888, 2001.

WYS, R. Chromatography and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. **Journal of Chromatography B**, v. 671, p. 381-425,1995.

YANG, A.; LARSEN, T. W.; TUME, R. K. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 43, n. 8, p.1809-1817, 1992.

YANG, A.; TUME, R. K. A Comparison of beta-carotene-splitting activity isolated from intestinal mucosa of pasture-grazed sheep, goats and cattle. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v. 30, n. 2, p. 209-217, 1993.

YUYAMA, L.K.O.; MARINHO, H.A.; ALENCAR, F.H.; YONEKURA, L.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina A (retinol) e carotenóides. IN: COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrients. Ed. Manole: São Paulo, p.1172, 2009.

ZAVA, M.A. **Produção de búfalos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984. 245p.