



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA ADULTERAÇÃO COM SORO DE QUEIJO EM AMOSTRAS DE
LEITE BOVINO UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

MICHELE PATRICIA FELIPE

Maringá

2024

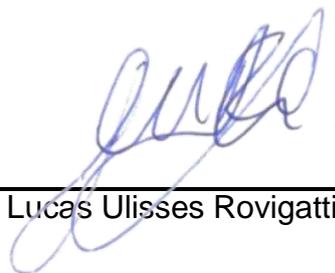
MICHELE PATRÍCIA FELIPE

**“AVALIAÇÃO DE ADULTERAÇÃO COM SORO DE QUEIJO EM
AMOSTRAS DE LEITE BOVINO UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV
- VIS”.**

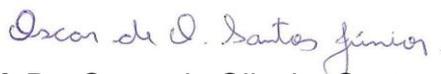
Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.



Prof. Dra. Grasiela Scaramal Madrona



Prof. Dr. Lucas Ulisses Rovigatti Chiavelli



Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

R315a

Felipe, Michele Patrícia

Avaliação da adulteração com soro de queijo em amostras de leite bovino utilizando espectrofotometria UV-VIS / Michele Patrícia Felipe. -- Maringá, PR, 2024.
27 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2024.

1. Espectrofotômetro UV/Vis. 2. Caseinomacropéptideo. 3. Segurança alimentar. 4. Soro de queijo. 5. Aminoácidos. I. Santos Junior, Oscar de Oliveira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 664.65

Orientador

Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior

BIOGRAFIA

Michele Patrícia Felipe nasceu no estado do Paraná, na cidade de Atalaia. Possui graduação em Licenciatura em Química pela Faculdade UNIUBE de Uberaba-MG. Trabalha na indústria de alimentos no setor da garantia da qualidade. Atualmente cursando mestrado em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), realizando pesquisa para determinação de metodologia analítica para identificação de fraude em alimentos.

Dedico

A minha família, em especial a minha mãe Cleide Inês G. Felipe e minha filha Isadora Felipe Coleoni, pelo apoio e incentivo, a meus queridos amigos de trabalho e aos que o mestrado me proporcionou conhecer, por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a todos que desempenharam um papel fundamental nesta fase da minha vida e foram essenciais para a conclusão deste sonho. Em especial, quero agradecer a todos que contribuíram significativamente ao longo deste trabalho. Em especial:

Primeiramente a Deus;

Ao meu orientador Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos Júnior, pela oportunidade, orientação e confiança concedida, que foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional;

A Patrícia Daniele da Silva Santos pela sua generosidade, orientação e conselhos, que foram fundamentais ao longo desta jornada;

Agradeço aos meus amigos e colegas de pesquisa pela contribuição fundamental no desenvolvimento e elaboração deste mestrado;

Aos membros do grupo de pesquisa APLE-A, pelo incentivo e colaboração com esse projeto;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela oportunidade de realizar este sonho e crescimento na vida tanto profissional quanto pessoal;

A empresa Leite Líder de Lobato-PR pelo fornecimento das amostras e por permitir a liberação necessária para que eu pudesse realizar os experimentos. Agradeço também aos meus colegas de trabalho, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram, sendo cruciais para o desenvolvimento deste projeto.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico.

Autores: Michele Patrícia Felipe; Patrícia Daniele da Silva Santos; Mariana Leoncio; Alisson Figueiredo; Elton G. Bonafe; Oscar Oliveira Santos.

Título do artigo: Assessment of cheese whey adulteration in milk samples through UV-Vis Spectrophotometry.

Nome da revista para o qual foi submetido: Food Analytical Methods

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. Milk and dairy products are widely consumed by the population and contribute to the human diet as important sources of proteins, lipids, carbohydrates, vitamins and minerals. Due to these characteristics, the economic importance, high demand and the complexity of the production chain make it favorable to fraudulent practices, especially with the addition of whey, as it is a low-cost by-product and a by-product of cheese production. To detect fraud in the milk sample, the analysis is based on the identification of CMP, which is a peptide resulting from the hydrolysis of the k-casein peptide bond between amino acids 105-106 Phe-Met, its detection in low concentrations in routine analyzes in dairy products it is difficult, because its composition is similar to that of milk and the physical-chemical characteristics are similar. The internationally recognized method for identifying whey in milk is high-performance liquid chromatography (HPLC). This technique requires time, qualified professionals, high cost of analysis due to solvents, materials and equipment maintenance, and is therefore an high cost to be applied routinely in receiving milk. Given these circumstances, the Ultraviolet-Visible Molecular Absorption Spectrophotometer (UV-Vis Spectrophotometer) is an alternative for routine analysis. The technique has low operational costs, simplicity in its application and high selectivity, since the substances to be analyzed absorb energy only at specific wavelengths of the UV-Vis spectrum. The purpose of the present study is to develop a methodology aimed at quantifying caseinomacropptide (CMP) in raw milk samples upon receipt, with the aim of providing faster results. This makes it possible to make agile and practical decisions, allowing the appropriate allocation of milk based on those established by Normative Instruction IN n° 69/2006 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA).

AIMS. The objective of this study is to develop a methodology capable of evaluating the concentration of CMP in milk samples adulterated with cheese whey.

MATERIAL AND METHODS. The raw milk and cheese whey used in the experiments were purchased from a local dairy (Lobato, Paraná, Brazil), around 6 L of milk and 2 L of whey were used to carry out the analyses. Verification of the quality of the samples was carried out through physical-chemical analyzes of raw milk according to the methodology established by IN 76 of MAPA (Brazil, 2020), the pH values of raw milk and samples with added whey were carried out following Official Methods for Analysis of Products of Animal Origin - MAPA / SDA 1st Ed. 2022. The quantification of the titratable acidity of the samples was determined following the AOAC 947.05:2019 standard. Density at 15° C and stability to ethanol were determined as described at the Adolfo Lutz Institute. Chemical and physical methods for food analysis. to analyze the cryoscopy index, the IDF 108 - ISO 5764:2009 method was used. To determine Lipids, the NMKL 40:2005 method was followed. To determine the CMP, a calibration curve was prepared according to the preparation procedure described in MET POA/04/03/01. CMP precipitation was carried out with 5 mL of TCA and 10 mL of the sample in test tubes. Next, the samples passed through an ultrasonic bath for 20 min and were then centrifuged for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.40 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter membrane. And then 5 µL of the samples were diluted in 3 mL of distilled water. Solutions were prepared with cheese whey added to milk at concentrations corresponding to 2, 5, 7, 10, 15 and 20% (v v-1), the samples were analyzed in replicates (n = 4) and readings were taken in the wavelength

(λ) of 205 nm using the Molecular Absorption Spectrophotometry technique in the Ultraviolet/Visible Region (UV/VIS Spectrophotometry).

RESULTS AND DISCUSSION. Physicochemical analyzes (acidity, pH, stability, cryoscopy, density and lipids) were carried out on samples without and with levels of addition of different concentrations of whey in milk to verify the quality of milk received in dairy products, and to what level addition is possible to detect in these analyzes. Through these, we found that the higher the whey adulteration levels, the higher the acidity of the raw milk and consequently the lower the pH. The stability to alizarol was shown to be outside the stability limits by legislation for samples with 30% serum addition, on the other hand, the fat content is not in accordance with IN 76 from 20% serum adulteration, where the minimum value for this parameter must be 3.0 g per 100 g of milk. The freezing point by cryoscopic analysis was in accordance with the standard with up to 90% of serum added, however from that point onwards, the results were divergent from the established range (-0.530 to -0.555 °H). For density values with only 100% serum added, results below the established standard can be observed (1.029 - 1.032 g mL⁻¹). These parameters are mandatory in the routine of receiving milk in the industry, providing an overview of the quality of the product received. However, it is worth highlighting that, despite the mandatory nature of these analyzes, the detection of fraud related to the addition of whey, in concentrations of up to 20%, did not prove to be viable through these analyzes. Therefore, to validate the method using the ultraviolet and visible spectrophotometer (UV-Vis), standard solution absorbance measurements were carried out at 205 nm, where we obtained a correlation coefficient greater than 0.99, indicating the satisfactory linearity of the method, the Precision was established through recovery studies with three serum concentration levels (5, 10 and 20%), which resulted in recoveries that indicate good reliability of the results. Therefore, based on the data acquired during validation, the method is capable of detecting concentrations lower than 5 mg L⁻¹ of added whey in milk.

CONCLUSIONS. The present study sought to develop a tool for detecting adulteration in milk with cheese whey, by determining the CMP content. Spectrophotometric measurements in the UV/Vis region proved to be accurate and reliable, being able to monitor and control the quality of milk produced and sold, meeting the need for dairy products. Through this method it was possible to detect CMP concentrations lower than 5 mg L⁻¹, this method has greater sensitivity than tests commonly used in routine analyzes such as immunochromatography and lower cost and time than high performance liquid chromatography (HPLC). Therefore, by inserting UV/Vis spectrophotometry as an analytical instrument in dairy products, it will provide assertive decision-making, less impact on condemning milk unsuitable for consumption and consequently greater production volume.

Keywords: UV/Vis spectrophotometer, Food safety, Amino acids, caseinomacropptide, cheese whey

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO. O leite e os produtos lácteos são amplamente consumidos pela população e contribuem para dieta humana, como importantes fontes de proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais. Devido a essas características, à importância econômica, alta demanda e a complexidade da cadeia produtiva o torna favorável a práticas fraudulentas, principalmente com a adição do soro, por ser um subproduto da produção de queijo e de baixo custo. Para detectar fraude na amostra de leite a análise baseia-se na identificação do caseinomacropeptídeo (CMP), que é um peptídeo resultante da hidrólise da ligação peptídica da k-caseína entre os aminoácidos 105-106 Phe-Met, sua detecção em baixas concentrações nas análises de rotina em laticínios é difícil, devido sua composição ser parecida com a do leite e as características físico-químicas serem semelhantes. O método internacionalmente reconhecido para identificação de soro no leite, é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) essa técnica é demorada, requer profissionais qualificados para execução do equipamento, elevado custo de análise por parte dos solventes, materiais, sendo, portanto, uma análise de elevado custo para ser aplicada como rotina no recebimento de leite. Dadas estas circunstâncias, o Espectrofotômetro de Absorção Molecular Ultravioleta-Visível (Espectrofotômetro UV-Vis) é uma alternativa a ser utilizado para análises de rotina. A técnica apresenta baixo custo operacional, simplicidade na sua aplicação e alta seletividade, uma vez que as substâncias a serem analisadas absorvem energia apenas em comprimentos de onda específicos do espectro UV-Vis. O propósito do presente estudo consiste na elaboração de uma metodologia destinada à quantificação do (CMP) em amostras de leite bovino cru no momento de seu recebimento, com o objetivo de fornecer resultados mais rápidos para tomada de decisão no recebimento de matéria prima em laticínios. Com isso viabilizando a tomada de decisões ágeis e práticas, permitindo a destinação adequada do leite com base no estabelecidos pela Instrução Normativa IN nº 69/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

OBJETIVO. O objetivo deste estudo é desenvolver uma metodologia capaz de avaliar a concentração de CMP em amostras de leite adulteradas com soro de queijo em baixas concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS. O leite cru e o soro de queijo utilizados nos experimentos, foram adquiridos em um laticínio local (Lobato, Paraná, Brasil), cerca de 6 L de leite e 2 L do soro de leite cru foram utilizados para realização das análises. O controle de qualidade das amostras foi realizado de acordo com metodologia estabelecida pela IN 76 do MAPA (Brasil, 2020), os valores de pH do leite cru e o soro foram realizados seguindo Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal - MAPA / SDA 1º Ed. 2022. A quantificação da acidez titulável das amostras foram determinadas seguindo a norma AOAC 947.05:2019. A densidade a 15° C e estabilidade ao alizarol foram determinadas seguindo o descrito no Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos e índice de crioscopia foi utilizado o método IDF 108 - ISO 5764:2009. Para determinação de Lipídios seguiu-se conforme o método NMKL 40:2005. Para determinação do CMP foi preparada uma curva de calibração conforme procedimento de preparo descrito no MET POA/04/03/01. Para a precipitação do CMP adicionou-se 5 mL de TCA e 10 mL da amostra em tubos de ensaio. Na sequência, as amostras passaram por banho ultrassônico na frequência de 37 kHz por 20 min, em seguida, foram centrifugados por 10 min. O sobrenadante foi filtrado por uma membrana de filtro de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,40 µm. Um volume de 5 µL do

filtrado foi diluído em 3 mL de água destilada. Foram preparadas soluções com soro de queijo adicionado ao leite em concentrações correspondentes a 2, 5, 7, 10, 15 e 20% (v v⁻¹), as amostras foram analisadas em replicatas (n = 4) e as leituras foram realizadas no comprimento de onda (λ) de 205 nm pela técnica de Espectrofotometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta/Visível (Espectrofotometria UV/VIS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO. As análises físico-químicas (acidez, pH, estabilidade, crioscopia, densidade e lipídios), foram realizadas em amostras sem e com níveis de adições de concentrações diferentes do soro no leite para verificar a qualidade do leite recebido em laticínios, e até que nível de adição é possível detectar nestas análises a presença de soro. Através destas, verificou-se que quanto maior os níveis de adulteração do soro, maior a acidez do leite cru e conseqüentemente menor o pH. A estabilidade ao alizarol mostrou-se fora dos limites de estabilidade pela legislação para amostras com 30% de adição do soro, em contrapartida o teor de gordura não está de acordo com a IN 76 a partir de 20% de adulteração de soro, onde o valor mínimo para este parâmetro deve ser de 3,0 g por 100 g de leite. O ponto de congelamento por análise crioscópica, se mostrou em conformidade com a norma com até 90% de soro adicionado, no entanto a partir desse ponto, os resultados estavam divergentes do intervalo estabelecido (-0,530 a -0,555 °H). Para os valores de densidade apenas com 100 % de soro adicionado pode-se observar resultado abaixo do padrão estabelecido (1,029 – 1,032 g mL⁻¹). Estes parâmetros são obrigatórios na rotina de recebimento do leite na indústria, fornecendo uma vista geral sobre a qualidade do produto recebido. Porém, vale ressaltar que, a detecção de fraudes relacionadas à adição de soro de leite, só foi possível por estas a partir de 20%. Diante disso, para a validação do método através do espectrofotômetro ultravioleta e visível (UV/Vis) foram realizadas medidas de absorbância de solução padrão em 205 nm, onde verificou-se um coeficiente de correlação superior à 0,99 indicando a linearidade satisfatória do método, a precisão foi estabelecida através de estudos de recuperação com três níveis de concentração de soro (5, 10 e 20%), que resultaram em recuperações que indicam uma boa confiabilidade dos resultados. Dessa forma, a partir dos dados adquiridos durante a validação, o método é capaz de detectar concentrações a partir de 5 mg L⁻¹, de adição de soro no leite. Esse resultado é significativo, visto que a legislação permite uma concentração de até 30 mg L⁻¹. Pode-se concluir, portanto, que o método é eficaz.

CONCLUSÕES. O presente estudo buscou desenvolver uma ferramenta para detecção de adulteração no leite com soro de queijo, através da determinação do teor de CMP. As medidas espectrofotométricas na região do UV/Vis se mostraram precisas e confiáveis, sendo capaz de monitorar e controlar a qualidade do leite produzido e comercializado, atendendo a necessidade de laticínios. Através desse método foi possível detectar concentrações de CMP a partir de 5 mg L⁻¹, esse método possui maior sensibilidade que testes comumente empregados em análises de rotina como o de imunocromatografia, menor custo e tempo do que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Diante disso, ao inserir a espectrofotometria UV/Vis como instrumento analítico nos laticínios proporcionará tomada de decisões assertivas, menos impacto em condenação de leite impróprio para o consumo e conseqüentemente maior volume de produção.

Palavras-chave: Espectrofotômetro UV/Vis, Segurança alimentar, Aminoácidos, caseinomacropéptido, soro de queijo.

ARTICLE

AVALIAÇÃO DA ADULTERAÇÃO COM SORO DE QUEIJO EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Michele Patrícia Felipe^{a,c}, Patrícia Daniele da Silva dos Santos, Mariana Silva Leoncio^b, Elton G. Bonafe^c, Oscar Oliveira Santos^{a,b,c*}

^aDepartamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR- Brasil.

^bPós Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR- Brasil.

^cPós Graduação em Ciência de Alimentos na Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR- Brasil.

*e-mail: oosjunior@uem.br

ORCID ID: 0000-0002-9631-8480

Resumo

A adição fraudulenta de soro de queijo ao leite bovino é um problema não só econômico, mas também de saúde pública, uma vez que a prática pode comprometer a qualidade e composição nutricional de produtos lácteos. Para a determinação deste tipo de fraude é quantificado o conteúdo de caseinomacropéptido (CMP), o qual pode estar presente no leite em uma concentração limite de 30 mg L^{-1} , de acordo com a legislação brasileira. O presente trabalho buscou desenvolver uma metodologia analítica, empregando a técnica de Espectrofotometria UV-Vis para a determinação do CMP em amostras de leite adulteradas com soro de queijo como uma alternativa para as análises de rotina, visando análises rápidas e diretas, com menor custo de operação. Em vista disso, o método proposto demonstrou boa linearidade ($R^2 > 0,99$) para a faixa de concentrações avaliadas de 2, 5, 7, 10, 15 e 20% (v v⁻¹), com limites expressos em termos de absorvância de detecção 0,123 e quantificação 0,405 adequados, além de boa precisão com desvio padrão relativo (DPR) igual a 0,913% e boa exatidão obtendo recuperações na faixa de 79,7 a 104,5%. Ademais, as medidas espectrofotométricas foram sensíveis a concentrações de CMP a partir de 5 mg L^{-1} . Por último, neste estudo foi desenvolvida uma metodologia com menor custo de operação e elevada sensibilidade, oferecendo uma alternativa inovadora e eficiente na determinação de adição de soro ao leite, e ainda alternativa efetiva para laboratórios de qualidade focados em laticínios.

Palavras-chave: Espectrofotômetro UV/Vis, Segurança alimentar, Aminoácidos, caseinomacropéptido, soro de queijo

Introdução

O leite bovino é um biofluido considerado imprescindível para uma boa saúde, impactando no desenvolvimento da microbiota intestinal e sistema imunológico, juntamente a seus derivados lácteos, são considerados nutritivos, completos para uma dieta equilibrada (Foroutan et al., 2019; Nagraik et al., 2021). Apresenta composição química bastante complexa, incluindo diversos macro e micronutrientes, são alimentos abundantes em proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais (especialmente cálcio, magnésio, potássio, zinco e fósforo) (FAO 2013; Foroutan et al., 2019; Warserwicz et al., 2019).

A prática mais comum de adulteração em leite consiste na adição de produtos exógenos a sua composição original, mas tal ato inescrupuloso pode ser realizado de outras formas (Nagraik et al., 2021). De acordo com a FDA (do inglês, *US. Food and Drug Administration*), a adulteração alimentar com motivação econômica ocorre visando lucro ou redução nos custos de produção, podendo ser caracterizada como a adição ou substituição intencional de uma substância ao produto alimentício para aumentar seu volume ou melhorar sua aparência (FDA, 2023). Já o código alimentar brasileiro, caracteriza a fraude como ato de “corromper, adulterar, falsificar ou alterar uma substância ou produto alimentícios” destinado ao consumo (Brooks et al., 2021; Onyeaka et al., 2022).

No Brasil, de acordo com dados fornecidos pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária), no ano de 2022 a cadeia produtiva de leite conviveu menores níveis de importação e redução em sua produção, levando a inflação inédita no setor e disparo nos preços dos produtos lácteos, aliado a uma alta generalizada nos preços dos alimentos, um menor consumo de leite foi observado entre os brasileiros (Embrapa, 2023).

A adição do soro de queijo ao leite é uma das adulterações consideradas mais comuns, por ser um subproduto da produção de queijo, apresentar menor valor comercial e gerar maior rendimento ao leite. A detecção do soro de queijo nas análises de rotina em laticínios é complexa, uma vez que sua composição se assemelha bastante ao leite, assim como suas características físico-químicas, como índice de crioscopia e densidade. Entretanto, este tipo de fraude leva a uma redução da qualidade, composição nutricional dos produtos lácteos, além de gerar riscos à saúde dos consumidores por

conterem substâncias tóxicas como peróxido de hidrogênio ou formol (Cortez et al., 2010; Abrantes et al. 2014; Lobato et al., 2020).

A detecção de leite adulterado com soro baseia-se na identificação do índice de caseinomacropeptídeo (CMP), liberado durante a coagulação do leite, o CMP é um peptídeo resultante da hidrólise da ligação peptídica da k-caseína entre os aminoácidos 105-106 Phe-Met. Dessa hidrólise, são formados a para-kcaseína (1-105), que permanece nas micelas de caseína, e o CMP, que permanece no soro (Recio et al., 2000; Lobato et al., 2020). Conforme descrito na normativa 69/2006, a legislação brasileira proíbe a adição de soro ao leite, permitindo níveis de até 30 mg L⁻¹ de CMP para o leite destinado ao consumo direto e até 75 mg L⁻¹ de CMP pode ser destinado para a produção de derivados lácteos (Brasil, 2006).

O método internacionalmente reconhecido para identificação de soro no leite, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Entretanto, deve-se considerar que tal técnica exige profissionais qualificados, equipamentos e solventes ultrapuros, além de ser uma técnica laboriosa que requer frequente manutenção do equipamento, sendo, portanto, dispendiosa e impraticável para análises de rotina (Magalhães 2008). Contudo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias analíticas que permitam a determinação rápida e direta do índice de CMP, visto que em laboratórios dedicados a garantia do controle de qualidade de laticínios é necessário agilidade para as tomadas de decisões em torno dos produtos recebidos.

Pensando nisso, a Espectrofotometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta-Visível (Espectrofotômetro UV-Vis) apresenta-se como uma alternativa para análises de rotina. A técnica apresenta baixo custo de operação, simplicidade de aplicação, além de elevada seletividade, uma vez que as substâncias a serem analisadas absorvem energia apenas em determinados comprimentos de onda contidos no espectro ultravioleta-visível (Yang et al., 2021 e Lyndgaard, et al., 2014). Os peptídeos do CMP têm maior concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e são capazes de absorver energia somente na faixa de 205 a 217 nm (Kilara et al., 2011; Oliva et al., 2002).

Sendo assim, a técnica de espectrofotometria UV-Vis apresenta grande potencial em atender as necessidades dos laboratórios de controle de qualidade para laticínios por apresentarem rapidez de análise, baixo custo e sensibilidade frente a detecção de adição de soro ao leite.

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver uma metodologia capaz de determinar o índice de CMP em baixas concentrações nas amostras de leite que foram adulterados com soro de queijo, de forma rápida e com baixo custo de análise.

Materiais e métodos

Reagentes e soluções

Para o preparo de todas as soluções, utilizou-se água ultrapura (condutividade elétrica = $1.106 \mu\text{S cm}^{-1}$), obtida em sistema de destilação Milli-Q® (Millipore®, USA) coagulante BIOMAZ Quimosina Líquida 600 IMCU/ mL (Biotech Brasil Fermentos e Coagulantes, Ltda.®, Alto Piquiri – PR) foi utilizado na obtenção do soro de queijo.

Uma solução estoque de CMP (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.®, Diadema – SP) foi necessária para o preparo das soluções padrão ($10 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em meio do leite e água deionizada, que por sua vez foram necessárias para a determinação da curva de calibração analítica, obtida pelo método de calibração externa.

Um kit de teste rápido (Milk Rapid Teste Kit, BIOASY®) (Somaticell Comercio de Diagnósticos Ltda.®, Jundiaí - SP) foi empregado para a determinação rápida do teor de CMP. A precipitação do CMP foi feita com ácido tricloroacético (TCA) 24% ($v v^{-1}$).

Instrumentação

Para o preparo das amostras, foram utilizados um banho ultrassônico (Elmasonic P, ELMA®, Brasil) e centrífuga (Harrier 18/80, Sanyo MSE®, Kent, Reino Unido).

As análises físico-químicas sucederam-se mediante uso de pHmêtro (FiveGo pH meter F2, Mettler Toledo®, China), acidímetro (Acídímetro Dornic, Gerber®, Brasil) para acidez, crioscópio (540 FLEX, Instrumentos para Laboratório TR, Brasil) para o índice crioscópico e Centrífuga Inox (8 BTF, Instrumentos para Laboratório®, Brasil) para aferir o porcentual de gordura no leite cru.

O índice de CMP das amostras foi determinado através de espectrofotômetro UV-Vis (Genesys 10-S, Thermo Scientific®, USA).

Amostras

O leite cru e o soro de queijo empregados foram adquiridos em laticínio local (Lobato, Paraná, Brasil). As análises físico-químicas para determinação da qualidade das amostras de leite cru foram realizadas de acordo com estabelecido na IN 76 do MAPA (Brasil, 2020). Foram utilizados 6 L de leite e 2 L do soro, que por sua vez foram congelados imediatamente após o recebimento, a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento das análises.

Para a determinação do CMP, seis amostras de leite cru (1 L) foram adquiridas por diferentes produtores locais (Maringá, Paraná, Brasil). Para a continuidade dos estudos, um pool destas amostras foi obtido e refrigerado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análises.

Determinação das Propriedades físico-químicas

Os valores de pH do leite cru e das amostras fortificadas com soro foram determinados seguindo Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal - MAPA / SDA 1° Ed. 2022.

A acidez das amostras foi determinada seguindo a norma AOAC 947.05:2019. A estabilidade ao alizarol e a densidade a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram determinadas seguindo o descrito no Instituto Adolfo Lutz em Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.

Para determinação do índice de crioscopia foi utilizado o método IDF 108 - ISO 5764:2009, e por fim para análise de lipídios foi determinada conforme o método NMKL 40:2005.

Determinação do CMP por Espectrofotômetro UV-Vis

A partir do *pool* de amostras, foi preparado o branco analítico, e as soluções padrão fortificadas com diferentes concentrações 10, 20, 30, 60, 100 ($\mu\text{g. ml}^{-1}$) de CMP, conforme procedimento de preparo da curva de calibração descrito no MET POA/04/03/01, que por sua vez foram empregadas na obtenção da curva analítica. Também a partir destas amostras foi adicionado o soro de queijo em concentrações correspondentes a 2, 5, 7, 10, 15 e 20% (v v^{-1}).

O CMP foi separado das outras proteínas do leite através de procedimento de precipitação com 5 mL de TCA e 10 mL da amostra em tubos de ensaio. Em seguida, os tubos foram levados a banho ultrassônico por 20 min em uma frequência de 37 kHz e centrifugados a 6000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi recolhido e filtrado por uma membrana de filtro de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,40 µm. A partir do filtrado recolhido, alíquotas de 5 µL foram diluídas em 3 mL de água destilada.

As leituras de absorvância foram obtidas em comprimento de onda (λ) de 205 nm por meio da técnica de Espectrofotometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta/Visível (Espectrofotometria UV/VIS). Todas as amostras foram analisadas em replicatas ($n = 4$)

Resultados e Discussões

Análises Físico-Químicas

Análises físico-químicas, incluindo pH, densidade, acidez, estabilidade ao alizarol, índice crioscópico e porcentagem de gordura, são análises de rotina para recebimento de amostras de leite em laboratórios focados em laticínios (Cortez et al., 2010; Brasil, 2020). Através destes parâmetros é possível obter informações a respeito da qualidade do leite analisado, como por exemplo, agentes microbianos, reconstituintes de densidade, neutralizantes de acidez, e outros (Cortez et al., 2010). Dessa forma, anterior a determinação dos níveis de CMP por espectrofotometria na região do UV-Vis, foram averiguadas algumas das propriedades físico-químicas das amostras de leite cru com e sem adição de soro de leite. Os resultados obtidos para acidez, pH, estabilidade, crioscopia, densidade e teor de gordura nas amostras fortificadas com 0 a 100% de soro encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos determinados em leite cru e fortificado com diferentes níveis de soro de leite.

% de soro adicionado ao leite	ACIDEZ	pH	EST	CRI	DEN	GOR
0	0,14	6,91	85	0,534	1,0318	3,6
1	0,14	6,81	85	0,537	1,0306	3,6

2	0,14	6,82	85	0,533	1,0306	3,6
3	0,14	6,81	85	0,531	1,0306	3,6
4	0,14	6,82	85	0,533	1,0306	3,5
5	0,14	6,75	85	0,533	1,0306	3,4
7	0,14	6,80	80	0,537	1,0308	3,3
9	0,14	6,78	80	0,533	1,0308	3,3
11	0,14	6,76	80	0,530	1,0308	3,3
20	0,14	6,80	76	0,539	1,0320	2,8
30	0,13	6,80	72	0,533	1,0308	2,7
40	0,13	6,75	68	0,535	1,0306	2,3
50	0,13	6,79	68	0,534	1,0310	2,0
60	0,12	6,73	68	0,532	1,0306	1,7
70	0,12	6,72	68	0,531	1,0288	1,7
80	0,10	6,65	68	0,530	1,0290	1,0
90	0,10	6,65	68	0,529	1,0286	0,6
100	0,09	6,61	68	0,525	1,0276	0,3

ACIDEZ = Teor de Acidez Titulável (g de ácido láctico 100 mL⁻¹); EST = Estabilidade do leite no alizarol (%); CRI = Ponto de Congelamento (°H); DEN = Densidade do leite à 15 °C (g L⁻¹); GOR = Teor de gordura (%).

Conforme descrito na Instrução Normativa N° 76 (IN 76), implementada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2020), os teores de acidez titulável do leite devem estar dentro da faixa de concentrações de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico por 100 mL de leite. Analisando os resultados explanados na **Tabela 1**, observa-se que na faixa de 0 a 20% de soro adicionado ao leite, a acidez titulada correspondia a 0,14 g de ácido láctico 100 mL⁻¹, não sendo possível observar variação destes parâmetros nestes pontos de concentração. Após 30% de soro adicionado, os teores de acidez titulável para as amostras analisadas ficaram fora da faixa permitida pela IN 76. Além disso, o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a acidez e o teor de soro adicionado foi igual a - 0,96, indicando uma relação inversamente proporcional entre os parâmetros avaliados. Já para o pH, a média obtida para as 18 amostras fortificadas com soro foi de 6,79, também sendo possível observar uma correlação negativa entre os valores medidos para o pH e o adulterante estudado (r = - 0,87). Estes

resultados sugerem que quanto maior for o nível de adulteração com soro, maior será a acidez do leite cru.

Ainda de acordo com IN 76, a porcentagem mínima aceitável de estabilidade ao alizarol para amostras de leite corresponde a 72% ($v v^{-1}$). Para esta análise, observou-se que de 0 a 5% de soro adicionado ao leite, a estabilidade correspondeu a 85 %, havendo um decréscimo na faixa de 7 a 20%, e a partir de 30% de soro adicionado, as amostras apresentaram valores de estabilidade fora do permitido pela legislação, correspondendo a resultados menores que 72%.

Também foi determinado o teor de gordura no leite, onde os pontos de 20 a 100% de soro adicionado apresentaram, em média, resultados 2,1 vezes menores do que para aqueles determinados na faixa compreendida entre 0 a 11%. Mediante os valores obtidos para esta análise, conclui-se que a partir de 20% de adulteração com o soro, o teor de gordura no leite entra em desacordo com a IN 76, onde a concentração mínima de gordura deve ser de 3,0 g a cada 100 g de leite.

O ponto de congelamento foi avaliado através de análise crioscópica e a resposta expressa em termos de graus Hortvet negativos. Para as amostras analisadas, os resultados variaram de -0,530 a -0,539 °H, e apenas a partir de 90% de soro adicionado ao leite foi possível observar não conformidade com a norma, a qual estabelece que o índice crioscópico deve estar na faixa de -0,530 a -0,555 °H. (Cortez et al., 2010) e seus colaboradores avaliaram a adição de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado ao leite e observaram que apenas sob adição de água era possível notar alteração no índice crioscópico da amostra. Apesar de ser rico em água, a presença de lactose, proteínas solúveis e sais minerais no soro agem de forma a diminuir seu índice crioscópico (Carvalho et al., 2007), o que explica o fenômeno observado nas amostras estudadas.

A densidade relativa do leite, de acordo com as metodologias oficiais, deve ser obtida a 15 °C, e os valores aceitáveis para este indicador devem estar compreendidos entre 1,028 a 1,034 ($g mL^{-1}$). A partir da **Tabela 1**, conclui-se que quase todos os pontos de concentração de soro adicionado apresentaram resultados de densidade dentro da faixa estabelecida (1,028 a 1,034 $g mL^{-1}$), exceto para 100% de soro adicionado ao leite, onde a ordem de densidade obtida foi igual a 1,028 $g mL^{-1}$.

Os resultados obtidos concordam com estudo conduzido por (Alves et al., 2018), onde até 10% de adição de qualquer tipo de soro (soro de coalhada, soro ácido e soro de coalhada acidificado) não foi detectado qualquer extrapolação aos limites estabelecidos

para as propriedades físico-químicas em amostras de leite. A detecção de soro de queijo adicionado ao leite em análises de rotina é bastante complexa, uma vez que ambos compartilham da mesma matriz orgânica, tornando difícil distinguir as mudanças nas propriedades do leite após adição do adulterante (Abrantes et al., 2014; Alves et al., 2018).

Conclui-se que a avaliação das propriedades estudadas não é suficiente para detecção de fraude por adição de soro de queijo em leite cru, uma vez que apenas a partir de 20% de soro adicionado foi possível observar alteração nos parâmetros avaliados.

Validação do método por Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do Ultravioleta-Visível

A validação do método desenvolvido foi realizada com base no guia de validação de métodos analíticos INMETRO (Orientação sobre validação de métodos analíticos) (INMETRO, 2020). Para determinação das figuras de mérito, primeiramente foram realizadas leituras de absorbância das soluções padrão ($\lambda = 205 \text{ nm}$), preparadas em meio do leite cru, com adição de CMP na faixa de concentrações compreendida de 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir do método de calibração por adição de padrão empregado, obteve-se a equação da reta $y = 0,0236x + 0,4439$, com coeficiente de correlação linear (R^2) acima de 0,99 ($R = 0,997$), indicando que o método apresentou linearidade satisfatória para a faixa de concentrações empregada.

O limite de detecção (LD) instrumental, expresso em termos de absorbância, foi de 0,123 e o limite de quantificação (LQ) igual a 0,405. A precisão foi avaliada através da precisão intermediária, onde o leite com 15% de adição do soro foi analisado em três dias diferentes, obtendo um desvio padrão relativo (DPR) igual a 0,913%, indicando uma boa concordância entre os resultados.

Por fim, a exatidão foi avaliada por meio de estudos de adição e recuperação a partir da adição de três níveis de concentração do adulterante a amostra. Dessa forma, foram adicionadas as concentrações de 5, 10 e 20% de soro, obtendo recuperações na faixa de 79,7 a 104,5% indicando uma boa confiabilidade dos resultados, estando de acordo com o limite aceitável que é de 80 a 110%.

Determinação do índice de CMP em leite por espectrofotometria no UV-Vis

Como demonstrado pelos resultados determinados na **Tabela 1**, as análises de rotina realizadas no recebimento do leite não são suficientes para identificar fraude por adição de soro, já que ambos se assemelham em suas propriedades físico-químicas. Dessa forma, novas técnicas de análise, como a espectrofotometria UV-Vis, são imprescindíveis para melhor identificar a adição inescrupulosa de substâncias estranhas a composição original do leite cru.

A **Tabela 2** descreve os resultados obtidos em espectrofotômetro UV-Vis a partir da leitura de absorbância das amostras no comprimento de onda igual a 205 nm. Foi determinado que a concentração de CMP no leite sem o adulterante equivalia a 4,78 mg L⁻¹, já a partir de 2% de adição de soro as concentrações variaram de 26,26 a 209,89 mg L⁻¹.

Tabela 2: Determinação do índice de CMP em amostras de leite cru através de medidas espectrofotométricas na região do ultravioleta-visível.

% de soro adicionado ao leite	A _{205 nm} ¹	Concentração (mg L ⁻¹)
0	0,493	4,78 ± 1,51
2	0,661	26,26 ± 1,43
5	0,821	46,92 ± 2,28
7	1,016	73,23 ± 2,64
10	1,293	107,05 ± 1,44
15	1,510	134,76 ± 0,63
20	2,101	209,89 ± 6,39

¹Absorbância lida em 205 nm; resultados expressos em termos de média ± desvio padrão, n = 4.

De acordo com a Instrução Normativa N° 69, de dezembro de 2003, o índice de CMP tolerável para leites destinado ao abastecimento direto não deve ser superior a 30 mg L⁻¹. Isto posto, a partir dos dados determinados na **Tabela 2** é possível concluir que a partir de 5% de adição de soro, o leite pode ser considerado inadequado para o consumo direto, mas adequado para ser direcionado a produção de derivados lácteos. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por (Alves et al., 2018). Nesse estudo, a adição de soro e soro acidificado em laticínios foi determinada através da técnica de CLAE, e os autores determinaram que para amostras fortificadas com soro a

concentração de 30 mg L⁻¹ de CMP estava na faixa de 2 a 4% de adição de soro, já para o soro acidificado, essa concentração era atingida após o acréscimo 3,5% desse adulterante.

Além das medidas de absorvância, a presença de CMP em amostras de leite foi determinada a partir de análises com um kit de teste rápido, baseado na técnica de imunocromatografia, onde o limite de detecção da análise permite reconhecer concentrações de CMP a partir de 30 mg L⁻¹, ou 4% (v v⁻¹) de soro adicionado. Foram analisadas, portanto, as concentrações de 0, 2, 5, 10,15 e 20% de soro e a partir do ponto 2% o teste já indicou positivo para a presença de CMP.

O método desenvolvido apresenta algumas vantagens em relação a determinação do CMP do que pelo teste rápido previamente mencionado, dentre essas vantagens destaca-se a relevante redução nos custos com as análises, uma vez que a análise por meio do método proposto atinge uma média de R\$ 20,00 reais, enquanto a execução do teste rápido de R\$ 52,00 reais. Além disso, o método desenvolvido tem maior sensibilidade, uma vez que o teste é capaz de detectar concentrações do analito apenas a partir de 30 mg L⁻¹, já a metodologia proposta foi capaz de determinar valores inferiores a 5 mg L⁻¹. Ademais, através do teste rápido é possível fazer apenas análises qualitativas da presença do CMP, enquanto através das leituras de absorvância das amostras por espectrometria UV-Vis é possível quantificar com determinada confiabilidade o teor do analito.

Em relação a análises pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), é comum que as indústrias enviem amostras para laboratório externo que ocorre em razão do custo elevado para aquisição de equipamentos de cromatografia, além disso, não é justificável o investimento em tais equipamentos para análises em escala industrial, uma vez que são frequentemente utilizados para análises específicas.

Nesse contexto, o custo por análise é consideravelmente mais elevado, variando entre R\$ 400,00 a R\$ 600,00 reais, com um tempo significativo para a obtenção dos resultados, situando-se entre 10 e 20 dias.

Com implementação do método proposto, estima-se que o custo por análise seja reduzido para aproximadamente R\$ 20,00 reais aliados a resultados disponíveis em 30 minutos, sendo do preparo até a finalização da análise, este cenário torna-se viável caso a empresa adquira um equipamento de espectrofotometria, cujo valor é aproximadamente 90% inferior ao de um equipamento de cromatografia, representando uma significativa economia de tempo e custo em comparação com o envio de amostras

para análise em laboratório externo utilizando a metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Conclusão

Em suma, o trabalho buscou desenvolver uma nova forma de detectar adulteração do leite com soro de queijo a partir de um método seletivo para determinação do teor de CMP nas amostras. As medidas espectrofotométricas na região do UV-Vis mostram ser precisas e confiáveis, capazes de monitorar e controlar a qualidade do leite produzido e comercializado, atendendo a demandas dos laboratórios focados em laticínios. O método demonstra ser rápido e de custo acessível, capaz de detectar a adição de soro ao leite em concentrações menores do que 5 mg L⁻¹ de CMP, além de apresentar maior sensibilidade e ser menos dispendioso do que testes imunocromatográficos comumente empregados em análises de rotina. Além disso, seu custo é significativamente inferior ao envio de amostras para análises externas por cromatografia. É importante ressaltar também a facilidade em termos de capacitação técnica para o manuseio de um espectrofotômetro, tornando-o uma opção mais acessível.

Referências

Abrantes, R. M; Campêlo, S. C; Silva, A. B. J. Adulteration of milk: Methods of detection and implications for consumer. Rev Inst Adolfo Lutz, 2014.

Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC). "Determinação de acidez titulável em leite fluído e creme". In: Métodos Oficiais de Análise da AOAC. 21ª ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2019.

Alves, E. P., de Alcântara, A. L. D., Guimarães, A. J. K., de Santana, E. H. W., Botaro, B. G., & Fagnani, R. (2018). Adulteração de leite com soro de coalho acidificado: uma limitação para detecção de caseinomacropéptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência. Journal of Science Food and Agriculture, 98, 3994.

Brasil. (2002). IN 69: Instrução Normativa nº69, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.

Brasil. (2018). IN 76: Instrução Normativa nº 76. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos. Secretaria de Defesa Agropecuária.

Brooks, C., Parr, L., Smith, J. M., Buchanan, D., Snioc, D., & Hebshy, E. (2021). Uma revisão da fraude alimentar e da autenticidade alimentar em toda a cadeia de abastecimento de alimentos com um exame do impacto da pandemia de COVID-19 e do Brexit na indústria alimentar. *Food Control*, 130, 108171.

Carvalho, B. M. A., Carvalho, L. M., Alcântara, L. A. P., & Bonomo, R. C. F. (2007). Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. *Rede Vet*, 8, 1695.

Cortez, M., Dias, V. G., Maia, R. G., & Costa, C. C. A. (2010). Características físico-químicas e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 65, 2010.

Pesquisa e Agropecuária: Anuário do Leite, 2023. [Link: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1154264/1/Anuario-Leite-2023.pdf>].

Federação Internacional de Laticínios (IDF). IDF 108 - ISO 5764:2009. Leite - Determinação do ponto de congelamento, Bélgica: IDF, 2009.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2013). Leite e produtos lácteos na nutrição humana.

FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA). (2023). Adulteração economicamente motivada (fraude alimentar) 2024.

Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-Fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L., Zheng, J., ... Wishart, D. S. (2019). Composição química do leite de vaca comercial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 4897.

Instituto Adolfo Lutz. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2022.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). (2020). Orientação sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008.

Kilara, A., & Chandan, C. R. (2011). Ingredientes lácteos modificados por enzimas. Em *Ingredientes lácteos para processamento de alimentos*.

Lyndgaard, B. C., Rasmussen, A. M., Engelsen, B. S., Thaysen, D., & Berg, D. V. F. (2013). Passando de procedimentos de limpeza baseados em receitas para baseados em medições: Monitoramento do processo de limpeza no local das unidades de filtragem de soro de leite por espectroscopia ultravioleta e quimiometria. *Journal of Food Engineering*, 118(4), 404-412.

Lobato, P. R., Heringer, J. P. M., Fortini, M. E. R., ... Fonseca, L. M. (2020). Índice de CMP em leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais, Brasil, durante os anos de 2011 a 2017. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72, 641.

Magalhães, A. M. (2008). Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e Pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa. Dissertação de mestrado.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Nome do Documento. 1. ed. Brasília: MAPA/SDA, 2022.

Nagraik, R., Sharma, A., Kumar, D., Chawla, P., & Kumas, A. P. (2021). Detecção de adulterantes de leite: abordagem convencional e de base de biossensor: uma revisão. *Sensors and Bio-Sensors Research*, 33, 100433.

NMKL – Nordval Internacional. NMKL 40. 2005. 2ª Ed. Fedt. Bestemmelse i mælk ved butyrometer-(Gerber) metoden. Conteúdo de gordura. Determinação em leite por butirômetro - método Gerber.

Onyeaka, H., Ukwuru, M., Anumudu, C., & Anyogu, A. (2002). Fraude alimentar em tempos de insegurança: desafios e oportunidades para reduzir a fraude alimentar em África. *Trends in Food Science & Technology*, 125, 26.

Poonia, A., Alok, J. H. A., Sharma, R., Singh, H. B., Ashiwini, K. R., & Sharma, N. (2017). Detecção de adulteração no leite: uma revisão. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 23. doi:10.1111/1471-0307.12274.

Recio, I., Garcia-Risco, M. R., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2001). Caracterização de peptídeos produzidos pela ação de proteinases psicrotróficas na k-caseína. *Journal of Dairy Research*, 67, 625.

Warsewicz, G. H., Rejman, K., Laskowski, W., & Czczotko, M. (2019). Leite e produtos lácteos e seus valores nutricionais: Contribuição para a dieta polonesa média. *Nutrients*, 11(9), 2237.

Yang, B., Guo, W., Liang, I., Zhou, W., & Xhu, X. (2021). Projeto e avaliação de um sistema miniatura de detecção da qualidade do leite baseado em espectroscopia UV/Vis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103698.