

Avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico para determinação da atividade da fosfatase alcalina residual em manteiga

Evaluation of the sensitivity of visual and spectrophotometric Scharer rapid test for determining residual alkaline phosphatase activity in butter

RIALA6/1383

Cláudia Aparecida de Oliveira e SILVA^{1*}, Sebastião Cesar Cardoso BRANDÃO², Antônio Fernandes de CARVALHO², Juraci Alves de OLIVEIRA³

*Endereço para correspondência: ¹ Divisão de Vigilância Sanitária, Fundação Ezequiel Dias/FUNED, Instituto Octávio Magalhães, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, MG, CEP: 30510-010, tel: 31 3314-4685 / 31 9988-5042, e-mail: claudiaufv@yahoo.com.br

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, UFV

³ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, UFV

Recebido: 14.05.2010 - Aceito para publicação: 19.07.2011

RESUMO

A determinação da fosfatase alcalina (ALP) residual é usada na indústria de laticínios há mais de 60 anos para verificar a eficiência da pasteurização. Estudos sobre a atividade dessa enzima em manteiga são escassos no Brasil, cuja avaliação é obrigatória somente para leite pasteurizado. Avaliou-se a sensibilidade do teste rápido de Scharer, modalidades visual e espectrofotométrica, para efetuar a análise da atividade da ALP em manteiga em comparação com a técnica fluorimétrica, cujo limite estabelecido pela Food and Drugs Administration (FDA) é de 350,0 mU/kg de produto. As amostras de manteigas foram preparadas com creme pasteurizado e adicionando-se quantidades de 0,000%; 0,010%; 0,015%; 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v) de creme cru. Pelo teste rápido de Scharer visual foi possível detectar a atividade residual da enzima a partir de concentrações de 0,050% de creme cru. Sua sensibilidade não foi condizente com a do método fluorimétrico, que detectou valores médios de 348,9 mU/kg no produto fabricado com 0,015% de creme cru. A técnica espectrofotométrica demonstrou maior sensibilidade, com detecção de creme cru na concentração de 0,015%, correspondente ao limite estabelecido pela FDA. Modificações técnicas no teste rápido de Scharer são necessárias para melhorar a sensibilidade analítica do ensaio.

Palavras-chave. manteiga, tratamento térmico, fosfatase alcalina, metodologias.

ABSTRACT

Determination of residual alkaline phosphatase (ALP) has been used in the dairying industries for evaluating the efficiency of pasteurization. This study aimed at assessing the sensitivity of Scharer rapid test, both visual and spectrophotometric techniques for determining the activity of ALP in butter, in comparison to the fluorimetric assay, being 350.0 mU enzyme/kg of product the limit established by the Food and Drug Administration (FDA). Butters were made from pasteurized cream and amounts of 0.000%; 0.010%; 0.015%; 0.025%; 0.050% and 0.100% (v/v) of raw cream were added into. By using visual Scharer rapid technique, the enzyme residual activity was detected starting at concentrations of 0.050% of raw cream. This sensitivity was not consistent with that found in fluorimetric methodology, which showed value of 348.9 mU/kg in a manufactured product containing 0.015% raw cream. The spectrophotometric technique showed high sensitivity, detecting raw cream concentration of 0.015%, corresponding to the limit established by FDA. Modifications should be done for improving the analytical sensitivity of the Scharer rapid test.

Keywords. butter, thermal treatment, alkaline phosphatase, methodologies.

INTRODUÇÃO

Pasteurizar o leite ou o creme de leite consiste em destruir, pelo emprego conveniente do calor, a quase totalidade da microbiota banal e toda a microbiota patogênica, quando esta existir, modificando, contudo, o menos possível a estrutura física e o equilíbrio químico do produto, assim como sua constituição e os seus elementos bioquímicos¹.

A fosfatase alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) é uma enzima naturalmente presente no leite. Sua concentração pode variar de acordo com a raça do animal, alimentação, período de lactação, produtividade e ao longo das estações do ano. Por ser a ALP inativada na pasteurização eficiente do leite ou creme de leite, a determinação de seus níveis residuais é usada na indústria de laticínios há mais de 60 anos para comprovar a eficiência do tratamento térmico de pasteurização. Sua resistência térmica é ligeiramente superior à das formas não esporuladas dos micro-organismos patogênicos mais resistentes que podem estar presentes no leite². Assim o tratamento aplicado comercialmente para a pasteurização do leite ou do creme de leite, além de destruir os micro-organismos patogênicos, diminui a atividade dessa enzima a concentrações residuais. Em condições insuficientes de pasteurização, a enzima é reduzida a concentrações acima das consideradas apropriadas, o que pode indicar pasteurização ineficiente ou pós-contaminação com matéria-prima crua³.

Análises laboratoriais para determinação da atividade da ALP são baseadas no princípio de que a enzima hidrolisa ésteres monofosfatados em temperatura e pH determinados, conduzindo à liberação de compostos que podem ser detectados por reações colorimétricas, fluorescência ou luminescência^{4,5}.

O limite de detecção varia entre 0,1% a 0,5% v/v de leite cru adicionado para a maioria dos métodos colorimétricos, podendo-se obter um limite de detecção de 0,006% v/v quando se utiliza o método fluorimétrico^{6,7}.

O método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico é um teste colorimétrico clássico para determinação da ALP⁸. O substrato fenilfosfato de sódio, sob ação da enzima, libera fenol. O fenol reage com CQC (2,6-dicloroquinona 4-cloroimida) formando o indofenol, de coloração azul. O composto formado é detectado visualmente ou espectrofotometricamente por comparação com uma curva de calibração de solução de fenol em água^{3,4}.

No método fluorimétrico (Fluorophos[®]), o produto da reação é fluorescente. Trata-se de um método rápido, muito sensível e atualmente, além do método de quimiluminescência (*Charm Test*), é aceito pela Food and Drugs Administration (FDA) para análise da ALP em leite e produtos lácteos. O limite máximo permitido é de 350 miliunidades (mU) de enzima por litro ou quilograma de produto⁹.

Informações sobre a atividade residual da ALP em manteiga e de avaliações da sensibilidade e dos limites de detecção dos métodos analíticos utilizados para avaliação desse produto são escassas. Fato que ocorre principalmente no Brasil, em que a análise da ALP não é um procedimento analítico obrigatório pela legislação vigente para verificação da eficiência da pasteurização do creme usado para a fabricação da manteiga¹⁰. A maioria dos trabalhos internacionais tem como objeto de pesquisa produtos fluidos, como leite integral e desnatado, leite achocolatado e creme de leite com baixo teor de gordura^{6,11-13}.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade do método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico na determinação da atividade residual da ALP em manteiga, comparando-o com o método fluorimétrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Creme cru integral foi obtido no Laticínio Escola da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Após a análise do teor de gordura pelo método butirométrico de Gerber¹⁴, foi realizada a padronização para 40,0% a 41,0% de gordura com água destilada ou leite desnatado. Em seguida, o creme foi submetido ao tratamento térmico de 85 °C, por 30 minutos. Após os 30 minutos, o creme foi imerso em banho de gelo por aproximadamente 30 minutos até que atingisse temperatura inferior a 20 °C e estocado em geladeira por uma noite para que ocorresse a maturação.

Métodos

Fabricação das manteigas em escala laboratorial

O creme padronizado, pasteurizado e maturado foi adicionado de creme cru nas proporções de 0,000%; 0,010%; 0,015%; 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v). Após a mistura homogênea, iniciou a mistura em batedeira

doméstica da marca Walita, inicialmente na velocidade "1" e, posteriormente, na velocidade "2", até a obtenção da manteiga. O leite foi drenado, a manteiga foi lavada por duas vezes com água gelada, usando-se em cada lavagem o mesmo volume de leite retirado. Foram adicionados 2,0% (m/m) de sal em relação ao peso da manteiga obtida. O produto final foi armazenado em embalagens de polietileno e congelado a -15°C , até o momento da análise. Foram realizadas 10 fabricações de cada concentração de creme cru utilizada, em dias diferentes e determinada a atividade da ALP no creme cru padronizado.

A determinação da atividade da ALP, no creme cru padronizado usado nas fabricações das manteigas foi realizada em duplicata pelo método fluorimétrico, segundo a metodologia descrita por Rocco³ no Standard Methods for the Examination of Dairy Products. O equipamento Fluorophos[®] e todos os reagentes utilizados no método fluorimétrico são fabricados exclusivamente pela Advanced Instrument.

Em função da alta atividade da enzima no creme cru, foi necessário realizar uma diluição 1:1000 (v/v) do creme em água destilada, antes de submetê-lo à análise fluorimétrica.

A dois mililitros da solução de substrato Fluorophos[®], adicionados em cubetas próprias, previamente estabilizadas em bloco de aquecimento a 38°C , por no mínimo 20 minutos, transferiu-se uma alíquota de 75,0 μL da amostra diluída preparada. A cubeta, com a amostra e o substrato, foi tampada com filme plástico tipo PVC, agitada rapidamente, seca com papel absorvente e inserida no porta-cubeta do equipamento.

Após o primeiro minuto, necessário para que ocorresse a estabilização da temperatura, a taxa de fluorescência emitida pela amostra por minuto (F/min) foi medida, automaticamente, durante dois minutos. Uma unidade da enzima ALP corresponde à quantidade da enzima que catalisa a transformação de 1,0 μmol de substrato Fluorophos[®], por minuto, por litro de amostra. Os resultados foram expressos em miliunidades da enzima por litro de creme (mU/L), em função das baixas concentrações da enzima encontrada nos produtos finais. O valor obtido foi multiplicado por mil (fator de diluição da amostra).

Determinação da atividade residual da ALP nas manteigas fabricadas

As manteigas fabricadas em cada repetição foram analisadas quanto à atividade da ALP pelo

método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, e pelo método fluorimétrico (Fluorophos[®]), após 24h a 48h de fabricação, e foram mantidas congeladas até o momento de realização das análises.

Utilizou-se as metodologias descritas por Rocco³ no Standard Methods for the Examination of Dairy Products.

Método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico

As amostras congeladas a -15°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) foram pesadas em porções de 0,5 g diretamente nos tubos de ensaio, em triplicata. Pesou-se também 0,5 g do controle negativo, representado pela amostra de manteiga tratada a 95°C , por 1 minuto. Os tubos foram colocados em banho-maria, a 40°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), por alguns minutos, até derretimento da manteiga. Adicionou-se, a cada tubo, 5,0 mL de solução substrato de trabalho (fenilfosfato dissódico, 0,1% m/v) – concentração simples. Eles foram agitados e incubados em banho-maria a 40°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por exatamente, 16 minutos, contados a partir do momento em que a temperatura no interior de um tubo controle com substrato atingiu 40°C . Após a incubação, seguiu-se a remoção dos tubos e a adição de 0,1 mL de solução CQC 0,3% m/v e 0,1 mL de catalisador sulfato de cobre (CuSO_4) 0,2% m/v, sendo novamente incubados por mais cinco minutos a 40°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Após os cinco minutos, procedeu-se a transferência para o banho de gelo, com temperatura máxima de 10°C por, aproximadamente 15 minutos. Retirou-se, com o auxílio de uma espátula, a fina camada sólida de gordura formada e a fase aquosa de cada tubo foi transferida para tubos limpos e previamente identificados. Adicionou-se 3,0 mL de butanol neutralizado e resfriado a -20°C . Inverteu-se quatro vezes em meio ciclo, ou seja, inverteu-se o tubo em um segundo e pausou-se mais um segundo (meio ciclo). Esse procedimento foi realizado por quatro vezes. Os tubos foram deixados em repouso por dois minutos e então foram repetidos os passos de inversão (quatro tempos em meio ciclo). Obteve-se, dessa forma, a fase alcoólica contendo o indofenol produzido pela reação do CQC com o fenol originado da hidrólise do substrato pela ação da enzima ALP.

Os tubos permaneceram em repouso por duas horas para que fosse possível a obtenção de uma camada alcoólica límpida (camada superior) e posterior análise visual e espectrofotométrica. Ambas as análises foram realizadas com base na comparação dos tubos

das amostras com uma curva de calibração obtida a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de fenol equivalente por mL de solução.

A curva de calibração foi avaliada quanto às premissas de linearidade: diagnóstico de *outliers* pelo resíduo de Jackknife; distribuição normal dos resíduos pelo teste Ryan-Joiner; autocorrelação dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson e homocedasticidade pelo teste de Levene modificado por Brown-Forsythe. Após o atendimento das premissas, foi realizada a análise de falta de ajuste do modelo (desvio da linearidade), por análise de variância (ANOVA)^{15,16}.

Análise visual

Comparou-se a coloração dos tubos de cada amostra com o tubo do controle negativo e com os tubos da curva de calibração. As amostras cujos tubos apresentaram coloração azulada, igual ou mais intensa que o tubo da curva de calibração que continha 1,0 µg de fenol/g de amostra ou coloração mais intensa que o tubo do controle negativo foram consideradas positivas para a atividade residual da ALP. Já as amostras que apresentaram coloração (translúcida) igual ao tubo da curva de calibração que continha 0,0 µg de fenol/g de amostra ou igual ao tubo do controle negativo foram consideradas negativas.

Análise espectrofotométrica

Realizou-se a determinação da absorvência da fase alcoólica dos tubos da curva de calibração e das amostras, em espectrofotômetro (Shimadzu, model 1240 UV-Visível) no comprimento de onda de 650nm. Para obtenção das concentrações de fenol em cada amostra analisada, em µg de fenol/g de manteiga, utilizou-se a equação da reta obtida por meio da leitura da curva de calibração e dos valores de absorvência líquida das amostras. Para amostras que tinham um “branco” (controle negativo), como era o caso da manteiga, subtraiu-se a absorbância desse branco da presente na amostra e obteve-se assim a absorvência líquida^{3,4}.

Avaliação da atividade da ALP pelo método fluorimétrico

Para o preparo da amostra de manteiga utilizou-se os procedimentos descritos no manual do equipamento¹⁷. Pesou-se 0,5 g de cada amostra de manteiga em um tubo de ensaio e adicionou-se 5,0 mL da

solução tampão de extração (*Cheese Extraction Buffer*). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria, a 38 °C, por 10 minutos. Cada tubo foi agitado em Vortex na velocidade máxima por exatamente um minuto. Partindo-se da solução aquosa, realizou-se a análise da atividade da ALP no equipamento Fluorophos®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variação da atividade da ALP no creme cru padronizado

As amostras de creme cru usadas na fabricação das manteigas, nas 10 repetições realizadas, foram obtidas durante os meses de maio, junho e julho e apresentaram os valores mínimo, máximo e médio para a atividade da ALP descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade da ALP, determinada pelo método fluorimétrico, no creme cru padronizado utilizado para fabricação das manteigas nas 10 repetições

Valor encontrado	Atividade de ALP (mU/L)
Mínimo	9.872.500
Máximo	28.733.500
Médio	16.644.150
Coefficiente de variação (CV %)	30,08

Em função dessas variações, a quantidade de creme cru adicionada ao creme pasteurizado que correspondia a uma atividade residual da ALP de 350,0 mU/kg (valor limite estipulado pela FDA, utilizando o método fluorimétrico) na manteiga encontrou-se dentro do intervalo de 0,010% a 0,025% (v/v).

Ao estudar a atividade da ALP pelo método fluorimétrico em leite fluido integral na primavera e no verão, Castro¹⁸ encontrou valores de atividade entre 516.800 mU/L e 1.519.800 mU/L. A autora verificou que a adição de 0,025% a 0,050% (v/v) de leite cru ao leite pasteurizado correspondia ao limite de 350,0 mU/L estabelecido pela FDA⁹.

A diferença nos valores encontrados para creme de leite e leite pode ser explicada principalmente pelo fato de haver uma maior concentração da enzima na fração gordurosa dos produtos lácteos. A enzima, apesar de não ser lipossolúvel, encontra-se adsorvida entre os glóbulos de gordura^{7,11}. Logo, a quantidade de creme cru necessária para atingir o limite máximo permitido de atividade residual da ALP é muito inferior que a quantidade de leite cru necessária, sem levar em

consideração fatores como estação do ano, período de lactação, entre outros.

Resultados da atividade residual da ALP nas manteigas pelos métodos rápidos de Scharer, visual e espectrofotométrico e fluorimétrico

As curvas de calibração obtidas a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de fenol equivalente por mL de solução, apresentaram coeficiente de determinação (r^2) entre 0,9979 e 0,9999.

O modelo atendeu a todas as premissas de linearidade (detecção de *outliers*, distribuição normal dos resíduos, ausência de autocorrelação entre os resíduos e homocedasticidade). Quando avaliada a falta de ajuste do modelo linear simples por ANOVA, o mesmo apresentou regressão significativa e falta de ajuste não significativa (α : 0,05).

Tabela 2. Curvas de calibração utilizadas nas repetições realizadas para avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico

Repetição	Curva de calibração	Coefficiente de determinação (r^2)
1	$\hat{y} = 0,0653X + 0,0015$	0,9993
2	$\hat{y} = 0,0634X - 0,0034$	0,9998
3	$\hat{y} = 0,0606X + 0,0061$	0,9979
4	$\hat{y} = 0,0601X + 0,0063$	0,9997
5	$\hat{y} = 0,0657X - 0,0050$	0,9995
6	$\hat{y} = 0,0642X + 0,0081$	0,9995
7	$\hat{y} = 0,0625X + 0,0058$	0,9989
8	$\hat{y} = 0,0641X + 0,0091$	0,9990
9	$\hat{y} = 0,0697X + 0,0035$	0,9999
10	$\hat{y} = 0,0664X + 0,0103$	0,9994

Tabela 3. Análise de variância para o ajuste do modelo linear simples utilizado para cálculo da curva de calibração (µg de fenol/mL de solução) para determinação da atividade de ALP residual em manteiga

FV	GL	SQ	QM	F	Fcritico
Regressão	1	0,64390	0,64390	15785,99737	4,84434
Resíduo	11	0,00045	0,00004		
Falta de ajuste	3	0,00013	0,00004	1,06456	4,06618
Entre níveis	4	0,64402			
Erro puro	8	0,00032	0,00004		
Total	12	0,64434			

Em comparação com o controle negativo (manteiga tratada a 95 °C, por um minuto), foi possível distinguir o resultado positivo a partir da adição de 0,025% de creme cru, sendo que para as concentrações de 0,050% e 0,100% obteve-se resultados positivos em todas as repetições realizadas.

Já em relação ao o tubo 1,0 µg/mL da curva de calibração, apenas 30,0% das amostras contaminadas com 0,025% de creme cru apresentaram resultado positivo, o que indica uma menor sensibilidade quando se utiliza essa forma de comparação.

Soares¹⁹ ao trabalhar com leite fluido e queijo Minas padrão, também encontrou dificuldades na comparação visual da curva de calibração com as amostras analisadas. Queijos tipo mussarela, ricota, Minas frescal e Minas padrão foram analisados por Oliveira et al.²⁰, quanto à atividade residual da ALP, concluindo que a curva de calibração utilizada foi inapropriada para a interpretação visual dos resultados, devido à grande variação nas tonalidades de azul obtida para os diferentes tipos de queijos.

Métodos fluorimétricos^{6,21} utilizam curvas de calibração para cada produto analisado, sendo as concentrações conhecidas do produto de reação adicionadas a uma amostra do produto a ser testado. Já o método rápido de Scharer utiliza uma mesma curva para todos os produtos lácteos, elaborada a partir de soluções de fenol em água. Como os constituintes dos produtos influenciam na tonalidade da coloração obtida, os padrões podem não corresponder a essa variação de tonalidade, o que dificulta a interpretação dos resultados.

No método espectrofotométrico foi possível detectar a presença de atividade da ALP a partir de 0,010% de creme cru, mas só em concentrações acima de 0,050% atingiu-se o limite de 1,0 µg de fenol/g de amostra. Esse limite é citado por Rocco³ como a concentração residual de enzima que indica pasteurização imprópria ou contaminação com matéria-prima não pasteurizada, o que equivaleria a, aproximadamente, 0,10% de contaminação com creme cru. Observou-se que para a manteiga esse valor seria aproximadamente a metade, ou seja, 0,050% de creme cru adicionado ao creme pasteurizado (Tabela 4).

O método de Scharer espectrofotométrico para a análise de manteiga apresentou linearidade de resposta para as adições de creme cru (v/v) utilizadas. Ao relacionar a porcentagem de creme cru adicionado

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos pelo método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico e fluorimétrico nas 10 repetições realizadas

Creme cru % (v/v)	Scharer Visual (Resultado Positivo)		Espectrofotométrico (µg de fenol/g)	Fluorimétrico (mU/Kg)
	CN*	Padrão** (1,0 µg/mL)	Valores médios	Valores médios
0,000	0 (0%)	0 (0%)	-0,06 + 0,10	ND***
0,010	0 (0%)	0 (0%)	0,08 + 0,12	ND***
0,015	1 (10%)	1 (10%)	0,19 + 0,16	348,9 +/- 83,4
0,025	8 (80%)	3 (30%)	0,33 + 0,23	544,1 +/- 89,3
0,050	10 (100%)	10 (100%)	0,83 + 0,38	1.144,7 +/- 331,2
0,100	10 (100%)	10 (100%)	1,72 + 0,62	ND***

*comparando os tubos com a coloração obtida no Controle Negativo (CN)

**comparando com o tubo da curva padrão que contém 1,0 µg de fenol equivalente/mL

*** ND = não determinado

(v/v) e a quantidade de µg de fenol/g de amostra, obteve-se a equação: $\hat{y} = 18,044X - 0,0865$ e coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9989. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9995, o que implica em forte relação entre a quantidade de creme cru adicionada e a atividade residual da ALP em manteiga.

Em cada repetição, analisou-se, pelo método fluorimétrico, a manteiga com menor concentração de creme cru adicionado que apresentava resultado visual positivo pelo método rápido de Scharer e a de maior concentração que apresentava resultado visual negativo. Com essas análises, pretendeu-se estabelecer a comparação da sensibilidade e do limite de detecção do método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, com o método fluorimétrico.

Ao comparar os três métodos utilizados e ao adotar como parâmetro o valor de atividade de ALP estabelecido atualmente pela FDA de 350,0 mU/kg, pelo método fluorimétrico, pode-se concluir que o método rápido de Scharer visual não foi sensível o suficiente para detectar esse valor e sim apenas valores para a enzima, em média, superiores a mil mU/kg de manteiga. No entanto, para a manteiga, esse método foi mais sensível do que para leite fluido, como indicam os trabalhos de Castro¹⁸, que apenas detectou a presença de ALP pelo método visual com a adição de no mínimo 1,0% de leite cru ao pasteurizado, o que correspondia a uma atividade próxima a 8 mil mU/L de leite.

Ao analisar o queijo Minas padrão pelo mesmo método, Soares¹⁹ concluiu que somente a partir de concentrações de 0,50% de leite cru era possível detectar

resultados positivos nas amostras de queijo pelo método visual, o que evidencia a maior sensibilidade do método rápido de Scharer visual para manteiga, em relação aos outros dois produtos estudados.

A maior sensibilidade do método visual para manteiga pode ser associada principalmente à maior atividade da ALP no creme do que no leite e, também possivelmente por características intrínsecas do produto, o que possibilita a melhor visualização da coloração azul na manteiga do que em amostras de leite e de queijo.

Uma atividade da ALP de aproximadamente 350,0 mU/kg de manteiga correspondeu, em média a 0,19 µg de fenol/g de amostra, pelo método espectrofotométrico. Esse valor foi relacionado a quantidades adicionadas de creme cru que variaram entre 0,010 a 0,025% (v/v), sendo que na maioria das repetições este valor foi igual a 0,015% (v/v).

A relação encontrada entre a porcentagem de creme cru adicionada e a atividade residual da ALP na manteiga, torna evidente o fato de que o limite de 1,0 µg de fenol/g de amostra estabelecido para este método corresponde a valores muito superiores ao limite de 350,0 mU/kg. No caso da manteiga, 0,050% de contaminação com creme cru corresponderam a valores médios de 1.144,0 mU/kg. Logo esse limite residual da atividade da ALP deve ser revisto e determinado para cada produto lácteo individualmente, de forma que para todos eles o limite estabelecido seja equivalente ao valor máximo de 350,0 mU/kg pelo método fluorimétrico.

Entre os métodos utilizados, o fluorimétrico é o mais rápido, apresenta alta especificidade para atividade

da ALP, alta sensibilidade, baixo limite de detecção, quantificação automática da atividade da enzima e registro impresso. No entanto, apresenta a desvantagem de possuir alto custo por análise, pois todos eles são importados e fornecidos unicamente pela Advanced Instruments, detentora da patente do método.

O método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico apresentou, para análise de manteiga, algumas limitações. Observou-se a dificuldade de se comparar a coloração das amostras com a coloração da curva de calibração, em função das diferenças na tonalidade da coloração azul. Era constante a ocorrência de contaminações pela presença de fenol livre nas vidrarias utilizadas e instabilidade dos reagentes preparados, o que demonstra a inespecificidade do método.

Problemas semelhantes foram citados por Soares¹⁹. A autora explicitou a necessidade do uso de 30 mL de butanol para garantir que todo fenol livre fosse retirado da solução de substrato, o que foi confirmado no presente trabalho. O método oficial determina o uso de apenas 3 mL para realização dessa extração.

No decorrer das análises observou-se que a forma e a velocidade de inversão dos tubos da curva de calibração para extração do indofenol interferiam diretamente nos resultados. Essa etapa do procedimento analítico não é muito bem detalhada na metodologia, que cita apenas que os tubos devem ser invertidos por seis voltas completas. Essa subjetividade dá margem à ocorrência das variações acima citadas e podem comprometer assim os resultados do trabalho desenvolvido.

CONCLUSÃO

O método rápido de Scharer visual possui limite de detecção superior ao correspondente a 350,0 mU/kg, portanto não apresentou sensibilidade satisfatória para determinação visual da ALP em manteiga.

O método espectrofotométrico foi mais sensível que o visual, e foi capaz de detectar a atividade da ALP na manteiga correspondente a atividade de 350,0 mU/kg, porém, observa-se a necessidade de implementar modificações na metodologia, além de determinar um novo limite, pois a quantidade de fenol correspondente ao limite do método fluorimétrico é bem inferior ao limite de 1,0 µg de fenol/g de amostra estipulado para essa análise.

Apesar dos problemas expostos, o método rápido de Scharer é bastante difundido, de preço mais acessível e possível de ser utilizado nos laboratórios, como análise de rotina para atividade da ALP. Desde que tomados, é claro, os devidos cuidados em sua realização e que sejam realizadas modificações no intuito de garantir uma sensibilidade condizente como método fluorimétrico e a confiabilidade dos resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

1. Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, Boekel MAJS. Chapter 2: Milk Components in Dairy Technology – Principles of milk properties and processes. New York – USA. 1999; p. 91-98
2. Karmas R, Kleyn DH. Determination and interpretation of alkaline phosphatase activity in experimental and commercial butters. *J Dairy Sci*. 1990;73(3):584-9.
3. Rocco RM, Fitts J. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association. Edited by H. Michael Wehr and Joseph F. Frank. 17th Edition, NW Washington, 2004; p. 341-62.
4. Murthy GK, Kleyn DH, Richardson T, Rocco RM. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association. Edited by Robert T. Marshall. 16th Edition, NW Washington, DC. 1992; p. 412-30.
5. Fox PF, Kelly AL. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - part 2. *Int Dairy J*. 2006;16:517-32.
6. Rocco RM. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in fluid dairy products. *J Food Prot*. 1990; 53(7):588-91.
7. Claeys WL, Loey AM, Hendrickx ME. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. *Trends Food Sci Technol*. 2002; 13:293-311.
8. Cornell University – College of Agriculture and Life Sciences. Alkaline phosphatase testing for milk pasteurization. Dairy Science Facts. Department of Food Sciences. Stocking Hall, Ithaca, NY 14853; 1998.
9. Food and Drug Administration - CFSAN/Office of Compliance. Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance. Public health service publication (2003 Revision). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Washington. DC; 2003. 340 p.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Estabelece os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1.
11. Painter CJ. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time/temperature treatments. Thesis [master of science]. Madison (WI): University of Wisconsin-Madison; 1995.
12. Angelino PD, Christen GL, Penfield MP, Beattie S. Residual alkaline phosphatase activity in pasteurized milk heated at various temperatures - measurement with the Fluorophos and Scharer rapid phosphatase tests. *J Food Prot*. 1999;62(1):81-5.

13. Rampling AM, Greenwood MH, Davies GEN. Use of a fluorimetric test for a bovine alkaline phosphatase to demonstrate under-pasteurization of skimmed milk and cream. *Int Dairy J*. 2004;14:691-5.
14. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1. p. 8.
15. Pimentel MF, Neto BB. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Rev Quim Nova*. 1996;19(3):268-77.
16. Souza, SVC. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; 2007.
17. Advanced Instruments. The advanced® fluorometer – user's manual. Advanced Instruments Inc. Dairy and Food Technology Division, Needham Heights, Massachusetts; 1992.
18. Castro PRS. Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa - UFV; 2005.
19. Soares CF. Avaliação de métodos colorimétricos qualitativos e quantitativos para a determinação de atividade de fosfatase alcalina em leite e queijo Minas padrão [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); 2003.
20. Oliveira AMG, Neves VJ, Boaventura RL, Pires LL, Lima LL. Análises de fosfatase alcalina residual em queijos inspecionados pelo Estado de Minas Gerais. XXII Congresso Nacional de Laticínios; Juiz de Fora (MG), julho de 2005; p. 427-430 [anais de congresso].
21. Fenoll J, Jourquin G, Kauffmann JM. Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products. *Talanta*. 2002; 56:1021-6.