

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL**

**CURSO DE QUIMICA INDUSTRIAL**

**UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**KÁTIA VERONICA TENÓRIO**

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS EM  
LEITE BOVINO IN NATURA**

**DOURADOS – MS**

**2014**

**KÁTIA VERONICA TENÓRIO**

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS EM LEITE  
BOVINO IN NATURA**

*Trabalho de conclusão de curso apresentado como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Química Industrial pela Universidade  
Estadual do Mato Grosso do Sul.*

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Claudia Andréa Lima Cardoso

**DOURADOS – MS**

**2014**

KÁTIA VERONICA TENÓRIO

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CROMATOGRÁFICAS EM LEITE BOVINO IN  
NATURA

Dourados, 13 de novembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Andréa Lima Cardoso

(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leila Cristina Konradt Moraes

(Membro)

---

Prof Dr Jonas da Silva Mota

(Membro)

*Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim e me auxiliaram durante a minha caminhada na graduação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mesmo eu tendo me afastado Dele na maior parte do curso, Ele não ter se afastado de mim.

Agradeço também aos meus pais, por absolutamente tudo. Principalmente pelo incentivo aos estudos e a força dada durante toda minha graduação. E a minha irmã, por todos os dias que ela me ajudou.

Agradeço também ao meu tio Adelar, por todos os conselhos, apoio, força e amizade que prestou a mim durante toda minha vida.

A professora e orientadora Cláudia, que dedicou seu valioso tempo para me orientar na realização deste trabalho, além da paciência e por todo conhecimento a mim transmitidos durante suas aulas e durante a execução do trabalho no laboratório.

Aos professores Leila e Jonas por participar da banca e contribuir com críticas construtivas para melhoria e enriquecimento do trabalho.

As técnicas do laboratório de química geral Cássia Canaza Fonseca de Almeida e Sabrina de Avila pela ajuda e colaboração durante minha pesquisa.

Aos meus queridos amigos de graduação quero agradecer os grandes momentos de alegria e também de desespero que compartilhamos. Agradeço especialmente a Laís Calheiros, Vinicius Oliveira, Lidiani Nazaro e Isabela Silva pelos auxílios nos estudos e principalmente nos tediosos relatórios.

A todos os demais professores do curso, por ter disponibilidade de transmitir seus conhecimentos e dirimir todas as nossas dúvidas enquanto alunos.

A todos que passaram pela minha vida durante a graduação eu agradeço de coração, pois me deram forças para nunca desistir e continuar sempre em frente, rumo a um brilhante futuro que me aguarda, se Deus quiser.

Enfim, a todos o meu sincero muito obrigada!

*Comece fazendo o que é necessário, depois  
o que é possível e de repente você estará  
fazendo o impossível.*

SÃO FRANCISCO DE ASSIS

## RESUMO

O agronegócio do leite ocupa um espaço de destaque na economia mundial. Este sistema industrial é um dos mais expressivos do Brasil pela sua importância social, e a atividade leiteira é praticada em todo país, em cerca de um milhão de propriedades rurais. Atualmente, gera mais de três milhões de empregos diretos na produção primária e agrega mais de seis bilhões de Reais ao valor da produção agropecuária nacional. De acordo com *United States Department of Agriculture (USDA)*, o Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo, com produção média de 30.846 m<sup>3</sup> de leite por ano, mostrando assim a importância desta atividade para o país. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda consumo mínimo de 500 mL de leite de qualidade por dia para adultos e 1L para crianças e idosos. Considerando-se a importância do leite para o consumo humano, este estudo teve por objetivo analisar acidez, estabilidade em álcool etílico, resíduos por incineração e alcalinidade dos resíduos e a presença de thiamethoxam em leite bovino in natura. O leite foi coletado em Dourados – MS, durante o ano de 2014. As análises físico-químicas de foram realizadas empregando metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz e a presença do thiamethoxam foi investigada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Pelas análises físico-químicas realizadas o leite bovino in natura analisado está dentro dos padrões estipulados pela legislação, exceto pela amostra 1 no parâmetro de acidez. Também não foi determinada a presença de thiamethoxam nas amostras analisadas.

**Palavras-chave:** Leite, Análises, Físico-Químicas, Cromatográficas, Thiamethoxam

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>08</b>
<b>1.1 ASPECTOS GERAIS</b>	<b>08</b>
<b>1.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO</b>	<b>09</b>
<b>1.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE BOVINO</b>	<b>10</b>
<b>1.4 CONTAMINANTES DO LEITE BOVINO</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>15</b>
<b>3.1 COLETA DO MATERIAL DE ANÁLISE</b>	<b>15</b>
<b>3.2 MATERIAIS E REAGENTES</b>	<b>15</b>
<b>3.2.1 Preparo de Soluções</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2 Soluções Comerciais</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3 Materiais Utilizados</b>	<b>16</b>
<b>3.3 METODOLOGIA</b>	<b>17</b>
<b>3.3.1 Determinação da Acidez do Leite Bovino</b>	<b>17</b>
<b>3.3.2 Estabilidade em Álcool Etílico 68 e 70%</b>	<b>17</b>
<b>3.3.3 Determinação de Resíduos por Incineração (Cinzas)</b>	<b>17</b>
<b>3.3.4 Determinação da Alcalinidade das Cinzas em Carbonato de Sódio</b>	<b>17</b>
<b>3.3.5 Identificação da Presença de Pesticidas por Análise Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b>	<b>17</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
<b>4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS</b>	<b>19</b>
<b>4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS</b>	<b>20</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>22</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>23</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>26</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS

O leite é um alimento de grande importância na alimentação humana, devido ao seu elevado valor nutritivo, como fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas. Desta forma torna-se também um excelente meio para o crescimento de vários grupos de micro-organismos desejáveis e indesejáveis (VENTIRINI et al., 2007).

Do ponto de vista de saúde pública, ocupa lugar de destaque em nutrição humana, pois se constitui em um alimento essencial para todas as idades, principalmente recém-nascidos, o mesmo se aplica para todos os derivados lácticos (NASCIMENTO et al., 2001). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o consumo diário mínimo de 500 mililitros de leite por dia para um adulto e mínimo de um litro durante a adolescência e a terceira idade. Entretanto, no Brasil, o consumo médio do produto *per capita* é inferior a um copo diário, cerca de 170 mL (COSTA, 2005).

O leite é composto por 100.000 tipos de moléculas diferentes, o que lhe confere um alto grau de complexidade, pois cada uma destas moléculas apresenta uma função específica, propiciando nutrientes ou proteção imunológica para o neonato (VELOSO et al., 2002).

Os avanços nas técnicas relacionadas às etapas de produção, processamento e distribuição do leite têm favorecido ainda mais o seu consumo, principalmente o de origem bovina (LANGONI et al., 2011). Essas etapas, porém, induzem a alterações bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas, nutricionais, sensoriais e reológicas, que tratam do comportamento mecânico quando este é consumido, que podem comprometer a qualidade do produto final (LEVY-COSTA e MONTEIRO, 2004).

O leite deve passar pelo processo de pasteurização, que pode ser lenta ou rápida. A pasteurização serve para garantir ao consumidor um leite de melhor qualidade, livre de micro-organismo. Na pasteurização rápida, o leite é aquecido à temperaturas entre 72 e 75°C por um tempo que pode variar de 15 a 20 segundos. Após esse tratamento térmico, o leite é resfriado à 5°C e, em seguida, é embalado e estocado em câmaras refrigeradas. Na pasteurização lenta o leite é aquecido a 63°C durante 30 minutos e passa por resfriamento natural (GABBI, 2013).

Dependendo do processo em que o leite é conduzido para o processamento, ele pode ser classificado. De acordo com a Instrução Normativa 51 de 18 de setembro de 2002 o leite recebe as seguintes denominações A, B ou C (MAPA, 2014). Essas denominações são

determinadas a partir da contagem de micro-organismos presentes no leite, ou a partir de análises físico-químicas de propriedades do mesmo (VENTIRINI et al., 2007).

O leite tipo A é oriundo de um controle mais rigoroso na produção e higienização do leite. O leite é pasteurizado e embalado na própria fazenda, existindo, portanto, uma menor quantidade de micro-organismos. O leite tipo B é transportado para indústria em qual ele é pasteurizado e embalado e já o leite tipo C é aquele pasteurizado e embalado na indústria, tendo uma maior quantidade de micro-organismos. O leite tipo A e B possuem mais e 3% de gordura, enquanto no leite tipo C, essa quantidade é reduzida para menos de 3% (VENTIRINI et al., 2007).

## 1.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO

O constituinte quantitativamente mais importante do leite, em geral, é a água, na qual estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes. A maior parte da água presente no leite está como água livre, embora haja água ligada a outros componentes, como proteínas, lactose e substâncias minerais (GALVÃO e SILVA, 2009).

O leite bovino também é bastante rico em gordura, que se encontra principalmente em glóbulos, contendo triglicerídeos, envolvidos por uma membrana lipoproteica. O leite de vaca possui aproximadamente 440 ésteres de ácidos graxos e os principais são o ácido palmítico e o ácido oleico. A gordura é o constituinte que mais sofre variação em razão da alimentação, estação do ano e período de lactação do animal (GUIMARÃES et al., 2013).

No leite estão presentes todas as vitaminas conhecidas. As vitaminas A, D, E e K estão associadas aos glóbulos de gordura e as demais ocorrem na fase aquosa do leite. A concentração das vitaminas lipossolúveis depende da alimentação do gado, exceto a vitamina K. Esta, como as vitaminas hidrossolúveis, é sintetizada no sistema digestivo dos ruminantes (GALVÃO e SILVA, 2009).

O leite bovino também possui vários compostos nitrogenados, dos quais aproximadamente 95% ocorrem como proteínas e 5% como compostos nitrogenados não proteicos. O nitrogênio proteico do leite é constituído de cerca de 80% de nitrogênio caseínico e de 20% de nitrogênio não caseínico, sendo estes albuminas e globulinas. Diversos fatores influenciam na composição e na distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, tais como temperatura ambiente, doenças do animal, estágio de lactação, número de parições, raça e teor energético da alimentação do animal (SILVA, 1997).

Numerosas enzimas podem ser encontradas no leite, como lípases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. O desenvolvimento, intencional ou não, de microrganismo no leite contribui para o complexo enzimático. As atividades dessas enzimas é influenciada pelas condições do meio, como temperatura, pH, acesso ao substrato, sendo alteráveis pelo processamento tecnológico (GALVÃO e SILVA, 2009).

A lactose é o glucídio característico do leite, formado a partir da glicose e da galactose, sendo o constituinte sólido predominante e menos variável (GALVÃO e SILVA, 2009).

O leite contém teores consideráveis de cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio, além de baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês, formando sais orgânicos e inorgânicos. A associação entre os sais e as proteínas do leite é um fator determinante para a estabilidade das caseínas e diferentes agentes desnaturantes (SILVA, 1997).

### **1.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE BOVINO**

O leite fresco, produzido sob condições ideais, apresenta sabor pouco pronunciado apresentando-se como doce e salgado, devido à relação entre a lactose e cloretos presentes no leite, além de não ácido e não amargo (PELLEGRINI et al., 2012).

A cor branca do leite resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A homogeneização torna o leite mais branco, pela maior dispersão da luz. A coloração amarelada provém do pigmento caroteno, que é lipossolúvel (SILVA, 1997).

O leite, logo após a ordenha, apresenta reação ácida com a fenolftaleína, mesmo sem que nenhuma acidez como ácido láctico tenha sido produzida por fermentações. A acidez do leite fresco deve-se à presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos (GALVÃO e SILVA, 2009).

Para o leite proveniente de diversas fontes, depois de misturado, o pH varia entre 6,6 e 6,8, com média de 6,7 a 20°C ou 6,6 a 25°C. O leite apresenta considerável efeito tampão, especialmente em pH entre 5 e 6, em razão da presença de dióxido de carbono, proteínas, citratos, lactatos e fosfatos (SILVA, 1997).

As substâncias dissolvidas no leite fazem com que o ponto de ebulição seja levemente maior que o da água. As temperaturas médias de ebulição, ao nível do mar, situam-se entre 100 e 101°C (PELLEGRINI, 2012).

O leite é mais viscoso que a água, em razão da presença de proteínas e lipídios, podendo sofrer alterações com o processamento industrial. O leite integral e o leite desnatado tem viscosidade média, a 20°C, de 1,631 e 1,404 mPa, respectivamente (SILVA, 1997).

O leite deve ter o aspecto líquido homogêneo, formando uma camada de gordura na superfície quando deixado em repouso. Não pode conter substâncias estranhas, devendo este ser sempre limpo (VENTIRINI et al., 2007).

#### **1.4 CONTAMINANTES DO LEITE BOVINO**

O agronegócio do leite ocupa um espaço de destaque na economia mundial. Este sistema industrial é um dos mais expressivos do Brasil pela sua importância social, e a atividade leiteira é praticada em todo país, em cerca de um milhão de propriedades rurais, gera mais de três milhões de empregos diretos na produção primária e agrega mais de seis bilhões de reais ao valor da produção agropecuária nacional (LANGONI et al., 2011).

Com base em dados disponibilizados pela *International Dairy Federation* (IDF 2005), Guimarães 2006, salientou que o Brasil é o sexto maior produtor de leite, o que mostra a importância desta atividade para o país.

O leite bovino pode ser contaminado de muitas formas, mesmo antes de ser extraído do animal, uma forma de contaminação é por pesticidas. No Mato Grosso do Sul, por ser uma área agrícola, tem em seu solo presença de agrotóxicos.

Os agrotóxicos ou pesticidas são definidos como substâncias que agem direta ou indiretamente em um organismo vivo, podendo matá-lo ou controlá-lo de alguma maneira, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo. Em geral, a maioria desses compostos tem a propriedade comum de bloquear rápida e eficientemente um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos. Por isto, são bastante empregados em diversos ramos de atividades e aplicações na agricultura (JARDIM et al., 2009).

Estes agrotóxicos são classificados conforme a legislação brasileira, para o Mato Grosso do Sul a lei que estabelece a classificação é a Lei nº 1.239, de 18 de dezembro de 1991, e esta é feita a partir da toxicidade do mesmo em comparação as pessoas e também ao meio ambiente. A classificação se dá conforme apresentado abaixo: (ANVISA, 2014).

- CLASSE I – Extremamente tóxico (Faixa Vermelha);
- CLASSE II – Altamente tóxico (Faixa Amarela);
- CLASSE III – Moderadamente tóxico (Faixa Azul);
- CLASSE IV – Pouco tóxico (Faixa Verde);

O uso de pesticidas ainda é a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, buscando maior produtividade. Portanto, nos últimos anos, vários tipos de pesticidas, incluindo herbicidas e inseticidas têm sido utilizados com frequência para a proteção das culturas. Entre estes o thiamethoxam [(PT) -3 - (2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno(nitro)-amina], que pertence aos inseticidas neonicotinóides, da família nitroguanidina, que atua no receptor nicotínico acetilcolina de insetos, danificando o sistema nervoso dos mesmos, levando-os à morte. Este inseticida é largamente utilizado no controle de pragas iniciais, como insetos sugadores e apresenta efeito bioativador, uma vez que mesmo na ausência de pragas, promove aumento em vigor e desenvolvimento nas plantas tratadas. Este é amplamente utilizado no mundo, devido à suas vantagens, como ser moderadamente tóxico ao homem e ao ambiente e ter alta atividade contra pragas e insetos (PEREIRA, 2010).

O thiamethoxam é um pesticida que possui uma molécula bastante estável, desta forma tem maior tempo de contaminação do solo, assim podendo apresentar valores de meia-vida entre 501 e 613 dias (RIGITANO e SOUZA JÚNIOR, 2009).

Os pesticidas são comumente aplicados diretamente no solo ou sobre as plantas. Mesmo quando aplicados sobre as plantas, parte significativa da dose acaba chegando ao solo. Uma vez no solo, os pesticidas estão sujeitos à ação de diversos processos, os quais influenciam direta ou indiretamente sua eficiência no controle de plantas daninhas, pragas e fungos de solo, como também governam o destino desses produtos no ambiente (CHAIN et al., 1999).

O uso de pesticidas no processo de produção agrícola e a consequente contaminação dos alimentos têm sido alvos de constante preocupação no âmbito da saúde pública (ANVISA, 2014). A presença de resíduos e contaminantes em produtos animais tais como carne, leite e ovos, pode ocorrer como consequência da aplicação direta no animal ou quando estes ingerem alimentos, como pastagens, forragens e rações que os contenham pesticidas (OTTOBONI, 1991; BENTABOL e JOBRAL, 1995).

A interação de pesticidas com o leite bovino se dá tanto pela gordura presente no leite, sendo que o conteúdo de lipídios do leite (3-5%) quanto na água formadora da emulsão láctea já que grande parte dos pesticidas tem grande solubilidade em água. A contaminação do gado leiteiro ocorre na corrente sanguínea, que é passada para o leite, já que grande parte do sangue do animal se concentra na região mamária. Assim faz com que a concentração dos pesticidas seja maior nesta região. Desta forma a contaminação do leite pode conduzir efeitos tóxicos no receptor (OTTOBONI, 1991; BENTABOL e JOBRAL, 1995).

Pesticidas do tipo organoclorados já foram identificados em leite bovino coletados na região do Mato Grosso do Sul. Esta classe de pesticidas, atualmente, tem seu uso e comercialização proibida por lei federal, por apresentar grandes níveis de toxicidade a seres humanos e animais em geral (AVANCINI et al., 2013).

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar a contaminação por thiamethoxam e algumas propriedades físico-químicas do leite bovino in natura, sendo estas: acidez, estabilidade em álcool etílico, resíduos por incineração e alcalinidade dos resíduos.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 COLETA DO MATERIAL DE ANÁLISE

O leite foi coletado na Fazenda Maffini no município de Dourados – MS, durante o ano de 2014, nos meses de janeiro a junho, bimensalmente, para análises cromatográficas e físico-químicas. A coleta do leite foi realizada em garrafas PETs lavadas com água corrente e com álcool etílico comercial 46%. O leite foi armazenado no freezer com temperaturas próximas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises.

#### 3.2 MATERIAIS E REAGENTES

##### 3.2.1 Preparo de Soluções

*Fenolftaleína 1%:* Pesou-se 1,0000 g de fenolftaleína (fenolftaleína P.A.,  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , VETEC<sup>®</sup>,  $\text{MM}=318,33 \text{ g mol}^{-1}$ ) e dissolveu-se em 100 de álcool etílico P.A., transferiu-se para balão volumétrico de 500 mL completou-se o volume com água recém destilada, então agitou-se a solução e transferiu-a para frasco conta-gotas.

*Biftalato de potássio:* Pesou-se 0,9435g de biftalato de potássio ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{COOKCOOH}$ ,  $\text{MM}= 204,0012 \text{ g mol}^{-1}$ ), seco em estufa a  $120^{\circ}\text{C}$  por 2 horas para este tornar-se padrão-primário. Dissolveu-se a massa pesada em água destilada e transferiu-se para um balão de 25 mL e completou-se o volume. Reservou-se para posterior utilização na padronização da solução de Hidróxido de Sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .

*Hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ :* Diluiu-se 50,00 mL de hidróxido de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$  em água destilada em um balão de 500,00 mL, padronizou-se e reservou-se para posterior utilização.

*Carbonato de sódio:* Pesou-se 0,1338g de carbonato de sódio ( $\text{NaCO}_3$ ,  $\text{MM}= 82,9987 \text{ g mol}^{-1}$ ), seco em estufa a  $260^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para este tornar-se padrão-primário. Dissolveu-se a massa pesada em água destilada e transferiu-se para um balão de 25,00 mL, completando-se o volume até o menisco e agitou-se. Reservou-se para posterior utilização na padronização da solução de Ácido Clorídrico  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  preparada.

*Ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ :* Diluiu-se 5,00 mL de solução de ácido clorídrico  $6 \text{ mol.L}^{-1}$  em água destilada em um balão de 250,00 mL e padronizou-se e reservou-se para posterior utilização.



*Cloreto de cálcio 40%:* Pesou-se 52,9936g de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MM} = 147,03 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) e dissolveu-se em água destilada, transferiu-se para um balão de 50,00 mL, neutralizou-se a solução com ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , completou-se o volume do balão com água destilada até o menisco e agitou-se.

*Solução Extratora:* Preparou-se 50,00 mL solução extratora de acetato de etila/metanol/acetona 2:4:4 v:v:v, adicionando-se 10 mL de acetato de etila em um balão volumétrico de 50,00 mL, juntamente com 20,00 mL de metanol e 20,00 mL de acetona, todos os solventes são grau HPLC.

### 3.2.2 Soluções Comerciais

*Álcool etílico 68%*

*Álcool etílico 70%*

### 3.2.3 Materiais Utilizados

Balança Analítica GEHAKA<sup>®</sup>;  
Balões volumétricos de 25, 50 e 100 mL;  
Banho Termostático TUIMIL<sup>®</sup>;  
Béqueres de 50 e 100 mL;  
Buretas de 10 e 25 mL;  
Cadinhos;  
Capela de exaustão PRASELAB<sup>®</sup>;  
Centrífuga THERMO-HERAEUS<sup>®</sup>;  
Chapa aquecedora NOVA ETICA<sup>®</sup>;  
Erlenmeyers de 250 mL;  
Espátulas metálicas  
Estufa MADICATE<sup>®</sup>;  
Filtro de seringa;  
Mufla TUIMIL<sup>®</sup>;  
Pipetas Volumétricas de 2, 5, 10 e 20 mL;  
Pissetas com Água Destilada;  
Seringa;  
Vial;

Vortex TC ELETRONIC®;

### **3.3 METODOLOGIA**

#### **3.3.1 Determinação da Acidez do Leite Bovino**

Transferiu-se 10 mL de amostra para um erlenmeyer de 250,00 mL, adicionou-se 5 gotas de solução de fenolftaleína 1%. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> até obter-se a coloração rosa na solução. Repetiu-se o procedimento em triplicata para cada uma das três amostras de leite recolhidas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### **3.3.2 Estabilidade em Álcool Etílico 68 e 70%**

Adicionou-se em um tubo de ensaio 2,00 mL de leite com auxílio de uma pipeta volumétrica, juntamente com 2,00 mL de álcool etílico 68%, misturou-se e observou-se. Repetiu-se o procedimento para o álcool 70%, em triplicata, para cada uma das três amostras de leite recolhidas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### **3.3.3 Determinação de Resíduos por Incineração (Cinzas)**

Pipetou-se 20,00 mL de amostra e se adicionou em uma cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a 550°C por 2 horas, resfriada em dessecador e pesada. Evaporou-se em chapa aquecedora a 80°C até secagem. Após secagem aumentou-se a temperatura para 120°C e carbonizou-se ainda na chapa. Incinerou-se em mufla a 550°C por 4 horas. Resfriou-se em dessecador e pesou-se. Repetiu-se o procedimento para cada uma das três amostras de leite recolhidas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### **3.3.4 Determinação da Alcalinidade das Cinzas em Carbonato de Sódio**

Transferiu-se, quantitativamente, as cinzas obtidas no procedimento anterior para um erlenmeyer de 250,00 mL com pequenas porções de água destilada. Adicionou-se aos poucos 10 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Resfriou-se em banho de gelo e adicionou-se 5 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 40% e 5 gotas de fenolftaleína 1%. Deixou-se em repouso por 5 minutos e titulou-se o excesso de HCl com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

### **3.3.5 Identificação da Presença de Pesticidas por Análise Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Pipetou-se 1 mL de amostra em um tubo de ensaio, colocou-se em banho-maria por 20 minutos à 40°C. Em seguida adicionou-se 10 mL de solução extratora acetato de etila/metanol/acetona (2:4:4, v:v:v). Submeteu-se a vortex por 1 minuto e a ultrassom por 20 minutos. Centrifugou-se durante 15 minutos com velocidade de 200 rpm. Retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para um vidro de penicilina e levou-se a capela para evaporação.

Após evaporado o solvente, solubilizou-se a amostra em 0,2 mL de metanol, e filtrou-se em filtro de seringa, transferindo o líquido filtrado para um vial e armazenou-se para posteriores análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

As análises foram realizadas empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta e utilizando a coluna de fase reversa C-18 (Phenomenex Gemini, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm). A fase móvel iniciou com água/metanol (60:40 v/v) permanecendo até 7 min, em 23 min a 100% de metanol retornando a condição inicial aos 35 min. Fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda monitorados de 254 e 280 nm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados obtidos foram calculados segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008) e cada amostra apresenta uma média da triplicata de análise e também são descritas as médias das três amostras analisadas no período de janeiro a junho de 2014 (Tabela 1).

Tabela 1 – Média dos resultados das análises físico-químicas das amostras de leite bovino

Parâmetro	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03	Média Geral
<b>Acidez (%)</b>	0,19±0,01	0,17±0,01	0,16±0,01	0,18±0,01
<b>Estabilidade em etanol 68%</b>	Estável	Estável	Estável	Estável
<b>Estabilidade em etanol 70%</b>	Instável	Instável	Instável	Instável
<b>Cinzas (%)</b>	1,02±0,01	0,99±0,01	0,95±0,01	0,99±0,01
<b>Alcalinidade das cinzas (%)</b>	0,012±0,001	0,013±0,001	0,011±0,001	0,012±0,001

Fonte: A Autora, 2014

Analisando a Tabela 1, observamos que o leite apresenta valores de acidez entre 0,16 e 0,19%, expressa em ácido láctico. A elevação da acidez é determinada pela transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, caracterizando a acidez desenvolvida do leite. Para valores normais de acidez em leite bovino in natura variam entre 0,14 e 0,18, segundo a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (Anexo 1), assim sendo notamos que a amostra 01 apresenta-se fora dos padrões. Porém, mesmo com essa distorção a média geral das amostras ainda se apresentou dentro dos padrões.

Para o álcool etílico 68% todas as amostras deste estudo foram estáveis o mesmo não acontece com as amostras submetidas a álcool etílico 70%, pois ocorreu formação de coágulos em todos os tubos. Ao utilizar uma maior concentração de álcool, ocorre uma maior

desestabilização das proteínas, devido à alteração na constante dielétrica do meio que reduzirá a repulsão entre cargas iguais das proteínas, fazendo com que estas se aproximem o suficiente para que ocorra a coagulação das mesmas (SILVA, 2012).

A estabilidade perante álcool etílico, medida no leite é referente à caseína que é a proteína mais importante do leite e compreende, em torno, de 85% das proteínas lácteas. As caseínas agregam-se formando grânulos insolúveis chamados micelas. A estrutura granular multimolecular das micelas de caseína são compostas de várias proteínas similares mais água e minerais, principalmente cálcio e fósforo. Neste teste, o álcool etílico reduz a estabilidade coloidal da micela de caseína e provoca coagulação dessa fração proteica (SILVA, 2012).

Para as cinzas das amostras de leite analisadas obteve-se uma média de 0,99 (Tabela 1). As cinzas de uma amostra de alimentos é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica que é transformada em  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NO}_2$ . A composição das cinzas pode variar conforme o alimento analisado. No caso do leite tem-se grande quantidade de cálcio, magnésio e em pequenas quantidades de ferro, alumínio e zinco. Após incineração as cinzas apresentam-se na forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos ou cloretos dependendo das condições de amostra, no caso de amostras de leite a matéria inorgânica permanece na forma de óxidos. O teor de matéria inorgânica presente no leite pode variar de 0,7-6,0%, sendo assim, as amostras analisadas estão dentro dos padrões da legislação (HARTMANN, 2002).

A alcalinidade das cinzas é um padrão tomado para verificar adulterações no leite bovino, principalmente na caracterização da adição de substâncias alcalinas no produto. Valores normais para leites fluidos são entre 0,010 e 0,030%, sendo que valores superiores a isto, principalmente superiores a 0,040% indicam que houve adulteração do leite com substâncias alcalinas (BRASIL, 2003).

Nas amostras de leite bovino analisadas obteve-se média de alcalinidade de 0,012% (Tabela 1), assim sendo estão dentro dos padrões indicando que não ocorreu adulteração do produto com substâncias alcalinas.

## 4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

O thiamethoxam é um pesticida que possui uma molécula bastante estável, desta forma tem maior tempo de contaminação do solo, assim podendo apresentar valores de meia-vida entre 501 e 613 dias (RIGITANO e SOUZA JÚNIOR, 2009). Este é muito utilizado em Mato Grosso do Sul para tratamento de sementes e após o plantio aplicados com

pulverizadores, portanto pode ser um contaminante do pasto dos animais e também chegar a contaminar o leite.

O método para identificação do pesticida foi realizado por comparação do tempo de retenção do padrão (Figura 1) de pesticida com o tempo de retenção das amostras analisadas nas mesmas condições e não foi determinada a presença do mesmo nas amostras analisadas.

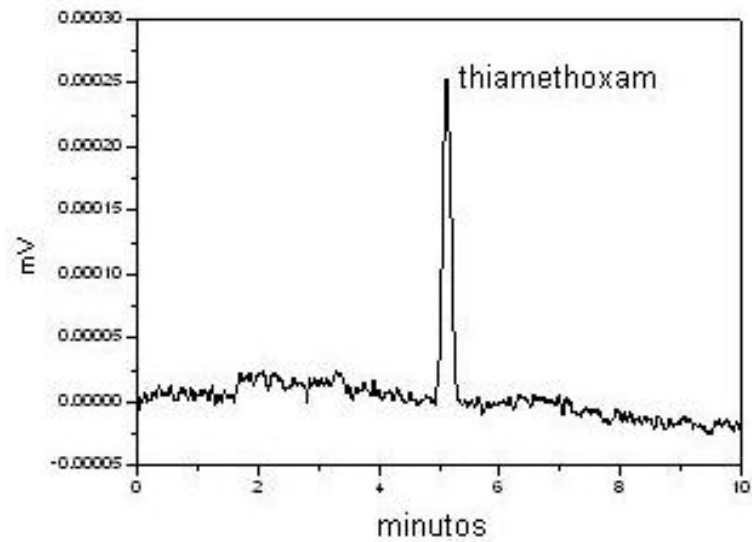


Figura 1 – Cromatograma do padrão de thiamethoxam

## 5 CONCLUSÃO

Pelas análises físico-químicas realizadas o leite bovino in natura analisado está dentro dos padrões estipulados pela legislação, exceto pela amostra 1 no parâmetro de acidez. Também não foi determinada a presença de thiamethoxam nas amostras analisadas. Pelos parâmetros monitorados o leite analisado é seguro.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Portaria Normativa N<sup>o</sup> 149, de 30 de Dezembro de 1996, *Critérios para a Classificação Toxicológica de Agrotóxicos*, Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia!/ut/p/c4/04\\_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B\\_A3djM\\_2CbedFANFW4Q0!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/inicio/agrotoxicos++toxicologia/publicacao+agrotoxico+toxicologia/criterios+para+a+classificacao+toxicologica](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_A3djM_2CbedFANFW4Q0!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/inicio/agrotoxicos++toxicologia/publicacao+agrotoxico+toxicologia/criterios+para+a+classificacao+toxicologica)> Acesso em 03 de junho de 2014.

AVANCINI, R. M. et. al., Organochlorine Compounds in Bovine Milk From the State of Mato Grosso do Sul – Brazil. **Revista Chemosphere**, v. 90, p. 2408–2413, 2013.

BENTABOL, A.; JODRAL, M. Occurrence of Organochlorine Agrochemical Residues in Spanish Cheeses. **Revista Pesticides Science**, v. 44, p. 177–182, 1995.

BRASIL. **Instrumentação Normativa** N<sup>o</sup> 22, de 14 de abril de 2003, do *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária*. Diário Oficial, Brasília, p. 12, 2003.

CHAIN, A. et al., **Avaliação de Perdas de Pulverização em Culturas de Feijão e Tomate**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999, 23 p. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 29). Documento On-Line.

COSTA, E. O. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite. **Napgama**, v. 8, p. 18–21, 2005.

GABBI, A. M. **Características do Leite Bovino Produzido em Sistemas de Alimentação e de Produção com Diferentes Aportes Tecnológicos**. Tese de Doutorado, 139 p., UFRGS, Porto Alegre, RS, 2013.

GALVÃO, C. E.; SILVA, H. G. C., **Qualidade do Leite de Vaca: Microbiologia, Resíduos Químicos e Aspectos de Saúde Pública**. Trabalho monográfico de conclusão da



especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal (TCC), 55 p., Instituto Qualittas, Campo Grande, SP, 2009.

GUIMARÃES, F. F. Modificação na Geografia da Produção Mundial de Leite. **Revista Nappama**, v. 9, p. 19–23, 2006.

GUIMARÃES, P. C. L. et al. Coliformes Fecais em Leite de Vacas Vacinadas e não Vacinadas para Brucella. **Revista Eletrônica da Univar**, v. 2, p. 61–66, 2013.

HARTMANN, W. **Sólidos Totais em Amostras de Leite de Tanques**. Dissertação de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, 70 p., UFPR, Curitiba, PR, 2002.

JARDIM, I. C. S. F. et al. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: Uma Preocupação Ambiental Global – Um Enfoque às Maças. **Química Nova**, v. 32, p. 996–1012, 2009.

LANGONI, H. et al. Aspectos Microbiológicos e de Qualidade do Leite Bovino. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 1059–1065, 2011.

LEVY-COSTA, R. B.; MONTEIRO, C. A., Consumo de Leite de Vaca e Anemia na Infância no Município de São Paulo. **Revista Saúde pública**, v. 38, p. 797–803, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, v. 1, São Paulo: IMESP, p. 831–854, 2008.

MAPA, Instrução Normativa N° 51, de 18 de Setembro de 2002, do *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado*, Disponível em: < <http://www.leitebrasil.org.br/legislacao.htm>>, Acesso em 15 de novembro de 2014.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Ocorrência de Resíduos de Antibióticos no Leite Comercializado em Piracicaba, SP. **Revista Nutrição**, v. 14, p. 119–124, 2001.

OTTOBONI, M. A. **The Dose Makes the Poison**. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 244, 1991.

PELLEGRINI, L. G. et al. Características Físico-Químicas de Leite Bovino, Caprino e Ovino. **Revista Synergismus Scientifica UTFPR**, Vol. 7, Nº 1, 2012.

PEREIRA, M. A. **Tiametoxam em plantas de cana-de-açúcar, feijoeiro, soja, laranjeira e cafeeiro: parâmetros de desenvolvimento e aspectos bioquímicos**. Tese de Doutorado em Ciência Fitotécnica, 125 p., USP, Piracicaba, SP, 2010.

RIGITANO, R. L. O.; SOUZA JÚNIOR, R. P. **Comportamento Ambiental do Inseticida Thiamethoxam em um Latossolo Vermelho Distroférico de Dourados, MS**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2009. 22p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 49). Documento On-Line.

SILVA, L. C. C. et al. Estabilidade Térmica da Caseína e Estabilidade ao Álcool 68, 72, 75 e 78%, em Leite Bovino. **Revista do Instituto dos Laticínios Cândido**, v. 67, p. 55–60, 2012.

SILVA, P. H. F. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola**, v. 1, p. 3–5, 1997.

VELOSO, A. C. A. et al. Detecção de Adultrações em Produtos Alimentares Contendo Leite e/ou Proteínas Lácteas. **Química Nova**, v. 25, p. 609 – 615, 2002.

VENTIRINI, K. S. et al. **Características do Leite**, Programa Institucional de Extensão, p. 6, UFES, Vitória, ES, 2007.

## ANEXO 1

Tabela 2 – Padrões estipulados pela legislação para leite in natura

<b>Item de Composição</b>	<b>Leite Cru Refrigerado Tipo A Integral</b>	<b>Leite Cru Refrigerado Tipo B Integral</b>	<b>Leite Cru Refrigerado</b>
<b>Gordura (g/100g)</b>	Mínimo 3,0	Mínimo 3,0	Teor Original
<b>Acidez, em Ácido Láctico (%)</b>	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18
<b>Estabilidade em Álcool Etílico 68%</b>	Estável	Estável	Estável
<b>Densidade Relativa, 15/15°C, g/mL</b>	1,028 a 1,034	1,028 a 1,034	1,028 a 1,034
<b>Índice Crioscópico</b>	Máximo: -0,512°C	Máximo: -0,512°C	Máximo: -0,512°C
<b>Sólidos Não-Gordurosos (%)</b>	Mínimo: 8,4	Mínimo: 8,4	Mínimo: 8,4
<b>Proteína Total (%)</b>	Mínimo: 2,9	Mínimo: 2,9	Mínimo: 2,9
<b>Contagem Padrão de Placas (UFC/mL)</b>	Máximo: $1,0 \times 10^4$	Máximo: $5,0 \times 10^5$	Máximo: $7,5 \times 10^5$
<b>Contagem de Células Somáticas (CS/mL)</b>	Máximo: $6,0 \times 10^5$	Máximo: $6,0 \times 10^5$	Máximo: $7,5 \times 10^5$

Fonte: MAPA, 2014