

FOSFATASE ALCALINA EM LEITE E DERIVADOS: ASPECTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS

Alkaline phosphatase in milk and dairy products: theoretical and practical aspects

Gisela de Magalhães Machado¹

Adbeel de Lima Santos¹

Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior²

Renata Golin Bueno Costa²

Paulo Henrique Costa Paiva³

SUMÁRIO

A indústria de laticínios vem passando por grandes transformações. O aumento na capacidade produtiva para atender ao crescente número de consumidores traz novos desafios tecnológicos. Segurança alimentar, qualidade e eficiência econômica são essenciais. Nesse sentido, conhecer e aplicar corretamente as técnicas analíticas de controle de qualidade do leite e de seus derivados, dentre elas a de atividade de fosfatase alcalina, é fundamental. Este trabalho tem como objetivo apresentar alguns aspectos que são relevantes na aplicação e interpretação das técnicas de determinação de atividade de fosfatase alcalina bem como servir de fonte de informações para futuros trabalhos.

Termos para indexação: leite, fosfatase alcalina, qualidade.

1 INTRODUÇÃO

Todo leite que não foi tratado termicamente contém a enzima fosfatase, sendo que seu teor varia principalmente em função do estágio de lactação, da presença de infecções no úbere e de fatores individuais. No início da lactação, o teor de fosfatase no leite é baixo, regularizando-se com o passar do tempo. O leite proveniente de animais com mastite também contém baixos teores de fosfatase, isso muito provavelmente devido à presença de leucócitos (Fox & McSweeney, 1998). A existência de uma fosfatase em leite foi pela primeira vez reconhecida em 1925. Desde então diversos estudos foram realizados no sentido de aprofundar o conhecimento existente a respeito dessa enzima e características úteis e importantes foram descobertas nestas pesquisas (Fox & McSweeney, 1998). Este trabalho tem como objetivo apresentar alguns aspectos que são relevantes na aplicação e interpretação da técnica de determinação de atividade de fosfatase alcalina bem como servir de fonte de informações para futuros trabalhos.

2 A FOSFATASE NO LEITE

Atualmente sabe-se que no leite existem vários tipos de fosfatases: pirofosfatase inorgânica, pirofosfatase nucleotídeo, fosfatase de ácido fosfatídico, adenosina trifosfatase e glucose-6-fosfatase, todas encontradas em preparações da membrana do glóbulo de gordura. Mas dois tipos de fosfatase que se diferenciam em diversos aspectos, sendo um fator relevante o pH de atuação, são as mais estudadas: a fosfatase alcalina e a ácida (Fox e McSweeney, 1998). Essas se diferenciam em diversos aspectos, sendo um dos mais relevantes o pH de atuação (Fox & McSweeney, 1998). A fosfatase alcalina (E.C.3.1.3.1) é uma fosfomonoesterase que possui pH ótimo de atividade em torno de 9,0, sendo este valor dependente do substrato em que vai atuar, da quantidade desse substrato, e também de fatores composicionais, como presença de moléculas com características tamponantes (Haab e Smith, 1956). A fosfatase ácida, cujo pH ótimo para atividade é de aproximadamente 4,0, é uma fosfomonoesterase ácida (E.C.3.1.3.2) que é encontrada principalmente no

- 1 Professores e Pesquisadores EPAMIG Instituto de Laticínios Cândido Tostes, discentes Mestrado profissionalizante Ciência e Tecnologia do leite e Derivados: giselammachado@epamig.br; lima@epamig.br;
- 2 Professores e Pesquisadores EPAMIG Instituto de Laticínios Cândido Tostes, docentes Mestrado profissionalizante Ciência e Tecnologia do leite e Derivados: luizcarlos@epamig.br; renata.osta@epamig.br;
- 3 Professor e Pesquisador EPAMIG Instituto de Laticínios Cândido Tostes: paulohcp@epamig.br

plasma do leite. Sua concentração no leite é muito baixa quando comparada à da fosfatase alcalina, mas é alta no colostro (Walstra & Jenness, 1984).

Da fosfatase alcalina foram identificadas duas isoenzimas principais, a α e a β -fosfatase, localizadas fundamentalmente no plasma do leite e na membrana do glóbulo de gordura respectivamente. A β -fosfatase, isoenzima mais abundante, tem sido purificada a partir do leite de vaca e é um dímero de duas subunidades idênticas ou muito similares, cada uma das quais possui uma massa molar de aproximadamente 85.000 Da. Contém 5 átomos de zinco por molécula de dímero. Seu pH ótimo para a hidrólise varia de um éster fosfato a outro e com a composição do meio. A membrana do glóbulo de gordura contém pelo menos 10 enzimas distintas e a fosfatase alcalina representa aproximadamente 10% das proteínas da membrana (Walstra & Jenness, 1984). Esses dímeros são formados pelo aquecimento (100°C/2 minutos) ou acidificação (pH 2,1) (Fox & McSweeney, 1998). Embora não exista relação entre o teor de fosfatase e o teor de gordura no leite cru, a fosfatase alcalina está associada ao glóbulo de gordura. Ela não é solúvel em gordura, mas está presente na fina camada protéica que cobre os glóbulos ou é adsorvida ao glóbulo de gordura. Este fato requer que os glóbulos de gordura estejam bem distribuídos no leite antes da determinação de sua atividade (Burgwald, 1939).

Outra característica que diferencia as fosfatases alcalina e ácida é a sensibilidade ao calor. A fosfatase alcalina apresenta maior sensibilidade ao calor que a fosfatase ácida, não apresentando atividade após tratamento térmico de pasteurização, enquanto a ácida é resistente a tal procedimento. A pasteurização lenta (65°C/30min) causa uma inativação de 10 a 20% da fosfatase ácida. Já o tratamento térmico de 88°C/30min é requerido para a sua completa inativação (Fox & McSweeney, 1998). Por ser mais resistente ao calor que os microrganismos patogênicos não esporulados comumente encontrados no leite e por ser sensível aos binômios tempo/temperatura praticados na pasteurização, a atividade de fosfatase alcalina tem sido utilizada principalmente como parâmetro para avaliação do tratamento térmico e para verificação de fraude por adição de leite cru. Diversas técnicas têm sido elaboradas e modificadas com base em sua atividade fosfoesterase (Murthy et al, 1992).

Estudos indicaram que em alguns casos havia ocorrência de teste positivo para fosfatase em creme pasteurizado e refrigerado, e que aparentemente esse resultado não foi causado por fosfatase ligada ou protegida/adsorvida ao glóbulo de gordura. Amostras de creme pasteurizado que desenvolveram reação de fosfatase positiva após estocagem a 10°C ou 4°C continham bacilos

formadores de esporos gram positivos que produziam fosfatase e foram identificados como *Bacillus cereus* e *Bacillus mesentericus*. Esses microrganismos não foram detectados em amostras com resultado negativo para fosfatase alcalina. (Barber & Frazier, 1942). A possibilidade de haver presença de fosfatase não oriunda do leite na amostra levou à necessidade de criar um teste que as diferenciasse. A fosfatase alcalina de origem microbiana apresenta maior estabilidade térmica que a enzima do leite, sendo esta propriedade utilizada para diferenciar as duas num teste controle (Pratt-Lowe et al, 1987). Posteriormente foram descobertas algumas fosfatases microbianas tão termolábeis quanto as endógenas do leite e um teste para diferenciá-las ainda não está disponível (Karmas & Kleyn, 1990). Se leite cru contém microrganismos produtores de esporos, as células vegetativas serão destruídas pela pasteurização, mas os esporos sobrevivem, germinam e produzem fosfatases termo resistentes (Murthy et al, 1992).

Tanto as fosfatases alcalina como a ácida liberam fosfato inorgânico das caseínas e dos ésteres solúveis, o que pode acontecer no leite e em seus derivados sob condições adequadas. No pH do leite a fosfatase ácida é mais ativa (Walstra & Jenness, 1984). A atividade da fosfatase ácida no leite é apenas 2% da atividade da fosfatase alcalina. Apesar de poder desfosforilar caseína sob condições adequadas, até onde se sabe a fosfatase alcalina não tem significância tecnológica em leite e derivados, talvez pelo pH ótimo de atuação da enzima estar muito distante do pH normal do leite, como pode ser visto na Tabela 1, e também devido ao efeito inibitório causado por fosfatos inorgânicos. A fosfatase ácida apresenta significância tecnológica devido à sua termoresistência e pH ácido de atuação. Sua importância reside principalmente na maturação de queijos, onde peptídeos desfosforilados podem ser isolados, comprovando essa atividade. Apesar disso, não se sabe se esses produtos são oriundos de ação da fosfatase ácida ou microbiana. A desfosforilação de proteínas limita a taxa de hidrólise protéica nos queijos, uma vez que muitas proteases e peptidases são inativas frente a substratos desfosforilados (Fox & McSweeney, 1998).

A fosfatase alcalina apresenta renaturação após certo período de estocagem do leite e produtos lácteos. Harvey Fram (1957) foi um dos primeiros pesquisadores a detectar isso, quando constatou que o creme imediatamente após o tratamento térmico apresenta reação negativa para fosfatase alcalina, mas quando permanece à temperatura ambiente por pelo menos 2 horas, o teste para fosfatase se torna positivo. O mesmo não encontrou mudança no teste de fosfatase quando o creme foi devidamente refrigerado. A análise microbiológica do creme pasteurizado pelo método HTST (75°/15s) que deu resultado positivo no teste para fosfatase, indicou

Tabela 1 – Características da fosfatase alcalina do leite (adaptado de Fox & McSweeney,1998).

Característica	Condições
pH ótimo	(Substrato p-nitrofenil-fosfato) 9,65 – 10,5
Temperatura ótima	37°C
Ativadores	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺
Massa molecular	170 – 190 kDa
Associação/dissociação	2 subunidades de massa molar 85 kDa, formadas pelo aquecimento (100°C por 2 min) ou acidificação até pH = 2,1

pouca ou insignificante mudança após 2 horas de estocagem em relação à população microbiana inicial, demonstrando que a atividade encontrada não seria devido à presença das enzimas microbianas (Fram, 1957). A reativação pode ocorrer após aquecimento em temperaturas como 84°C para leite e 74°C para creme. A temperatura de estocagem ótima para reativação é 30°C, na qual a reativação é detectada após 6 horas e pode continuar por até 7 dias. Sais de magnésio e de zinco promovem fortemente a reativação. Outros sais como de estanho e de cobre e EDTA são inibitórios, enquanto ferro não causa efeito na renaturação da fosfatase alcalina. Grupos sulfidril (-SH) parecem ser essenciais para a reativação, e talvez seja por isso que a fosfatase seja reativada mais facilmente em leite UHT que em leite pasteurizado HTST. O papel dos grupos sulfidril, fornecido pelas soroproteínas desnaturadas, é o de apresentar efeito quelante de metais pesados, sendo que esses últimos poderiam se ligar aos grupos sulfidril da enzima que também foram ativados na desnaturação se não se ligassem às soroproteínas, prevenindo assim a renaturação. Mg²⁺ e Zn²⁺ aparentemente causam uma mudança conformacional na enzima desnaturada, necessária para a renaturação (Fox e McSweeney,1998). Dessa forma, a presença de soroproteínas desnaturadas diminui o magnésio e zinco disponíveis, evitando a renaturação de fosfatase alcalina. No leite UHT, tanto pelo processo direto quanto indireto, a desnaturação de soroproteínas é maior que na pasteurização, mas essas proteínas desnaturadas, sobretudo a β -lactoglobulina, estão em grande parte formando pontes dissulfeto com a κ -caseína (Silva, 2004), possivelmente não estando disponíveis para atuar com seu importante efeito quelante na prevenção de renaturação de fosfatase alcalina.

O teste de diferenciação entre a enzima ativa e a enzima renaturada é baseado no aumento da atividade fosfatásica como resultado da adição de Mg²⁺: a atividade de fosfatase alcalina renaturada é aumentada até 14 vezes enquanto a enzima nativa tem sua atividade aumentada de apenas 2 vezes. Fosfatase ácida não sofre ativação na presença de sais de magnésio (Fox & McSweeney,1998).

Existem evidências de que o sal presente em produtos como a manteiga aumenta a possibilidade de reativação da fosfatase alcalina ou corrobora na liberação de fosfatase alcalina residual de uma estrutura protetora natural (Karmas & Kleyn, 1990). Além disso, o sal adicionado em vários queijos aumenta a susceptibilidade da fosfatase alcalina ao calor, tornando-a mais termolábil (Murthy *et al*, 1992). O teste para determinação de atividade de fosfatase alcalina tem limitada utilidade em produtos muito ácidos, a exemplo do iogurte, devido à inativação da enzima pelo ácido (Murthy *et al*, 1992).

3 METODOLOGIAS ATUALMENTE UTILIZADAS

A fosfatase alcalina hidrolisa ésteres de mono fosfatos à temperatura e pH apropriados liberando compostos que podem ser detectados por desenvolvimento de cor. A quantidade de cor desenvolvida é proporcional à concentração da enzima (Murthy *et al*, 1992). Os métodos mais utilizados na atualidade para detecção ou medição da atividade de fosfatase alcalina são o Scharer rápido (visual e espectrofotométrico), Rutgers e Fluorimétrico. Os métodos descritos sucintamente a seguir foram adaptados de Standard Methods for Examination of Dairy Products (Murthy *et al*, 1992), e servem para análise não apenas de leite, mas também de derivados, desde que o preparo de amostras seja feito previamente e de maneira adequada.

Para todos os métodos é indicado que algumas amostras controles sejam conduzidas paralelamente aos experimentos. Os controles são os que seguem:

- Controle negativo: usado para determinar os efeitos dos contaminantes dos reagentes, materiais coloridos ou gordura. Para tal deve ser usada amostra aquecida em banho-maria fervente por 1 minuto sendo resfriada rapidamente em seguida.
- Controle positivo: usado para assegurar que os reagentes, como o CQC (2,6-dicloroquinonacloroimida) e o fenil fosfato dissódico estão funcionando

apropriadamente. O procedimento para tal determinação implica em misturar leite fresco cru à amostra tratada por 95°C/1 min ou preparar pequenos discos (0,64 cm de diâmetro) contendo leite cru seco à vácuo.

- Controle de substâncias interferentes: é aplicado para análise de produtos como queijos, leites achocolatados, sorvetes e outros produtos aromatizados. A presença de vanilina provoca um resultado falso positivo no teste de Scharer, pois reage com CQC produzindo indofenol (azul). Já produtos derivados do cacau podem conter substâncias que inibem a atividade enzimática, neste caso resultando em um teste falso-negativo, difícil de detectar. Para essa determinação é indicado realizar o teste usando tampão simples, sem substrato. Resultados positivos se devem à presença de interferentes.
- Controle de fosfatase microbiana: realizado quando o produto apresenta alta contagem microbiana ou foi estocado por tempo prolongado antes da análise. A fosfatase microbiana é, na maioria das vezes, mais termoresistente que a enzima própria do leite. Caso o teste tenha sido positivo para fosfatase alcalina, pasteurizar a amostra e refazer o teste. Caso o resultado ainda seja positivo há indicação de que a fosfatase presente seja de origem microbiana.
- Controle de fosfatase renaturada: baseado no fato de que fosfatase alcalina renaturada em produtos HTST ou UHT são reativadas quando estocadas com sais de magnésio a 34°C (1 h) e apresentarão um aumento de 4 a 10 vezes maior na sua atividade que o mesmo produto estocado sem os sais de magnésio.

3.1 Método Scharer visual

Este é um teste rápido que utiliza como substrato para a fosfatase o fenil fosfato dissódico. O fenol liberado reage com 2,6-dicloroquinona cloroimida na presença de sulfato de cobre gerando um indofenol de cor azul, que é posteriormente isolado pela ação de butanol neutralizado. Os métodos envolvendo fenil-fosfato dissódico como substrato são muito sensíveis e todas as vidrarias, tampas e reagentes devem ser livres de fenol. A metodologia oficial brasileira descrita na Instrução Normativa nº 68 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA - é qualitativa e adaptada deste método Scharer visual. Na metodologia oficial não há a extração do indofenol por butanol e nem comparação com padrões em diferentes níveis de fenol, não sendo também

estabelecido um limite quantitativo comparativo. De acordo com trabalho realizado por Castro *et al* (2005 b) o método brasileiro só detectou como positivas amostras contendo de 1 a 2% de leite cru adicionado ao leite tratado termicamente, limite mínimo muito elevado e considerado insatisfatório por esses pesquisadores. A Portaria nº1 de outubro de 1981 do MAPA, ainda vigente, utiliza metodologia similar à Instrução Normativa nº 68, porém utiliza comprimidos Phos-phax® e Indo-phax® que contém os mesmo reagentes e promovem as mesmas reações descritas a seguir. O método Scharer visual apresenta restrições quanto ao uso em leite UHT, devido à presença de aminoácidos aromáticos na β-lactoglobulina, que desnaturada, expõem esses grupos e os torna aptos a reagir com CQC formando um composto de cor azul, que pode ser confundido como atividade de fosfatase no substrato. A β-lactoglobulina apresenta em sua estrutura primária quatro resíduos de fenilalanina, quatro de tirosina e dois de triptofano (Fox & McSweeney, 1998).

Reações:

Fenil fosfato dissódico + fosfatase alcalina + água
 $\xrightarrow{pH\ 9,8\pm 0,2}$ fenol + fosfato de sódio

Fenol + 2,6-dicloroquinonacloroimida (CQC) + sulfato de cobre
 $\xrightarrow{pH\ 9,3-9,4}$ indofenol (azul)

3.2 Método Scharer – espectrofotométrico

As reações que acontecem nesta técnica são semelhantes ao método visual, porém aqui há a quantificação de fenol produzido pela fosfatase alcalina por análise de absorvância a 650 nm. A curva de calibração do método é feita utilizando fenol p.a. em diferentes concentrações, sendo este reagente adicionado de dicloroquinona cloroimida para desenvolvimento da cor azul (indofenol). Para amostras o método espectrofotométrico é similar ao visual, porém, após a adição de álcool butílico neutro, a amostra deve ser centrifugada e a camada alcoólica retirada e sua absorvância lida a 650 nm. A absorvância obtida para a amostra deve ser comparada com os padrões para obter a concentração de fenol da amostra.

O método oficial da A.O.A.C.(946.01) para análise de fosfatase alcalina residual em leite é um método de Scharer espectrofotométrico adaptado, que utiliza 2,6 dibromoquinonacloroimida (BQC) no lugar de 2,6 dicloro quinonacloroimida (CQC) como reagente de desenvolvimento de cor (produção de indofenol após reação com fenol liberado pela ação da enzima no seu substrato fenil fosfato dissódico). A A.O.A.C.(946.03) apresenta especificidades analíticas para cada tipo de queijo, utilizando este método adaptado de Scharer. Estas especificidades estão relacionadas principalmente à quantidade e tipo de soluções tampões adequadas para cada tipo de queijo,

uma vez que este produto apresenta capacidade tamponante diferenciada em função de seus constituintes, processos e tempos de maturação diversos, que podem interferir na análise devido ao pH alcalino para atividade enzimática excelente requerido pela fosfatase.

3.3 Método Rutgers

Este método de determinação de atividade de fosfatase alcalina se fundamenta no fato de que a enzima atua sob condições de temperatura e pH adequadas, sob o substrato diciclohexilamina fenolfaleína mono-fosfato, liberando como produto da reação fenolfaleína. Essa substância apresenta coloração rosa em pH alcalino. A intensidade da cor será proporcional à quantidade de enzima ativa no meio, uma vez mantida constante e em excesso a quantidade de substrato e demais variáveis.

Reação:

Diciclohexilamina fenolfaleína mono-fosfato + fosfatase alcalina + água $\xrightarrow{\text{pH}10,15}$ fenolfaleína (rosa)

3.4 MÉTODO FLUORIMÉTRICO

O método fluorimétrico, devido à sua rapidez e precisão analítica, é extensamente reconhecido por órgãos de fiscalização em todo o mundo. O Comitê Europeu para segurança de produtos lácteos estabelece o limite máximo de 350 mU/L para a atividade de fosfatase alcalina residual em leite pasteurizado. Já a entidade americana Food and Drug Administration (FDA) determina que este mesmo limite deva ser aplicado a diversos produtos lácteos (Martins, 2006). O método fluorimétrico para quantificação da fosfatase alcalina utiliza como substrato um monoéster ortofosfórico aromático, denominado Fluorophos®, que sob hidrólise, catalisada pela fosfatase alcalina, perde um radical fosfato e torna-se um composto altamente fluorescente, denominado Fluoroyellow. (Castro e Brandão, 2005a). O coeficiente de correlação deste método com o Schärer é 0,995 (Murthy et al, 1992).

A Federação Internacional de Leite (FIL) recomenda um método fluorimétrico similar a este descrito a seguir para detecção de fosfatase em leite, bebidas a base de leite e queijo (FIL 155 partes I e II, 2006).

Reação:

Fluorophos + fosfatase alcalina + água $\xrightarrow{\text{pH}10,0\pm 0,05}$ fluoroyellow (fluorescente)

3.5 Outras técnicas

Existem no mercado diversos kits comerciais para análise de fosfatase alcalina em leite. Um dos mais utilizados é o kit fosfatase alcalina FS® (diasys),

originalmente utilizado para detecção da enzima no sangue, mas utilizado com sucesso para análise de leite. Este kit utiliza como substrato para a enzima o p-nitrofenilfosfato que sob ação enzimática libera o p-nitrofenol, de cor amarela, resultado em 3 minutos a 37°C ou 6 minutos em temperatura ambiente. Este método apresenta a mesma eficiência que o método oficial descrito na Instrução normativa nº68 do MAPA (Paiva et al, 2006). O procedimento é simples e consiste na adição de dois reagentes do kit, em quantidades indicadas (gotas), à amostra de leite. O método rápido que utiliza fitas (Laborclin®) para análise de leite segue o mesmo princípio químico do kit FS® (diasys).

A Federação Internacional de Leite (FIL) utiliza uma metodologia semelhante a esta citada anteriormente (substrato p-nitrofenilfosfato que sob ação enzimática libera o p-nitrofenol) para detecção de fosfatase alcalina em leite e soro fluido e também em leite em pó e soro em pó. Na técnica da FIL o tempo de incubação é de 2 horas e pode detectar até 0,5% de leite cru adicionado ao leite pasteurizado ou 0,2% se o teste for comparado por meio de espectrofotometria (absorvância a 405 nm). O resultado é dado em μg de indofenol por mL de amostra e os valores podem variar entre 0 e 14. Os padrões na verdade são os controles positivo e negativo que são feitos paralelamente à amostra (FIL 82, 2004).

Outra metodologia também utilizada pela FIL tem por base o sistema enzimático foto ativado (enzymatic photo-activated system – EPAS) para análise em leite e bebidas lácteas, cujo princípio de detecção é bem diferente dos citados até o momento. Na presença de fosfatase alcalina, o substrato estável aromático dioxetano-fosfato é hidrolisado a 35°C para produzir um produto foto ativado (quimio-luminescência). A foto-ativação do produto é amplificada por um componente macromolecular. A reação de hidrólise é paralisada depois de um tempo específico de incubação (3 minutos). A quantidade de quimio-luminescência produzida é medida e convertida em unidades de enzima por um luminômetro, que deve ser previamente calibrado (FIL, 2007). Salter & Fitchen (2006) obtiveram excelentes resultados deste método comparativamente ao fluorimétrico, obtendo mesma reprodutibilidade e repetibilidade nos resultados das amostras de leite de diferentes espécies analisadas.

Diversas técnicas estão sendo pesquisadas e desenvolvidas para melhorar a precisão da detecção da atividade de fosfatase ou tornar esse processo mais rápido. Como exemplo pode ser citada a técnica desenvolvida por Hassan et al (2009) que utiliza 4 – nitrofenilfosfato como substrato para a fosfatase e seu decréscimo (que é proporcional à quantidade de enzima presente na

amostra) é detectado por um sensor plástico tipo membrana. É um método rápido ser usado tanto para leite e derivados quanto para fluidos biológicos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da atividade de fosfatase alcalina no leite possui importância fundamental, pois possibilita a verificação da eficácia do tratamento térmico de maneira rápida e confiável, sem a necessidade de análises microbiológicas demoradas e caras. A evolução da técnica até a obtenção de kits rápidos com bons níveis de detecção fornece para a indústria informação de caráter fundamental, já que o tratamento térmico conduzido de maneira inadequada incorre em riscos à saúde pública.

SUMMARY

The dairy industry is passing through changes. The number of consumers is growing and the industry has to increase its capacity, which brings new technological challenges. Food safety, quality and economic efficiency are essential. In this sense, get to know and correctly apply the analytical techniques of quality control of milk and its derivatives, among which the determination of alkaline phosphatase activity, is essential. This paper aims to present some aspects that are relevant to the interpretation and application of the technique of determination of alkaline phosphatase activity as well as serve as a source of information for future work.

Index terms: milk, phosphatase, quality.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods Of Analysis**. Method 946-03 Phosphatase (residual) in Cheese. Final Action. Cap.33, p 67-69, 1995.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods Of Analysis**. Method 946-01 Phosphatase (residual) in Milk. Final Action, 1995.

BARBER, F. W.; FRAZIER, W. C.; The Development of a Positive Phosphatase Test in Refrigerated, Pasteurized Cream. **Journal of Dairy Science**, Champaign, p. 343-352, 1942.

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. Publicado no **Diário Oficial da União** de 14/12/2006, Seção 1, Página 8

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 1, de 07 de outubro de 1981**. Aprova os Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, constituindo-se em Métodos Microbiológicos e Métodos Físicos e Químicos. Publicado no **Diário Oficial da União** 13/10/1981, Seção 1, Página 19381

BURGWALD, L. H. The Phosphatase Test: a Review of the Literature on its Application for Detecting Irregularities in the Pasteurization of Milk and Dairy Products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 22, p. 853-873, 1939.

CASTRO, P.R.S.; BRANDÃO, S.C.C. Avaliação do método fluorimétrico na determinação da atividade fosfatase alcalina residual em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.345, p. 132-136. 2005a

CASTRO, P.R.S., RIGUEIRA, J.C.S., BRANDÃO, S.C.C. Avaliação do método Scherer modificado visual e espectrofotométrico e do método oficial brasileiro na determinação da atividade de fosfatase alcalina residual em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.345, p. 136-139. 2005b

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H.. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Chapman & Hall. 478 p. 1998.

FRAM, H. The Reactivation of Phosphatase in HTST Pasteurized Dairy Products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.40, p.19-27, 1957.

HAAB, W.; SMITH, L. M. Some Properties of Alkaline Phosphatase of Milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, p. 546-555, 1956.

HASSAN, S.S.M.; SAYOUR, H.E.M.; KAMEL, A.H. A simple-potentiometric method for determination of acid and alkaline phosphatase enzymes in biological fluids and dairy products using a nitrophenylphosphate plastic membrane sensor. **Analytica Chimica Acta**. n. 640, p. 75-81, 2009.

IDF International Dairy Federation. **Milk and Milk Products – Determination of alkaline phosphatase activity. Part 1: Fluorimetric method for milk and milk based drinks**. Brussels, 2006. 11 p.(International Standard 155-1).

IDF International Dairy Federation. **Milk and Milk Products – Determination of alkaline phosphatase activity. Part 2: Fluorimetric method for cheese**. Brussels, 2003. 8 p.(International Standard 155-2).

- IDF International Dairy Federation. **Milk and dried Milk, butter milk and butter milk powder, whey and whey powder – Detection of phosphatase activity.** Brussels, 2004. 9 p.(International Standard 82).
- IDF International Dairy Federation. **Milk and milk based drinks - Determination of alkaline phosphatase activity – Enzymatic photo-activated system (EPAS) method.** Brussels, 2007. 16 p.(International Standard 209).
- KARMAS, R.; KLEYN, D. H. Determination and Interpretation of Alkaline Phosphatase Activity in Experimental and Commercial Butters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, p. 584-589, 1990.
- MARTINS, F. O. **Adaptação do método rápido de Scharer para detecção da atividade de fosfatase alcalina residual em queijo minas padrão de acordo com exigências internacionais.** Viçosa, UFV, 77 p., 2006. (Dissertação de mestrado).
- MURTHY, G.K; KLEYN, D.H; RICHARDSON, T; ROCCO, R.M. In:MARSHALL, R.T. (Ed.). **Standard Methods for Examination of Dairy Products.** American Public Health Association. 16th edition. Washington, p.413-430. 1992.
- PAIVA, D.M.; ALMEIDA, V.F; SOUZA, M.R., CERQUEIRA, M.M.O.P; LEITE, M.O.; FONSECA, L.M.; PENNA, C.F.A.M. Comparação de dois métodos de detecção de fosfatase alcalina em amostras de leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.61, n.351, p. 83-85. 2006.
- PRATT-LOWE, E. L.; RICHARDSON, T.; GEIGER, R. M. Inactivation of Microbial Alkaline Phosphatase in Hispanic-Style Cheeses with the Scharer Rapid Phosphatase Test. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, p.1804-1806, 1987.
- RODRIGUES, R. A fosfatase alcalina no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.30, n.182, p. 3-6. 1975.
- SALTER, R. S.; FITCHEN, J. Evaluation of a Chemiluminescence Method for Measuring Alkaline Phosphatase Activity in Whole Milk of Multiple Species and Bovine Dairy Drinks: Interlaboratory Study. **Journal of AOAC International** Vol. 89, No. 4, p. 1061-1071. 2006
- SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação.** Juiz de Fora: Templo Editora, 2004. p.127.
- TETRA-PAK. **Dairy processing handbook.** Lund: LP Grafiska AB, 1995. 436p.
- WASLTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica.** Zaragoza: Editorial Acribia, 1984, 423 p.