



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102014019340-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102014019340-5

(22) Data do Depósito: 05/08/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 26/04/2016

(51) Classificação Internacional: G01N 33/04; G01N 21/78.

(54) Título: KIT E MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, -. CGC/CPF: 88648761000103.
Endereço: R. Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco A, Sala 301, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070-560, Brasileira

(72) Inventor: LELIS APARECIDA PETRINI FORTUNA; ANNA CELIA SILVA ARRUDA; LUCIANA BAVARESCO ANDRADE TOUGUINHA; SERGIO ECHEVERRIGARAY.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 05/08/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 02/02/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

KIT E MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO

Campo da Invenção

[0001]A presente invenção descreve kits e métodos para identificação de leite instável não ácido. A presente invenção se situa no campo da química.

Antecedentes da Invenção

[0002]A indústria láctea atualmente utiliza o teste do etanol para predizer a estabilidade térmica e a acidez do leite, no entanto este teste não é capaz de diferenciar o leite com caseína instável (LINA) do leite ácido. Os dois tipos de leite apresentam o mesmo comportamento frente ao teste do etanol, sendo impossível por este teste diferenciar o LINA do leite ácido.

[0003]O teste de etanol é usado para diferenciar o leite normal do leite ácido. O resultado positivo ao teste do etanol é visível e, produz precipitações da micela de caseína quando em contato com etanol. A interpretação não correta do resultado ao teste do etanol faz com que grandes quantidades de leite sejam descartadas, já que o LINA é interpretado erroneamente como sendo leite ácido. A composição físico-química, células somáticas, pH, acidez Dornic, contagem bacteriana total do LINA estão dentro dos parâmetros exigidos pela legislação IN62 (Brasil, 2011).

[0004]O descarte indevido do leite instável não ácido tem prejudicado o produtor rural por ter seu leite descartado e, a indústria que perde produto de ótima qualidade. O LINA por possuir caseína instável, apresenta um fator positivo para o processamento de queijos e iogurtes sendo esta característica além de desejável, primordial para o processamento destes lácteos. A temperatura utilizada na pasteurização é indicada para o processamento do LINA pela indústria, assim o LINA pode ser comercializado de forma *in natura* ou na forma de derivados lácteos, garantindo a segurança alimentar do consumidor. O leite estável por possuir a micela de caseína resistente a altas

temperaturas e por isso pode ser utilizado no processo *Ultra High Temperature* (UHT).

[0005]Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0006]O artigo “Incidência de leite instável não ácido (LINA) em uma microbacia leiteira no estado do espírito santo” publicado em 2011, revela uso de EDTA para reduzir a disponibilidade do cálcio total no leite e proporcionar uma maior estabilidade do leite ao etanol. Entretanto o documento não identifica o leite instável não ácido presente no leite.

[0007]O artigo “ACIDEZ TITULÁVEL” publicado pela EMBRAPA, revela o teste de acidez titulável usado para detectar o leite instável não ácido (LINA) através de uma substância básica, o hidróxido de sódio, e uma substância indicadora, a fenolftaleína. Entretanto, o documento não apresenta dados para uma otimização da detecção do leite instável não ácido.

[0008]Dessa forma, devem ser encontradas formas simples e eficientes de identificação do leite instável não ácido (LINA) que contribuam para evitar o descarte indevido do mesmo.

[0009]Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0010]Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de concretizações de kits e métodos para identificação de leite instável não ácido (LINA). O conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados são kits e métodos que atuam na identificação de leite instável não ácido em diferenciação ao leite normal e o leite com acidez inadequada (pH muito baixo).

[0011]Como primeiro objeto, a invenção apresenta um Kit para identificação de leite instável não ácido compreendido por uma mistura de indicadores de pH.

[0012] Como segundo objeto, a invenção apresenta um método para identificação de leite instável não ácido, compreendido:

- a) coleta de uma alíquota de leite
- b) realização do teste de etanol 72% (v/v) com a alíquota de leite coletada na etapa a);
- c) coleta de uma nova alíquota de leite; e
- d) adição do kit para identificação de LINA compreendido por uma mistura de indicadores de pH à alíquota coletada na etapa c).

[0013] Como terceiro objeto, a presente invenção apresenta um kit para identificação de leite instável não ácido compreendido por um recipiente contendo água e pelo menos um íon quelante.

[0014] Como quarto objeto, a presente invenção apresenta um método para identificação de leite instável não ácido compreendido:

- a) coleta de uma alíquota de leite;
- b) realização do teste de etanol 72% (v/v) com a alíquota de leite coletada na etapa a); e
- c) a adição do kit de identificação de leite instável não ácido compreendido por um recipiente contendo água e pelo menos um íon quelante à alíquota de leite obtida na etapa b).

[0015] Como quinto objeto, a presente invenção apresenta um kit para identificação de leite instável não ácido compreendendo 1,8mL de NaOH N/9 e fenolftaleína, preferencialmente 3 a 4 gotas fenolftaleína.

[0016] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0017] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente é apresentado as presentes figuras:

[0018]A figura 1 mostra o teste ao etanol com resultado positivo em LINA (A-B) e Leite ácido (C-D).

[0019]A figura 2 mostra a re-solubilização dos coágulos de A e B após a adição do Kit EDTA

[0020]A figura 3 mostra o acidímetro de Dornic.

[0021]A figura 4 mostra a titulação, com solução titulante de NaOH N/9 com a alteração de cor da solução para róseo.

[0022] A figura 5 mostra resultados do teste indicador misto.

[0023]A figura 6 mostra resultados do teste indicador misto.

Descrição Detalhada da Invenção

[0024]A possibilidade de identificação de leite instável não ácido (LINA) em diferenciação ao leite normal e o leite ácido permite que o LINA não seja descartado indevidamente, o qual pode ser aproveitado pelo produtor rural e a pela indústria. O LINA por possuir caseína instável, apresenta um fator positivo para o processamento de queijos e iogurtes sendo esta característica além de desejável, primordial para o processamento destes lácteos.

[0025]Em um primeiro objeto, Kit para identificação de leite instável não ácido, a presente invenção apresenta uma mistura de indicadores de pH.

[0026]Em uma concretização, a mistura de indicadores de pH apresenta faixa de pH de variação de cor próximo a 5,2 a 6,8; 6,8 a 8,2 e 6,0 a 7,6.

[0027]Em uma concretização, a mistura de indicadores de pH é uma mistura de vermelho fenol e o púrpura de bromocresol.

[0028]Em uma concretização, a mistura de indicadores de pH é preparada com uma parte de vermelho fenol e duas partes de púrpura de bromocresol em proporção mássica.

[0029]Em um segundo objeto, método para identificação de leite instável não ácido, compreendendo:

- a) coleta de uma alíquota de leite

b) realização do teste de etanol 72% (v/v) com a alíquota de leite coletada na etapa a);

c) coleta de uma nova alíquota de leite; e

d) adição do kit para identificação de LINA compreendido por uma mistura de indicadores de pH à alíquota coletada na etapa c).

[0030] Em uma concretização, a quantidade do indicador misto é de 150 µL.

[0031] Em um terceiro objeto, Kit para identificação de leite instável não ácido, a presente invenção compreende um recipiente contendo água e pelo menos um íon quelante.

[0032] Em uma concretização, o íon quelante é o sal dihidrogenoetilenodiaminotetracetato de dissódico.

[0033] Em uma concretização, a quantidade do íon quelante é de 50µL à 250 mM.

[0034] Em um quarto objeto, método para identificação de leite instável não ácido compreendendo:

a) coleta de uma alíquota de leite;

b) realização do teste de etanol 72% (v/v) com a alíquota de leite obtida na etapa a); e

c) a adição do kit de identificação de leite instável não ácido que compreende um recipiente contendo água e pelo menos um íon quelante à alíquota de leite obtida na etapa b).

[0035] Em uma concretização, as etapas b) e c) definidas acima são realizadas simultaneamente.

[0036] Em um quinto objeto, kit para identificação de leite instável não ácido, a presente invenção compreende 1,8mL de NaOH N/9 e fenolftaleína, preferencialmente 3 a 4 gotas fenolftaleína.

[0037] Em uma concretização, a fenolftaleína possui 1% (m/v).

[0038] Faixa de pH de mudança de cor

[0039] No contexto da presente invenção, o termo “faixa de pH de mudança de cor” deve ser entendido como uma faixa de valor de pH onde ocorra o ponto de

viragem do indicador mostrado por uma mudança visível de cor permitindo uma estimativa do valor de pH do meio.

[0040] Quelante

[0041] No contexto da presente invenção, o termo “Quelante” pode ser entendido como uma substância que forma complexos através da conjugação por ligações covalentes coordenadas com cátions metálicos.

[0042] Alíquota

[0043] No contexto da presente invenção, o termo “Alíquota” pode ser entendido como uma fração da quantidade total de leite.

[0044] Teste de etanol 72% (v/v)

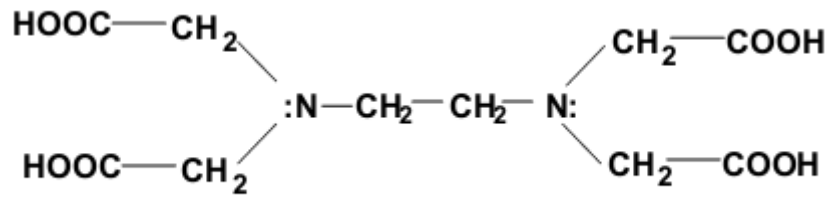
[0045] “Teste de etanol 72% (v/v)” se refere ao teste de etanol que segue a legislação vigente IN 62 (BRASIL, 2011). São misturados 2 mL de leite e 2 mL de etanol no mínimo 72% (v/v) e agitados, em seguida se houver a formação de coágulos, o resultado é considerado positivo ao teste de etanol.

[0046] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

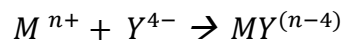
Exemplo 1.

[0047] O primeiro exemplo consiste na identificação de leite instável não ácido (LINA) através de um Kit contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), é o quelante mais importante porque forma complexos extremamente estáveis com metais. O kit é manipulado em forma de solução contendo água deionizada e o sal dihidronoetilenodiaminotetracetato de dissódico (EDTA-Na).

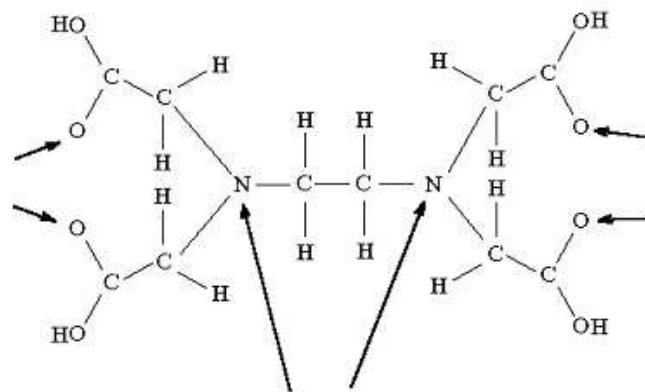
[0048] O EDTA na forma de ácido ou sal dissódico pode ser obtido em alto grau de pureza, podendo ser usado como padrão primário, porém, se necessário pode ser padronizado contra solução padrão de zinco. Abaixo a estrutura do EDTA, um ácido poliprótico com $pK_{a1} = 2,0$; $pK_{a2} = 2,7$; $pK_{a3} = 6,2$ e $pK_{a4} = 10,3$.



[0049] Este é um ácido tetracarboxílico, possuindo quatro hidrogênios ionizáveis, sendo simplificada representado por H_4Y . A reação com íon metálico pode ser genericamente representa por:



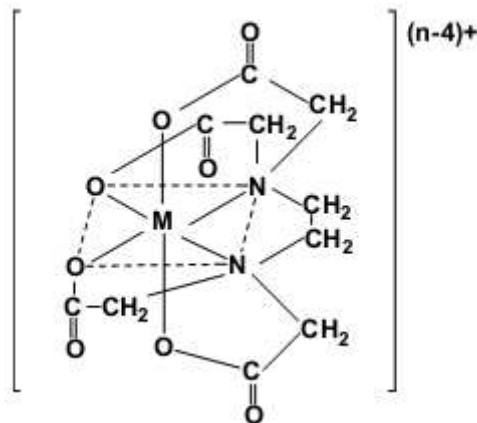
[0050] Na complexação de íons metálicos com EDTA, a sua espécie ativa é o íon y^{4-} , cuja concentração depende do pH. Pois, somente em solução nitidamente alcalina o EDTA se encontra presente predominantemente na forma de íon y^{4-} , com o aumento da concentração de íon de hidrogênio, cai a concentração da espécie y^{4-} , ou seja, a concentração do íon y^{4-} diminui com o decréscimo do pH. Abaixo a estrutura mostra os átomos que possuem pares de elétrons que formam as ligações covalentes coordenadas com os orbitais disponíveis dos metais. As setas representam os átomos ligantes.



[0051] Os íons metálicos (M) substituem os íons hidrogênios de dois ou mais grupos carboxílicos. Portanto, o pH da solução é importante na titulação. Em pH elevado, o quelato está mais dissociado (íon em maior quantidade – menos

protonado) na solução, e a detecção do ponto final da titulação é mais pronunciado.

[0052] O sal dissódico ($\text{EDTA} = \text{Y}^{4-}$) forma um quelato 1:1 com muitos metais de transição, conforme a estrutura abaixo:



[0053] A instabilidade do LINA é causada pelo cálcio iônico. Portanto, o EDTA, por ser um agente sequestrante de metais, forma ligações estáveis com os íons cálcio, inertizando estes íons e evitando a instabilidade da caseína. O EDTA presente no kit, quando em contato com o LINA, sequestra o cálcio iônico responsável pela instabilidade da caseína do LINA e não possui efeito sobre o leite ácido. Assim, se o leite for LINA, a formação de coágulos no leite a partir do teste de etanol será revertido, ou seja, os coágulos formados serão solubilizados enquanto o leite ácido continuará com os coágulos. Assim, os resultados são negativos ao teste do etanol.

[0054] O teste com EDTA pode ser realizado logo após o resultado do teste de etanol seu resultado, pois o resultado positivo para o LINA se dá pela re-solubilização dos coágulos formados no teste de etanol. Caso a amostra contenha leite ácido, a re-solubilização dos coágulos não ocorre mesmo com a adição do kit com EDTA.

[0055] No primeiro exemplo foi misturado 2 mL de leite com 2 mL de etanol de no mínimo 72% (v/v) e agitado até a homogeneização. Após a agitação, foi observado se houve formação de coágulos no leite. Em caso positivo, foi acrescentado o kit contendo 50 μL de EDTA a 250 mM para identificação do

LINA. Após a adição do Kit EDTA e a agitação, foi observado se houve a re-solubilização dos coágulos. Se não houver a formação de coágulos, o leite é classificado como leite instável não ácido, caso persista a formação de coágulos, o leite é classificado como ácido.

[0056]A Figura 1 e 2 mostra os resultados positivos ao teste ao etanol, caracterizados pela formação de coágulos imediatamente após a homogeneização da mistura de 2 mL de leite ácido ou LINA com 2 mL de etanol no mínimo a 72% (v/v). A Figura 2 mostra o resultado após a adição do Kit EDTA ao LINA, mostrando a re-solubilização dos coágulos e a produção de uma dispersão homogênea, enquanto que no leite ácido não ocorre a re-solubilização dos coágulos.

Exemplo 2.

[0057]O segundo método de identificação de leite instável não ácido (LINA) é realizado através de um kit que utiliza uma substância indicadora Fenolftaleína. Após o resultado positivo ao teste de etanol (BRASIL, 2011), primeiramente o LINA foi testado em acidímetro de Dornic adicionando-se fenolftaleína 1% (m/v) e realizando a titulação com solução titulante de NaOH N/9 até a alteração da cor para róseo. A cada 0,1 ml de NaOH N/9 gasto na escala do acidímetro de Dornic corresponde a 1°D (0,01% de ácido láctico).

[0058]Este teste segue um protocolo preconizado na legislação (BRASIL, 1981), portanto não é conveniente sugerir alterações no método, o qual já está validado. No entanto, este ensaio é realizado apenas no laboratório com vidrarias especiais (pipetas, acidímetro de Dornic, etc.) e por pessoas treinadas a nível técnico de laboratório. A proposta da presente invenção é a realização do ensaio em campo, no qual não é obtido o resultado exato do ensaio, mas é consumida a quantidade máxima de solução aceitável para classificar o leite em normal, sem acidez adquirida. O ensaio com resposta visual pode ser realizado por pessoas sem formação específica, apenas com um simples treinamento. O teste é de baixo custo, rápido, simples e eficiente.

[0059] Foi realizado primeiramente o teste em acidímetro de Dornic (Figura 3). Adicionou-se 10 ml de leite LINA em um Becker, e acrescentaram-se quatro gotas de fenolftaleína a 1% (m/v). Realizou-se de imediato a titulação, com solução titulante de NaOH N/9 até alteração de cor da solução para róseo (Figura 4). O volume médio de solução titulante ficou em média entre 1,5 a 1,8 mL. Cada 0,1 ml de NaOH N/9 gasto na escala do acidímetro de Dornic corresponde a 1°D (0,01% de ácido láctico). Após realizou-se a titulação de leite ácido e o volume de solução titulante ficou acima de 2,0 mL. A legislação classifica o leite normal com acidez Dornic entre 14 a 18°D. Portanto, o volume máximo gasto de solução titulante é de 1,8 mL, suficiente para mudar a cor da fenolftaleína de vermelho para róseo. Se a adição desse volume a 10 mL da amostra apresentar mudança de cor de vermelho para incolor, o leite apresenta acidez acima de 18 °Dornic, sendo classificado como ácido.

[0060] No teste de acidez dornic realizado no laboratório a solução de fenolftaleína utilizada é incolor, mas no KIT a fenolftaleína (3 a 4 gotas) já vem diluída com o NaOH N/9 (1,8 mL) apresentando dessa forma uma cor vermelha o Kit por causa da mistura. Está é a diferença na apresentação do KIT para os dois testes no laboratório e no campo. Contudo o resultado é eficiente, ou seja o mesmo : cor róseo para o LINA e incolor para o leite ácido.

Exemplo 3.

[0061] O terceiro método é um diferenciador de identificação de leite instável não ácido (LINA) com o leite ácido e é realizado a partir de um kit com uma solução indicadora mista contendo uma parte de vermelho de fenol para duas partes de púrpura de bromocresol.

[0062] A preparação da solução indicadora mista foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado uma solução contendo 100mg do indicador vermelho de fenol diluído a 100mL com NaOH 0,025 mol/L (solução 1) e uma outra solução contendo 200 mg do indicador diluído a 100mL com NaOH 0,01 mol/L (solução 2). Em uma segunda etapa foi misturado 4mL da solução 1 com 5 mL da solução 2. Após a mistura das duas soluções, foi retirado 50µL da

mistura e adicionado à 100µL da solução 2, resultando na solução indicadora mista da presente invenção.

[0063]O método consiste em adicionar à amostra do leite o indicador misto preparado e adicionar o etanol 72% (v/v), seguido de agitação e observação da coloração. Caso o leite seja muito ácido com pH abaixo de 6,2, sua coloração será verde, caso o leite seja ácido de pH entre 6,2 e 6,5, sua coloração será cinza, caso o leite seja normal ou LINA de pH entre 6,6 e 6,8, sua coloração será roxa. Alternativamente, também podem ser utilizados outros indicadores que apresentem faixa de pH de variação de cor próximo a 5,2 a 6,8; 6,8-8,2 e 6,0 a 7,6.

[0064]O LINA pode ser diferenciado do leite normal por apresentar formação de coágulos ou grumos após a adição de 2mL de etanol a 72 % (v/v), enquanto o leite normal permanecerá com uma dispersão homogênea. Alternativamente, esse método pode ser realizado simultaneamente ao teste do etanol para diferenciar Leite ácido, LINA e Normal ou dispensar a utilização do teste do etanol para diferenciar apenas o leite ácido de LINA por apresentarem cores distintas como resultado de teste.

[0065]A Figura 5 apresenta os resultados obtidos com o teste de indicador misto, para amostras de leite normal, leite ácido, leite muito ácido e LINA, respectivamente. Para o leite normal (Figura 5A), pode-se visualizar uma dispersão homogênea de cor roxa. Para o leite ácido (Figura 5B), a cor visualizada é cinza, enquanto que o leite muito ácido (Figura 5C) apresenta uma coloração verde com coágulos. O LINA (Figura 5D), apresenta a coloração roxa, porém com a formação de coágulos.

[0066] A figura 6 mostra os resultados apresentados na Figura 5 após a o leite ácido coagular novamente.

[0067]Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Método para identificação de leite instável não ácido **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a) coleta de pelo menos uma alíquota de amostra de leite;
- b) realização do teste de etanol 72% (v/v) com a dita alíquota de amostra de leite coletada na etapa a); e
- c) a adição de pelo menos um íon quelante a uma alíquota obtida na etapa b).

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** etapas b) e c) serem realizadas simultaneamente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo** íon quelante ser o sal dihidrogenoetilenodiaminotetracetato de dissódico, ácido etilenodiaminotetracético ou combinações dos mesmos.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pela** quantidade do íon quelante ser de 50 µL a 250 mM.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 **caracterizado pelo** fato de que a identificação do tipo de leite se dá por uma das seguintes formas:

- se a adição de álcool não gerar uma formação de coágulos; o tipo de leite identificado é o leite normal;
- se a adição de álcool gerar uma formação de coágulos e a adição do agente quelante gerar a dissolução dos ditos coágulos; o tipo de leite identificado é o leite LINA;
- se a adição de álcool gerar uma formação de coágulos e a adição do agente quelante não gerar a dissolução dos ditos coágulos; o tipo de leite identificado é o leite ácido.

6. Kit para identificação de leite instável não ácido **caracterizado por** ser utilizado em um método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, e compreender uma solução aquosa de íon quelante e uma solução de

etanol com concentração de 72% (v/v).

7. Kit, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** compreender adicionalmente pelo menos 1,8mL de NaOH N/9 e fenolftaleína.

8. Kit, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** compreender fenolftaleína a 1% (m/v).

FIGURAS

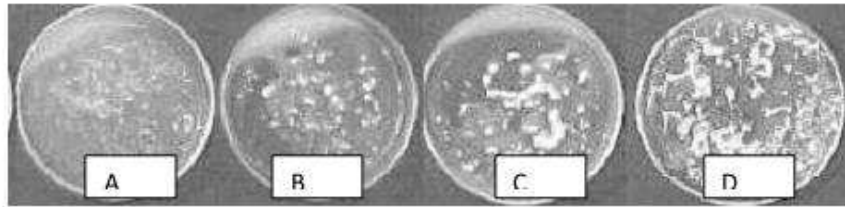


Figura 1



Figura 2



Figura 3

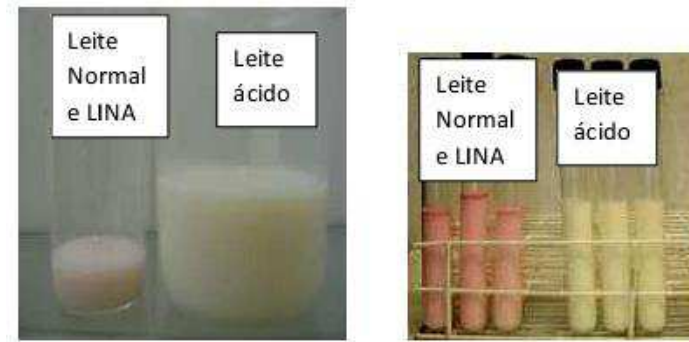


Figura 4

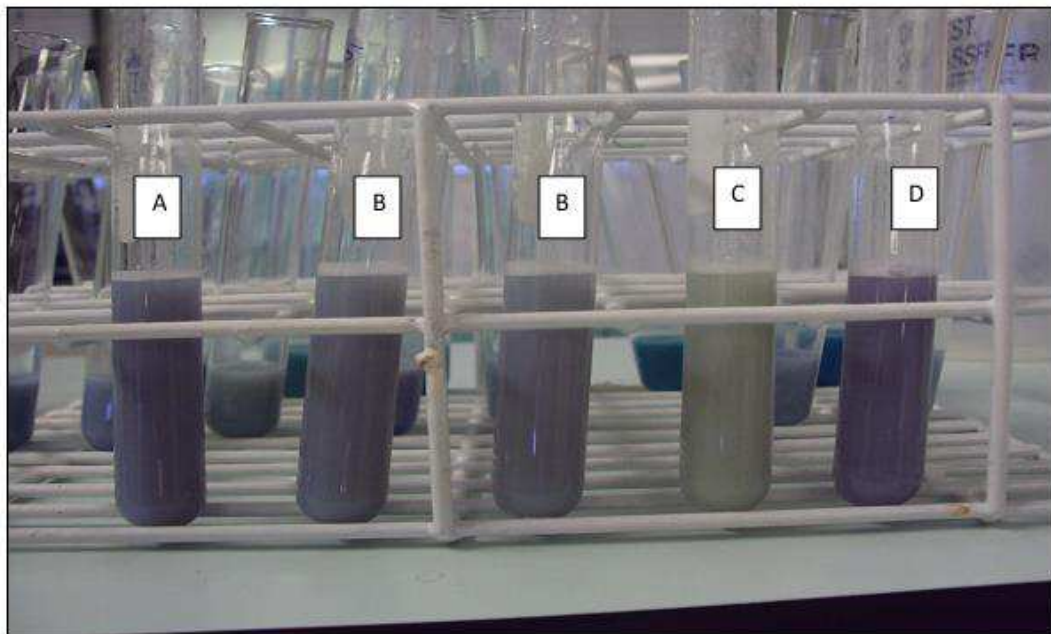


Figura 5

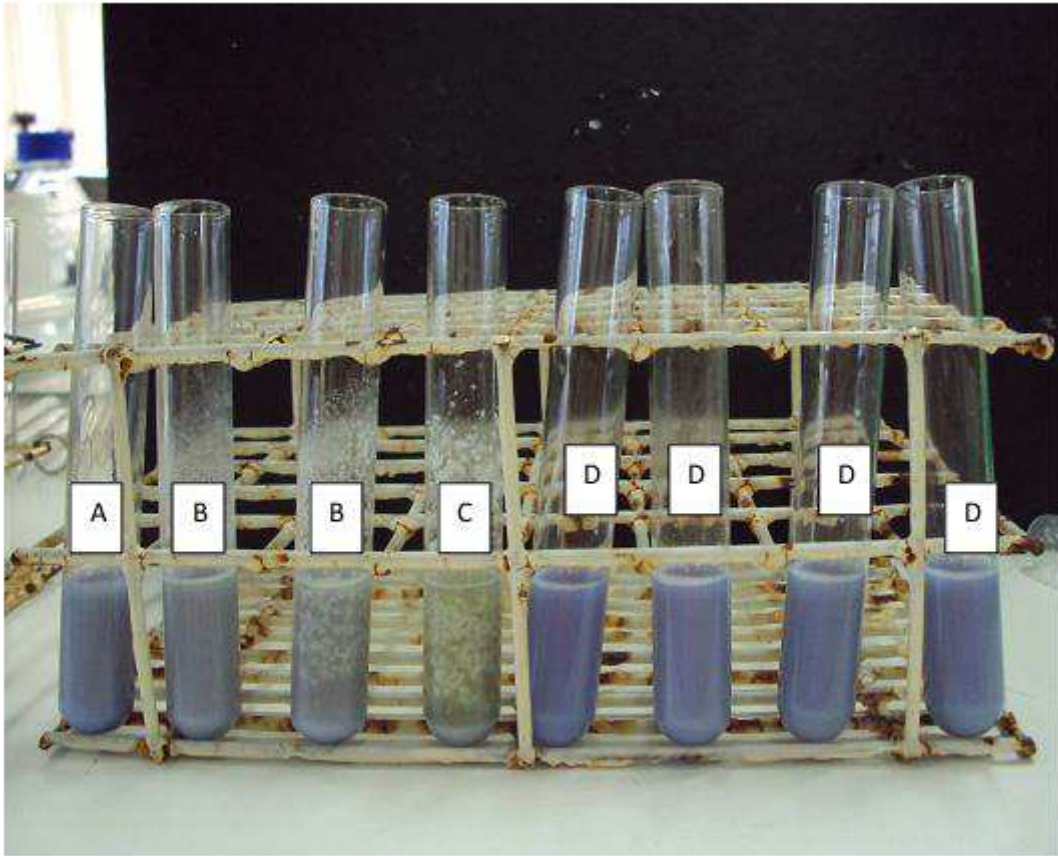


Figura 6