



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LIVIA CAVALETTI CORRÊA DA SILVA

**CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE ADULTERAÇÕES E
SUFICIÊNCIA DAS PROVAS OFICIAIS PARA ASSEGURAR
A QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO**

LIVIA CAVALETTI CORRÊA DA SILVA

**CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE ADULTERAÇÕES E
SUFICIÊNCIA DAS PROVAS OFICIAIS PARA ASSEGURAR
A QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal (nível Doutorado) da Universidade
Estadual de Londrina como requisito para a
obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof.Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586c Silva, Livia Cavaletti Corrêa da.
Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais
para assegurar a qualidade do leite pasteurizado / Livia Cavaletti Corrêa
da Silva. -Londrina, 2013.
83 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Leite - Adulteração e inspeção - Teses. 2. Leite - Pasteurização - Teses.
3. Leite - Controle de qualidade - Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. III. Título.

CDU 637.1

LIVIA CAVALETTI CORRÊA DA SILVA

**CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE ADULTERAÇÕES E SUFICIÊNCIA
DAS PROVAS OFICIAIS PARA ASSEGURAR A QUALIDADE DO
LEITE PASTEURIZADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal (nível Doutorado) da Universidade
Estadual de Londrina como requisito para a
obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vanerli Beloti
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Eder Paulo Fagan
UENP – Luiz Meneghel

Profa. Dra. Elsa Helena Walter de Santana
UNOPAR – Londrina – PR

Profa. Dra. Luciene Garcia Pretto Giordano
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Marcos Rodrigues de Mattos
UFLA – Lavras – MG

Londrina, 19 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jusmar e Flávia e à minha irmã Luciana por todo apoio e carinho.

À minha amiga e orientadora Profa. Dra. Vanerli Beloti, pelo incentivo e confiança de sempre e também por me contagiar com sua paixão pelo ensino e pesquisa.

Ao Dr. Ronaldo Tamanini pela amizade e por estar sempre por perto quando precisei.

A todos que fizeram ou fazem parte da grande família LIPOA que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho, pela dedicação, companheirismo e por fazer do laboratório nossa segunda casa.

Aos professores Marcos Rodrigues de Mattos, Elsa Helena Walter de Santana, Eder Paulo Fagan e Luciene Garcia Pretto Giordano por sua contribuição na correção deste trabalho.

Ao curso de pós-graduação em Ciência Animal da UEL.

A todos os amigos que me apoiaram e toleraram durante a execução deste trabalho.

SILVA, Livia Cavaletti Corrêa. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado.** 2013. 83 f. Tese (Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O leite é um alimento sujeito à fraudes. As mais frequentes são a adição de água, reconstituintes, conservantes e neutralizantes. Apesar da legislação determinar a pesquisa diária dessas substâncias, a avaliação do leite pelas indústrias geralmente é realizada apenas por análises físico-químicas genéricas como densidade e crioscopia. Contudo, essas fraudes muitas vezes são calculadas para impedir sua identificação por provas de rotina não específicas. O objetivo desse trabalho foi pesquisar a ocorrência de fraudes, resíduos de antibióticos e irregularidades físico-químicas e microbiológicas em leite pasteurizado, bem como avaliar a capacidade de detecção de adulterações e a suficiência das provas oficiais específicas e inespecíficas na identificação da adição de reconstituintes, conservantes e neutralizantes. Foram avaliadas 100 amostras de leite pasteurizado, produzido no Paraná, para a presença de reconstituintes, conservantes, neutralizantes e antibióticos e demais parâmetros físico-químicos e microbiológicos determinados pela legislação. Em outro experimento, a capacidade de detecção das provas oficiais para pesquisa de sacarose, cloretos, amido, formaldeído, cloro, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e neutralizantes da acidez foi avaliada utilizando-se de amostras adulteradas em laboratório. Foram avaliados adicionalmente testes não oficiais para avaliar a presença de inibidores do crescimento microbiano e o efeito inibidor de algumas substâncias conservantes e neutralizantes sobre a microbiota do leite cru. Os resultados mostraram que das 100 amostras de leite pasteurizado, 51% apresentaram problemas, das quais 25% estavam fora dos padrões nas análises físico-químicas e 10% nas análises microbiológicas, 14% apresentaram resíduos de antibióticos e a adição de reconstituintes foi detectada em 13% das amostras. Observou-se que a avaliação do leite apenas por análises físico-químicas de rotina, como densidade e crioscopia não é suficiente para identificar fraudes por adição de água e reconstituintes. As provas para a pesquisa específica de substâncias reconstituintes apresentaram boa capacidade de detecção, assim como a prova para pesquisa de formaldeído. A adição de sacarose em amostras adulteradas no laboratório elevou a porcentagem de lactose detectada por equipamentos que utilizam infravermelho e ultrassom, demonstrando que estes equipamentos não quantificam especificamente a lactose. Quanto às amostras adicionadas de conservantes e neutralizantes no laboratório, a prova inespecífica da cultura de iogurte foi capaz de detectar a inibição de crescimento nas amostras adicionadas de formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito e hidróxido de sódio, apresentando resultados próximos aos das provas oficiais para a pesquisa dessas substâncias. A adição de formaldeído, peróxido de hidrogênio e hipoclorito promoveu reduções significativas nas contagens de microorganismos aeróbios mesófilos no leite cru adulterado no laboratório. o entanto, não foi possível detectar peróxido de hidrogênio e compostos clorados após 24 horas de refrigeração, provavelmente em consequência da degradação e /ou inativação dessas substâncias no leite. A prova para a pesquisa de neutralizantes da acidez detecta a substância apenas quando a alcalinização é excessiva. A neutralização equilibrada do ácido láctico resulta na anulação da capacidade de detecção da prova. A pesquisa de inibidores microbianos, neutralizantes e reconstituintes é obrigatória apenas para leite cru, porém, a presença de grande parcela de amostras positivas para reconstituintes e antimicrobianos no leite pasteurizado demonstra falhas no controle de qualidade e pode indicar a prática de adulteração do leite também pela indústria.

Palavras-chave: Fraude. Reconstituintes. Conservantes. Neutralizantes. Antibióticos. Qualidade.

SILVA, Livia Cavaletti Corrêa. **Ability to detect adulteration and sufficiency of the official tests to assure pasteurized milk quality.** 2013. 83 p. Tese (Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Milk is one of the major targets for fraud. The most frequent are addition of water, restoratives, preservatives and neutralizers. Although legislation determines the daily survey of these substances by specific tests, milk evaluation by industries is usually performed only by generic physicochemical tests as density and freezing point. However, these adulterations are often calculated to prevent their identification by these routine non specific tests. The aim of this study was to investigate the occurrence of fraud, antibiotic residues and irregularities in physico-chemical and microbiological parameters in pasteurized milk produced in northern Paraná, as well as to evaluate the ability of adulteration detection by official tests to identify the addition of restoratives, preservatives and neutralizers in milk. An assesment was performed in 100 pasteurized milk samples to evaluate the presence of restoratives, preservatives, antibiotics and neutralizers and other physico-chemical and microbiological tests determined by legislation. In a second experiment, the detection ability of official tests for the research of sucrose, chloride, starch, formaldehyde, chlorine, hypochlorite, hydrogen peroxide and neutralizers was evaluated using samples adulterated in laboratory. Additionally, unofficial tests to evaluate the presence of inhibitors of microbial growth and the inhibitory effect of some preservative and neutralizers substances on the biota of raw milk were performed. Results show that of the 100 samples of pasteurized milk evaluated, 51% had problems, from which 25% were outside parameters for physicochemical analyzes, 10% for microbiological analyzes, 14% were positive for the presence of antibiotic and in 13% adulteration by restoratives were detected. It was observed that milk evaluation only by physico-chemical routine analyzes, such as density and cryoscopy is not sufficient to identify fraud by water and restoratives addition. Specific tets for restoratives detection exhibit good detection potentials, as well as the test for formaldehyde. . The addition of sugar altered quantification of lactose detected by equipments tha use infrared and ultrasound, demonstrating that these do not detect lactose exclusively. Regarding samples added with preservatives and neutralizers substances in laboratory, the yogurt culture test was able to detect microbial growth inhibition in samples added with formaldehyde, hydrogen peroxide, hypochlorite and sodium hydroxide. Presenting resluts similar to the official tests. The addition of formaldehyde, hydrogen peroxide and hypochlorite promoted significant reductions in the counts of mesophilic aerobic micro-organisms in raw milk adulterated in laboratory. However it was not possible to detect hydrogen peroxide and clhorated compounds after 24 hours of refrigeration, maybe due to its rapid degradation and / or inactivation of these substances in milk. Neutralizing substances detection can only dectect this substances when alcalinization is excessive. The balanced neutralization of latic acid results on the anulment of detection ability of the test. The research of preservatives, neutralizers and restoratives is not required for pasteurized milk, only for raw milk. The presence of large numbers of samples positive for these substances demonstrates flaws in quality control of raw milk or occurrence of milk adulteration by the industry itself.

Keywords: Fraud. Restoratives. Preservatives. Neutralizing. Antibiotics. Quality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESTADO DA ARTE

- Quadro 1** – Produção anual de leite dos 10 países de maior produção mundial em 2011 12
- Quadro 2** – Requisitos físico -químicos determinados para o leite cru refrigerado 15

ARTIGO 1

- Quadro 1** – Distribuição do número de amostras entre os laticínios avaliados e Serviço de Inspeção existente no estabelecimento 32
- Quadro 2** – Limites de detecção (LD) do Kit CowSide® II test (Charm Sciences Inc) e limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela legislação para a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado 34

ARTIGO 2

- Quadro 1** – Concentrações dos reconstituintes utilizados nos experimentos para avaliar alterações físico-químicas no leite e a sensibilidade analítica das provas descritas pela legislação antes e após a adição de 5% de água 47

ARTIGO 3

- Quadro 1** – Substâncias e concentrações utilizadas para avaliação da sensibilidade analítica de provas para pesquisa de conservantes e neutralizantes em leite cru 59
- Quadro 2** – Substâncias e concentrações utilizadas para avaliar o efeito inibitório sobre a microbiota de aeróbios mesófilos em leite cru e persistência dos resíduos durante 48 horas de refrigeração 61

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1** –Médias e número de amostras fora dos parâmetros estabelecidos² nas análises físico-químicas em amostras de leite pasteurizado, no período entre agosto e outubro de 2012, no estado do Paraná..... 35
- Tabela 2** –Distribuição de amostras de leite pasteurizado de laticínios do Paraná, avaliadas entre outubro e novembro de 2012, de acordo com a contagem (UFC/mL) de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM)..... 37
- Tabela 3** –Distribuição de amostras de leite pasteurizado de laticínios do Paraná, avaliadas entre outubro e novembro de 2012, de acordo com as contagens (UFC/mL) de coliformes totais (CT) e Escherichia coli (EC)..... 38

ARTIGO 2

- Tabela 1** –Detecção de cloretos, médias (n=3) e desvio padrão (DP) para densidade, crioscopia e condutividade de leite adicionado de diferentes concentrações de sal iodado comercial, antes e depois da adição de 5% de água 49
- Tabela 2** –Detecção de sacarose, médias (n=3) e desvio padrão (DP) para densidade, crioscopia e quantificação da lactose por Infravermelho (IV) e Ultrassom (US) de leite adicionado de diferentes concentrações de açúcar comercial, com e sem adição de 5% de água 50
- Tabela 3** –Detecção de amido, médias (n=3) e desvio padrão (DP) para densidade, crioscopia de leite adicionado de diferentes concentrações de amido de milho e farinha de trigo, com e sem adição de 5% de água 52

ARTIGO 3

- Tabela 1** –Capacidade de detecção de conservantes e neutralizantes em leite pelas provas de cultura de iogurte (CI), lactofermentação (LF), Charm® CowSide II Test (CT) e das provas indicadas pela legislação (LG)..... 63

Tabela 2 –Efeito inibidor do crescimento de aeróbios mesófilos nas contagens médias (n=3) promovido por substâncias conservantes e neutralizantes em leite cru, realizadas com 24 e 48 horas de refrigeração.....	63
Tabela 3 –Detecção de conservantes e neutralizantes no leite cru avaliada em três períodos, logo após adição ao leite (T0), após 24 horas (T24) e após 48 horas (T48) de refrigeração	64
Tabela 4 –Interferência da acidificação experimental do leite por ácido láctico após a adição de hidróxido de sódio na sensibilidade analítica da prova para a pesquisa de neutralizantes ¹ e alterações na acidez Dornic, alizarol 72% e pH.....	67

APÊNDICE A

Tabela 1 –Perfil enzimático, contagem padrão em placas (CPP), contagem de coliformes totais (CT) e Escherichia coli (EC), lactofermentação (LF) e pesquisa de antibióticos (ATB) em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012	73
Tabela 2 –Resultados das análises físico-químicas realizadas em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012	76
Tabela 3 –Resultados da pesquisa de reconstituintes, crioscopia e densidade em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012	78

APÊNDICE B

Tabela 1 –Alterações médias (n=3) observadas na densidade (D), crioscopia (C), condutividade (Cd.) e acidez dornic do leite adicionado de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) comercial, com e sem adição de 5% de água e pesquisa de cloretos	81
---	----

Tabela 2 –Alterações médias (n=3) observadas na densidade (D), crioscopia (C), condutividade (Cd.) e acidez dornic do leite adicionado de diferentes concentrações de açúcar comercial, com e sem adição de 5% de água, pesquisa de sacarose e influência da adição de açúcar na quantificação da lactose pelo método do Infravermelho (IV) e do Ultrassom (US)	82
Tabela 3 –Alterações médias (n=3) observadas na densidade (D), crioscopia (C), condutividade (Cd) e acidez dornic do leite adicionado de diferentes concentrações de amido de milho e farinha de trigo comercial, com e sem adição de 5% de água e pesquisa de amido	83

SUMÁRIO

1 ESTADO DA ARTE	12
1.1 PRODUÇÃO LEITEIRA NACIONAL	12
1.2 MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	13
1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO	14
1.4 ADULTERAÇÃO DO LEITE	16
1.4.1 Fraudes por Adição de Água e Reconstituintes da Densidade	16
1.4.2 Fraudes por Adição de Neutralizantes	18
1.4.3 Fraudes por Adição de Conservantes	18
1.5 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE	20
1.6 REFERÊNCIAS	23
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 ARTIGO 1 - SUFICIÊNCIA DAS PROVAS OFICIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDES E GARANTIA DA QUALIDADE E SEGURANÇA DO LEITE PASTEURIZADO	30
3.1 RESUMO	30
3.2 ABSTRACT	30
3.3 INTRODUÇÃO	31
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.6 CONCLUSÕES	40
3.7 REFERÊNCIAS	40
4 ARTIGO 2 - AMPLITUDE DAS ALTERAÇÕES PROMOVIDAS PELA ADIÇÃO EXPERIMENTAL DE RECONSTITUINTES AO LEITE E CAPACIDADE DE DETECÇÃO POR PROVAS ESPECÍFICAS	44
4.1 RESUMO	44
4.2 ABSTRACT	44
4.3 INTRODUÇÃO	45

4.4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.6 CONCLUSÕES.....	53
4.7 REFERÊNCIAS	53

5 ARTIGO 3 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DAS PROVAS PARA PESQUISA DE CONSERVANTES E NEUTRALIZANTES

UTILIZANDO LEITE EXPERIMENTALMENTE ADULTERADO	56
5.1 RESUMO	56
5.2 ABSTRACT	56
5.3 INTRODUÇÃO.....	57
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	58
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.6 CONCLUSÕES.....	67
5.7 REFERÊNCIAS	68

6 CONCLUSÕES.....	71
--------------------------	-----------

APÊNDICES.....	72
-----------------------	-----------

APÊNDICE A –Resultados obtidos para cada uma das 100 amostras de leite pasteurizado avaliadas no artigo 1.....	73
---	----

APÊNDICE B –Média de resultados obtidos as amostras de leite pasteurizado adulterado em laboratório pela adição de substâncias reconstituintes (sal, açúcar, farinha de trigo e amido de milho), referentes ao artigo 2	81
---	----

1 ESTADO DA ARTE

1.1 PRODUÇÃO LEITEIRA NACIONAL

O Brasil é atualmente o quarto maior produtor de leite no mundo (Quadro 1), estando atrás apenas dos Estados Unidos, da Índia e da China (FAO, 2013). Em 2011 a produção brasileira atingiu 32,09 bilhões de litros de leite, um crescimento de 57,47% desde 2001 (EMBRAPA, 2012).

Quadro 1 – Produção anual de leite dos 10 países de maior produção mundial em 2011

Posição mundial	País	Produção (mil litros)
1	Estados Unidos	89.015.200
2	Índia	52.500.000
3	China	36.928.901
4	Brasil	32.091.000
5	Rússia	31.385.700
6	Alemanha	30.301.400
7	França	24.426.500
8	Nova Zelândia	17.893.800
9	Reino Unido	14.246.000
10	Turquia	13.802.400

Fonte: FAO (2013)

Segundo o último censo agropecuário realizado pelo IBGE em 2006, o Brasil possui 1,34 milhões de propriedades produtoras de leite, porém, apenas 940 mil destas comercializam seu produto. Do total de produtores inseridos na cadeia leiteira, 80% correspondem à pequenos produtores, sendo que 70,51% possuem uma produção diária máxima de 50 litros de leite (IBGE, 2006).

O estado do Paraná é o terceiro maior produtor nacional depois dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Em 2011 produziu 3,8 bilhões de litros de leite, o que corresponde à 11,9% da produção nacional (EMBRAPA, 2012).

1.2 MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

No ano de 1998 foi criado no Brasil o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite. O objetivo inicial do programa era o de aumentar a competitividade do setor leiteiro no Brasil (BRASIL, 1998). Em 2002 o programa recebeu bases legais, por meio da Instrução Normativa 51, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002).

A nova legislação trouxe alterações importantes para a produção leiteira com consequências relevantes para a qualidade do leite. Entre as principais alterações pode-se citar o resfriamento do leite ainda na propriedade rural, a coleta do leite à granel e a fixação de parâmetros de qualidade para o leite cru, inexistentes até então. Além disso, a legislação previa parâmetros para a contagem padrão em placas (CPP) e a contagem de células somáticas (CCS) progressivamente mais rígidos para o leite cru (BRASIL, 2002).

Contudo a implantação dos novos parâmetros não correu conforme previsto. A exemplo disso, a última alteração nos padrões que reduziria a CPP de 750 mil UFC/mL para 100 mil UFC/mL nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, prevista para 01 de julho de 2011, foi adiada por 6 meses e, mais tarde outra prorrogação de 5 anos foi apresentada na forma de uma nova legislação, a Instrução Normativa 62 (IN 62), publicada em dezembro de 2011 (BRASIL, 2002; 2011a).

Além de determinar uma progressão mais sutil nas exigências para o leite cru, a IN 62 restringe a produção leiteira à apenas dois tipos: leite cru tipo A e leite cru refrigerado. o texto também esclarece questões importantes como a obrigatoriedade da realização da pesquisa diária de inibidores do crescimento microbiano no leite cru refrigerado (BRASIL, 2011a).

Em nove anos de vigência do PNMQL foram constatados avanços significativos (BRASIL, 2011b). Entretanto, parte do leite produzido no país ainda apresenta qualidade insatisfatória (BELOTI et al., 2011a; 2012; MARTINS et al., 2008; MATTOS et al., 2010; ROSA; QUEIROZ, 2007; SILVA et al., 2011; TAMANINI et al., 2007). Assim medidas como o treinamento dos produtores rurais em boas práticas de manejo (MATSUBARA et al., 2011; VALLIN et al., 2009) e o aprimoramento das relações entre produtor e indústria, adotando um sistema de pagamento baseado em parâmetros de qualidade do leite são fundamentais para dar continuidade à melhoria da qualidade do leite (BRASIL, 2011b).

No Brasil, o responsável pela análise do leite antes de sua captação pelo caminhão tanque é o próprio motorista, que também decide, baseado apenas na temperatura do leite e no resultado do teste do alizarol, se o leite será recolhido ou não (BRASIL, 2011a). Esse papel importante na cadeia leiteira é muitas vezes realizado por profissionais mal treinados e mal remunerados (SBRISSIA, 2005).

Em países da Comunidade Europeia e Estados Unidos, por exemplo, a legislação traz uma seção que trata isoladamente sobre os profissionais envolvidos na captação de leite. Os regulamentos desses países consideram esse profissional como parte importante da cadeia produtiva e enfatizam que seus hábitos operacionais afetam diretamente a qualidade e a segurança do leite entregue aos seus cuidados (FDA, 2009; UE, 2004). Nos Estados Unidos estes profissionais devem passar por um treinamento rigoroso sobre qualidade de leite e noções de higiene antes de receber a permissão para executar essa tarefa e passam ainda por avaliações periódicas (FDA, 2009).

O modelo brasileiro de pagamento do leite por volume traz consequências diretas para sua qualidade, já que desmotiva os produtores a buscar melhorias na produção e na obtenção do leite e incita o transportador a captar leites em desacordo com os padrões, de forma a obter um maior volume a ser captado. Outra possível consequência dessa forma de pagamento seria a prática de fraudes por motivação econômica, que envolve o aumento de volume com adição fraudulenta de água e reconstituintes da densidade.

1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO

O controle diário do leite recebido pela indústria deve contemplar, de acordo com a legislação vigente, a realização das seguintes análises: temperatura, teste do álcool ou alizarol 72% v/v, acidez titulável, índice crioscópico, densidade relativa a 15°C; teor de gordura; pesquisa de fosfatase alcalina e peroxidase (quando a matéria-prima for proveniente de usina), determinação do teor de sólidos totais e de sólidos não gordurosos (BRASIL, 2011a). Os parâmetros determinados para essas análises são exibidos no quadro 2.

Além dessas provas, a legislação determina a pesquisa diária de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade e de inibidores do crescimento microbiano (BRASIL, 2011a). Contudo, a grande maioria das indústrias não realiza a pesquisa específica dessas substâncias, avaliando o leite recebido apenas por meio das análises físico-químicas inespecíficas de acidez Dornic, densidade, crioscopia e pesquisa de antibióticos.

Quadro 2 – Requisitos físico-químicos determinados para o leite cru refrigerado.

Requisitos	Limites
Matéria Gorda, g /100 g	Teor Original, com o mínimo de 3,0 ⁽¹⁾
Densidade relativa a 15/15OC g/mL ⁽²⁾	1,028 a 1,034
Acidez titulável, g ácido láctico/100 mL	0,14 a 0,18
Extrato seco desengordurado, g/100 g	mín. 8,4
Índice Crioscópico	-0,530 ^o H a -0,550 ^o H (equivalentes a -0,512 ^o C a -0,531 ^o C)
Proteínas, g /100g	mín. 2,9

¹É proibida a realização de padronização ou desnate na propriedade rural. Dispensada a realização quando o ESD for determinado eletronicamente.

Fonte: Brasil (2011a)

Adicionalmente, não está estabelecido na legislação quais ou quantos grupos de antibióticos devem ser pesquisados na plataforma de recepção do leite (BRASIL, 2011a). Assim, pela falta de regulamentação e pelo elevado custo dos kits para detecção de antibióticos, os laticínios acabam por pesquisar apenas um grupo, o que pode levar à recepção de leite com resíduos dos grupos não pesquisados.

Outra limitação da legislação é que a pesquisa de fraudes e de inibidores do crescimento microbiano é obrigatória apenas para o leite cru (BRASIL, 2011). A ausência de fiscalização do leite pasteurizado pode levar à exposição ao consumo de leite adulterado e com resíduos de inibidores microbianos, sempre que houver falhas no controle realizado pela indústria. Além disso, as adulterações do leite realizadas pela própria indústria, não serão identificadas.

Entretanto, atualmente existem ações de monitoramento do leite no Brasil. o Programa de Controle de Resíduos em Leite (PCRL), criado em 1999, visa a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários, de agrotóxicos, de contaminantes ambientais e inorgânicos. O PCRL determina limites máximos de resíduos para 29 antibióticos, além de outras substâncias como praguicidas, antiparasitários e micotoxinas (BRASIL, 2011c). Um dos objetivos do programa é garantir a segurança e a inocuidade dos alimentos disponibilizados aos consumidores. No entanto, o programa realiza análises em apenas uma pequena parcela do leite produzido no país, utilizando um plano de amostragem (BRASIL, 1999).

1.4 ADULTERAÇÃO DO LEITE

O leite é um dos alimentos mais frequentemente envolvidos em fraudes (MOORE; SPINK; LIPP, 2012). O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) considera fraudado o leite que: for adicionado de água, substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição; sofrer subtração de qualquer dos seus componentes; estiver cru e for vendido como pasteurizado ou for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade (BRASIL, 1997).

Além de lesar o consumidor economicamente, por fornecer um produto de qualidade inferior à declarada, a adulteração do leite pode representar risco à saúde, dependendo do tipo de substância utilizada na fraude. Um dos mais graves exemplos ocorreu no ano de 2008 na China. A fraude consistia na adição da substância melamina ao leite para simular um aumento no seu teor proteico. Foram reportadas seis mortes e mais de 300 mil pessoas adoeceram (SHARMA; PARADAKAR, 2010).

No Brasil, em 2007, foi descoberto um esquema de adulteração do leite em indústrias de Minas Gerais. Uma fórmula calculada por químicos contendo substâncias conservantes, neutralizantes e reconstituintes, soro de queijo e água era adicionada ao leite (G1, 2007; SPIGLIATTI, 2007).

As fraudes mais praticadas no leite são o aumento de volume, a adição de reconstituintes da densidade, neutralizantes da acidez e substâncias conservantes (KARTHEEK et al., 2011; TRONCO, 2008). Somada à motivação financeira, a prática de fraudar o leite pode ser incitada pela dificuldade na detecção das fraudes utilizando apenas as provas de rotina (KARTHEEK et al., 2011).

1.4.1 Fraudes por Adição de Água e Reconstituintes da Densidade

Embora seja pouco sofisticada, a principal fraude detectada no leite continua sendo a adição de água com o objetivo de aumentar seu volume (FIRMINO et al., 2010; GIOMBELLI et al., 2011; MENDES et al., 2010; SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2011). Essa fraude dificilmente é realizada de forma isolada, já que pode ser rapidamente detectada por provas de rotina como densidade e crioscopia (TRONCO, 2008). Para mascarar a adição de água são utilizadas substâncias denominadas reconstituintes da densidade como sal, açúcar, farinha (TRONCO, 2008).

No Brasil, diferentes estudos demonstram a ocorrência de fraudes por adição de reconstituintes ao leite. No Distrito Federal, a presença de sacarose e cloretos foi detectada respectivamente em 86,28% e 1,39% de 72 amostras de leite pasteurizado (ROSA-CAMPOS et al., 2011). Esses reconstituintes também foram detectados em 20 amostras de leite cru por Firmino et al. (2010), no estado de Minas Gerais, em frequências de 36% para a adição de cloretos e 6% para presença de sacarose, além de 40% das amostras com crioscopia fora dos padrões. Mendes et al. (2010) não encontraram sacarose, amido ou cloretos em 32 amostras de leite pasteurizado, produzidas em Mossoró-RN, embora tenham detectado 50% das amostras fora dos padrões para crioscopia. Souza et al. (2011) detectaram 12 (60%) amostras de leite pasteurizado fraudado com água. As amostras foram negativas para a pesquisa de cloretos e de amido.

Recentemente foi relatada a possibilidade de utilização de outras substâncias como o álcool etílico e o citrato de sódio como reconstituintes. O objetivo de sua utilização seria igualmente mascarar fraudes por adição de água, sendo que o álcool altera apenas no índice crioscópico, enquanto o citrato é capaz de promover alterações na densidade e na crioscopia do leite (BELOTI et al., 2010; 2011b).

A adição de soro do leite, oriundo da produção de queijo, é praticada com a finalidade de aumentar o volume do leite. Por possuir na sua composição água, lactose e sais, apresenta densidade e índice crioscópico muito próximos aos do leite, sendo esta uma das fraudes de detecção mais laboriosa e complexa (TRONCO, 2008).

Fraudes por adição de água e reconstituintes da densidade, por outro lado, são mais facilmente identificadas. As provas de densidade e crioscopia, realizadas na recepção do leite cru, auxiliam na detecção deste tipo de fraude. A adição de água reduz a densidade do leite e aumenta seu ponto de congelamento, enquanto a adição de reconstituintes produz o efeito inverso (SANTOS, FONSECA, 2007). No entanto, leites fraudados com quantidades equilibradas de água e reconstituintes podem não apresentar alterações nessas provas. Por isso, a legislação determina a pesquisa diária de reconstituintes da densidade no leite cru refrigerado, mas estas provas são laboriosas e demoradas e, às vezes, incompatíveis com a rotina de análises da indústria. Contudo, como exposto anteriormente, para o leite pasteurizado não existe essa exigência, o que dificulta a detecção de fraudes realizadas pela indústria (BRASIL, 2006; 2011a).

A adição de água e reconstituintes não representa risco à saúde do consumidor, mas por promover uma diluição dos seus componentes, promove uma redução no seu valor nutricional (SOUZA et al, 2011).

1.4.2 Fraudes por Adição de Neutralizantes

A obtenção do leite em condições de higiene insatisfatórias, bem como a insuficiência de refrigeração do leite após a ordenha originam leite com elevadas contagens de micro-organismos (SANTOS; FONSECA, 2007). Os micro-organismos presentes no leite em quantidades elevadas metabolizam a lactose transformando-a em ácido láctico e, conseqüentemente, elevando a acidez titulável, o que leva à recusa do produto pela indústria (BRASIL, 2011a).

A adição fraudulenta de neutralizantes como o bicarbonato de sódio ou o hidróxido de sódio visa ocultar a elevação da acidez Dornic do leite ou acidez Dornic à níveis acima dos permitidos pela legislação (TRONCO, 2008). Uma vez que o resultado da acidez Dornic deriva das reações entre componentes ácidos e alcalinos presentes no leite, e não da concentração real de ácido láctico, este pode ser adulterado pela adição de substâncias alcalinas que se ligam ao ácido láctico presente no leite, neutralizando-o (MILAGRES, 2008). Dessa forma, é importante que seja realizada a pesquisa específica de neutralizantes da acidez, prevista pela legislação vigente para o leite cru refrigerado (BRASIL, 2011a).

Contudo, uma vez que a elevação da acidez é responsável por limitar o crescimento microbiano, a redução na acidez favorece o aumento da população microbiana, determinando uma queda ainda maior na qualidade do produto (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

No Brasil, a literatura relata a pesquisa de neutralizantes da acidez no leite e as frequências observadas variam de nulas à 65% (FIRMINO et al., 2010; MARTINS et al., 2008; MENDES et al., 2010; SOUSA et al., 2011). A utilização de hidróxido de sódio pode promover saponificação da gordura do leite, causando defeitos no produto e nos derivados. Além disso, é uma substância corrosiva para os tecidos humanos, podendo representar risco ao consumidor dependendo da concentração final no leite (ANVISA, 2007).

1.4.3 Fraudes por Adição de Conservantes

Outro tipo de fraude relacionada à contaminação do leite é a adição de conservantes como cloro, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e formaldeído. O objetivo desta fraude é reduzir ou eliminar os micro-organismos presentes no leite prevenindo assim as alterações decorrentes da sua multiplicação (TRONCO, 2008).

Para a indústria, a presença desses resíduos no leite e particularmente prejudicial, já que eles podem interferir na produção de derivados que envolvem a adição de culturas lácticas por inibir sua multiplicação durante a fabricação desses produtos (TRONCO, 2008).

O cloro e o hipoclorito são os princípios ativos mais comumente utilizados na higienização de instalações e equipamentos em propriedades leiteiras e laticínios devido a sua alta eficácia e baixo custo. Sua baixa estabilidade na presença de matéria orgânica, nesse caso o leite, pode dificultar a detecção deste resíduos acidentais ou adicionados de forma fraudulenta e também limitar a ação conservante dessas substâncias (CORDS; DYCHDALA; RICHTER, 2001). Calcula-se que, sem o adequado enxágue, soluções contendo entre 200 e 500 ppm de cloro, deixariam um resíduo máximo de 0,8 a 1,4 ppm. Quantidades superiores a 20 ppm podem ser atribuídas a adição fraudulenta (OLIEMAN, 2003). Quanto ao risco de ingestão, o hipoclorito é corrosivo para pele e mucosas e poderia provocar irritação do trato gastrointestinal (ATSDR, 2002).

O peróxido de hidrogênio ou água oxigenada não pode ser considerado um contaminante acidental do leite, uma vez que não é comumente utilizado na higienização de utensílios, equipamentos ou na desinfecção dos tetos (OLIEMAN, 2003). Sua utilização assim como o uso de qualquer conservante no leite é proibida no Brasil (BRASIL, 1997).

O peróxido de hidrogênio pode promover alterações na qualidade nutricional do leite, reduzindo de forma significativa a concentração de vitamina C, sendo relatadas também redução das vitaminas A e B1. Por apresentar rápida degradação no leite e pouco provável que atinja concentrações suficientes para causar efeitos adversos ao consumidor (LÜCK, 1962).

O formaldeído também não é rotineiramente empregado na higienização de utensílios e equipamentos na produção e beneficiamento do leite (OLIEMAN, 2003) e, recentemente, a sua adição na formulação de produtos desinfetantes foi proibida, o que torna esse tipo de fraude menos provável (ANVISA, 2008). Contudo, é uma substância comprovadamente cancerígena, mesmo em baixas concentrações (NCI, 2012).

No Brasil diferentes autores relatam a presença de substâncias conservantes no leite. Souza et al., 2011 pesquisaram fraudes em 100 amostras de leite UHT produzido em 6 estados brasileiros (Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Goiás) e detectaram 44 amostras positivas para a presença de formaldeído, 30 positivas para peróxido de hidrogênio e 12 para cloro. Em Garanhuns-PE, foi detectada a presença de cloro (13%) e peróxido de hidrogênio (20%) em 15 amostras de leite cru (FREITAS FILHO et al.,

2009). Rosa-Campos et al. (2011) pesquisaram fraudes por adição de neutralizantes e conservantes em 72 amostras de leite pasteurizado produzido no Distrito Federal e detectaram 7 amostras positivas para peróxido de hidrogênio. Fimino et al. (2010) analisaram 60 amostras de leite cru refrigerado em Minas Gerais e detectaram a presença de formol em 13% e de nitrato em 40% destas. Mendes et al. (2010) estudando leite informal produzido em Mossoró-RN, não detectaram fraudes por adição de reconstituintes, neutralizantes ou conservantes.

A legislação determina a pesquisa diária de substâncias inibidoras do crescimento microbiano na recepção do leite cru refrigerado. Existem provas específicas para a pesquisa de cloro, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e formaldeído (BRAsiL, 2006).

No entanto, a pesquisa diária de todas essas substâncias em todo o leite recebido pela indústria é inviável, especialmente quando se considera a dificuldade de execução de algumas destas provas (BRAsiL, 2006).

A realização de provas inespecíficas baseadas na inibição de culturas bacterianas seria interessante como teste de triagem, pois apesar de não definirem o princípio inibidor, indicam sua presença. Na lactofermentação, por exemplo, observa-se a inibição das bactérias naturalmente presentes no leite cru (BEHMER, 1999). Na prova do iogurte avalia-se a inibição de culturas específicas: *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactococcus thermophilus* (TRONCO, 2008). Existem também kits comerciais como o Kit Charm® Cow Side II test que utilizam culturas de *Bacillus stearothermophilus* (CHARM SCIENCES®, 2011).

Em síntese, fraudes por adição de substâncias conservantes ao leite são recorrentes no Brasil, o que demonstra falhas no controle de qualidade da indústria e também dos órgãos fiscalizadores. Os problemas associados à prática de fraudes por adição dessas substâncias ao leite variam entre prejuízo das características sensoriais e dos processos tecnológicos que envolvem a utilização de culturas lácticas e problemas de toxicidade para consumidores.

1.5 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE

Os antibióticos são os medicamentos mais utilizados em rebanhos leiteiros no estado do Paraná (PONTES-NETO et al., 2005). Os principais grupos de antimicrobianos utilizados no rebanho leiteiro nacional são: beta-lactâmicos, tetracilinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e as sulfonamidas (SANTOS; FONSECA, 2007). O leite constitui uma das vias de eliminação dos antibióticos, assim, quando vacas são tratadas durante o período de lactação

essas substâncias e seus metabólitos contaminam o leite (JENSEN, 1995; SANTOS; FONSECA, 2007).

O período de carência de um medicamento pode ser definido como o intervalo de tempo necessário para que a substância administrada ao animal ou seus metabólitos atinjam na carne e no leite valores iguais ou inferiores aos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela legislação. Durante esse período, portanto, o leite deverá ser descartado (PALERMO-NETO, 2008).

Dessa forma, resíduos de medicamentos veterinários como os antibióticos poderão ser detectados no leite sempre que ocorra violação do período de carência. Ainda, alterações na forma e via de aplicação e /ou na dosagem recomendada podem provocar a persistência de resíduos durante períodos superiores aos recomendados para o descarte do leite pela bula do medicamento (PALERMO-NETO, 2008).

No Brasil diversos estudos descrevem a presença de resíduos de antibióticos no leite. As frequências descritas variam conforme a técnica utilizada, o princípio pesquisado e a região estudada. São relatadas frequências que variam entre 2,6% e 64,9%. Morais et al. (2009) analisaram 57 amostras de leite pasteurizado dos tipos B e C e detectaram 25 (44%) amostras positivas para tetraciclina, 2 (3,5%) para betalactâmicos, 4 (7%) para estreptomicina ou diidroestreptomicina e 6 (10,5%) amostras positivas para tetraciclina e betalactâmicos.

Há inclusive detecção de antibióticos de uso proibido pela legislação, como relatado por Oliveira; Bando e Machinski Junior (2007), que detectaram 2,6% de 151 amostras de leite pasteurizado positivas para cloranfenicol, no Paraná. Vieira et al. (2012), detectaram cloranfenicol em 6 (7,59%) de 79 amostras de leite pasteurizado, também no Paraná. O mesmo estudo detectou no total 15 (19%) amostras positivas para antibióticos, das quais 3 (3,79%) continham tetraciclina, 3 (3,79%) estreptomicina, 2 (2,53%) betalactâmicos e 1 (1,26%) gentamicina.

Em outro estudo Nero et al. (2007) detectaram resíduos de betalactâmicos e sulfonamidas em 11,4% das 210 amostras de leite cru de quatro regiões brasileiras, PR, SP, RS e MG. Sousa et al. (2012) avaliaram 30 amostras de leite pasteurizado e detectaram resíduos de antibióticos em 13,33%. O Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVET) detectou presença de antibióticos em 112 (24,08%) das 465 amostras de leite UHT avaliadas em todo o Brasil. Os princípios identificados foram betalactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, estreptomicina e diidroestreptomicina, sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina (ANVISA, 2009).

A pesquisa de antibióticos deve ser realizada pela indústria na recepção do leite cru, conforme prevê a legislação (BRASIL, 2011a). Entretanto, a legislação não é clara quanto à padronização dessas análises, o que pode resultar em falhas no controle de qualidade e expor o consumidor à esses resíduos. Usualmente são utilizados kits comerciais que detectam a presença de apenas um grupo de antimicrobianos. Seria mais interessante que fossem utilizadas provas menos específicas, capazes de identificar diferentes grupos de antibióticos, como a prova da cultura do iogurte e kits comerciais que se baseiam na inibição de culturas bacterianas específicas e apresentam resultados relativamente rápidos. Essas provas poderiam ser utilizadas na triagem das amostras, o que reduziria os custos dessas análises e permitiria a identificação simultânea de vários grupos de antimicrobianos, resultando em um número maior de amostras positivas, quando comparados à utilização apenas de testes que pesquisam um grupo específico (TRONCO, 2008; CHARM SCIENCES®, 2011).

Além disso, os antibióticos são compostos termo resistentes, apresentando-se estáveis após tratamentos térmicos como a pasteurização e mesmo a ultrapasteurização (HASSANI et al., 2008; UNUSAN et al., 2009). Dessa forma, os resíduos de antibióticos presentes no leite cru estarão presentes também nos seus derivados. Entretanto, a legislação não determina a pesquisa dessas substâncias no leite pasteurizado (BRASIL, 2011a). Dentre os transtornos causados pelos resíduos dessas substâncias no leite pode-se citar a inibição de culturas lácticas, que traz prejuízos para a indústria e o risco à saúde do consumidor (SANTOS; FONSECA, 2007).

A presença de resíduos de antibióticos no leite cru é um problema grave do ponto de vista da saúde pública (ANVISA, 2009). A ocorrência de toxicidade aguda pela ingestão de produtos de origem animal contaminados com resíduos de antibióticos raramente e ob servada, uma vez que os níveis desses resíduos geralmente estão em baixas concentrações. No entanto, em indivíduos sensíveis à penicilina reações de hipersensibilidade podem ocorrer após uma única exposição (ANVISA, 2009).

Os problemas decorrentes da ingestão acidental de antibióticos pela alimentação podem ser classificados em três grupos; problemas toxicológicos; imunopatológicos, relacionados à ocorrência de reações alérgicas e problemas relacionados à seleção de micro-organismos resistentes à antibioticoterapia (SANTOS, FONSECA, 2007).

1.6 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº 34**, de 31 de outubro de 2007. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/REL>>. Acesso em: 1 dez. 2012.

_____. Resolução RDC nº 35, de 3 de junho de 2008. Dispõe sobre conservantes permitidos para produtos saneantes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, nº 105, 4 jun. 2008.

_____. Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMVET. **Relatório 2006-2007 Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo**. 2009. Disponível em: <<http://websphere.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ba64428041ece36fb8d5fd255d42da10/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Calcium hypochlorite and sodium hypochlorite**. 2002. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts184.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13. ed., São Paulo: Editora Noel, 1999.

BELOTI, V.; MANTOVANI, F. D.; SILVA, M. R.; TAMANINI, R.; GARCIA, D. T.; SILVA, F. A. Alterações do ponto de congelamento do leite por adição do estabilizante citrato de sódio. **Anais do IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

BELOTI, V.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; SILVA, L. C. C.; SHECAIRA, C. L.; NOVAES, D. G.; SILVA, F. F.; GIOMBELLI, C. J.; MANTOVANI, F. D.; SILVA, M. R. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Saponema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.16, jan. 2011a.

BELOTI, V.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C. Impacto da implantação de boas práticas de higiene na ordenha sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, n.388, p. 05-10, 2012.

BELOTI, V.; SILVA, L.C.C.; TAMANINI, R.; GIOMBELLI, C. J.; SILVA, M.R.; MANTOVANI, F. D. Influência da água e do álcool na densidade e no ponto de congelamento do leite. In: V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2011, Salvador-BA. **Anais do V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**, 2011b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952. Alterado pelo Decreto 2244 de 04 de junho de 1997. Altera o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - R.I.I.S.P.O.A. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n.105, p. 11555, 05 jun.1997.

_____. Portaria nº 166, de 5 de maio de 1998. Criar Grupo de Trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade e a modernização do

setor produtivo de leite e derivados no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, 6 maio 1998.

_____. Instrução Normativa No 42. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 213, dez. 1999.

_____. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 13. 21 set. 2002.

_____. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Estabelece os Métodos analíticos físico-químicos oficiais para leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 239, p.8, 14 dez. 2006.

_____. Instrução Normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p.6, 30 dez. 2011a.

_____. **Mapa atualiza regras para qualidade do leite**. 2011b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2011/12/mapa-atualiza-regras-para-qualidade-do-leite>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

_____. Instrução Normativa nº 24, de 9 de agosto de 2011. Publica o Subprograma de Monitoramento em carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2011, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal PNCRB. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 154, p. 10, , 11 ago. 2011c.

CHARM SCIENCES. **Operator's manual**: Charm® CowSide II Test for Beta-lactams and other antimicrobial drugs in milk. Charm Sciences Inc.: Massachusetts. out. 2011.

CORDS, B. R.; DYCHDALA, G. R.; RICHTER, F. L. Cleaning and Sanitizing in Milk Production and Processing. In: **Applied dairy microbiology**. MARTH, E. H.; STEELE, J. L. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 547-587.

EMPRAPA. **Conjuntura do mercado lácteo**. Juiz de Fora, v.5, n.44, p. 1-11, out. 2012. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2012_10_Produ%C3%A7%C3%A3o_Leite.pdf> Acesso em: 28 jan. 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Faostat. **Countries by commodity**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

FDA. Food and Drug Administration. **Grade "A" pasteurized milk ordinance**. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/Product->

SpecificInformation/MilkSafety/NationalConferenceonInterstateMilkShipmentsNCIMSMo
 IDocuments/UCM209789.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2013.

FIRMINO, F. C.; TALMA, S. V.; MARTINS, M. L.; LEITE, M. O.; MARTINS, A. D. O. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n.376, p. 5-11, set. out., 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.182p.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; GONÇALVES, T. M.; SOUZA, J. J. F.; SILVA, A. H. I.; OLIVEIRA, H. B.; BEZERRA, J. D. C. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns -PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 03, n. 02, p. 38-46, 2009.

G1. **Depoimentos revelam como funcionava fraude do leite**. 2007. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL161409-5598,00.html>>. Acesso em: 29 nov. 2012.

GIOMBELLI, C. J.; TAMANINI, R.; BATAGLINI, A. P. P.; MAGNANI, D. F.; ÂNGELA, H. L.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e dos para metros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B, produzidos no Parana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1539-1546, out./dez. 2011.

HASSANI, M.; LÁZARO R, PÉREZ C, CONDÓN S, PAGÁN R. Thermostability of Oxytetracycline, Tetracycline, and Doxycycline at Ultrahigh Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.8, p. 2676-2680, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agrop ecuario.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

JENSEN, R. G. Contaminants in Bovine Milk. In: _____ **Handbook of Milk Composition**. San Diego: Academic Press. 1995. p. 887-901.

KARTHEEK, M.; A.; SMITH, A.; KOTTAI MUTHU, A.; MANAVALAN, R. Determination of Adulterants in Food: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.2, p.629-636, 2011.

LUCK, H. The use of hydrogen peroxide in milk and dairy products. In: WHO/FAO. Milk Hygiene. 1962. p. 449-455.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, out./dez. 2008.

MATSUBARA, M.; BELOTI, V.; TAMANIN, R.; FAGNANI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; BATTAGLINI, A. P. P.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, p. 277-286, 2011.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 173-182, jan./mar. 2010.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 349-356, abr./jun. 2010.

MILAGRES, M.P. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão de íons**. 2008. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2008

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, v.77, n.4, p.118-126, 2012.

MORAIS, C. M. Q. J.; DURÃES, T. S.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.1, 2009.

NCI. National Cancer Institute. United States Of America. **Formaldehyde and Cancer Risk**. 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/formaldehyde#r2>> . Acesso em: 4 dez. 2012.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. ; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391- 393, 2007.

OLIEMAN, C. Detecting Taints from Cleaning and Disinfecting Agents. In:LELIEVELD, H. L. M.; MOSTERT, M. A.; HOLAH, J.; WHITE, B. **Hygiene in food processing**. Cambridge: Woodhead. 2003. p. 279-287.

OLIVEIRA, C. R.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Science**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 59- 62, 2007.

PALERMO-NETO, J. Resíduos de substâncias químicas em alimentos de origem animal. In: SPPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 783-814.

PONTES NETTO, D.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JUNIOR, M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BENINI, BOMBARDELLI, A. L. C.; VEDOVELLO FILHO, D.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

ROSA-CAMPOS, A. A., ROCHA, J. E. S.; BORGIO, L. A.; MENDONÇA, M. A. Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo C produzido

na região de Brasília, Distrito Federal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 379, v.66, p.30:34, 2011.

ROSA, L. S.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p.422-430, 2007.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole. 2007. 314P.

SBRISSIA, G. F. **Sistema agroindustrial do leite: custos de transferência e preços locais**. 2005. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

SHARMA, K.; PARADAKAR, M. The melamine adulteration scandal. **Food Security**, n. 2, p. 97-107, 2010.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T., PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267- 276, jan./mar. 2011.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2008.

SOUSA, F.; SILVA, L.; SOUSA, E.; SILVA, J.; FEITOSA, M. Análises físico-químicas e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado tipo C. **Caderno Verde De Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável**, v.1, n.1, 2011.

SOUSA, F. C.; SILVA, L. M. M.; SILVA, J. N.; CRUZ, C. S. A.; SOUSA, E. P. Resíduos de antibiótico em amostras de leite pasteurizado tipo C comercializado na região cariense. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p.21-24, 2012.

SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; CELEGHINI, R. M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANTANA, A. S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, v.124, p.692-695, 2011.

SPIGLIATTI, S. **PF prende 25 por fraude em leite longa vida**. 2007. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/geral,pf-prende-25-por-fraude-em-leite-longa-vida,68731,0.htm>> Acesso em: 29 nov. 2012.

TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo C produzido na região norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, jul./set. 2007.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206p.

UE. União Europeia. Regulation (EC) n° 853/2004 of the european parliament and of the council. Laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. 29 abr. 2004. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

UNUSAN, N. Occurrence of chloramphenicol, streptomycin and tetracycline residues in ultra-heat-treatment milk marketed in Turkey. *International Journal of Food Sciences & Nutrition* [serial online]. August, v.60, n 5, p 359-364. 2009.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas praticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 1, p. 181-188, jan./mar. 2009.

VIEIRA, T. S. W. J.; RIBEIRO, M. R.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JÚNIOR, M.; PONTES NETTO, D. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 791-796, abr. 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de reconstituintes, conservantes, neutralizantes, e resíduos de antibióticos no leite pasteurizado produzido no norte do Paraná e avaliar a sensibilidade analítica e suficiência das provas determinadas por lei para assegurar a qualidade do leite pasteurizado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a adequação do leite pasteurizado produzido na região norte do Paraná aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos determinados pela legislação.

Pesquisar a ocorrência de resíduos de antibióticos e adulterações por adição de água, reconstituintes, conservantes e neutralizantes em amostras de leite pasteurizado produzido na região norte do Paraná.

Avaliar a sensibilidade analítica das provas indicadas pela legislação brasileira para a pesquisa de reconstituintes, conservantes e neutralizantes no leite.

Avaliar métodos de detecção de conservantes no leite por inibição do crescimento microbiano.

Avaliar a persistência de resíduos detectáveis de substâncias conservantes e neutralizantes no leite refrigerado, 24 e 48 horas após sua adição.

3 ARTIGO 1

SUFICIÊNCIA DAS PROVAS OFICIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDES E GARANTIA DA QUALIDADE E SEGURANÇA DO LEITE PASTEURIZADO

3.1 RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a suficiência das metodologias oficiais, determinadas pela legislação, na identificação de fraudes e na garantia da qualidade e segurança do leite pasteurizado. Foram avaliadas 100 amostras de leite pasteurizado integral produzido no Paraná. As amostras foram submetidas, segundo metodologia oficial, à pesquisa de amido, cloretos, sacarose, álcool etílico, formaldeído, cloro, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e neutralizantes da acidez. A pesquisa de antibióticos foi feita por meio do Kit CowSide® II test (Charm Sciences Inc). Foram realizadas ainda as análises de densidade, gordura, crioscopia, acidez Dornic, alizarol 72%, pH e lactofermentação. Foram enumerados micro-organismos aeróbios mesófilos, coliformes à 30°C e *Escherichia coli*. Em 51(51%) amostras os resultados se encontraram fora dos parâmetros em pelo menos uma análise e/ou foi identificada a ocorrência de fraude. Quanto às análises físico-químicas, 25 (25%) amostras estavam fora dos padrões e para as análises microbiológicas, 10 (10%) amostras. A presença de antibióticos foi detectada em 14 (14%) amostras. Em 5 (5%) amostras foi detectada adição de água e em 13 (13%) presença de reconstituintes da densidade. Os principais problemas identificados no leite pasteurizado foram a ocorrência de fraudes por adição de água e/ou adição de reconstituintes e presença de resíduos de antibióticos. As provas de controle de qualidade determinadas para o leite pasteurizado pela legislação vigente não foram suficientes para identificar as fraudes detectadas nesse estudo. A contaminação do leite por resíduos de antibióticos representa risco à saúde do consumidor.

Palavras chave: Adulteração. Reconstituintes. Neutralizantes. Conservantes. Antimicrobianos. Legislação.

3.2 ABSTRACT: The objective of this study was to assess the suitability of official tests, determined to pasteurized milk by law, on fraud detection and on quality and safety assurance for this product. Samples of pasteurized whole milk (100), produced in Paraná were evaluated. The samples were tested for the presence of starch, chloride, sucrose, ethanol alcohol, formaldehyde, chlorine, hypochlorite, hydrogen peroxide and acidity neutralizers. The presence of antibiotic was researched by CowSide® II test kit (Charm Sciences, Inc). Analyses of density, fat, cryoscopy, Dornic acidity, alizarol 72%, pH and lactofermentation were also performed. Mesophilic aerobic microorganisms, coliforms at 30 ° C and *Escherichia coli* were enumerated. In most of the samples (51%) results were out of standards for at least one test and/or occurrence of fraud was detected. Regarding physical-chemical analyzes, 25 (25%) samples were out of standards and for microbiological analyzes, 10 (10%) samples. The presence of antibiotic was detected in 14% of samples. In 5 (5%) samples water addition was detected and in 13 (13%) the presence of restorative substances. The main problems identified in pasteurized milk were the occurrence of fraud by water addition and/ or restorative substances and the presence of antibiotic residues. Quality control tests determined for pasteurized milk by current legislation were not sufficient to identify the frauds detected by this study. Further, milk contamination by antibiotics residues pose as a risk to consumers health. adulteração, reconstituintes, neutralizantes, conservantes, antimicrobianos, legislação.

Keywords: Fraud. Restorative substances. Neutralizers. Preservatives. Antimicrobials. Legislation.

3.3 INTRODUÇÃO

No Brasil, os principais problemas relatados para o leite pasteurizado são a sua qualidade microbiológica insatisfatória, o não cumprimento dos parâmetros físico-químicos e a ocorrência de fraudes (BRICIO; SILVA; FINGER, 2005; GIOMBELLI et al., 2011; SILVA et al., 2008; SILVA et al. 2007; SILVA et al., 2010; SOUSA et al., 2011; TAMANINI et al., 2007).

As fraudes mais comumente observadas envolvem a adição de água ou soro de queijo para aumentar o volume; neutralizantes da acidez como bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio; reconstituintes da densidade como sal, açúcar e amido; e conservantes como hipoclorito, cloro, peróxido de hidrogênio e formaldeído (KARTHEEK et al., 2011). Além da motivação financeira, a prática de fraudar o leite pode ser incitada pela dificuldade na sua detecção utilizando apenas as provas de rotina (KARTHEEK et al., 2011).

A legislação brasileira determina a pesquisa diária de substâncias reconstituintes, neutralizantes e inibidoras do crescimento microbiano no leite cru (BRASIL, 2011a), o controle realizado pela indústria, bem como pelos serviços de inspeção se limita à avaliação de poucos parâmetros físico-químicos como acidez dornic, estabilidade ao álcool, crioscopia, densidade, porcentagem de gordura e pesquisa de antibióticos. Além disso, a pesquisa de fraudes não é exigida para o leite pasteurizado (BRASIL, 2011a).

A legislação brasileira não estabelece quais grupos de antibióticos devem ser pesquisados no leite cru (BRASIL, 2011a), dessa forma, a indústria muitas vezes pesquisa apenas um grupo, o que pode levar à recepção de leite com resíduos de grupos de antibióticos não pesquisados.

Assim, o número restrito de provas utilizadas no controle de qualidade do leite cru e pasteurizado, aliado às limitações inerentes a essas provas na detecção de fraudes, criam uma lacuna no controle de qualidade do leite. Uma série de problemas podem decorrer desse fato e inclusive oferecer risco à saúde do consumidor, como a presença de resíduos de antibióticos no leite (ANVISA, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suficiência das provas determinadas pela legislação, na identificação de fraudes e na garantia da qualidade e da segurança do leite pasteurizado, pesquisando a ocorrência de fraudes e de resíduos de antibióticos por meio de análises oficiais e complementares e por meio da avaliação físico-química e microbiológica das amostras.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas 100 amostras de leite, classificado como leite pasteurizado integral, provenientes de 10 laticínios, localizados na região norte do estado do Paraná (Quadro 1). As amostras foram enviadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR por agentes da Vigilância Sanitária ou pelos próprios laticínios para controle de qualidade. Todas as amostras foram analisadas no período entre 01 de agosto e 31 de outubro de 2012.

Quadro 1 – Distribuição do número de amostras entre os laticínios avaliados e Serviço de Inspeção existente no estabelecimento.

Laticínio	Serviço de inspeção*	Total de amostras analisadas
A	SIP	11
B	SIF	10
C	SIM	7
D	SIP	11
E	SIP	8
F	SIP	10
G	SIP	14
H	SIP	7
I	SIP	12
J	SIP	10
Total		100

* SIM - Serviço de Inspeção Municipal; SIP - Serviço de inspeção do Paraná; SIF - Serviço de Inspeção Federal
Fonte: Elaboração do autor

Análises Microbiológicas

A temperatura das amostras de leite foi mensurada no momento de chegada ao laboratório, sem violação da sua embalagem original. Amostras com temperatura superior a 10°C ou inferior a 0°C foram excluídas do estudo. Em seguida as embalagens foram higienizadas e as amostras mantidas em refrigeração até o momento da análise, que ocorreu no máximo 24 horas após sua chegada ao laboratório. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante.

As amostras de leite foram diluídas de forma decimal seriada em solução salina peptonada 0,1% até a diluição 10^{-3} . A enumeração de micro-organismos aeróbios

mesófilos foi realizada em Agar Padrão para Contagem (PCA), utilizando as três diluições decimais, semeadas em duplicata e incubadas à $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (BRASIL, 2003).

A enumeração de coliforme totais e *Escherichia coli* foi feita em placas Petrifilm™ EC (3M, St. Paul, MN, EUA) semeando-se a amostra integral e incubando-a à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para enumeração de coliformes totais e por 48 horas para enumeração de *E. coli*, conforme instruções do fabricante.

A microbiota predominante em cada amostra, foi determinada pela prova da lactofermentação descrita por Behmer (1999) com modificações. Em tubos de rosca estéreis, 10 ml de cada amostra de leite foram incubados à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após a incubação os coágulos foram classificados. Coágulos pequenos e retraídos na parede do tubo, com grande separação de soro foram classificados como digeridos. Coágulos com presença de bolhas e orifícios formados pela produção de gás pela microbiota presente foram classificados como esponjosos. Coágulos perfeitos, sem separação de soro e lisos foram classificados como gelatinosos. Finalmente, tubos que não apresentaram coagulação do leite foram classificados como líquidos (BEHMER, 1999).

Análises Físico-Químicas, Pesquisa de Fraudes e Resíduos de Antibióticos

Em todas as amostras determinou-se densidade à 15°C , teor de gordura pelo método Gerber, crioscopia, acidez Dornic e estabilidade ao alizarol 72%, cálculo dos Sólidos Totais e Sólidos não Gordurosos, de acordo com a Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006). O pH foi aferido pelo pHmetro digital HI 8424 - Hanna, conforme orientações do fabricante. A crioscopia foi realizada no crioscópio eletrônico digital micro processado PZL 7000 - PZL, conforme orientações do fabricante, com três repetições para cada amostra.

Para avaliar a fraude por adição de reconstituintes da densidade foram realizadas as pesquisas de: sacarose, cloretos, amido e álcool etílico. A fraude por adição de neutralizantes da acidez foi realizada pelo método B da fenolftaleína e a pesquisa de fraudes por adição dos conservantes: formaldeído, cloro, hipoclorito e peróxido de hidrogênio (método do guaiacol) foram executadas conforme descrito na Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006), com exceção da pesquisa de sacarose realizada conforme descrito nos Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes (BRASIL, 1981).

Para pesquisa de antibióticos foi utilizado o kit CowSide® II test da Charm Sciences Inc, conforme instruções do fabricante. O teste se baseia na inibição microbiana e detecta a presença de 32 antimicrobianos, conforme exposto no quadro 2.

Quadro 2 – Limites de detecção (LD) do Kit CowSide® II test (Charm Sciences Inc) e limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela legislação para a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado.

Grupo	Antimicrobiano	LD (µg/kg)	LMR (µg/kg)	Grupo	Antimicrobiano	LD (µg/kg)	LMR (µg/kg)
Beta-lactâmicos	Amoxicilina	3 - 4	4 ¹	SF*	Sulfadiazina	40 - 60	100 ¹
	Ampicilina	3 - 4	4 ¹		Sulfadimetoxina	25 - 50	100 ¹
	Cefacetil	10 - 15	125 ²		Sulfametazina	75 - 125	100 ¹
	Cefalexina	75 - 100	100 ²		Clortetraciclina	200 - 300	100 ¹
	Cefalonio	15 - 20	20 ²		Doxaciclina	25 - 75	100 ¹
	Cefoperazone	20 - 30	50 ²		Oxitetraciclina	75 - 100	100 ¹
	Ceftiofur e metabólitos	50 - 100	100 ¹	Tetraciclina	50 - 100	100 ¹	
	Cefuroxima	20 - 25	50 ²	Macrolídeos	Eritromicina	75 - 100	40 ²
	Cefapirina	8 - 10	60 ²		Espiramicina	300 - 400	200 ²
	Cloxacilina	15 - 25	30 ¹		Lincomicina	100 - 150	150 ²
	Dicloxacilina	5 - 10	30 ¹		Pirlimicina	25 - 50	100 ²
	Nafcilina	5 a 10	30 ²		Tilmicosina	25 - 35	50 ²
	Oxacilina	5 - 10	30 ¹		Tilosina	20 - 30	50 ²
Penicilina G	2 - 3	4 ¹	AG*	Gentamicina	75 - 150	100 ²	
Outros	Dapsona	1 - 2		0 ²	Neomicina	100 - 150	500 ²

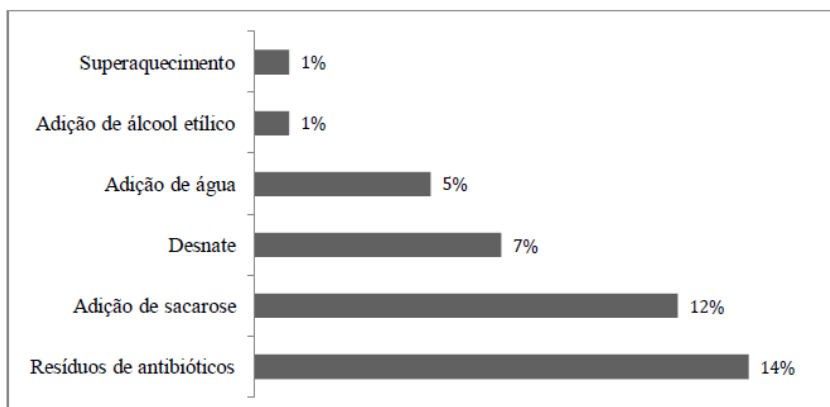
*Estabelecido pela Instrução Normativa 24 (BRASIL, 2011b); Estabelecido pelo Alimentarius * SF - sulfonamidas; AG - aminoglicosídeos*

Fonte: Charm Sciences (2011), modificado pelo autor

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises demonstraram que 51 (51%) das amostras apresentaram pelo menos uma alteração nas análises realizadas e, 21 (21%) foram reprovadas em mais de uma análise. Os parâmetros físico-químicos reprovaram 25% das amostras e os microbiológicos 10% (BRASIL, 2011a), em 13% das amostras foi detectada a presença de substâncias fraudulentas e em 14% resíduos de antibióticos (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Porcentagens de fraudes e resíduos de antibióticos detectados em 100 amostras de leite pasteurizado produzido no Paraná entre outubro e novembro de 2012.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em pelo menos uma amostra de cada um dos 10 laticínios estudados foi detectada alguma irregularidade nas análises físico-químicas. A tabela 1 apresenta a média e o número de amostras fora dos parâmetros físico-químicos desse estudo. A maioria das infrações foram observadas para o teor de sólidos não gordurosos (SNG), sólidos totais (ST) e gordura.

A redução nos teores de sólidos totais e não gordurosos no leite está relacionada, no leite pasteurizado, à fraudes por adição de água e/ou desnate. Na determinação da porcentagem de gordura, 5 das 9 amostras fora dos padrões apresentaram 2,9% de gordura, o que sugere problemas de padronização do produto.

Tabela 1 – Médias e número de amostras fora dos parâmetros estabelecidos² nas análises físico-químicas em amostras de leite pasteurizado, no período entre agosto e outubro de 2012, no estado do Paraná.

Análise	Média (DP) ¹	Padrão ²	Amostras fora do padrão (%)	Média (DP) ³
Sólidos não gordurosos (%)	9 (±0,163)	≥ 8,4	11 (11%)	8,25 (±0,069)
Sólidos totais (%)	12 (±0,399)	≥ 11,4	6 (6%)	11,05 (±0,243)
Gordura (%)	3 (±0,336)	≥ 3	9 (9%)	2,7 (±0,304)
Alizarol 72%	-	Estável	7 (7%)	-
Crioscopia (°H)	-0,537 (0,004)	-0,550 à -0,530	5 (5%)	-0,526 (±0,002)
Densidade (g/mL)	1,0305 (±0,001)	1,028 à 1,034	0	-
pH	6,71 (±0,098)	NE*	-	-
Acidez °D	16,7 (±0,877)	14 à 18	1 (1%)	19 (-)
Fosfatase	-	Negativa	0	-
Peroxidase	-	Positiva	1 (1%)	-

*Padrão não estabelecido; ¹ Média e desvio padrão (DP) das 100 amostras de leite avaliadas; ² Segundo a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011); ³ Média e desvio padrão (DP) apenas das amostras fora dos parâmetros estabelecidos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Leite Instável Não Ácido (LINA) foi detectado na prova do alizarol em 7 (7%) amostras. Entre outras causas, a instabilidade apresentada pode ser relacionada à qualidade da matéria-prima em seis destas amostras, que apresentaram coágulo do tipo digerido na prova de lactofermentação. Esse tipo de coágulo é gerado pela presença de microorganismos psicrotróficos que produzem enzimas proteolíticas termoresistentes, e degradam a proteína do leite (BEHMER, 1999). Outros fatores podem estar envolvidos com a ocorrência de LINA como o excesso de íons cálcio, altas contagens de células somáticas e adição de etanol (OLIVEIRA; TIMM, 2006).

As cinco amostras fora dos parâmetros para crioscopia apresentaram resultados acima de $-0,530^{\circ}\text{H}$, indicando fraude por adição de água. Além disso, em 4 destas amostras os resultados para SNG estavam abaixo do mínimo estabelecido de 8,4% (BRASIL, 2011a). O teor de SNG normal apresentado na quinta amostra provavelmente se deve à sua elevada porcentagem de gordura (3,7%) e densidade normal (1,031g/mL), uma vez que a porcentagem de SNG foi obtida pela fórmula prática (BRASIL, 2006).

No Brasil, estudos demonstram que a fraude por adição de água ao leite ainda é bastante frequente. A literatura relata ocorrência de 11,3% à 60% desse tipo de fraude em leite fluido (FIRMINO et al., 2010; GIOMBELLI et al., 2011; MARTINS et al., 2008; MENDES et al., 2010; SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

Na análise de densidade não foram observadas inconformidades. Em relação à pesquisa de reconstituintes da densidade, em nenhuma amostra avaliada detectou-se a presença de amido ou cloretos, mas 12 (12%) amostras apresentaram fraude por adição de sacarose e uma (1%) amostra foi positiva para presença de álcool etílico. O álcool etílico é usado com o objetivo de adulterar a crioscopia após fraudes por adição de água (BELOTI et al., 2011b). As amostras fraudadas com sacarose pertenciam à 8 dos 10 laticínios avaliados. Em quatro desses laticínios essa fraude foi recorrente. As amostras positivas para sacarose e álcool apresentaram resultados dentro do padrão para crioscopia e densidade, exceto por uma amostra positiva para sacarose, que apresentou crioscopia de $-0,524^{\circ}\text{H}$.

Esses resultados demonstram que fraudes por adição de água e reconstituintes, quando realizadas de forma equilibrada podem não ser identificadas pelas provas de densidade e crioscopia, determinadas pela legislação para o leite pasteurizado. Isso ilustra a importância da realização de provas específicas para a pesquisa de reconstituintes não só na matéria-prima, mas também no produto final.

A utilização de provas específicas para identificação de fraude por adição de reconstituintes é relatada na literatura em frequências que variam de 1,39 à 86,28%

(FIRMINO et al., 2010; ROSA-CAMPOS et al., 2011). Outros estudos, porém, não relatam a esse tipo de adulteração (MENDES et al., 2010; SOUSA et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

Fraudes por adição de neutralizantes no leite objetivam mascarar a acidez adquirida, decorrente do metabolismo microbiano, que produz ácido lático (TRONCO, 2008). Quando a adulteração é bem feita, a acidez volta ao intervalo de normalidade. Dessa forma, a avaliação da acidez titulável não é suficiente para atestar a ausência de neutralizantes da acidez (MILAGRES, 2008).

A média obtida para o pH de 6,71 (Tabela 1) ficou dentro do intervalo entre 6,6 e 6,8, considerado normal para o leite produzido no Brasil (SANTOS; FONSECA, 2007). Apenas uma amostra (1%) apresentou acidez Dornic acima do permitido pela legislação (BRASIL, 2011a), essa amostra também apresentou contagens elevadas para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente 49 e 10 UFC/mL.

Nenhuma amostra apresentou fraude por adição de neutralizantes, resultado relatado também por outros pesquisadores (FIRMINO et al., 2010; MARTINS et al., 2008; MENDES et al., 2010). Uma das amostras se apresentou alcalina na prova do alizarol, com acidez de 14°D e pH de 6,88, sugestivo para uso de neutralizantes, ou para adição de água, que não foi identificada na amostra.

Na avaliação microbiológica, 10 amostras (10%), oriundas de 7 dos 10 laticínios avaliados estavam fora dos padrões estabelecidos para leite pasteurizado (BRASIL, 2011a). Destas, nove (9%) continham coliformes totais acima de 4 UFC/mL, três (3%) apresentaram aeróbios mesófilos acima de 8×10^4 UFC/mL (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Distribuição de amostras de leite pasteurizado de laticínios do Paraná, avaliadas entre outubro e novembro de 2012, de acordo com a contagem (UFC/mL) de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM).

Intervalo	n
< 1.000	8 (8%)
Entre 1.001 e 10.000	60 (60%)
Entre 10.001 e 50.000	25 (25%)
Entre 50.001 e 80.000	4 (4%)
> 80.000	3 (3%)
Total	100 (100%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em três (3%) amostras foi detectada a presença de *Escherichia coli* (Tabela 3), acima do limite estabelecido para coliformes à 45°C (BRASIL, 2011a) o que representa contaminação de origem fecal após o tratamento térmico e a possível presença de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). No entanto, a maioria das amostras (71%) apresentou boa qualidade microbiológica, com baixas contagens de aeróbios mesófilos e ausência de coliformes. A média observada nas embalagens para o prazo de validade dos leites avaliados foi de 6,27 dias, sendo 8 dias o maior prazo e 5 dias o menor.

Tabela 3 – Distribuição de amostras de leite pasteurizado de laticínios do Paraná, avaliadas entre outubro e novembro de 2012, de acordo com as contagens (UFC/mL) de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC)

Intervalo	CT n	EC n
Padrões (BRASIL, 2011)	Máx. 4	-
<1**	71 (71%)	97 (97%)
Entre 1 e 2	11 (11%)	-
Entre 2,1 e 4	9 (9%)	1 (1%)
Entre 4,1 e 10	1 (1%)	1 (1%)
Entre 11 e 100	7 (7%)	1 (1%)
> 100	1 (1%)	-

* Limite inferior de quantificação da metodologia Petrifilm™ (3M, St. Paul, MN, EUA).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A qualidade microbiológica do leite avaliada neste estudo foi melhor que a relatada por outros estudos realizados na mesma região. Giombelli et al. (2011) encontraram 58 (47,54%) de 192 amostras de leite pasteurizado com contaminação acima dos limites permitidos. Tamanini et al. (2007) relataram que 30% das 80 amostras de leite pasteurizado tipo C fora dos parâmetros estabelecidos.

A lactofermentação é uma prova para avaliar a microbiota predominante no leite cru (BEHMER, 1999), porém, nesse estudo essa prova foi empregada como uma ferramenta auxiliar na avaliação da qualidade do leite pasteurizado. A maior parte dos coágulos (71%) foi classificada como digerido. Esse resultado indica problemas com a qualidade do leite cru utilizado como matéria-prima, que possivelmente apresentava uma microbiota predominantemente constituída por micro-organismos psicrófilos, produtores de enzimas proteolíticas termoestáveis (BEHMER, 1999). Das seis amostras que geraram coágulos esponjosos, característicos de uma microbiota composta predominantemente por

coliformes (BEHMER, 1999), três apresentaram micro-organismos do grupo coliforme acima dos padrões.

Não houve formação de coágulo em 10 (10%) amostras indicando a possível presença de inibidores microbianos (BEHMER, 1999), exceto antibióticos e conservantes que não foram detectados nessas amostras. Outra possibilidade é que as baixas contagens detectadas nessas amostras, menores que 5×10^3 UFC/mL, não tenham sido suficientes para reduzir o pH do leite ao ponto isoelétrico da caseína de 4,6 (ORDOÑEZ, 2005) e promover sua coagulação em 24 horas. Apenas 13 amostras (13%) tiveram coágulos gelatinosos, considerados ideais para a produção de derivados lácteos por representar uma microbiota composta predominantemente por bactérias ácido lácticas (BEHMER, 1999).

Todas amostras foram negativas para as substâncias conservantes pesquisadas: formaldeído, cloro, hipoclorito e peróxido de hidrogênio. No entanto, devemos considerar que parte destas substâncias são voláteis e/ou rapidamente degradadas ou inativadas no leite e dificilmente detectadas no leite pasteurizado (SAHA, 2003; CORDS; DYCHDALA; RICHTER, 2001).

A presença de antibióticos foi detectada em 14 amostras (14%). A contaminação do leite por resíduos de antibióticos é consequência principalmente da utilização desses medicamentos nas vacas em lactação associada à inobservância do período de carência (SANTOS; FONSECA, 2007). Sua detecção no leite pasteurizado reafirma a estabilidade térmica destas substâncias e sua atividade até o momento do consumo (UNUSAN, 2009).

No Brasil a ocorrência de antibióticos no leite fluido relatada na literatura é bastante variável, dependendo da técnica utilizada, princípio pesquisado e da região estudada. Os relatos de detecção oscilam entre 2,7% e 64,9% (ANVISA, 2009; MORAIS et al., 2009; NERO et al., 2007; OLIVEIRA; BANDO; MACHINSKI JUNIOR, 2007; SOUSA et al., 2012; VIEIRA et al., 2012).

A legislação brasileira não determina a pesquisa de antibióticos no leite pasteurizado (BRASIL, 2011a) assim, se houver falha no controle do leite cru, o leite pasteurizado pode conter esses resíduos, representando risco para a saúde do consumidor. Reações de hipersensibilidade, indução de resistência bacteriana, lesões oculares, hepáticas e renais, além do possível comprometimento do desenvolvimento ósseo em crianças já foram associados à ingestão desses resíduos (ANVISA, 2009).

3.6 CONCLUSÕES

As provas determinadas para a avaliação do leite pasteurizado pela legislação não são suficientes para assegurar a qualidade e segurança desse produto.

A maioria das amostras de leite pasteurizado produzido no Paraná apresentou irregularidades compatíveis com fraude por adição de água, desnate, adição de reconstituintes da densidade e presença de resíduos de antibióticos.

A ausência de determinação legal para a pesquisa de antibióticos e fraudes no leite pasteurizado tornam o produto suscetível a esses problemas quando ocorrem falhas no controle de qualidade da matéria-prima ou quando a fraude é realizada pela própria indústria.

As amostras avaliadas apresentaram boa qualidade microbiológica.

3.7 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMVET. **Relatório 20062007 Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo**. 2009. Disponível em: <<http://websphere.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ba64428041ece36fb8d5fd255d42da10/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13. ed., São Paulo: Editora Noel, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1981.

_____. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Estabelece os Métodos analíticos físico-químicos oficiais para leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 239, p.8, 14 dez. 2006.

_____. Instrução Normativa n. 62. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água . **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, 26 ago. 2003.

_____. Instrução Normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p.6, 30 dez. 2011a.

_____. Instrução Normativa nº 24, de 9 de agosto de 2011. Publica o Subprograma de Monitoramento em carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2011, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em

Produtos de Origem Animal PNCRB. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 154, p. 10, 11 ago. 2011b.

BRICIO, S. M. L.; SILVA, C. G.; FINGER, R. M. Qualidade bacteriológica do leite pasteurizado tipo C produzido no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.12, n.1/3, p. 124-126, jan./dez. 2005.

CORDS, B. R.; DYCHDALA, G. R.; RICHTER F. L. Cleaning and Sanitizing in Milk Production and Processing. In: **Applied dairy microbiology**. MARTH, E. H.; STEELE, J. L. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 547-587.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.182p.

FIRMINO, F. C.; TALMA, S. V.; MARTINS, M. L.; LEITE, M. O.; MARTINS, A. D. O. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n.376, p. 5-11, set. out., 2010.

GIOMBELLI, C. J.; TAMANINI, R.; BATAGLINI, A. P. P.; MAGNANI, D. F.; ÂNGELA, H. L.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica , físico-química e dos parâmetros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B , produzidos no Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1539-1546, out./dez. 2011.

KARTHEEK, M.; A.; SMITH, A.; KOTTAI MUTHU, A.; MANAVALAN, R. Determination of Adulterants in Food: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.2, p.629-636, 2011.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JUNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K.P. CORTEZ, A. L. L. CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.295-298, abr.-jun. 2008.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico -químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 349-356, abr./jun. 2010.

MILAGRES, M.P. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão de íons**. 2008. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2008.

MORAIS, C. M. Q. J.; DURÃES, T. S.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.1, 2009.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. ; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391- 393, 2007.

OLIVEIRA, C. R.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Science**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 59- 62, 2007.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 259-263, 2006.

ORDONEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v.2.

ROSA-CAMPOS, A. A.; ROCHA, J. E. S.; BORGIO, L. A.; MENDONÇA, M. A. Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 379, v.66, p.30:34, 2011.

SAHA, B. K.; ALI, M. Y.; CHAKRABORTY, M.; ISLAM, Z.; HIRA, A. K. Study on the preservation of raw milk with hydrogen peroxide (H₂O₂) for rural dairy farmers. **Pakistan Journal of Nutrition**, n.2, v.1, p.36-42, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole. 2007. p.197-208.

SILVA, G.; DIAS, A. M. A.; FRANÇA, J. A.; NEGREIROS, R. C. A.; FALÇÃO, Z. S.; FERREIRA, M. P. B. Avaliação da qualidade do leite tipo "C" integral comercializado em Recife-PE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.62, n.356, p.64-68, maio/jun. 2007.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J.O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2008.

SILVA, R. CRUZ, A. G.; FARIA, J.A.; MOURA, M. M.; CARVALHO, L. M.; WATER, E. H.; SANT'ANA, A. S. Pasteurized milk: efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.2, p.217-219, fev. 2010.

SOUSA, F.; SILVA, L.; SOUSA, E.; SILVA, J.; FEITOSA, M. Análises físico-químicas e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado tipo C. **Caderno Verde De Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável**, v.1, n.1, 2011.

SOUSA, F. C.; SILVA, L. M. M.; SILVA, J. N.; CRUZ, C. S. A.; SOUSA, E. P. Resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado tipo C comercializado na região cariense . **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p.21-24, 2012.

SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; CELEGHINI, R. M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, v.124, p.692-695, 2011.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo C produzido na região norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, jul./set. 2007.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206p.

UNUSAN, N. Occurrence of chloramphenicol, streptomycin and tetracycline residues in ultra-heat-treatment milk marketed in Turkey. **International Journal of Food Sciences e Nutrition**, v.60, n 5, p 359-364. 2009.

VIEIRA, T. S. W.J.; RIBEIRO, M. R.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JÚNIOR, M.; PONTES NETTO, D. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Parana, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 791-796, abr. 2012.

4 ARTIGO 2

AMPLITUDE DAS ALTERAÇÕES PROMOVIDAS PELA ADIÇÃO EXPERIMENTAL DE RECONSTITUINTES AO LEITE E SENSIBILIDADE ANALÍTICA POR PROVAS ESPECÍFICAS

4.1 RESUMO: A fraude mais comumente observada no leite é a adição de água. Outras fraudes são decorrentes desta, como a adição de substâncias reconstituíntes com o objetivo de mascarar a diluição, como sal, açúcar e amiláceos. Apesar de haver determinação legal para a realização diária de provas específicas para detecção de reconstituíntes, muitas indústrias utilizam apenas provas não específicas como a densidade e a crioscopia para identificar esse tipo de fraude. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade analítica das provas de densidade e crioscopia e das provas específicas para pesquisa de adulteração por adição de cloretos, sacarose e amido no leite. Neste estudo, leite pasteurizado tipo A, livre de quaisquer substâncias estranhas, foi adicionado experimentalmente, de diferentes concentrações de sal, açúcar, farinha de trigo ou amido de milho e água, e avaliado pelas provas de densidade, crioscopia, acidez Dornic, e condutividade e por provas específicas para pesquisa de sacarose, cloretos e amido, além de quantificar a lactose por infravermelho e ultrassom. Os resultados obtidos demonstram que as provas de densidade e crioscopia não são suficientes para detectar fraudes por adição de água e reconstituíntes. As provas específicas para a pesquisa de reconstituíntes apresentam boa sensibilidade analítica, identificando concentrações mínimas de 0,027% para sal, 0,045% para açúcar e 0,009% para amiláceos, constituindo importantes ferramentas auxiliares no combate às fraudes. Observou-se que a adição de açúcar aumentou a porcentagem de lactose quantificada por equipamentos de ultrassom e infravermelho, demonstrando que estes não identificam especificamente a lactose.

Palavras chave: Adição de água. Açúcar. Sal. Farinha. Infravermelho. Ultrassom

4.2 ABSTRACT: The most frequently observed fraud in milk is water addition. Other frauds to mask the dilution are consequential to this, for example the addition of restorative substances: salt, sugar and starch. Although legislation determines the daily research of restorative substances by specific methodology, many industries use only unspecific tests such as density and freezing point to identify these types of fraud. The aim of this study was to evaluate the capacity detection by density and freezing point test as well as by specific tests for the adulteration detection by chlorides, sucrose and starch addition on milk. In this study, pasteurized grade A, free of adulterants, milk was added with different concentrations of salt, sugar, wheat flour or corn starch and water in the laboratory, and evaluated through nonspecific tests of density, freezing point determination, Dornic acidity and conductivity and specific tests for the research of sucrose, chlorides and starch, besides lactose quantification by infrared and ultrasound methodology. The obtained results show that density and freezing point are not sufficient to identify milk fraud by water and restorative substances. However, specific tests for the research of restorative substances have good detection capacity, identifying minimum concentrations of 0.027% for salt, 0.05% for sugar and 0.009% for starch, and for that, considered important tools to inhibit frauds. It was observed that addition of sugar increased lactose percentage by ultrasound and infrared equipment, thus these methodologies do not detect exclusively lactose.

Keywords: Water addition. Sugar. Salt. Flour. Infrared. Ultrasound.

4.3 INTRODUÇÃO

No período compreendido entre 1980 e 2010 o leite foi apontado como um dos alimentos mais frequentemente fraudados (MOORE; SPINK; LIPP, 2012). É considerado fraudado o leite que: for adicionado de água, substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição; sofrer subtração de qualquer dos seus componentes; estiver cru e for vendido como pasteurizado ou for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade (BRASIL, 1997a).

A fraude mais comum no leite é a adição de água, historicamente praticada por produtores e pela indústria por questões econômicas. No Brasil, diversos estudos relatam a ocorrência de adulteração do leite por adição de água com frequências que variam entre 11,3 e 60% (GIOMBELLI et al., 2011; MARTINS, 2008; SILVA et al., 2008; FIRMINO et al., 2010; MATTOS et al., 2010).

Dentre as análises do controle de qualidade do leite, a aferição da crioscopia e da densidade são utilizadas para identificar fraudes por adição de água e de reconstituintes e têm como parâmetros legais 1,028 a 1,034 g/mL para a densidade à 15°C e -0,550°H à -0,530°H para a crioscopia (BRASIL, 2011). A adição de água ao leite diminui sua densidade e aproxima a crioscopia de 0°H, enquanto a adição de reconstituintes provoca o efeito contrário e objetiva recompor estes parâmetros (SANTOS; FONSECA, 2007).

Entre os reconstituintes mais utilizados estão o sal e o açúcar que, por formarem solução com a água, recompõe mais eficientemente a crioscopia do que os amiláceos que, por estarem em suspensão, recompõe a densidade, mas não interferem na crioscopia (TRONCO, 2008). Se a adição desses compostos é realizada de forma equilibrada com a quantidade de água, as provas de densidade e crioscopia rotineiramente realizadas no leite podem não ser capazes de detectá-la.

A legislação determina a pesquisa diária de reconstituintes na recepção do leite cru pela indústria (BRASIL, 2011) e, embora indústria e órgãos fiscalizadores tenham disponíveis análises específicas para identificar esse tipo de adulteração, seja pela dificuldade de execução, pelo volume de leite recebido, ou por ausência de conhecimento, essas ferramentas muitas vezes não são utilizadas.

Outra realidade é que as consequências da adição de água e suas combinações com reconstituintes parecem ser bastante familiares aos produtores. No entanto, não há na literatura dados que auxiliem os pesquisadores, a indústria e órgãos fiscalizadores a

conhecer com maior precisão a capacidade de alterar a densidade e a crioscopia dos principais reconstituintes.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a sensibilidade analítica das provas específicas para a pesquisa de cloretos, sacarose e amido e das provas de densidade e crioscopia diante das alterações físico-químicas promovidas pela adição experimental desses reconstituintes e de água ao leite.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das alíquotas para avaliação

Para este experimento foi utilizado leite pasteurizado tipo A, negativo para a presença de reconstituintes e dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2011).

Cada reconstituente (sal, açúcar ou amiláceos) foi isoladamente avaliado em experimentos com três repetições. Para cada uma das repetições foram utilizados 4,5 litros do leite tipo A, homogeneizados e divididos em nove alíquotas de 500 mL. Oito alíquotas foram destinadas à adição de oito diferentes concentrações de um dos reconstituintes: sal iodado, açúcar, farinha de trigo ou amido de milho comerciais (Quadro 1) e uma alíquota sem adição foi reservada para o controle negativo. As análises de cada alíquota foram realizadas em triplicata.

Quadro 1 – Concentrações dos reconstituintes utilizados nos experimentos para avaliar alterações físico-químicas no leite e a sensibilidade analítica das provas descritas pela legislação antes e após a adição de 5% de água.

Aliquota	Água (%)	Sal (%)	Açúcar (%)	Amido de milho (%)	Farinha de Trigo (%)
Controle -	0	0	0	0	0
1	0	0,025	0,050	0,010	0,010
2	0	0,030	0,100	0,025	0,025
3	0	0,035	0,150	0,050	0,050
4	0	0,040	0,200	0,075	0,075
5	0	0,045	0,250	0,100	0,100
6	0	0,050	0,500	0,500	0,500
7	0	0,075	0,750	1,000	1,000
8	0	0,100	1,000	2,500	2,500
Controle -	5	0	0	0	0
9*	5	0,023	0,045	0,009	0,009
10*	5	0,027	0,091	0,023	0,023
11*	5	0,032	0,136	0,045	0,045
12*	5	0,036	0,181	0,068	0,068
13*	5	0,041	0,238	0,091	0,091
14*	5	0,045	0,454	0,454	0,454
15*	5	0,068	0,680	0,907	0,907
16*	5	0,091	0,907	2,268	2,268

Concentrações idênticas às adicionadas ao leite íntegro e recalculadas para a concentração final após adição de 5% de água.

Fonte: Elaborado pelo autor

Análises físico-químicas e pesquisa das fraudes

Em todas as alíquotas, adicionadas de um dos reconstituintes, foram feitas análises físico-químicas de densidade à 15°C, crioscopia (PZL® 7000), acidez Dornic. A condutividade (Hanna® HI8424) foi aferida nas alíquotas adicionadas de sal ou açúcar. A pesquisa de cloretos e de amido (BRASIL, 2006) foi realizada, respectivamente nas alíquotas adicionadas de sal e nas alíquotas adicionadas de farinha de trigo ou amido de milho. A pesquisa de sacarose (BRASIL, 1981) foi realizada nas alíquotas adicionadas de açúcar.

Quantificação da lactose

Para avaliar a interferência da adição de açúcar (sacarose) na quantificação da lactose, o leite adicionado com diferentes concentrações de açúcar comercial (Quadro 1) foi submetido à análise por ultrassom (BOECOLAC - Lac 60 (Hexis®) e por infravermelho (BENTLEY® 2000) na Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH).

Avaliação da adição de água

Após a realização de todas as provas, 400 mL das alíquotas adicionadas de reconstituintes foram adicionadas de 5% de água e tiveram as concentrações de reconstituintes recalculadas, devido à diluição, resultando nas concentrações descritas nas alíquotas de 9 à 16 demonstradas no quadro 1.

Análise dos dados

Os dados obtidos foram tabulados e analisados no programa Microsoft Excel® 2010.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os reconstituintes estudados promoveram diferentes amplitudes de alterações na densidade e no índice crioscópico do leite.

Sal

O reconstituente com maior capacidade de alteração dos parâmetros avaliados foi o sal iodado. A adição de 0,1% de sal é capaz de aprofundar a crioscopia em média em $-0,064^{\circ}\text{H}$ e aumentar a densidade em $0,0008 \text{ g/mL}$ (Tabela 1).

Tabela 1 –Detecção de cloretos, médias (n=3) e desvio padrão (DP) para densidade, crioscopia e condutividade de leite adicionado de diferentes concentrações de sal iodado comercial, antes e depois da adição de 5% de água.

Aliquota	Sal (%)	Pesquisa cloretos	Densidade (g/mL)		Crioscopia (°H)		Condutividade (mS/cm)	
			Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	0	-	1,032	0,000	-0,537	0,001	5,94	0,082
1	0,025	-	1,033	0,002	-0,552	0,002	6,31	0,137
2	0,030	+	1,032	0,001	-0,557	0,001	6,50	0,091
3	0,035	+	1,032	0,001	-0,561	0,002	6,57	0,084
4	0,040	+	1,033	0,001	-0,564	0,001	6,64	0,107
5	0,045	+	1,033	0,001	-0,566	0,001	6,72	0,123
6	0,050	+	1,033	0,002	-0,570	0,001	6,62	0,256
7	0,075	+	1,033	0,001	-0,585	0,001	7,01	0,178
8	0,100	+	1,033	0,002	-0,604	0,003	7,42	0,131
Após adição de 5% de água								
Controle	0	-	1,030	0,000	-0,510	0,004	5,78	0,073
9	0,023	-	1,030	0,001	-0,523	0,001	6,20	0,061
10	0,027	+	1,031	0,001	-0,526	0,002	6,28	0,216
11	0,032	+	1,030	0,000	-0,529	0,002	6,42	0,096
12	0,036	+	1,030	0,000	-0,533	0,002	6,50	0,076
13	0,041	+	1,031	0,001	-0,535	0,002	6,57	0,085
14	0,045	+	1,030	0,000	-0,538	0,002	6,58	0,080
15	0,068	+	1,030	0,001	-0,555	0,001	6,92	0,067
16	0,091	+	1,031	0,001	-0,571	0,003	7,36	0,067

Fonte: Elaboração do autor.

Os resultados obtidos nas alíquotas 12, 13 e 14 demonstram a importância de provas específicas para a pesquisa da adição de cloretos, já que quando adicionado em concentrações equilibradas com a água, esse tipo de fraude não é detectada nas provas de densidade e crioscopia. A menor concentração de sal detectada pela prova de pesquisa de cloretos foi de 0,027%, enquanto concentrações superiores à 0,036% seriam necessárias para mascarar adição de 5% de água (Tabela 1). A prova para a pesquisa de cloretos possui baixo custo e é de fácil execução. Contudo, por ser subjetiva, sua interpretação pode apresentar complicações, uma vez a coloração final do teste varia entre amarelo pálido para resultados positivos e amarelo "gema de ovo" para resultados negativos. Para evitar dúvidas recomenda-se a realização do teste com controles positivo e negativo.

A adição de sais estabilizantes de proteína como o citrato de sódio promove alteração semelhante, porém em menor intensidade, como demonstrado por Beloti et al.

(2012) que observaram aprofundamento da crioscopia em cerca de $-0,020^{\circ}\text{H}$ após a adição de 0,1% de citrato de sódio ao leite.

Concentrações de 0,1% de sal aumentaram em média 1,55 mS/cm na condutividade do leite (Tabela 1). Esses resultados coincidem com o exposto por Nascimento et al. (2010), que observaram que a adição de sal aumentou progressivamente a condutividade, enquanto a adição de água causou o efeito inverso.

Açúcar

A adição de açúcar promoveu menores alterações nos parâmetros físico-químicos quando comparada à adição de sal. Concentrações de 0,1% de açúcar aprofundaram a crioscopia em $-0,005^{\circ}\text{H}$ e aumentaram densidade em 0,0003 g/mL (Tabela 2). Não foi observada alteração significativa na condutividade do leite adicionado de açúcar.

Tabela 2 – Detecção de sacarose, médias (n=3) e desvio padrão (DP) para densidade, crioscopia e quantificação da lactose por Infravermelho (IV) e Ultrassom (US) de leite adicionado de diferentes concentrações de açúcar comercial, com e sem adição de 5% de água.

Aliquota	Açúcar (%)	Pesquisa de Sacarose	Densidade (g/mL)		Crioscopia ($^{\circ}\text{H}$)		Lactose IV (%)		LactoseUS (%)	
			Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Controle	0	-	1,032	0,000	-0,538	0,005	4,44	0,083	4,38	0,138
1	0,050	+	1,032	0,000	-0,543	0,002	4,55	0,015	4,39	0,111
2	0,100	+	1,032	0,000	-0,546	0,001	4,58	0,012	4,41	0,127
3	0,150	+	1,032	0,000	-0,550	0,001	4,62	0,012	4,42	0,111
4	0,200	+	1,033	0,000	-0,553	0,001	4,59	0,099	4,44	0,112
5	0,250	+	1,033	0,001	-0,552	0,006	4,67	0,021	4,53	0,176
6	0,500	+	1,034	0,001	-0,570	0,008	4,85	0,012	4,70	0,124
7	0,750	+	1,035	0,001	-0,586	0,005	5,04	0,021	4,74	0,101
8	1,000	+	1,037	0,001	-0,604	0,005	5,23	0,036	4,91	0,180
Após adição de 5% de água										
Controle	0	-	1,030	0,001	-0,509	0,004	4,31	0,105	4,16	0,121
9	0,045	+	1,030	0,000	-0,514	0,001	4,31	0,015	4,15	0,117
10	0,091	+	1,030	0,000	-0,518	0,001	4,36	0,010	4,16	0,121
11	0,136	+	1,031	0,001	-0,520	0,002	4,38	0,017	4,17	0,139
12	0,181	+	1,031	0,001	-0,524	0,002	4,37	0,093	4,21	0,105
13	0,238	+	1,030	0,000	-0,522	0,006	4,42	0,023	4,29	0,133
14	0,454	+	1,031	0,000	-0,537	0,005	4,60	0,006	4,41	0,132
15	0,680	+	1,032	0,001	-0,552	0,006	4,77	0,006	4,51	0,131
16	0,907	+	1,033	0,001	-0,565	0,003	4,98	0,225	4,61	0,147

Fonte: Elaborada pelo autor.

A prova para pesquisa de sacarose foi capaz de detectar concentrações 10 vezes menores (0,045%) do que a concentração de açúcar necessária para mascarar adição de 5% de água (0,45%), como demonstra a avaliação da alíquota 14 (Tabela 2).

Apesar disso, o teste possui alguns fatores que podem interferir nos resultados. A prova deve ser realizada com rapidez, pois em poucos minutos é iniciada a degradação da lactose, o que pode gerar resultados falsos positivos (BRASIL, 2006). Por isso, aconselha-se a utilização de controles positivo e negativo. Além disso, a prova utiliza ácido clorídrico concentrado, que deve ser manipulado em capela de exaustão de gases, o que torna a prova inviável para a utilização na rotina da indústria.

SILVEIRA et al. (2004) demonstraram que os resultados obtidos para a quantificação de lactose pelo método de infravermelho não diferem dos obtidos pelos métodos de referência. No presente estudo foi observado que os métodos de infravermelho e ultrassom utilizados para a quantificação da lactose são influenciados pela adição de açúcar comercial.

A adição de 0,1% de açúcar eleva em média 0,06% na quantificação de lactose pelo método do infravermelho e 0,04% no método de ultrassom. Pinto et al. (2008) relataram haver diferença significativa na avaliação da composição do leite por meio de ultrassom e por infravermelho, indicando que o método de ultrassom possui menor precisão.

O parâmetro legal para a lactose é de no mínimo 4,3% e consta no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1997a). Essa informação pode auxiliar na identificação de fraudes, já que este é o componente que apresenta menor variação no leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

Amiláceos

Conforme esperado, a adição de amiláceos não promoveu alterações na crioscopia (Tabela 3), já que essas substâncias não se encontram em solução perfeita no leite e, portanto, não interferem no ponto de congelamento (SANTOS; FONSECA, 2007). Dessa forma, divergências apresentadas entre os resultados da prova de densidade e da crioscopia ainda são os melhores indicativos desse tipo de fraude, que pode ser confirmada pela prova específica. A prova para a pesquisa de amido foi capaz de detectar concentrações de até 0,009% de farinha de trigo ou amido de milho, além de apresentar simples execução e baixo custo.

Tabela 3 –Detecção de amido, médias (n=3) e desvio padrão (DP) para densidade, crioscopia de leite adicionado de diferentes concentrações de amido de milho e farinha de trigo, com e sem adição de 5% de água.

Aliquota	Amiláceo (%)	Pesquisa de amido	Amido de milho				Farinha de trigo			
			Densidade (g/mL)		Crioscopia (°H)		Densidade (g/mL)		Crioscopia (°H)	
			média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
Controle	0	-	1,032	0,001	-0,537	0,002	1,032	0,001	-0,535	0,002
1	0,010	+	1,033	0,000	-0,534	0,002	1,032	0,001	-0,534	0,004
2	0,025	+	1,032	0,001	-0,535	0,001	1,032	0,001	-0,534	0,003
3	0,050	+	1,033	0,000	-0,535	0,002	1,032	0,001	-0,533	0,002
4	0,075	+	1,033	0,000	-0,535	0,002	1,032	0,001	-0,534	0,003
5	0,100	+	1,032	0,002	-0,537	0,002	1,032	0,001	-0,534	0,002
6	0,500	+	1,034	0,001	-0,536	0,002	1,033	0,001	-0,535	0,002
7	1,000	+	1,036	0,001	-0,537	0,002	1,034	0,001	-0,537	0,003
8	2,500	+	1,039	0,001	-0,538	0,003	1,037	0,001	-0,540	0,002
Após adição de 5% de água										
Controle	0	-	1,030	0,001	-0,508	0,002	1,030	0,001	-0,507	0,002
9	0,009	+	1,030	0,000	-0,507	0,003	1,029	0,000	-0,508	0,002
10	0,023	+	1,030	0,000	-0,507	0,002	1,029	0,000	-0,507	0,001
11	0,045	+	1,030	0,000	-0,507	0,001	1,029	0,000	-0,507	0,002
12	0,068	+	1,030	0,000	-0,507	0,002	1,029	0,000	-0,520	0,024
13	0,091	+	1,031	0,001	-0,509	0,001	1,029	0,001	-0,507	0,002
14	0,454	+	1,032	0,001	-0,510	0,000	1,030	0,002	-0,514	0,009
15	0,907	+	1,033	0,001	-0,509	0,001	1,031	0,001	-0,510	0,002
16	2,268	+	1,035	0,003	-0,510	0,002	1,033	0,002	-0,513	0,002

Fonte: Elaborada pelo autor.

A adição dos três tipos de reconstituintes avaliados não apresentou efeito significativo sobre a acidez Dornic do leite, ao contrário da adição de água, que, por apresentar pH superior ao do leite, reduziu a acidez média, obtida de todos os controles negativos (n=9), de 16,03°D para 15,19°D nos controles negativos após a adição de 5% água (n=9).

Embora a fraude por adição de água seja bastante frequente, geralmente utiliza-se apenas a crioscopia e a densidade para sua identificação. A legislação brasileira (BRASIL, 2011) incluiu recentemente um segundo parâmetro para a crioscopia de -0,550°H que serve como indicativo de fraudes por adição de reconstituintes, que tendem a aprofundar a crioscopia.

Observou-se que a avaliação do leite apenas pelas provas de crioscopia e densidade não foi suficiente para a detecção de fraude, nas alíquotas 12 à 14 adicionadas de sal e água (Tabelas 1) e na alíquota 14 adicionada de açúcar e água (Tabela 2).

Os resultados obtidos demonstram que as provas específicas para a pesquisa de cloretos, sacarose e amido avaliadas são capazes de detectar a adição destes reconstituintes em concentrações menores que as necessárias para mascarar fraudes por 5% de água.

Fraudes bem formuladas que combinam adição de água e de reconstituintes como o sal e o açúcar podem fornecer resultados normais para a crioscopia e densidade,

existindo inclusive fórmulas para fraudar o leite, como as identificadas pela Operação Ouro Branco da Polícia Federal (G1, 2007; SPIGLIATTI, 2007). Deste modo, faz-se necessário que o controle de qualidade do leite seja realizado de forma mais abrangente, incluindo a pesquisa dos reconstituintes não só no leite cru como também nos leites tratados termicamente pela pasteurização ou tratamento UHT, para os quais a obrigatoriedade da pesquisa de reconstituintes não existe (BRASIL, 1997b; 2011), pressupondo que se trata de uma fraude cometida apenas por produtores.

4.6 CONCLUSÕES

As análises de crioscopia e densidade realizadas na rotina da avaliação da qualidade do leite não são suficientes para identificar a adição experimental de água e reconstituintes.

As provas específicas para a pesquisa de reconstituintes no leite avaliadas neste estudo constituem ferramentas importantes na identificação de fraudes no leite, apresentando boa sensibilidade analítica e baixo custo, porém algumas dificuldades de interpretação.

O sal foi o reconstituente com maior poder de alteração nos parâmetros de densidade e crioscopia.

A adição de água ao leite, independente da adição de reconstituintes, é responsável por uma redução na acidez Dornic.

4.7 REFERÊNCIAS

BELOTI, V.; MANTOVANI, F. D.; SILVA, M. R.; TAMANINI, R.; GARCIA, D. T.; SILVA, F. A. Alterações do ponto de congelamento do leite por adição do estabilizante citrato de sódio. **Anais do IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1981.

_____. Decreto n 30.691 de 29 de março de 1952. Alterado pelo Decreto 2244 de 04 de junho de 1997. Altera o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - R.I.I.S.P.O.A. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n.105, p. 11555, 05 jun.1997a.

_____. Portaria 370 de 04/09/1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1997b.

_____. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Estabelece os Métodos analíticos físico-químicos oficiais para leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 239, p.8, 14 dez. 2006.

_____. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p.6, 30 dez. 2011.

FIRMINO, F. C.; TALMA, S. V.; MARTINS, M. L.; LEITE, M. O.; MARTINS, A. D. O. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n.376, p. 5-11, set. out., 2010.

G1. **Depoimentos revelam como funcionava fraude do leite**. 2007. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL161409-5598,00.html>>. Acesso em: 29 nov. 2012.

GIOMBELLI, C. J.; TAMANINI, R.; BATAGLINI, A. P. P.; MAGNANI, D. F.; ÂNGELA, H. L.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e dos parâmetros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B, produzidos no Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1539-1546, out./dez. 2011.

MARTINS, A. M. C. V. et al. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.295-298, abr.-jun. 2008.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 173-182, jan./mar. 2010.

MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, v.77, n.4, p.118-126, 2012.

NASCIMENTO, W.W.G.; BELL, M.J.V.; ANJOS, V.C.; FURTADO, M. A. M. Uso de medidas de condutividade elétrica para a detecção de adição de água, cloreto de sódio e soda cáustica no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 375, v. 65, p. 11-17, 2010.

PINTO, A. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FERNANDEZ, V. N. V.; SANTOS, J. O. Comparação entre os métodos de referência e a análise eletrônica na determinação da composição do leite bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.3, p. 273-276, 2008.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Composição e síntese do leite. In: _____. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole. 2007. p.197-208.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2008.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; CANÇADO, S. V.; FERRAZ, V. Comparação entre os métodos de referência e a análise eletrônica na determinação da composição do leite bovino. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p.782-787, 2004.

SPIGLIATTI, S. **PF prende 25 por fraude em leite longa vida**. 2007. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/geral,pf-prende-25-por-fraude-em-leite-longa-vida,68731,0.htm>>. Acesso em: 29 nov. 2012.

5 ARTIGO 3

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DAS PROVAS PARA PESQUISA DE CONSERVANTES E NEUTRALIZANTES UTILIZANDO LEITE EXPERIMENTALMENTE ADULTERADO

5.1 RESUMO: O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de detecção de conservantes e neutralizantes no leite por provas específicas, descritas pela legislação, e inespecíficas baseadas na inibição do crescimento microbiano, bem como avaliar a persistência desses resíduos durante a refrigeração do leite e as alterações microbiológicas decorrentes da sua adição. No laboratório foram adicionadas separadamente ao leite cru diferentes concentrações de formaldeído (0,0005; 0,005; 0,05; 0,01; 0,5 e 0,1%), peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, cloro, detergente alcalino clorado (0,05; 0,1 e 0,5) ou hidróxido de sódio (0,01; 0,025; 0,05 e 0,1%). Em seguida, foram realizadas as provas específicas para a pesquisa de cada conservante e neutralizante, e provas inespecíficas de inibição microbiana, além de contagem de aeróbios mesófilos em placas Petrifilm™ AC antes e depois da adição dos conservantes e neutralizantes. As provas específicas para a pesquisa de conservantes detectaram a presença de formaldeído (0,005%), peróxido de hidrogênio (0,1%) e hipoclorito (0,5%). No entanto, após 24 horas de sua adição não se detectou hipoclorito ou peróxido. A prova para a pesquisa de neutralizantes detectou a presença de hidróxido de sódio (0,1%), inclusive após 48 horas. No entanto, a acidificação do leite impede sua detecção. As provas inespecíficas de inibição do crescimento microbiano detectaram a presença de formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, sendo a prova da cultura do iogurte a que apresentou resultados mais próximos aos das provas específicas. Alterações significativas nas contagens de aeróbios mesófilos no leite cru foram observadas após a adição de formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio. O hidróxido de sódio reduziu significativamente as contagens apenas após 48 horas da sua adição.

Palavras chave: Sanificantes. Detergente. Inibição. Microbiota. Resíduos.

5.2 ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the detection ability of neutralizers of preservatives substances in milk by specific tests, described by the law, and nonspecific tests based on microbial inhibition, as well as evaluate the persistence of these residues during refrigeration of milk and microbiological changes resulting from its addition. In the laboratory different concentrations of formaldehyde (0.0005; 0.005; 0.05; 0.01; 0.5 and 0.1%), hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, chlorine, chlorinated alkaline detergent (0.05, 0.1 and 0.5) or sodium hydroxide (0.01, 0.025, 0.05 and 0.1%) were separately added to raw milk. Then, specific and nonspecific microbial inhibition tests were performed for the detection of each preservative and neutralizer substance added, along with mesophilic aerobic count Petrifilm™ AC plates before and after addition of preservatives and neutralizers. Specific tests detected the presence of formaldehyde (0.005%), hydrogen peroxide (0.1%) and hypochlorite (0.5%). However, after 24 hours of its addition hypochlorite and peroxide were not detected. Test for neutralizers detected the presence of sodium hydroxide (0.1%), even after 48 hours. However, acidification of milk prevents its detection. Nonspecific microbial inhibition tests detected formaldehyde, hydrogen peroxide, sodium hypochlorite and sodium hydroxide, and the test of yoghurt culture presented results similar to the specific tests. Significant changes in aerobic mesophilic counts in raw milk were observed after the addition of formaldehyde, hydrogen peroxide, sodium hypochlorite. Sodium hydroxide alone significantly reduced counts after 48 hours of its addition.

Keywords: Sanitizers. Detergents. Inhibition. Biota. Residues.

5.3 INTRODUÇÃO

O Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite foi criado em 1998 com o objetivo de aumentar a competitividade do setor de leite e derivados no Brasil (BRASIL, 1998). Entre as metas do programa está a redução na contagem bacteriana total (CBT) no leite cru, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a partir de 2002, por meio de parâmetros microbiológicos progressivamente mais rígidos (BRASIL, 2002; 2011).

Para as regiões sul e sudeste, a CBT no leite cru que antes de 2002 não possuía parâmetro, atualmente pode atingir no máximo 600 mil UFC/ml, número que será reduzido para 300 mil UFC/ml em julho de 2014 e para 100 mil UFC/ml em julho de 2016 (BRASIL, 2011). Apesar da melhoria da qualidade microbiológica do leite, diversos pesquisadores demonstram que o leite cru produzido no Brasil continua apresentando classificação insatisfatória (BELOTI et al., 2012; MARTINS et al., 2008; ROSA; QUEIROZ, 2007; SILVA et al., 2011; MATTOS et al., 2010).

Produtores que não atingem os parâmetros determinados pela legislação devem ter o leite recusado pelo laticínio (BRASIL, 2011). Práticas fraudulentas são utilizadas na tentativa de mascarar a má qualidade microbiológica do leite e suas decorrentes alterações físico-químicas. Essas fraudes envolvem a adição de conservantes como peróxido de hidrogênio, formaldeído, cloro, hipoclorito ou neutralizantes como o hidróxido de sódio (TRONCO, 2008).

A Instrução Normativa 62 determina a pesquisa de neutralizantes, e inibidores do crescimento microbiano apenas no leite cru (BRASIL, 2011), o que pressupõe que estas adulterações sejam realizadas apenas por produtores de leite e que a indústria realiza o controle adequado da matéria prima. No entanto, no ano de 2007, foi identificado um esquema de adulteração de leite UHT no estado de Minas Gerais, que envolvia a adição de uma solução composta de conservantes, neutralizantes e reconstituintes, além de soro e água (G1, 2007; SPIGLIATTI, 2007), uma fraude sofisticada, não detectada pelas provas de rotina e atribuída às indústrias. Esse fato ilustra a importância do controle não só na matéria-prima, mas também no produto final. Essas substâncias são frequentemente detectadas no leite fluido por diferentes pesquisadores (FIRMINO et al., 2010; FREITAS FILHO et al., 2009; ROSA CAMPOS et al., 2011; SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

A adição de neutralizantes e inibidores do crescimento microbiano além de proibida pela legislação (BRASIL, 2011), pode trazer risco à saúde do consumidor (ANVISA, 2007; EPA, 2000; NCI, 2011) e comprometer sua confiança no produto.

Apesar de determinar redução na acidez Dornic, a adição de neutralizantes nem sempre é identificada por essa análise, já que em quantidades equilibradas de neutralizantes e ácido láctico a acidez resultante poderá ser normal (MILAGRES, 2008). A legislação descreve diferentes provas específicas destinadas à pesquisa de substâncias conservantes e neutralizantes (BRASIL, 2006). No entanto, a pesquisa diária dos diferentes tipos de fraudes passíveis de ocorrerem no leite pode ser inviável para a indústria, devido ao número de provas e à dificuldade apresentada para realização de algumas delas.

Para a detecção de conservantes, existe a alternativa de utilizar provas inespecíficas que se baseiam na inibição de culturas específicas de micro-organismos. Na lactofermentação observa-se a inibição das bactérias naturalmente presentes no leite cru. Na prova do iogurte avalia-se a inibição de culturas específicas: *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactococcus thermophilus* e, no Kit Charm® Cow Side II test a inibição de culturas de *Bacillus stearothermophilus*. Essas provas apresentam baixo custo e apresentam a vantagem de detectar simultaneamente resíduos de antibióticos (BEHMER, 1999; CHARM SCIENCES®, 2011; TRONCO, 2008)

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade analítica das provas específicas e inespecíficas para a pesquisa dos conservantes e neutralizantes da acidez adicionados experimentalmente ao leite, a persistência desses resíduos em leite refrigerado durante 48 horas e as conseqüentes alterações microbiológicas.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da sensibilidade analítica das provas para a pesquisa de conservantes e neutralizantes foi realizada em três repetições independentes, sendo realizadas análises em triplicata para cada repetição. Para cada repetição, aproximadamente 6 litros de leite cru refrigerado, isento de substâncias estranhas e dentro dos parâmetros exigidos pela legislação (BRASIL, 2011), foram homogeneizados e divididos em 19 alíquotas de 300 mL, em frascos de vidro esterilizados. Em 18 alíquotas foram adicionadas, em separado, uma entre três diferentes concentrações de cada substância avaliada, conforme descrito no quadro 1. Uma alíquota foi destinada ao controle negativo. As concentrações utilizadas no estudo

(Quadro 1) foram selecionadas tendo como base concentrações empregadas em fraudes, descritas pela literatura (ANVISA, 2007).

Quadro 1 – Substâncias e concentrações utilizadas para avaliação da sensibilidade analítica de provas para pesquisa de conservantes e neutralizantes em leite cru

Substância avaliada	Concentrações
Formaldeído P.A.	0,0005; 0,005; 0,05; 0,01; 0,5 e 0,1%
Solução de peróxido de hidrogênio 3%	0,05; 0,1 e 0,5%
Solução de Hipoclorito de Sódio 2,0 a 2,5%	0,05; 0,1 e 0,5%
Solução de cloro a 750 ppm	0,05; 0,1 e 0,5%
Solução de detergente alcalino clorado	0,05; 0,1 e 0,5%
Hidróxido de sódio (em escamas	0,01; 0,025 e 0,05%

Fonte: Elaborado pelo autor

Provas específicas

As alíquotas preparadas e o controle negativo foram submetidos, conforme a substância adicionada, à pesquisa de formaldeído, peróxido de hidrogênio (método do guaiacol), cloro, hipoclorito ou neutralizantes da acidez pelos métodos A do ácido Rosólico e B da fenoltaleína, conforme descrito pela Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006). Para a pesquisa de formaldeído, além das concentrações descritas no quadro 1 avaliou-se concentrações adicionais de 0,01; 0,005 e 0,0005%.

Foram realizadas adicionalmente as provas de acidez Dornic e estabilidade ao alizarol 72% v/v para todas as substâncias avaliadas.

Provas inespecíficas

As alíquotas adicionadas de conservantes ou neutralizantes foram avaliadas por três métodos de inibição microbiana: a lactofermentação, a prova da cultura de iogurte e o Kit Charm® Cow Side II test (Charm Sciences, Inc.).

a) Prova da Lactofermentação

Em tubos de rosca esterilizados foram pipetados 10 mL de cada alíquota. Os tubos foram incubados à 36±1°C por 24 horas. A ausência de formação de coágulo foi

interpretada como reação positiva para a presença de inibidores, e a formação de coágulo foi interpretada como negativa (BEHMER, 1999; com modificações).

b) Prova da Cultura de Iogurte

Em tubos de rosca estéreis foram distribuídos 10 mL das alíquotas. Os tubos foram aquecidos em banho-maria à 80°C por 5 minutos e, em seguida, resfriados à 45°C e adicionados de 1 mL da solução de trabalho, composta pela cultura recém preparada de *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactococcus thermophilus* e do indicador de pH púrpura de bromocresol. Os tubos foram incubados à 45±1°C por duas horas. Os resultados foram interpretados com base na alteração de cor do indicador de pH: amostras amarelo-esverdeadas foram consideradas negativas e amostras com coloração inalterada, roxa, foram positivas para inibição microbiana (TRONCO, 2008).

c) Kit Charm® CowSide II test (Charm Sciences, Inc.)

Nos frascos contendo a cultura de *Bacillus stearothermophilus* foram transferidos 100 µL de cada alíquota e, em seguida, incubados em banho-maria à 64±2°C, conforme instruções do fabricante. A leitura foi realizada visualmente, observando-se a coloração final dos frascos, que quando inalterada (roxa) foi classificada como positiva para a presença de inibidores e quando alterada (amarelo-esverdeado) como negativa.

O efeito inibidor de conservantes e neutralizantes sobre a microbiota do leite cru e a persistência dos resíduos durante refrigeração foi avaliado em três repetições independentes. Para cada repetição, três litros de leite cru refrigerado foram homogeneizados e divididos em sete alíquotas de 400 mL de leite, em frascos de vidro esterilizados. Destas, seis alíquotas foram adicionadas separadamente de uma das substâncias descritas em concentrações diferentes, demonstradas no quadro 2. Uma alíquota de leite foi utilizada como controle negativo.

Quadro 2 – Substâncias e concentrações utilizadas para avaliar o efeito inibitório sobre a microbiota de aeróbios mesófilos em leite cru e persistência dos resíduos durante 48 horas de refrigeração.

Substância avaliada	Concentração
Formaldeído P.A.	0,05%
Solução de peróxido de hidrogênio 3%	0,1%
Solução de Hipoclorito de Sódio 2,0 a 2,5% (comercial)	0,5%
Solução de cloro a 750 ppm	0,5%
Solução de detergente alcalino clorado	0,5%
Hidróxido de sódio (em escamas – comercial)	0,1%

Fonte: Elaborado pelo autor

As alíquotas adicionadas das substâncias conservantes ou neutralizantes e o controle negativo foram submetidas à contagem de aeróbios mesófilos após 24 e 48 horas de refrigeração, em placas Petrifilm™ AC (3M, St. Paul, MN, United States of America), conforme instruções do fabricante.

Uma fração de cada uma das alíquotas foi utilizada para pesquisa de conservantes ou neutralizantes, para avaliar a persistência dessas substâncias, em três períodos diferentes: logo após sua adição ao leite, 24 e 48 horas após a refrigeração. De acordo com a substância adicionada, foi realizada a pesquisa de formaldeído, peróxido de hidrogênio (método do guaiacol), cloro e hipoclorito ou neutralizantes (métodos A e B) (BRASIL, 2006). Durante o experimento os frascos foram mantidos fechados na geladeira em temperatura de $7\pm 1^{\circ}\text{C}$.

A interferência da acidificação do leite na detecção de neutralizantes foi realizada em outro experimento, com três repetições independentes. Para cada repetição 1,8 litros de leite pasteurizado foram homogeneizados e divididos em seis alíquotas de 300 mL. Cinco alíquotas foram adicionadas separadamente de diferentes concentrações de hidróxido de sódio (0,05;

0,1; 0,25; 0,5 e 1%) e uma alíquota foi destinada ao controle negativo. As alíquotas assim preparadas foram avaliadas para acidez Dornic, estabilidade ao alizarol 72% v/v (BRASIL, 2006) e aferição do pH (HI 8424, Hanna®), além da pesquisa de neutralizantes pelo método B da fenolftaleína (BRASIL, 2006), realizada em triplicada para cada alíquota.

Para simular a acidificação do leite promovida pelo metabolismo microbiano, após a avaliação inicial, 100 mL de cada alíquota foi adicionados de 5 gotas de fenolftaleína e titulados com ácido láctico P.A. até o desaparecimento da coloração rósea, de forma que a concentração final de ácido láctico adicionado permanecesse em equilíbrio com as

concentrações de hidróxido de sódio previamente adicionadas. Após esse procedimento, as alíquotas foram reavaliadas.

Análise dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa Microsoft Excel® 2010. Para a realização do teste "T" os valores foram convertidos para log.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as concentrações de conservantes e neutralizantes avaliadas pelas provas específicas descritas pela legislação (BRASIL, 2006), as mínimas detectadas para cada substância foram de: 0,005% para o formaldeído; 0,1% para o peróxido de hidrogênio; 0,5% para o hipoclorito de sódio e 0,1% para o hidróxido de sódio. A adição da solução de cloro a 750ppm e do detergente alcalino clorado não foi identificada, nas concentrações avaliadas, por nenhuma das provas estudadas.

A prova que apresentou maior sensibilidade foi a da pesquisa de formaldeído, o que é desejável, uma vez que essa substância possui efeito inibidor do crescimento de microorganismos mesmo em baixas concentrações. Apesar disso, trata-se de uma prova extremamente laboriosa, na qual se realiza um processo de destilação, que leva em média 1 hora para realização de cada amostra.

O formaldeído foi também detectado nas três concentrações avaliadas pelas provas de inibição microbiana (Tabela 1) e causou redução significativa ($p < 0,05$) nas contagens de aeróbios mesófilos no leite cru (Tabela 2). De fato, essa foi a substância com maior poder inibitório entre as testadas (Tabela 2).

Tabela 1 –Capacidade de detecção de conservantes e neutralizantes em leite pelas provas de cultura de iogurte (CI), lactofermentação (LF), Charm® CowSide II Test (CT) e das provas indicadas pela legislação (LG)

Substância avaliada	Conc. ¹ %	CI	LF	CT	LG ¹	Método de Detecção ²
Formaldeído	0,05	+	+	+	+	Pesquisa de formaldeído
	0,1	+	+	+	+	
	0,5	+	+	+	+	
Peróxido de hidrogênio	0,05	-	-	-	-	Pesquisa de peróxido de hidrogênio método B
	0,1	-	-	-	+	
	0,5	+	+	-	+	
Hipoclorito de sódio	0,05	-	-	-	-	Pesquisa de cloro e hipoclorito
	0,1	-	-	-	-	
	0,5	+	-	-	+	
Solução de 750 ppm de cloro	0,05	-	-	-	-	Pesquisa de cloro e hipoclorito
	0,1	-	-	-	-	
	0,5	-	-	-	-	
Detergente alcalino clorado	0,05	-	-	-	-	Pesquisa de cloro, hipoclorito e Neutralizantes métodos A e B
	0,1	-	-	-	-	
	0,5	-	-	-	-	
Hidróxido de sódio	0,01	-	-	-	-	Pesquisa de neutralizantes métodos A e B
	0,025	+	-	-	-	
	0,05	+	-	-	-	

Concentração; ² Conforme a Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006)

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 2 –Efeito inibidor do crescimento de aeróbios mesófilos nas contagens médias (n=3) promovido por substâncias conservantes e neutralizantes em leite cru, realizadas com 24 e 48 horas de refrigeração.

Tratamento	Conc. %	T ₂₄ (log UFC/mL)	Red. %**	T ₄₈ (log UFC/mL)	Red. %**
Controle negativo	-	7,19 ^a	-	7,67 ^a	-
Formaldeído	0,05%	4,12 ^b	42,74	3,94 ^b	48,56
Peróxido de hidrogênio	0,1%	6,18 ^c	13,97	7,27 ^c	5,19
Hipoclorito de sódio	0,5%	5,84 ^c	18,69	7,01 ^c	8,57
Solução de Cloro	0,5%	7,09 ^a	1,40	7,74 ^a	-0,94
Detergente alcalino clorado	0,5%	6,95 ^a	3,33	7,62 ^a	0,62
Hidróxido de sódio	0,1%	7,11 ^a	1,06	7,23 ^c	5,75

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste T ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaboração do autor

Na avaliação da persistência dos resíduos de formaldeído durante a refrigeração, sua presença foi detectada após 48 horas na concentração de 0,05% (Tabela 3). A adição de concentrações de 0,05; 0,1 e 0,5% de formaldeído promoveram aumento significativo ($p < 0,05$) na acidez Dornic, de 17°D no controle negativo, para respectivamente 20°D, 21°D e 28°D.

Tabela 3 –Detecção de conservantes e neutralizantes no leite cru avaliada em três períodos, logo após adição ao leite (T₀), após 24 horas (T₂₄) e após 48 horas (T₄₈) de refrigeração.

Substância avaliada	C ¹ (%)	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	Método de detecção ²
Formaldeído	0,05%	+	+	+	Pesquisa de formaldeído
Peróxido de hidrogênio	0,1%	+	-	-	Pesquisa de peróxido de hidrogênio método B
Hipoclorito de sódio	0,5%	+	+	-	Pesquisa de cloro e hipoclorito
Solução de Cloro	0,5%	-	-	-	Pesquisa de cloro e hipoclorito
Detergente alcalino clorado	0,5%	-	-	-	Pesquisa de cloro, hipoclorito e neutralizantes métodos A e B
Hidróxido de sódio	0,1%	+	+	+	Pesquisa de neutralizantes métodos A e B

Concentração; Conforme descrito na Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006)

Fonte: Elaboração do autor

A detecção da adição fraudulenta de formaldeído é de extrema importância, visto que se trata de uma substância carcinogênica mesmo em baixas concentrações, implicando em alto risco à saúde do consumidor (NCI, 2011). A inclusão de formaldeído em fórmulas de produtos saneantes foi proibida pela legislação (ANVISA, 2008), reduzindo assim a possibilidade de ocorrência dessa fraude.

Quanto à pesquisa de peróxido de hidrogênio, a concentração de 0,05%, compatível com as quantidades utilizadas na conservação do leite (ANVISA, 2007; SAHA et al., 2003), não foi detectada por nenhuma das provas estudadas. Além disso, a pesquisa de peróxido de hidrogênio, nesse estudo, foi realizada num intervalo máximo de 30 minutos após a adição ao leite. Na avaliação da persistência desses resíduos no leite durante a refrigeração (Tabela 3), a concentração de 0,1% não foi detectada após 24 horas de refrigeração.

Isso indica que o peróxido de hidrogênio é degradado rapidamente após promover a eliminação de micro-organismos. Deste modo, essa fraude dificilmente será detectada pela indústria ou pela fiscalização e, caso seja detectada, pode significar que as quantidades adicionadas ao leite foram muito altas. O peróxido de hidrogênio é considerado adequado para utilização em alimentos pois resulta em resíduos inócuos: água e oxigênio. No entanto, em concentrações superiores à 3% pode causar efeitos adversos à saúde do

consumidor (ANVISA, 2007) e, no Brasil, sua adição não é permitida no leite (BRASIL, 2011).

Resíduos de cloro e detergente alcalino clorado não foram detectados pelas provas específicas nem pelas provas que avaliam a inibição do crescimento microbiano (Tabela 1). Os resultados concordam com os resultados obtidos para as contagens de aeróbios mesófilos no leite cru, que também não sofreram influência da adição dessas substâncias ($p > 0,05$) (Tabela 2) e, além disso, podem estar relacionados à maior tolerância que as culturas de iogurte apresentam frente aos compostos clorados, quando comparados com outras substâncias desinfetantes (TAMIME, 2002).

Apesar de serem classificados como agentes com amplo espectro de atividade antimicrobiana, os compostos clorados são bastante suscetíveis à inativação pela matéria orgânica (CORDS: DYCHDALA; RICHTER, 2001), o que ocorre quando entram em contato ou são deliberadamente adicionados ao leite. Essa característica pode explicar a dificuldade na sua detecção pelo método específico estudado, que identifica a formação do iodo livre a partir do iodeto de potássio, pela ação do cloro livre ou hipoclorito (BRASIL, 2006).

O hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% detectada pela prova específica (BRASIL, 2006) e pela prova da cultura de iogurte (Tabela 1), permaneceu no leite e pôde ser detectado após 24 horas da sua adição, mas não depois de 48 horas (Tabela 3). A mesma concentração foi capaz de promover reduções significativas ($p < 0,05$) nas contagens de microorganismos aeróbios mesófilos no leite cru (Tabela 2).

A adição de cloro e hipoclorito ao leite pode ser considerada uma fraude comum, já que devido ao seu baixo custo e amplo espectro de ação são frequentemente empregados na higienização de equipamentos de ordenha e laticínios (CORDS: DYCHDALA; RICHTER, 2001; TRONCO, 2008). Sua adição intencional ao leite pode representar risco à saúde do consumidor (EPA, 2000).

A adição de hidróxido de sódio nas concentrações de 0,01; 0,025 e 0,05% alterou ($p < 0,05$) as médias obtidas para acidez Dornic de 17°D no controle negativo para 16°D, 13°D e 10°D, respectivamente. Concentrações de 0,025 e de 0,05% de hidróxido de sódio também resultaram em alizarol alcalino.

Contudo, a presença de hidróxido de sódio somente foi confirmada pelas provas específicas para a pesquisa de neutralizantes, métodos A e B (BRASIL, 2006), a partir de 0,1%, concentrações maiores que aquelas relatadas em fraudes, próximas à 0,02% (ANVISA, 2007). Essa concentração foi detectada após 48 horas de refrigeração, indicando

sua persistência no leite (Tabela 3), embora não tenha causado alteração significativa nas contagens de aeróbios mesófilos nas 24 após sua adição e apenas pequena redução nas contagens tenha sido observada após 48 horas (Tabela 2).

No entanto, o objetivo da fraude por adição de hidróxido de sódio ao leite não é o de reduzir a contaminação microbiana, mas mascarar seus efeitos no aumento da acidez Dornic (TRONCO, 2008). O método de determinação da acidez Dornic no leite não detecta a concentração real de ácido láctico, e sim a acidez titulável, que pode ser adulterada pela adição neutralizantes de acidez como o hidróxido de sódio e o bicarbonato de sódio, princípio empregado nessas fraudes (MILAGRES, 2008).

Na prova da cultura de iogurte concentrações de 0,025 e de 0,05% de hidróxido de sódio foram detectadas, porém o resultado observado não foi necessariamente devido à inibição microbiana, podendo ter sido causado pelo aumento do pH, observado na prova de acidez Dornic, determinante na coloração final da prova e também observado no alizarol. De qualquer forma, os testes indicariam que a amostra apresenta uma alteração.

A presença de detergente alcalino clorado não foi detectada por nenhuma das provas estudadas ou para pesquisa de neutralizantes pelos métodos A e B.

Peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, cloro e detergente alcalino clorado não apresentaram qualquer alteração na acidez Dornic ($p > 0,05$). Em todas as concentrações de conservantes e neutralizantes estudadas o leite permaneceu estável ao alizarol 72% v/v. A única alteração observada nessa prova foi a alcalinização promovida pelo hidróxido de sódio.

O Kit Charm® CowSide II Test, recomendado para a detecção de antibióticos em leite, detectou apenas a adição de formaldeído, o que demonstra que esta prova não sofre interferência das demais substâncias avaliadas por este estudo.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos na prova para a pesquisa de neutralizantes da acidez após a adição experimental de hidróxido de sódio em diferentes concentrações e após a neutralização do hidróxido de sódio com ácido láctico.

Tabela 4 –Interferência da acidificação experimental do leite por ácido láctico após a adição de hidróxido de sódio na sensibilidade analítica da prova para a pesquisa de neutralizantes¹ e alterações na acidez Dornic, alizarol 72% e pH.

NaOH (%)	Ácido Láctico (mL)	Pesquisa de neutralizantes	pH	Acidez Dornic	Alizarol 72%
0	0	-	6,78	16	estável
0,05	0	-	7,83	5	estável/ alcalino
0,10	0	+	9,84	SL	estável/ alcalino
0,25	0	+	11,65	SL	estável/ alcalino
0,50	0	+	12,52	SL	estável/ alcalino
1,00	0	+	13,25	SL	estável/ alcalino
0	0	-	6,81	16	estável
0,05	0,10	-	7,32	11,67	estável/ alcalino
0,10	0,20	-	7,51	9,67	estável/ alcalino
0,25	0,83	-	7,22	15,00	estável
0,50	1,20	-	7,24	16,33	instável/ alcalino
1,00	3,00	-	6,75	27,67	instável/ ácido

SL - sem leitura, leite apresentou coloração rósea persistente apenas com a adição de fenolftaleína; ¹Pesquisa de neutralizantes da acidez pelo método B da fenolftaleína, conforme descrito pela Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006).

Fonte: Elaboração do autor

A acidificação experimental do leite, posterior à adição de hidróxido de sódio impossibilitou a detecção deste neutralizante pelo método descrito pela legislação para sua pesquisa (BRASIL, 2006). A menor concentração de hidróxido de sódio detectada antes da acidificação foi 0,1% (Tabela 4). Após a acidificação com ácido láctico, o hidróxido de sódio não pôde ser detectado em nenhuma das concentrações avaliadas, demonstrando que quando neutralizado pelo ácido láctico, o hidróxido de sódio não é detectado. Os resultados obtidos na prova do alizarol e na acidez Dornic, por outro lado, foram bons indicativos dessa adulteração.

5.6 CONCLUSÕES

As provas específicas para a pesquisa de conservantes detectaram a presença de formaldeído, peróxido de hidrogênio e hipoclorito. No entanto, após 24 horas de sua adição não se detectou hipoclorito ou peróxido. A prova para a pesquisa de neutralizantes detectou a presença de hidróxido de sódio, inclusive após 48 horas. No entanto, a acidificação do leite impede sua detecção.

As provas inespecíficas de inibição do crescimento microbiano detectaram a presença de formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, sendo que a prova da cultura do iogurte apresentou resultados semelhantes aos das provas específicas.

Reduções significativas nas contagens de aeróbios mesófilos no leite cru foram observadas após a adição de formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio. O hidróxido de sódio reduziu significativamente as contagens apenas após 48 horas da sua adição.

Embora a prova para a pesquisa de peróxido de hidrogênio seja capaz de identificar a adição dessa substância, sua detecção em amostras de leite pela indústria ou órgãos fiscalizadores é pouco provável devido à rápida degradação observada para essa substância.

A adição de solução de cloro e detergente alcalino clorado não foi detectada por nenhuma das provas avaliadas.

5.7 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 35, de 3 de junho de 2008. Dispõe sobre conservantes permitidos para produtos saneantes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, nº 105, 4 jun. 2008.

_____. **Informe Técnico nº 34**, de 31 de outubro de 2007. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/REL>>. Acesso em: 1 dez. 2012.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13. ed., São Paulo: Editora Noel, 1999. pg

BELOTI, V.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C. Impacto da implantação de boas práticas de higiene na ordenha sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, n.388, p. 05-10, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 166, de 5 de maio de 1998. Criar Grupo de Trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade e a modernização do setor produtivo de leite e derivados no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, 6 maio 1998.

_____. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 13. 21 set. 2002.

_____. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Estabelece os Métodos analíticos físico-químicos oficiais para leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 239, p.8, 14 dez. 2006.

_____. Instrução Normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p.6, 30 dez. 2011.

CHARM SCIECES. **Operator's Manual: Charm® CowSide II Test for Beta-lactams and other antimicrobial drugs in milk**. Massachusetts: Charm Sciences Inc., 2011.

CORDS, B. R.; DYCHDALA, G. R.; RICHTER F. L. Cleaning and Sanitizing in Milk Production and Processing. In: **Applied dairy microbiology**. MARTH, E. H.; STEELE, J. L. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001, p. 547-587.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Chlorine:Hazard Summary**. 2000. Disponível em: Acesso em: 4 dez. 2012.

FIRMINO, F. C.; TALMA, S. V.; MARTINS, M. L.; LEITE, M. O.; MARTINS, A. D. O. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n.376, p. 5-11, set. out., 2010.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; GONÇALVES, T. M.; SOUZA, J. J. F.; SILVA A. H. I.; OLIVEIRA, H. B.; BEZERRA, J. D. C. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns -PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 03, n. 02, p. 38-46, 2009.

G1. **Depoimentos revelam como funcionava fraude do leite**. 2007. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL161409-5598,00.html>>. Acesso em: 29 nov. 2012.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, out./dez. 2008.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 173-182, jan./mar. 2010.

MILAGRES, M.P. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão de íons**. 2008. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2008.

NCI. National Cancer Institute. United States Of America. **Formaldehyde and Cancer Risk**. 2011. Disponível em:

<<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/formaldehyde#r2>>. Acesso em: 4 dez. 2012.

ROSA, L. S.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p.422-430, 2007.

ROSA-CAMPOS, A. A., ROCHA, J. E. S.; BORGIO, L. A.; MENDONÇA, M. A. Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 379, v.66, p.30:34, 2011.

SAHA, B. K.; ALI, M. Y.; CHAKRABORTY, M.; ISLAM, Z.; HIRA, A. K. Study on the preservation of raw milk with hydrogen peroxide (H₂O₂) for rural dairy farmers. **Pakistan Journal of Nutrition**, n.2, v.1, p.36-42, 2003.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T., PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267- 276, jan./mar. 2011.

SOUSA, F.; SILVA, L.; SOUSA, E.; SILVA, J.; FEITOSA, M. Análises físico-químicas e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado tipo C. **Caderno Verde De Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável**, v.1, n.1, 2011.

SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; CELEGHINI, R. M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANTANA, A. S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, v.124, p.692-695, 2011.

SPIGLIATTI, S. **PF prende 25 por fraude em leite longa vida**. 2007. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/geral,pf-prende-25-por-fraude-em-leite-longa-vida,68731,0.htm>>. Acesso em: 29 nov. 2012.

TAMINE, A. Y. Microbiology of starter cultures. In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products**. New York: Wiley Interscience, 3.ed.,p. 261-366, 2002.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206p.

6 CONCLUSÕES

A maioria das amostras de leite pasteurizado produzido no Paraná apresentou irregularidades como adição de água, desnate, presença de reconstituintes da densidade e resíduos de antibióticos. A maioria das amostras apresentou qualidade microbiológica satisfatória.

As provas determinadas pela Instrução Normativa 62, de 2011, para o controle de qualidade do leite pasteurizado são insuficientes para atestar sua integridade e qualidade, uma vez que a avaliação do leite apenas por meio das análises físico-químicas e microbiológicas de rotina, não é suficiente para identificar fraudes por adição de água, reconstituintes, conservantes e neutralizantes.

As provas para a pesquisa específica de reconstituintes apresentam boa sensibilidade analítica, bem como a prova para pesquisa de formaldeído, embora a dificuldade para realização da última inviabilize sua realização na rotina industrial. Entretanto, a detecção de peróxido de hidrogênio e de compostos clorados pode ser prejudicada pela rápida degradação e /ou inativação dessas substâncias no leite, tornando difícil sua identificação pela indústria e por órgãos fiscalizadores.

A pesquisa de neutralizantes da acidez só indica a sua presença se, após a neutralização do ácido láctico, ainda restar substância alcalina livre. A neutralização equilibrada anula sua capacidade de detecção.

A legislação deveria considerar a possibilidade de adulterações do leite promovidas pela indústria e introduzir a obrigatoriedade da pesquisa de substâncias adulterantes principalmente as que oferecem risco à saúde também para o leite pasteurizado no comércio.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Resultados obtidos para cada uma das 100 amostras de leite pasteurizado avaliadas no artigo 1

Tabela 1 –Perfil enzimático, contagem padrão em placas (CPP), contagem de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC), lactofermentação (LF) e pesquisa de antibióticos (ATB) em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	Peroxidase ¹	Fosfatase ¹	CPP ² (UFC/mL)	CT ³ (UFC/mL)	EC ³ (UFC/mL)	ATB ⁴	LF
1	positiva	negativa	3.150	0	0	-	digerido
2	positiva	negativa	1.670	0	0	+	gelatinoso
3	positiva	negativa	86.500	1	0	+	digerido
4	positiva	negativa	670	0	0	-	gelatinoso
5	positiva	negativa	3.300	0	0	-	gelatinoso
6	positiva	negativa	22.400	0	0	-	líquido
7	positiva	negativa	2.290	0	0	+	digerido
8	positiva	negativa	2.110	0	0	-	digerido
9	positiva	negativa	14.800	0	0	+	gelatinoso
10	positiva	negativa	14.100	4	0	+	digerido
11	positiva	negativa	10.000	0	0	-	digerido
12	positiva	negativa	25.500	0	0	-	gelatinoso
13	positiva	negativa	25.000	3	0	-	gelatinoso
14	positiva	negativa	5.450	0	0	-	digerido
15	positiva	negativa	5.550	0	0	-	digerido
16	positiva	negativa	10.300	2	0	-	digerido
17	positiva	negativa	2.230	0	0	+	digerido
18	positiva	negativa	4.200	3	0	+	digerido
19	positiva	negativa	7.200	0	0	+	digerido
20	positiva	negativa	340	0	0	-	líquido
21	positiva	negativa	4.400	0	0	-	digerido
22	positiva	negativa	5.300	0	0	-	líquido
23	positiva	negativa	4.250	0	0	-	gelatinoso
24	positiva	negativa	24.500	7	0	-	digerido
25	positiva	negativa	5.850	0	0	-	digerido
26	positiva	negativa	5.900	0	0	+	digerido
27	positiva	negativa	2.600	0	0	-	digerido
28	positiva	negativa	2.650	0	0	+	digerido
29	positiva	negativa	5.300	0	0	-	digerido
30	positiva	negativa	26.300	0	0	+	digerido

1 Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006); ² Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003); ³ Petrifilm™ EC (3M, St. Paul, MN, EUA); ⁴ kit CowSide II test (Charm Sciences Inc)

Continuação:

Tabela 1 –Perfil enzimático, contagem padrão em placas (CPP), contagem de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC), lactofermentação (LF) e pesquisa de antibióticos em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	Peroxidase	Fosfatase	CPP (UFC/mL)	CT (UFC/mL)	EC (UFC/mL)	ATB	LF
31	negativa	negativa	6.000	0	0	+	digerido
32	positiva	negativa	32.000	3	0	-	digerido
33	positiva	negativa	27.900	0	0	-	digerido
34	positiva	negativa	6.100	0	0	-	digerido
35	positiva	negativa	430	0	0	-	digerido
36	positiva	negativa	1.120	0	0	-	digerido
37	positiva	negativa	2.650	0	0	-	digerido
38	positiva	negativa	2.740	0	0	-	gelatinoso
39	positiva	negativa	15.750	0	0	-	digerido
40	positiva	negativa	4.850	0	0	-	digerido
41	positiva	negativa	8.050	0	0	-	digerido
42	positiva	negativa	6.000	0	0	-	digerido
43	positiva	negativa	11.150	22	0	-	digerido
44	positiva	negativa	3.200	0	0	-	liquido
45	positiva	negativa	4.800	12	0	-	digerido
46	positiva	negativa	72.000	49	10	-	digerido
47	positiva	negativa	11.500	0	0	-	digerido
48	positiva	negativa	3.000	0	0	-	liquido
49	positiva	negativa	5.000	0	0	-	esponjoso
50	positiva	negativa	1.500	0	0	-	gelatinoso
51	positiva	negativa	4.200	1	0	-	liquido
52	positiva	negativa	5.100	0	0	-	digerido
53	positiva	negativa	300	1	0	-	digerido
54	positiva	negativa	920	0	0	-	digerido
55	positiva	negativa	3.700	0	0	-	digerido
56	positiva	negativa	7.800	0	0	-	digerido
57	positiva	negativa	70.300	3	0	-	digerido
58	positiva	negativa	40.000	11	0	-	digerido
59	positiva	negativa	16.650	0	0	+	digerido

1 Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006); ² Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003); ³ Petrifilm™ EC (3M, St. Paul, MN, EUA); ⁴ kit CowSide II test (Charm Sciences Inc)

Continuação:

Tabela 1 –Perfil enzimático, contagem padrão em placas (CPP), contagem de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC), lactofermentação (LF) e pesquisa de antibióticos em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	Peroxidase	Fosfatase	CPP (UFC/mL)	CT (UFC/mL)	EC (UFC/mL)	ATB	LF
60	positiva	negativa	8.600	1	0	-	digerido
61	positiva	negativa	7.700	22	0	-	esponjoso
62	positiva	negativa	41.500	1	0	-	digerido
63	positiva	negativa	>250.000	0	0	-	digerido
64	positiva	negativa	2.500	2	0	-	digerido
65	positiva	negativa	2.900	0	0	-	gelatinoso
66	positiva	negativa	165.000	338	41	+	digerido
67	positiva	negativa	3.000	0	0	-	digerido
68	positiva	negativa	9.150	0	0	-	digerido
69	positiva	negativa	6.800	0	0	-	digerido
70	positiva	negativa	3.150	0	0	-	digerido
71	positiva	negativa	8.900	0	0	-	digerido
72	positiva	negativa	18.900	0	0	-	gelatinoso
73	positiva	negativa	5.500	4	0	-	esponjoso
74	positiva	negativa	5800	0	0	-	digerido
75	positiva	negativa	5.450	0	0	-	digerido
76	positiva	negativa	23.300	4	0	-	liquido
77	positiva	negativa	29.400	0	0	-	digerido
78	positiva	negativa	230	0	0	-	digerido
79	positiva	negativa	8.500	0	0	-	gelatinoso
80	positiva	negativa	2.800	61	0	-	digerido
81	positiva	negativa	350	0	0	-	digerido
82	positiva	negativa	1.300	1	0	-	digerido
83	positiva	negativa	6.750	0	0	-	esponjoso
84	positiva	negativa	1.280	0	0	-	liquido
85	positiva	negativa	8.250	0	0	-	digerido
86	positiva	negativa	4.150	0	0	-	liquido
87	positiva	negativa	52.500	1	0	-	gelatinoso
88	positiva	negativa	635	0	0	-	digerido
89	positiva	negativa	22.100	4	0	-	digerido
90	positiva	negativa	7.850	0	0	-	liquido
91	positiva	negativa	3.300	1	0	-	digerido
92	positiva	negativa	4.150	0	0	-	digerido
93	positiva	negativa	18.700	61	3	-	esponjoso
94	positiva	negativa	2.370	0	0	-	digerido
95	positiva	negativa	11.900	0	0	-	digerido
96	positiva	negativa	21.350	3	0	-	digerido
97	positiva	negativa	6.700	0	0	-	digerido
98	positiva	negativa	13.600	1	0	-	digerido
99	positiva	negativa	18.200	0	0	-	esponjoso
100	positiva	negativa	51.500	0	0	-	digerido

1 Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006); ² Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003); ³ Petrifilm™ EC (3M, St. Paul, MN, EUA); ⁴ kit CowSide II test (Charm Sciences Inc)

Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas realizadas em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	pH	Acidez Dornic (°D)	Alizarol 72%	Crioscopia	Densidade	Gordura	Sólidos Totais	Sólidos Não Gordurosos
1	6,61	18	Instável	-0,541	1,032	2,9	11,6	8,7
2	6,66	17	estável	-0,540	1,031	3,5	12,1	8,6
3	6,50	17	estável	-0,541	1,030	4,1	12,7	8,6
4	6,60	18	estável	-0,536	1,031	3,5	12,2	8,7
5	6,64	16	estável	-0,537	1,031	2,9	11,4	8,5
6	6,71	16	estável	-0,538	1,031	3,9	12,6	8,7
7	6,61	17	estável	-0,538	1,030	3,5	12,0	8,5
8	6,62	17	estável	-0,538	1,031	3,6	12,3	8,7
9	6,68	16	Instável	-0,524	1,030	3,4	11,7	8,3
10	6,78	15	estável	-0,528	1,030	3,1	11,4	8,3
11	6,78	16	Instável	-0,537	1,030	3,5	12,0	8,5
12	6,86	17	estável	-0,541	1,031	3,0	11,5	8,5
13	6,54	18	estável	-0,541	1,030	3,9	12,5	8,6
14	6,54	18	estável	-0,536	1,032	3,2	12,0	8,8
15	6,81	16	estável	-0,534	1,031	3,7	12,5	8,8
16	6,70	18	estável	-0,536	1,032	3,3	12,1	8,8
17	6,77	17	estável	-0,538	1,031	3,1	11,8	8,7
18	6,84	17	estável	-0,539	1,031	3,4	12,0	8,6
19	6,70	16	Instável	-0,534	1,030	3,7	12,3	8,6
20	6,69	17	estável	-0,535	1,031	3,2	11,9	8,7
21	6,85	15	estável	-0,538	1,031	3,1	11,8	8,7
22	6,77	14	estável	-0,536	1,030	3,2	11,7	8,5
23	6,81	17	estável	-0,534	1,030	3,1	11,6	8,5
24	6,67	16	estável	-0,540	1,031	3,5	12,1	8,6
25	6,90	16	estável	-0,538	1,031	3,3	11,9	8,6
26	6,93	16	Instável	-0,541	1,030	3,6	12,1	8,5
27	6,97	17	Instável	-0,539	1,031	2,5	11,1	8,6
28	6,89	16	estável	-0,539	1,030	3,2	11,7	8,5
29	6,84	17	estável	-0,538	1,031	3,1	11,6	8,5
30	6,80	16	estável	-0,536	1,031	3,2	11,8	8,6
31	6,86	17	estável	-0,538	1,031	3,1	11,7	8,6
32	6,80	17	estável	-0,540	1,030	3,5	11,9	8,4
33	6,80	17	estável	-0,541	1,031	3,4	12,0	8,6
34	6,70	17	estável	-0,542	1,030	3,5	11,9	8,4
35	6,73	18	estável	-0,530	1,031	2,2	10,7	8,5
36	6,85	18	estável	-0,535	1,030	3,2	11,6	8,4
37	6,78	17	estável	-0,536	1,029	3,1	11,3	8,2
38	6,68	18	estável	-0,539	1,030	3,0	11,5	8,5
39	6,64	16	estável	-0,539	1,031	3,4	12,0	8,6
40	6,71	17	estável	-0,545	1,031	4,0	12,8	8,8
41	6,71	16	estável	-0,524	1,030	3,4	11,7	8,3
42	6,64	17	estável	-0,538	1,031	3,0	11,6	8,6
43	6,48	16	estável	-0,534	1,029	3,5	11,7	8,2
44	6,70	18	estável	-0,538	1,031	3,0	11,6	8,6
45	6,70	16	estável	-0,534	1,031	3,5	12,2	8,7
46	6,72	19	estável	-0,536	1,030	3,1	11,6	8,5
47	6,77	17	estável	-0,536	1,030	3,7	12,2	8,5
48	6,63	16	estável	-0,542	1,028	3,8	11,9	8,1
49	6,80	17	estável	-0,539	1,030	3,5	11,9	8,4
50	6,75	17	estável	-0,540	1,030	3,0	11,4	8,4

Continuação:

Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas realizadas em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	pH	Acidez Dornic (°D)	Alizarol 72%	Crioscopia	Densidade	Gordura	Sólidos Totais	Sólidos Não Gordurosos
51	6,77	16	estável	-0,539	1,031	2,9	11,4	8,5
52	6,73	17	estável	-0,536	1,031	3,1	11,6	8,5
53	6,88	14	Estável alcalino	-0,536	1,030	3,5	12,1	8,6
54	6,85	16	estável	-0,536	1,030	3,6	12,0	8,4
55	6,63	17	estável	-0,534	1,031	3,5	12,2	8,7
56	6,60	17	estável	-0,534	1,030	3,5	12,0	8,5
57	6,60	16	estável	-0,529	1,031	3,7	12,5	8,8
58	6,65	17	estável	-0,534	1,030	3,6	12,0	8,4
59	6,63	16	estável	-0,540	1,030	3,4	11,8	8,4
60	6,70	16	estável	-0,538	1,030	3,8	12,4	8,6
61	6,64	16	estável	-0,532	1,031	3,2	11,9	8,7
62	6,78	16	estável	-0,538	1,031	3,0	11,6	8,6
63	6,66	15	estável	-0,524	1,029	3,0	11,2	8,2
64	6,70	15	estável	-0,531	1,030	3,1	11,6	8,5
65	6,75	17	estável	-0,539	1,030	3,0	11,4	8,4
66	6,64	16	estável	-0,535	1,030	3,1	11,4	8,3
67	6,66	17	estável	-0,543	1,031	3,4	12,0	8,6
68	6,73	17	estável	-0,538	1,030	3,3	11,7	8,4
69	6,74	15	estável	-0,541	1,031	3,3	11,9	8,6
70	6,75	18	Instável	-0,538	1,031	3,1	11,6	8,5
71	6,52	16	estável	-0,533	1,030	3,6	12,1	8,5
72	6,76	18	estável	-0,541	1,031	3,1	11,8	8,7
73	6,70	18	estável	-0,540	1,031	4,2	13,1	8,9
74	6,73	17	estável	-0,539	1,030	3,8	12,3	8,5
75	6,65	16	estável	-0,537	1,030	3,2	11,6	8,4
76	6,61	17	estável	-0,540	1,031	2,3	10,8	8,5
77	6,74	17	estável	-0,532	1,031	3,3	11,9	8,6
78	6,64	17	estável	-0,534	1,032	3,5	12,5	9,0
79	6,61	17	estável	-0,534	1,032	3,0	11,8	8,8
80	6,84	17	estável	-0,538	1,031	3,2	12,0	8,8
81	6,70	16	estável	-0,536	1,029	3,5	11,7	8,2
82	6,63	17	estável	-0,540	1,031	3,3	12,1	8,8
83	6,65	17	estável	-0,533	1,031	3,3	12,0	8,7
84	6,81	16	estável	-0,541	1,031	3,2	11,8	8,6
85	6,52	17	estável	-0,535	1,031	3,8	12,5	8,7
86	6,91	17	estável	-0,538	1,032	3,6	12,5	8,9
87	6,58	18	estável	-0,541	1,031	2,9	11,6	8,7
88	6,71	17	estável	-0,541	1,031	3,1	11,8	8,7
89	6,74	16	estável	-0,540	1,030	3,3	11,8	8,5
90	6,71	17	estável	-0,543	1,031	3,3	12,0	8,7
91	6,70	17	estável	-0,541	1,031	3,6	12,3	8,7
92	6,75	17	estável	-0,537	1,030	3,3	11,7	8,4
93	6,66	17	estável	-0,540	1,030	3,0	11,4	8,4
94	6,67	16	estável	-0,543	1,030	3,3	11,7	8,4
95	6,61	17	estável	-0,538	1,030	2,9	11,2	8,3
96	6,65	16	estável	-0,533	1,030	3,1	11,4	8,3
97	6,67	17	estável	-0,546	1,031	3,5	12,2	8,7
98	6,69	17	estável	-0,542	1,031	3,3	12,0	8,7
99	6,65	17	estável	-0,530	1,031	3,1	11,7	8,6
100	6,80	16	estável	-0,535	1,030	3,8	12,2	8,4

Tabela 3 – Resultados da pesquisa de reconstituintes, crioscopia e densidade em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	Crioscopia	Densidade	Amido	Sacarose	Cloretos	Álcool etílico
1	-0,541	1,032	-	-	-	-
2	-0,540	1,031	-	-	-	-
3	-0,541	1,030	-	-	-	-
4	-0,536	1,031	-	-	-	+
5	-0,537	1,031	-	+	-	-
6	-0,538	1,031	-	-	-	-
7	-0,538	1,030	-	-	-	-
8	-0,538	1,031	-	-	-	-
9	-0,524	1,030	-	+	-	-
10	-0,528	1,030	-	-	-	-
11	-0,537	1,030	-	-	-	-
12	-0,541	1,031	-	+	-	-
13	-0,541	1,030	-	+	-	-
14	-0,536	1,032	-	-	-	-
15	-0,534	1,031	-	-	-	-
16	-0,536	1,032	-	-	-	-
17	-0,538	1,031	-	-	-	-
18	-0,539	1,031	-	-	-	-
19	-0,534	1,030	-	-	-	-
20	-0,535	1,031	-	+	-	-
21	-0,538	1,031	-	-	-	-
22	-0,536	1,030	-	-	-	-
23	-0,534	1,030	-	-	-	-
24	-0,540	1,031	-	-	-	-
25	-0,538	1,031	-	-	-	-
26	-0,541	1,030	-	-	-	-
27	-0,539	1,031	-	-	-	-
28	-0,539	1,030	-	-	-	-
29	-0,538	1,031	-	-	-	-
30	-0,536	1,031	-	-	-	-
31	-0,538	1,031	-	+	-	-
32	-0,540	1,030	-	-	-	-
33	-0,541	1,031	-	-	-	-
34	-0,542	1,030	-	+	-	-
35	-0,530	1,031	-	-	-	-

Continuação:

Tabela 3 – Resultados da pesquisa de reconstituintes, crioscopia e densidade em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	Crioscopia	Densidade	Amido	Sacarose	Cloretos	Alcool etílico
36	-0,535	1,030	-	-	-	-
37	-0,536	1,029	-	-	-	-
38	-0,539	1,030	-	-	-	-
39	-0,539	1,031	-	-	-	-
40	-0,545	1,031	-	-	-	-
41	-0,524	1,030	-	-	-	-
42	-0,538	1,031	-	-	-	-
43	-0,534	1,029	-	-	-	-
44	-0,538	1,031	-	-	-	-
45	-0,534	1,031	-	-	-	-
46	-0,536	1,030	-	-	-	-
47	-0,536	1,030	-	-	-	-
48	-0,542	1,028	-	-	-	-
49	-0,539	1,030	-	-	-	-
50	-0,540	1,030	-	-	-	-
51	-0,539	1,031	-	-	-	-
52	-0,536	1,031	-	-	-	-
53	-0,536	1,030	-	-	-	-
54	-0,536	1,030	-	-	-	-
55	-0,534	1,031	-	-	-	-
56	-0,534	1,030	-	-	-	-
57	-0,529	1,031	-	-	-	-
58	-0,534	1,030	-	-	-	-
59	-0,540	1,030	-	-	-	-
60	-0,538	1,030	-	-	-	-
61	-0,532	1,031	-	-	-	-
62	-0,538	1,031	-	-	-	-
63	-0,524	1,029	-	-	-	-
64	-0,531	1,030	-	-	-	-
65	-0,539	1,030	-	-	-	-
66	-0,535	1,030	-	-	-	-
67	-0,543	1,031	-	-	-	-
68	-0,538	1,030	-	-	-	-
69	-0,541	1,031	-	-	-	-
70	-0,538	1,031	-	-	-	-

Continuação:

Tabela 3 – Resultados da pesquisa de reconstituintes, crioscopia e densidade em 100 amostras de leite pasteurizado integral produzidas no Paraná entre outubro e novembro de 2012.

No.	Crioscopia	Densidade	Amido	Sacarose	Cloretos	Alcool etílico
71	-0,533	1,030	-	+	-	-
72	-0,541	1,031	-	-	-	-
73	-0,540	1,031	-	-	-	-
74	-0,539	1,030	-	-	-	-
75	-0,537	1,030	-	-	-	-
76	-0,540	1,031	-	-	-	-
77	-0,532	1,031	-	+	-	-
78	-0,534	1,032	-	-	-	-
79	-0,534	1,032	-	-	-	-
80	-0,538	1,031	-	-	-	-
81	-0,536	1,029	-	-	-	-
82	-0,540	1,031	-	+	-	-
83	-0,533	1,031	-	-	-	-
84	-0,541	1,031	-	-	-	-
85	-0,535	1,031	-	-	-	-
86	-0,538	1,032	-	-	-	-
87	-0,541	1,031	-	-	-	-
88	-0,541	1,031	-	-	-	-
89	-0,540	1,030	-	+	-	-
90	-0,543	1,031	-	-	-	-
91	-0,541	1,031	-	+	-	-
92	-0,537	1,030	-	-	-	-
93	-0,540	1,030	-	-	-	-
94	-0,543	1,030	-	-	-	-
95	-0,538	1,030	-	-	-	-
96	-0,533	1,030	-	-	-	-
97	-0,546	1,031	-	-	-	-
98	-0,542	1,031	-	-	-	-
99	-0,530	1,031	-	-	-	-
100	-0,535	1,030	-	-	-	-

APÊNDICE B

Médias de resultados obtidos as amostras de leite pasteurizado adulterado em laboratório pela adição de substâncias reconstituintes (sal, açúcar, farinha de trigo e amido de milho), referentes ao artigo 2

Tabela 1 – Alterações médias (n=3) observadas na densidade (D), crioscopia (C), condutividade (Cd.) e acidez dornic do leite adicionado de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) comercial, com e sem adição de 5% de água e pesquisa de cloretos.

Água (%)	NaCl (%)	Pesquisa de cloretos	D (g/mL)	C (°H)	Cd. (mS/s)	Acidez (°D)
0	0	-	1,0322	-0,537	5,94	16,5
0	0,01	-	1,0323	-0,543	6,12	16,3
0	0,025	-	1,0331	-0,552	6,31	16,3
0	0,03	+	1,0325	-0,557	6,50	16,7
0	0,035	+	1,0325	-0,561	6,57	16,7
0	0,04	+	1,0329	-0,564	6,64	16,7
0	0,045	+	1,0329	-0,566	6,72	16,7
0	0,05	+	1,0331	-0,570	6,62	16,3
0	0,075	+	1,0331	-0,585	7,01	16,3
0	0,1	+	1,0334	-0,604	7,42	16,3
5	0	-	1,0301	-0,510	5,78	15,3
5	0,023*	-	1,0300	-0,523	6,20	15,0
5	0,027*	+	1,0307	-0,526	6,28	15,7
5	0,032*	+	1,0302	-0,529	6,42	15,7
5	0,036*	+	1,0302	-0,533	6,50	15,7
5	0,041*	+	1,0305	-0,535	6,57	15,7
5	0,045*	+	1,0303	-0,538	6,58	15,0
5	0,07*	+	1,0303	-0,555	6,92	15,0
5	0,09*	+	1,0306	-0,571	7,36	15,0

*Concentrações idênticas às adicionadas ao leite íntegro e recalculadas para a concentração final após adição de 5% de água.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 2 – Alterações médias (n=3) observadas na densidade (D), crioscopia (C), condutividade (Cd.) e acidez dornic do leite adicionado de diferentes concentrações de açúcar comercial, com e sem adição de 5% de água, pesquisa de sacarose (BRASIL, 1981) e influência da adição de açúcar na quantificação da lactose pelo método do Infravermelho (IV) e do Ultrassom (US).

Água (%)	Açúcar (%)	Pesquisa de sacarose	D (g/mL)	C (°H)	Cd. (mS/s)	Acidez (°D)	Lactose IV (%)	Lactose US (%)
0	0	-	1,0320	-0,538	5,84	16,2	4,44	4,38
0	0,05	+	1,0325	-0,543	5,80	16,3	4,55	4,39
0	0,10	+	1,0325	-0,546	5,80	16,3	4,58	4,41
0	0,15	+	1,0325	-0,550	5,82	16,3	4,62	4,42
0	0,20	+	1,0325	-0,553	5,78	16,3	4,59	4,44
0	0,25	+	1,0326	-0,552	5,94	15,7	4,67	4,53
0	0,50	+	1,0337	-0,570	5,89	16,0	4,85	4,70
0	0,75	+	1,0351	-0,586	5,89	16,0	5,04	4,74
0	1,00	+	1,0368	-0,603	5,86	16,3	5,23	4,91
5	0	-	1,0295	-0,509	5,77	15,3	4,31	4,16
5	0,07*	+	1,0304	-0,514	5,63	15,3	4,31	4,15
5	0,14*	+	1,0304	-0,518	5,66	15,3	4,36	4,16
5	0,21*	+	1,0307	-0,519	5,63	15,3	4,38	4,17
5	0,29*	+	1,0307	-0,522	5,64	15,3	4,37	4,21
5	0,36*	+	1,0304	-0,522	5,78	15,3	4,42	4,29
5	0,71*	+	1,0315	-0,537	5,75	15,3	4,60	4,41
5	1,07*	+	1,0321	-0,552	5,72	15,3	4,77	4,51
5	1,43*	+	1,0331	-0,565	5,62	15,0	4,98	4,61

*Concentrações idênticas às adicionadas ao leite íntegro e recalculadas para a concentração final após adição de 5% de água.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Alterações médias (n=3) observadas na densidade (D), crioscopia (C), condutividade (Cd) e acidez dornic do leite adicionado de diferentes concentrações de amido de milho e farinha de trigo comercial, com e sem adição de 5% de água e pesquisa de amido (BRASIL, 2006).

Água (%)	Amiláceo (%)	Prova Amido	Farinha de trigo			Amido de milho		
			Dens. g/mL	Criosc. °H	Acidez °D	Dens.	Criosc. °H	Acidez °D
0	0	-	1,0317	-0,535	16,0	1,0317	-0,537	16,7
0	0,01	+	1,0315	-0,534	15,0	1,0327	-0,534	15,7
0	0,025	+	1,0321	-0,534	15,0	1,0324	-0,535	15,3
0	0,05	+	1,0321	-0,533	15,3	1,0325	-0,535	15,7
0	0,075	+	1,0321	-0,534	15,3	1,0325	-0,535	15,7
0	0,10	+	1,0319	-0,534	16,0	1,0316	-0,537	16,0
0	0,50	+	1,0327	-0,535	16,7	1,0339	-0,536	16,0
0	1,00	+	1,0336	-0,537	16,7	1,0357	-0,537	15,7
0	2,50	+	1,0369	-0,540	16,3	1,0394	-0,538	16,7
5	0	-	1,0297	-0,507	15,2	1,0297	-0,508	14,7
5	0,009*	+	1,0293	-0,507	14,0	1,0295	-0,507	14,7
5	0,023*	+	1,0293	-0,506	14,0	1,0295	-0,507	14,3
5	0,045*	+	1,0293	-0,506	14,3	1,0296	-0,507	14,7
5	0,068*	+	1,0293	-0,506	14,3	1,0298	-0,507	14,7
5	0,09*	+	1,0294	-0,507	15,3	1,0305	-0,509	15,3
5	0,45*	+	1,0299	-0,514	15,7	1,0316	-0,510	15,3
5	0,91*	+	1,0308	-0,510	15,0	1,0332	-0,509	15,3
5	2,27*	+	1,0329	-0,513	15,3	1,0351	-0,510	15,7

*Concentrações idênticas às adicionadas ao leite íntegro e recalculadas para a concentração final após adição de 5% de água.

Fonte: Elaborada pelo autor.