

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE GOIÁS
CÂMPUS ITUMBIARA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

KAROLAYNE AMORIM SOUZA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS CONSERVANTES NA
CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DO LEITE E VERIFICAÇÃO DA
CAPACIDADE DE DETECÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM DE
ACORDO COM OS MÉTODOS QUALITATIVOS OFICIAIS DE ANÁLISE**

ITUMBIARA-GO

2021



INSTITUTO FEDERAL
Goiás

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAÇÃO NO REPOSITÓRIO DIGITAL DO IFG - ReDi IFG

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Digital (ReDi IFG), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IFG.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| ☐ Tese | ☐ Artigo Científico |
| ☐ Dissertação | ☐ Capítulo de Livro |
| ☐ Monografia – Especialização | ☐ Livro |
| ☒ TCC - Graduação | ☐ Trabalho Apresentado em Evento |
| ☐ Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Karolayne Amorim Souza

Matrícula: 20171040030061

Título do Trabalho: Avaliação da Ação de Substâncias Químicas Conservantes na Contagem Total de Bactérias do Leite e Verificação da Capacidade de Detecção em Diferentes Tempos de Estocagem de Acordo com os Métodos Qualitativos Oficiais de Análise

Autorização - Marque uma das opções

1. ☒ Autorizo disponibilizar meu trabalho no Repositório Digital do IFG (acesso aberto);
2. ☐ Autorizo disponibilizar meu trabalho no Repositório Digital do IFG somente após a data ____/____/____ (Embargo);
3. ☐ Não autorizo disponibilizar meu trabalho no Repositório Digital do IFG (acesso restrito).

Ao indicar a opção **2** ou **3**, marque a justificativa:

- ☐ O documento está sujeito a registro de patente.
☐ O documento pode vir a ser publicado como livro, capítulo de livro ou artigo.
☐ Outra justificativa: _____

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- i. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- ii. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- iii. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás.

Itumbiara-GO, 07/07/2021.

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

KAROLAYNE AMORIM SOUZA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS CONSERVANTES NA
CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DO LEITE E VERIFICAÇÃO DA
CAPACIDADE DE DETECÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM DE
ACORDO COM OS MÉTODOS QUALITATIVOS OFICIAIS DE ANÁLISE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca examinadora do Curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Itumbiara, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciado em Química.

Área de Concentração: Química de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Victorino Santos

Coorientadora: Dra. Simone Machado Goulart

**ITUMBIARA-GO
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S729a

Souza, Karolayne Amorim

Avaliação da ação de substâncias químicas conservantes na contagem total de bactérias do leite e verificação da capacidade de detecção em diferentes tempos de estocagem de acordo com os métodos qualitativos oficiais de análise. / Karolayne Amorim Souza. -- Itumbiara, 2021.

41 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Química) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Câmpus Itumbiara, 2021.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Victorino Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Simone Machado Goulart

1. Leite. 2. Laticínio. 3. Produtos químicos - Análise.

I. Título. II. Santos, João Paulo Victorino. III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás.

CDD 636.034

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
Biblioteca Maria Gabriela Pacheco Pardey / Câmpus Itumbiara
Bibliotecária: Rosiane Gonçalves de Lima CRB1/1684



INSTITUTO FEDERAL
Goiás

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
CÂMPUS ITUMBIARA

KAROLAYNE AMORIM SOUZA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS CONSERVANTES NA
CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DO LEITE E VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DE
DETECÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM DE ACORDO COM OS
MÉTODOS QUALITATIVOS OFICIAIS DE ANÁLISE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca examinadora do Curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás (IFG), Câmpus Itumbiara, como parte dos requisitos para a conclusão do Curso de Licenciatura em Química e obtenção do título de licenciado em Química.

Área de concentração: Química dos Alimentos.

Aprovada em 24 de junho de 2021.

(Assinado eletronicamente)

Prof. Dr. João Paulo Victorino Santos
Orientador - IFG – Câmpus Itumbiara

(Assinado eletronicamente)

Profa. Dra. Gláucia Aparecida Andrade Rezende
IFG - Câmpus Itumbiara

(Assinado eletronicamente)

Profa. Ma. Jennyfer Ribeiro de Moraes
IFG - Câmpus Itumbiara

ITUMBIARA - GO
2021

Documento assinado eletronicamente por:

- Jennyfer Ribeiro de Moraes, PROF ENS BAS TEC TECNOLÓGICO-SUBSTITUTO, em 05/07/2021 19:07:52.
- Gláucia Aparecida Andrade Rezende, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLÓGICO, em 05/07/2021 14:32:35.
- Joseo Paulo Victorino Santos, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLÓGICO, em 05/07/2021 13:44:57.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 03/07/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifg.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 178351

Código de Autenticação: 77dc7ce32d



Avenida Furnas, nº 55, Bairro Village Imperial, ITUMBIARA / GO, CEP 75524-010
(64) 2103-5622 (ramal: 5622)

Dedico este trabalho aos meus pais, que sem dúvida nenhuma são os grandes responsáveis por esta conquista. Sem eles nada seria possível e ao meu PET (Rabanada), que sempre se atentou em trazer mais leveza pra minha vida, seja com seu olhar amoroso ou com as travessuras que me faziam sorrir nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todos os momentos maravilhosos e por ter me mantido na trilha certa durante este projeto, com saúde e forças para chegar até o final.

Aos meus pais, Alequisandro e Nilva, pelo apoio, amor, carinho, dedicação e incentivo que serviram de alicerce para minhas realizações.

Aos meus irmãos, Geovanna e Lucas, por toda a paciência, amizade e atenção nos momentos que mais precisei.

A minha cachorra Rabanada, que sempre ouviu minhas lamentações, me deu carinho durante toda essa jornada, trouxe mais alegria para minha vida e sempre foi minha grande companheira, mesmo tendo sua atenção dividida com os projetos da faculdade.

Agradeço a todos os meus familiares, que torceram e tiveram orgulho de mim, em especial aos meus avós, Maria Sales, Juarez Amorim, Maria José e Edvaldo Moreira, que sempre me encorajaram a permanecer firme e ir em busca dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Paulo Victorino Santos que colaborou da melhor forma possível para a realização deste trabalho, sempre dedicado em sanar minhas dúvidas e me colocar na direção correta.

À profa. Dra. Simone Machado Goulart, pela oportunidade e por ter sido uma intermediária na busca por um orientador.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre torceram por mim, me deram apoio e ajudaram a enfrentar esse processo com mais leveza, vocês sempre estarão gravados no meu coração.

E em especial minha amiga e parceira Maria Stéfane, que está ao meu lado antes mesmo da faculdade, sempre me impulsionando a ser uma pessoa melhor, me fazendo sorrir e sendo um exemplo de força, dedicação e companheirismo, tenho muita sorte por ter alguém como você fazendo parte da minha vida.

Enfim agradeço a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação. A todos vocês o meu muito obrigada.

“Esperança é a única coisa mais forte que o medo”
(COLLINS, S. **Jogos Vorazes**, 2012)

RESUMO

Por se constituir de nutrientes facilmente assimiláveis, o leite se torna um excelente meio de cultura para a maioria dos microrganismos, tendo sua composição influenciada por diversos fatores e se tornando suscetível às adulterações. Os padrões de qualidade deste alimento devem ser rigorosamente controlados a fim de garantir um produto de segurança e que não venha causar danos à saúde. Fraudes por adição de substâncias conservantes no leite têm sido recorrentes no país devido ao fato de possuírem a capacidade de inibir o crescimento ou destruir os microrganismos patogênicos, deste modo, a necessidade de novas metodologias e técnicas para as análises de rotina, se faz de extrema importância, visto que, o leite fraudado além de acarretar diversos prejuízos econômicos traz consequências importantes à saúde do consumidor. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência das concentrações de substâncias químicas conservadoras como formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio na contagem total de bactérias e a capacidade de detecção em diferentes tempos de estocagem com base nos limites de detecção obtidos por Santos (2019). As análises foram realizadas com amostras comerciais de leite pasteurizado livre de resíduos e fraudadas seguindo os parâmetros: amostra 1 contendo uma concentração abaixo do limite de detecção; a amostra 2 que é caracterizada como LD e por final a amostra 3 que representa uma concentração acima do limite de detecção; e avaliadas quanto à presença de formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio pelos métodos oficiais nos tempos zero, 24 horas e 48 horas sob refrigeração de 4°C a 5°C. Os resultados obtidos mostram elevados percentuais de redução de bactérias totais no leite mesmo em concentrações mínimas e principalmente a partir do tempo de 24 horas. Além disso, foi possível constatar que diferentemente das outras substâncias utilizadas, o peróxido de hidrogênio se degrada após um período de 24 horas, o que o torna ainda mais difícil de ser detectado, dado que, ele não é mais perceptível no leite, porém, continua cumprindo sua função inibitória de proliferação de microrganismos. É de extrema importância que a microbiota do leite seja conhecida e controlada, pois, diversas bactérias podem ser veiculadas por produtos lácteos de baixa qualidade, tornando-o perecível e um possível disseminador de doenças aos seres humanos. As análises de resíduos de substâncias antimicrobianas devem ser feitas com frequência e de preferência com amostras coletadas diretamente nos tanques dos produtores para melhor avaliação das ocorrências de fraudes.

Palavras-chave: Fraudes no leite. Substâncias químicas conservadoras. Limite de detecção. Contagem total de bactérias.

ABSTRACT

By being of nutrients easy to assimilate. The milk becomes an excellent way of culture for the majority of microorganism, having your composition influenced by a range of factors and becoming prone to adulteration. The quality standard of this food must be rigorously controlled in order to ensure a safe product that doesn't cause any damage to our health. Frauds by adding preservatives substances in the milk have been recurrent in the country due to the fact of being able to inhibited growth or destroy pathogenies microorganisms, this way, the necessity of new methodologies and techniques for a routine analysis is extremely necessary, knowing that, the adulterated milk can, besides causing several economic losses also cause important consequences to the consumer's health. The objective of this project was to verify the influence of the concentration of preservative chemical substances like formaldehyde, hydrogen peroxide and sodium hypochlorite on the total account of bacteria and the capacity of detecting in different storage times based on detection limits obtained by Santos (2019). The analyses were made with commercial samples of residue-free pasteurized milk and adulterated following the parameters: sample 1 containing a concentration below the detection limit; sample 2 that is characterized as LD and at last, sample 3 that represents a concentration above the detection limit; and evaluated for the presence of formaldehyde, hydrogen peroxide and sodium hypochlorite by official methods at times zero, 24 hours and 48 hours under refrigeration from 4°C to 5°C. The obtained results show high percentages of reducing the total amount of bacteria in the milk even in low concentration and mostly after the time of 24 hours. Apart from that it was found that unlike other substances used, hydrogen peroxide degrades itself after a period of 24 hours, what makes even harder to detect it, due to the fact that it is no longer noticeable in milk, however, continues to fulfill its inhibiting function of the microorganism's proliferation. It is extremely important that the microbiota of milk is known and controlled, since low quality dairy products, making it perishable and a possible spread of disease to human beings can carry several bacteria. The analysis of residues of antimicrobial substances must be carried out frequently and preferably with samples collected directly from the producers' tanks for a better evaluation of fraud occurrences.

Keywords: Milk fraud. Preservative chemical substances. Detection limit. Total bacteria count.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Relação de percentual da composição química do leite nas espécies vaca zebu, cabra, ovelha, égua e ser humano.....	17
Tabela 02 -	Tabela com percentual de concentração de formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio.....	22
Tabela 03 -	Concentrações dos conservadores a serem utilizados nos experimentos para Avaliar as interferências na contagem total de bactérias nos tempos zero, 24 horas e 48 horas.....	23
Tabela 04-	Aplicação de testes qualitativos dos conservadores químicos nos seguintes tempos de estocagem 0h, 24h e 48h.....	25
Tabela 05-	Redução dos conservadores em relação ao branco.....	27

LISTA DE SIGLAS

ANVISA-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
CBT	Contagem de Bactérias Totais.
CCS	Contagem de Células Somáticas.
CCP-	Contagem Padrão em Placas.
EST-	Estrato Seco Total.
FAO-	Food and Agriculture Organization.
IN-	Instrução Normativa
LD	Limite de Detecção
MAPA-	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
PAC-	Programa de Autocontrole.
PNMQL-	Programa Nacional de Melhorias da Qualidade do Leite.
RBQL-	Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite.
RIISPOA-	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.
SDA-	Secretária de Defesa Agropecuária.
SIF-	Serviço de Inspeção Federal.
UHT-	Ultra High Temperature.
UFC-	Unidade de Formação de Colônias.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Objetivos.....	12
1.2	Justificativa.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO ou REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1.	Histórico de Consumo.....	14
2.2.	Legislação.....	14
2.3.	Características do Leite.....	16
2.4.	Higiene do Leite.....	18
2.5.	Adulterações no Leite.....	19
2.6.	Fraudes por Adição de Substâncias Químicas Conservadoras.....	20
2.7.	Contagem Total de Bactérias e Limite de Detecção.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Coleta e Preparo das Amostras para Avaliação.....	22
3.2	Análise de Formol.....	23
3.3.	Análise de Água Oxigenada (Peróxidos).....	23
3.4.	Análise de Hipoclorito de sódio.....	23
3.5.	Análise Microbiológica de Contagem Total de Mesófilos nas Amostras.....	24
3.6.	Análise Estatística dos Dados.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
	REFERÊNCIAS.....	31
	APÊNDICES.....	36

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de elevado valor nutricional e se faz necessário na vida de todos os mamíferos em seus primeiros meses de vida. Sua composição rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas favorecem a prevenção de problemas como a osteoporose e combate a subnutrição proteica (OLIVEIRA, FONSECA, GERMANO, 1999). Assim por se tratar de um produto consumido diariamente, por apresentar uma cadeia produtiva extremamente importante e por ser produzido em quase todos os municípios do país, o leite deve apresentar condições sanitárias apropriadas (RENTERO, 2019).

Por se constituir de nutrientes facilmente assimiláveis, o leite se torna um excelente meio de cultura para a maioria dos microrganismos. Dessa forma se torna extremamente importante que se dê uma atenção especial a este produto. Sua qualidade higiênica é influenciada por diversos fatores, como o estado sanitário do rebanho; manejo dos animais; equipamentos durante a ordenha, presença de microrganismos, resíduos de produtos de uso veterinário e odores estranhos (DÜRR, 2004).

Diante disso, a adição de substâncias ao leite é proibida e considerada fraude, pois de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)(BRASIL, 1997), considera-se impróprio para consumo humano o leite que apresente características sensoriais anormais, a adição de conservadores ou substâncias estranhas, contenha impurezas ou corpos estranhos de qualquer natureza, apresente resíduos de antibióticos ou inibidores, esteja fraudado, ou não atenda aos padrões microbiológicos e físico-químicos definidos em Regulamentos Técnicos específicos.

Segundo Spinosa e Tárraga (2014), substâncias químicas conservadoras são conservantes adicionados aos alimentos com a capacidade inibir o crescimento ou destruir os microrganismos patogênicos, sendo que essas substâncias podem ser incorporadas ao leite de modo acidental pelo tratamento medicamentoso com antibióticos (antimicrobianos) sem respeitar o período de carência¹, ou como adulterantes para evitar a proliferação de microbiota contaminante ou deteriorante (SILVA et. al. 2010).

Assim, dentre as fraudes por substâncias químicas conservadoras mais comuns relatadas por Tronco (2008), podemos mencionar, a adição de cloro, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e formaldeído, tendo como objetivo reduzir ou eliminar os microrganismos presentes no leite, prevenindo assim futuras multiplicações decorrentes de alterações.

A presença desses contaminantes no leite consiste em um problema de saúde pública, visto que, pode ocasionar em alterações no equilíbrio intestinal, seleção de bactérias resistentes no sistema digestório dos

¹Período de carência: prazo de eliminação do antibiótico no leite, após a última aplicação podendo variar de produto para produto e de acordo com a via de aplicação (BRITO; LANGE, 2005).

consumidores, multirresistência entre microrganismos e efeitos colaterais secundários (FAGUNDES, 1981). Ademais, tais substâncias interferem na indústria de laticínios gerando perdas e interferindo em análises de rotina.

Neste trabalho, são verificados a influência das concentrações de substâncias químicas conservadoras como formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio na contagem total de bactérias e a capacidade de detecção em diferentes tempos de estocagem com base nos limites de detecção dos métodos oficiais de análises qualitativas de resíduos químicos obtidos por Santos (2019).

1.1 Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Verificar a ação das substâncias químicas conservadoras na redução da contagem total de bactérias no leite, levando-se em consideração os limites de detecção dos métodos oficiais qualitativos de análises de resíduos químicos e a capacidade desses métodos em detectar essas substâncias em diferentes tempos de estocagem

1.1.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade dos métodos oficiais qualitativos em detectar peróxido de hidrogênio, formol e hipoclorito de sódio nos tempos zero, 24 horas e 48 horas de estocagem do leite de 4°C a 5°C.
- Avaliar a ação do peróxido de hidrogênio na contagem total de bactérias no leite, levando-se em consideração os limites de detecção dos métodos oficiais qualitativos de análise de resíduos químicos.
- Avaliar a ação do formol na contagem total de bactérias no leite, levando-se em consideração os limites de detecção dos métodos oficiais qualitativos de análise de resíduos químicos.
- Avaliar a ação do hipoclorito de sódio na contagem total de bactérias no leite, levando-se em consideração os limites de detecção dos métodos oficiais qualitativos de análise de resíduos químicos.
- Comparar os resultados encontrados com os descritos em trabalhos de pesquisa.

1.2 Justificativa

Fraude por adição de substâncias no leite tem sido recorrentes no país, o que demonstra falhas no controle de qualidade das indústrias e dos órgãos de fiscalização. Muitas metodologias para a pesquisa de adulterantes do leite, como por exemplo, a pesquisa para a detecção de formol, são extremamente laboriosas, complexas, demoradas e muitas vezes inviabilizam que as análises sejam feitas com maior frequência, especialmente pelas

indústrias, nas quais diversas fraudes passam despercebidas resultando no acesso dos consumidores a um produto adulterado (MAREZE et. al., 2015).

De acordo, com Rosa-Campos e colaboradores (2011), leites com carga microbiana elevada apresenta pH alterado e, conseqüentemente acidez Dornic elevada, o que causa a recusa do leite pelo laticínio. Assim, o formol, o peróxido de hidrogênio e o hipoclorito de sódio são utilizados em fraudes que visam paralisar a atividade microbiana, visto que, a incorporação dessas substância controlam a microbiota contaminante do leite podendo ser adicionados de forma intencional ou de forma acidental por meio da higienização de instalações e equipamentos em propriedades leiteiras e laticínios (SILVA, 2013).

Além disso, na literatura não existem métricas percentuais de concentração do que pode ser considerada fraude ou não em uma amostra, visto que, a partir do momento que é detectado substâncias diferentes a composição do leite já é considerada fraude, independentemente da quantidade. Ao levar em conta os principais prejuízos com as fraudes podemos dizer que além da diminuição nutricional e alteração da qualidade dos produtos, essas substâncias são altamente tóxicas, cancerígenas e quando hidrolisadas, como é o caso do peróxido, liberam oxigênio, água e calor, o que pode levar a combustão espontânea se em contato com matéria orgânica ou metais como o cobre e o bronze (LAUDA E ROCCO, 2007).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Histórico do Consumo de Leite

A utilização do leite já ocorria há milhares de anos atrás, no entanto, foi somente com Louis Pasteur que as técnicas de conservação como pasteurização, foram implantadas. Assim, com a ênfase do setor de laticínios e a necessidade de modernização e padronização na produção de leite, houve uma maior preocupação para que o leite fosse de melhor qualidade, evitando além dos prejuízos, também as fraudes (ALMEIDA- MURADIAN; PENTEADO, 2007).

Os primeiros dados da produção de leite no Brasil foram registrados pela FAO (Food and Agriculture Organization) em 1961, quando o país produziu cerca de 5,2 milhões de toneladas (FAO, 2016). No entanto, o primeiro marco de organização da produção leiteira data de 1952, quando o então presidente Getúlio Vargas assinou o decreto que aprovava o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), tornando obrigatória a pasteurização do leite, bem como a inspeção e o carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Além disso, tal decreto introduziu a classificação dos leites em tipo A, B e C, conforme as condições sanitárias de ordenha, processamento, comercialização e contagem microbiana (VILELA et. al., 2017).

Nos últimos 50 anos, a produção de leite no país tem crescido sistematicamente devido à grande demanda por produtos lácteos e atualmente o Brasil elenca o ranking entre os cinco maiores produtores leiteiros do mundo (RENTERO, 2019). De acordo com Gasques e colaboradores (2020), a produção de leite deverá crescer nos próximos 10 anos a uma taxa atual entre 1,9 e 2,8%, tendo como principal fator a melhoria na gestão das fazendas e na produtividade dos animais.

Assim, tendo em vista as diversas mudanças nos hábitos de consumo, poder aquisitivo e condições de bem-estar, podemos associar os altos índices de produção, com índices de consumo e consequentemente com índices de qualidade, pois, a população além de consumir mais, quer um produto em perfeitas condições, livre de contaminações e a ajuda de medidas introduzidas pela legislação por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), trouxeram importantes alterações sobre a produção com consequências relevantes para a qualidade deste produto ao longo dos anos (BRASIL, 2002).

2.2. Legislação

Como qualquer outro tipo de produto alimentício, a busca pela qualidade do leite e dos seus derivados é regulada por órgãos oficiais para garantir a segurança alimentar de toda a população. Assim quando falamos em legislação de produtos lácteos o MAPA é o responsável pela fiscalização da fabricação dos produtos de origem animal conforme a Lei 1283 de 18 de dezembro de 1950 e à ANVISA e os órgãos de Vigilância fiscalizam esses produtos no comércio. (BRASIL, 1950). Dentro destes órgãos são elaboradas diretrizes de orientação voltadas para todo o setor como é o caso do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) que foi criado em 1996 (BRASIL, 2002).

O PNMQL é um conjunto de medidas que visam melhorar a qualidade do leite no Brasil e especificadamente garantir que os produtos lácteos atendam às exigências do mercado consumidor, colocando o leite em posições de competição com o mercado exterior, possibilitando o aumento da produção nacional e melhorando as condições de pagamento. A proposta definitiva para o PNMQL foi então submetida à consulta pública por intermédio da Portaria nº 56, de 7 de dezembro de 1999, da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) e o resultado dessa ação foi à elaboração da Instrução Normativa nº 51 aprovada em 2002. (BRASIL, 2002)

A Instrução Normativa (IN) 51 promoveu mudanças na cadeia produtiva do leite com ações voltadas para a difusão das práticas para melhoria da qualidade, estabelecendo os “Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, tipo B, 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”. Sua classificação trouxe uma série de modificações para os produtores, empresas de laticínios e consumidores, que além de fornecer parâmetros aceitos internacionalmente promoveu normas comuns para todos os tipos de leite sendo estas a higiene pessoal, do animal, do ambiente e instalações adequadas para ordenha (BRASIL, 2002).

Foram determinados prazos para que o produtor se adequasse às exigências de qualidade. Apesar dos avanços conquistados, observou-se que uma grande parte dos produtores de leite brasileiro não estavam aptos a atender as exigências nos prazos estabelecidos, mais especificamente em relação aos parâmetros de CCS (Contagem de Células Somáticas) e CBT (Contagem de bactérias Totais)²(BRASIL, 2002; PAIVA, 2018).

Deste modo, os parâmetros de qualidade do leite foram atualizados por meio da Instrução Normativa nº 62, de 21 de dezembro de 2011, onde altera basicamente o cronograma que rege os parâmetros de qualidade do leite e dessa forma, ela normatiza desde as instalações passando pelos controles e higiene necessários com os animais, o local, as pessoas envolvidas, a armazenagem, o transporte, industrialização, processamento até o comércio, norteador o controle de qualidade do alimento e assegurando que o país alcance novos mercados (BRASIL, 2011).

² O CCS refere-se as células do sistema imune e do epitélio da glândula mamária das vacas que estão presentes no leite. Já o CBT refere-se à proliferação bacteriana no leite por contaminação externa e está estritamente relacionada com os processos de higiene durante a coleta e à manutenção da temperatura do tanque. (JAMAS et. al., 2018).

O prazo para atender as especificações técnicas de qualidade do leite determinadas na IN 62 foram postergadas sucessivamente com a publicação da Instrução Normativa nº 7, de 3 de maio de 2016 e Instrução Normativa nº 31 de 29 de junho de 2018. Durante o prazo de vigência da IN 31, foi novamente observado pelos resultados das análises oficiais de qualidade realizadas pela Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite (RBQL), que grande parte dos produtores não estariam aptos a atender as exigências de qualidade mais rígidas previstas para entrarem em vigor a partir de 1º de julho de 2019 (BRASIL, 2011; BRASIL, 2016; BRASIL, 2018).

Com o objetivo de simplificar o entendimento sobre os prazos e exigências de qualidade estabelecidos em Instruções Normativas anteriores e, promover um plano mais robusto e duradouro de qualificação dos produtores de leite, o MAPA publicou em 26 de novembro de 2018 a Instrução Normativa 76 e Instrução Normativa 77. A IN 76/77 estabeleceu os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial, e, ainda, revogou as Instruções normativas 51/2002, 62/2011, 07/2016 e 31/2018. A seguir um resumo das modificações perante a nova legislação. (BRASIL, 2018; PAIVA, 2018):

- A primeira mudança está relacionada à definição detalhada dos Programas de Autocontrole (PAC). O PAC deve abordar o estado sanitário do rebanho, planos para a qualificação dos fornecedores de leite, programas de seleção e capacitação de transportadores, sistemas de cadastro dos transportadores e produtores, além de descrever todos os procedimentos de coleta, transvase e higienização de tanques isotérmicos, caminhões, mangueiras e outros usados na coleta e transporte do leite até o laticínio

2.3. Características do Leite

Com uma composição complexa e características que variam de acordo com a espécie animal, o leite apresenta proteínas de alto valor biológico e vitaminas essenciais ao desenvolvimento de diversos seres vivos (FURTADO, 2010). O leite bovino é um produto comum da secreção da glândula mamária, que corresponde a uma mistura homogênea de diferentes substâncias que se encontram dispersas em meio aquoso, sob forma de emulsão, suspensão ou dissolvidas (BRASIL, 2014).

A composição do leite varia de acordo com a espécie, raça, alimentação, individualidade, fase de lactação, entre outros fatores, mas, geralmente é composto por componentes sólidos que representam cerca de 12% a 13% do leite sendo conhecidos por Estrato Seco Total (EST) e que se configuram como a parte nutritiva e aproximadamente 87,5% de água (FREITAS, et. al., 2009). De acordo com a Tabela 1, podemos verificar as distinções de percentual referente a diferentes espécies.

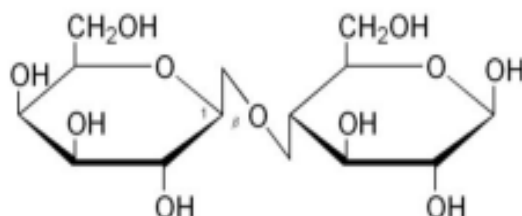
Tabela 01- Relação de percentual da composição química do leite nas espécies vaca zebu, cabra, ovelha, égua e humano.

Espécie/ raça	Gordura (%)	Proteína (%)	Relação proteína/gordura	Lactose (%)	Cinzas (%)	Sólidos totais (%)
Vaca Zebu	4,9	3,9	0,8	5,1	0,8	14,7
Cabra	3,5	3,1	0,9	4,6	0,8	12
Ovelha	5,3	5,5	1,0	4,6	0,9	16,3
Égua	1,6	2,7	1,7	6,1	0,5	11
Humano	4,5	1,1	0,2	6,8	0,2	12,6

Fonte: Handbook of milk composition (JENSEN, 1995).

Assim, o EST pode ser subdividido em: 3,5% de gorduras formadas principalmente pela ligação de glicerol e ácidos graxos de cadeia curta, oriundos de unidades de ácido acético derivadas da fermentação no rúmem (compartimento do aparelho digestivo); 3,5% de proteínas, que são partículas tão minúsculas que não conseguem assentar e assim permanecem em suspensão, além disso, podem variar em função de fatores ambientais, incluindo a nutrição (SOARES, 2013; CARVALHO et. al., 2007).

A caseína é a principal proteína do leite, no entanto, outras enzimas podem ser observadas como, as lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase; 4,7% de lactose, formada pela dissociação dos dissacarídeos glicose e galactose, como mostrado na Figura 1, sendo um dos elementos mais estáveis e uma primordial fonte de energia aos recém nascidos e por último 0,8% de minerais que podem ser encontrados na forma de cálcio, fósforo e ferro, ajudando o crescimento e o fortalecimento do esqueleto nos indivíduos mais novos e cumprindo o efeito benéfico na limitação do crescimento bacteriano no leite, visto que, o ferro está disposto em baixa concentração e que em altas quantidades se torna um excelente meio de crescimento bacteriano (SILVA, 1997; VEIGA, 2006).

Figura 01 – Fórmula estrutural da lactose (Gal β (1,4) -Gli)

Dissociação do dissacarídeo glicose e galactose pela digestão.

Fonte: Revista Aditivos Ingredientes, 2017.

Existe um permanente equilíbrio na composição do leite, de modo que, sua estabilidade agrega conhecimentos importantes sobre os resultados de testes que são realizados com o intuito de apontar ocorrências fraudulentas que alteram sua estrutura. Uma redução substancial da concentração de lactose ou dos outros sólidos totais altera as propriedades físicas do leite e levanta suspeita de contaminações após a ordenha (VIDAL e NETTO, 2018).

2.4. Higiene do Leite

A aquisição de um leite de qualidade envolve a necessidade de uma ordenha que reduza a contaminação física, química e microbiológica. Visto que, uma higiene deficiente causa deterioração dos produtos beneficiados, acarretando riscos ao consumidor e perda de renda dos agricultores, produtores e laticínios (DÜRR, 2012).

Quando tratamos de higienização, temos como figura chave o ordenhador, pois, sem sua efetiva colaboração os investimentos com equipamentos ou em animais de alta produção se tornam nulos. Além disso, as medidas de sanitização devem contemplar todo o processo de obtenção do leite garantindo boas condições, eficiência e qualidade desde o animal até as instalações (MILLOGO et. al., 2010).

Outra importante ação é a conservação deste produto em baixas temperaturas. O resfriamento deve ocorrer imediatamente após a ordenha e sem dúvidas, é uma das medidas de maior impacto sobre a qualidade do produto final, uma vez que, em temperaturas elevadas o crescimento microbiano no leite é inibido e não se prolifera alterando as características do leite como a fermentação da lactose e degradação de proteínas e gorduras (DÜRR, 2012).

Seguindo as orientações da Instrução Normativa 76/77, mensalmente o PNMQL colhe amostras de leite CRU refrigerado de cada propriedade rural fornecedora e dos estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal e estabelece entre as estipulações sancionadas pela legislação que para ter uma correta ordenha os produtores devem atender aos critérios sanitizantes descritos no Quadro 1 a seguir (BRASIL, 2011):

Quadro 01- Medidas de higiene durante e após a ordenha.

1. Manter a sala ou local de ordenha sempre limpos;
2. Usar roupas limpas para ordenhar as vacas;
3. Utilizar água potável de boa qualidade;
4. Lavar as mãos e mantê-las limpas durante a ordenha (de preferência, usar luvas de borracha);

5. Imergir as tetas em solução desinfetante antes e após a ordenha;
6. Lavar os equipamentos e utensílios após cada ordenha com água aquecida, usando os detergentes de acordo com o manual do fabricante dos mesmos;
7. Trocar borrachas e mangueiras dos equipamentos de ordenha na frequência recomendada pelo fabricante ou quando ocorrem rachaduras;
8. Lavar os tanques de refrigeração, usando água aquecida e detergente adequado cada vez que o leite for recolhido pelo transportador

Quadro com descrições sobre os critérios de higiene dos animais, ordenhadores e equipamentos.

Fonte:(DÜRR, 2012).

A qualidade do leite cru também pode ser influenciada por fatores zootécnicos, tais como alimentação e o potencial genético do rebanho, sendo que estes se tornam responsáveis pelas características de composição do leite, pela sua produtividade e se relacionam diretamente com a qualidade microbiológica do produto, determinando inclusive sua vida de útil (VIDAL e NETTO, 2018).

2.5. Adulteração no Leite

Um dos alimentos mais envolvidos em fraude é o leite (MOORE; SPINK; LIPP, 2012), deste modo, além de afetar o consumidor economicamente, em fornecer um produto de qualidade abaixo da declarada, a adulteração do leite pode representar riscos à saúde dependendo do tipo de fraude utilizada. De acordo com a legislação brasileira, considera-se fraude a incorporação de substâncias estranhas/diferentes à composição normal do leite, que podem ocorrer desde a sua produção na propriedade rural até a etapa de comercialização (BRASIL, 2002).

Inicialmente as adulterações do leite almejavam o aumento do volume, por meio da adição da água, e desnate para a produção de creme de leite. Esta fraude dificilmente é realizada de forma isolada e para mascarar a adição da água se utiliza substâncias denominadas reconstituintes de densidade como sal, açúcar, farinha. Bem como, a fraude por, adição de neutralizantes, visando ocultar a acidez Dornic do leite ou acidez Dornic à níveis acima dos permitidos pela legislação com neutralizantes como bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio e as fraudes por adição de conservantes (ABRANTES, CAMPÊLO E SILVA, 2014).

Deste modo, se sua produção não for supervisionada pelos órgãos públicos para averiguação de que o regulamento está sendo seguido, podem ocorrer surtos de origem alimentar, como por exemplo, a operação “Ouro Branco” ocorrida em 2007, que investigou duas cooperativas de laticínios no estado de Minas Gerais por adulterações de leite. Segundo as investigações as fraudes ocorriam com a adição de soro de leite, substâncias conservantes, neutralizantes e reconstituintes (G1, 2007; SPIAGLIATTI, 2007).

E em 2013, onde, o Ministério Público, na “Operação Leite Compensado” buscou combater fraudes e adulteração do leite em laticínios de Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. Foram, cerca de 300 mil litros de leite do tipo UHT-integral adulterados com formaldeído durante o transporte do leite cru. Em 2017, na 12a fase da investigação, foram encontrados ureia (tóxico em altas concentrações) e formol (cancerígeno) utilizados para aumentar a longevidade do produto (DA REDAÇÃO, 2014; GRIZZOTTI, 2013; MILHORANCE, 2017).

2.6. Fraudes por Adição de Substâncias Químicas Conservadoras

A importância dos microrganismos do leite revela que o conhecimento sobre o seu índice de contaminação microbiana pode ser usado no julgamento da sua qualidade. Assim, os conservantes mais utilizados nas fraudes por uso de substâncias químicas conservadoras são o hipoclorito de sódio popularmente chamado de água sanitária e que se faz presente durante as ações de higiene dos laticínios e indústrias; o peróxido de hidrogênio, que não pode ser considerado um contaminante acidental, visto que, não é comumente utilizado na higienização; e o formol que também não é rotineiramente empregado na higienização e sua adição na formulação de produtos desinfetantes foi proibida (OLIEMAN, et. al., 2003; ANVISA, 2008).

Segundo o Informe Técnico da ANVISA (2013), a ingestão de formol causa imediata e intensa dor na cavidade oral e faringe, dores abdominais com náuseas, vômitos e possível perda de consciência. No Brasil, a adição de peróxido de hidrogênio é proibida pela legislação (BRASIL, 1952), devido ao seu excesso residual ser prejudicial aos seres humanos. No entanto, fraudes por adição de substâncias conservantes ao leite têm sido recorrentes, acarretando em diversos danos entre eles, prejuízos das características sensoriais e dos processos tecnológicos que envolvem a utilização de culturas lácticas e problemas de toxicidade para consumidores (SILVA, 2013).

Diferentes autores relatam a presença de substâncias conservantes no leite. Sousa e colaboradores (2011) pesquisaram fraudes em 100 amostras de leite UHT produzido em 6 estados brasileiros 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 e colaboradores (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.

2.7. Contagem Total de Bactérias e Limite de Detecção

É importante que a microbiota do leite seja conhecida e controlada, visto que, diversas bactérias patogênicas podem ser veiculadas por produtos lácteos de baixa qualidade, tornando-o perecível e um ótimo disseminador de doenças ao seres humanos. Deste modo, entende-se por microrganismos seres microscópicos pertencentes a diferentes reinos biológicos, que necessitam de uma variedade de substâncias nutritivas para promover seu crescimento tais como: fontes de energia; de carbono; de nitrogênio; sais minerais; água e vitaminas (MENEZES et. al. 2014; NASCIMENTO, 2010).

O principal grupo de microrganismos indicador de qualidade no leite são os mesófilos aeróbicos, que se multiplica em temperatura ambiente podendo variar entre 20°- 40°C e se desenvolvem na presença de oxigênio. As avaliações são feitas através da contagem total em placas e em elevados percentuais sugere-se a presença de patogênicos tais como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, e podem induzir alterações físico-químicas irreversíveis através da acidificação que desestabiliza proteínas solúveis e micelas de caseína, favorecendo a coagulação, alteração do sabor/odor e redução do valor imunológico nutricional (NÖRBERG et. al., 2010; CHOULIARA et. al., 2010).

No entanto, nem todos os microrganismos causam deterioração do leite. Existem algumas bactérias que atuam benéficamente ajudando no equilíbrio da flora intestinal, sistema imunológico e combate a alergias alimentares como, por exemplo, as bactérias do gênero *Lactobacillus*. Sem falar que, espécies desse gênero são utilizadas no processo tecnológico, pois produzem ácido láctico a partir da lactose, participam do processo de maturação de queijos e produzem diacetil e acetaldeído, que conferem aroma e sabor aos produtos (ORDOÑES, 2005).

Quando falamos em contagem total de bactérias se torna indispensável mencionar os limites de detecção, visto que, a partir deste método se torna possível definir a menor quantidade de analito presente em uma amostra e determinar a influência destas substâncias químicas conservadoras relacionando com o tempo de estocagem e sua efetiva ação na redução de bactérias (PEREZ, 2010). Nesta pesquisa se fez necessário partir de limites de detecção já previstos por Santos (2019), onde foram determinados: 0,002%; 0,002% e 0,03% respectivamente para o peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e formol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e Preparo das Amostras para Avaliação

A avaliação da sensibilidade analítica das provas para a pesquisa de conservantes (formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio) foram realizadas a partir de pesquisas de Santos (2019) conforme a Tabela 2, e novos testes foram aplicados para avaliar o efeito da presença desses conservadores na contagem total de bactérias no leite.

Tabela 02 – Tabela com percentual de concentrações de formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio.

Amostra	Teor de formol (%)	Resultado	Teor de peróxido (%)	Resultado	Teor de hipoclorito (%)	Resultado
Controle	0%	Negativo	0%	Negativo	0%	Negativo
1	0,001%	Negativo	0,001%	Negativo	0,01%	Negativo
2	0,002%	Positivo	0,002%	Positivo	0,02%	Negativo
3	0,003%	Positivo	0,003%	Positivo	0,03%	Positivo
4	0,004%	Positivo	0,004%	Positivo	0,04%	Positivo
5	0,005%	Positivo	0,005%	Positivo	0,05%	Positivo
6	0,006%	Positivo	0,006%	Positivo	0,06%	Positivo
7	0,007%	Positivo	0,007%	Positivo	0,07%	Positivo
8	0,008%	Positivo	0,008%	Positivo	0,08%	Positivo
9	0,009%	Positivo	0,009%	Positivo		
10	0,010%	Positivo	0,010%	Positivo		

Fonte: Santos, 2019

Foram realizadas três coletas de amostras comerciais de leite pasteurizado, livre de resíduos e dentro dos parâmetros exigidos pela legislação (BRASIL, 2018), posteriormente as amostras foram fraudadas conforme a Tabela 3, e avaliadas quanto à presença de formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio pelo método oficial descrito a seguir nos tempos zero, 24 horas e 48 horas sob refrigeração de 4°C a 5°C. As Análises foram realizadas em triplicatas para cada teste e em três repetições/etapas para os seguintes parâmetros de concentração: o controle, (leite puro sem adulterações); a amostra 1, contendo uma concentração abaixo do limite de detecção; a amostra 2 que é caracterizada como LD e, por final, a amostra 3 que representa uma concentração a cima do limite de detecção.

Tabela 03 – Concentrações dos conservadores a serem utilizados nos experimentos para avaliar as interferências na contagem total de bactérias nos tempos zero, 24 horas, 48 horas.

Amostra	Formol (%)	Peróxido (%)	Hipoclorito (%)
Controle	0	0	0
1	0,001	0,001	0,02
2	0,002	0,002	0,03
3	0,003	0,003	0,04

Fonte: Autoria Própria

3.2. Análise de Formol

Para o teste, em um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de leite, 2 mL de ácido sulfúrico (50%) e 1 mL de percloroeto férrico (2%). Em seguida, a mistura foi aquecida até ebulição. O resultado positivo apresenta cor violeta, enquanto o resultado negativo cor amarela (BRASIL, 2006).

3.3. Análise de Água Oxigenada (Peróxidos)

Para detectar a adulteração por adição de água oxigenada, 10 mL de leite foram transferidos para um tubo de ensaio, seguido de aquecimento em banho-maria até 35°C. Posteriormente, foi adicionado 2 mL de solução hidroalcoólica de guaiacol 1% (v/v) e mais 5 mL de leite cru. A cor salmão indica a presença de água oxigenada (BRASIL, 2006).

3.4. Análise de Cloro e Hipocloritos

Em um tubo de ensaio, foram misturados 5 mL de leite a 0,5 mL de solução de iodeto de potássio (7,5%). O aparecimento da coloração amarela indica a presença de cloro livre. Para o teste de hipocloritos, adicionou-se ao mesmo tubo 4 mL de solução de ácido clorídrico/ água (1:2), que foram aquecidos em banho-maria a 80°C por 10 minutos. Posteriormente, o tubo foi resfriado em água corrente. O aparecimento da coloração amarela indica a presença de hipocloritos (BRASIL, 2006).

3.5. Análise Microbiológica de Contagem Total de Mesófilos nas Amostras

As amostras descritas na Tabela 03, foram submetidas às análises microbiológicas de contagem total de mesófilos com a finalidade de se verificar a possível redução da presença de bactérias nas amostras fraudadas. Para esse teste, foram utilizadas placas de Petrifilm® AC 6400, no qual, as amostras de formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio foram incubadas a 32°C por 24/48 horas, separadamente nos intervalos de 0 horas, 24 horas, 48 horas (SILVA et. al, 2010).

3.6. Análise Estatística dos Dados

As médias das análises microbiológicas foram expressas em tabela com resultado e desvio padrão e comparadas pelo Teste “T” - Teste de comparação de médias de “Student”, ao nível de 95% de confiança com utilização do software Microsoft EXCEL 2013 (REIS, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite e seus derivados são produtos que apresentam qualidades específicas e são perecíveis, portanto, exigem controles e fiscalização rígidos. Qualquer contaminação independente da concentração, não pode chegar até o consumidor, levando em consideração que não existem níveis seguros de ingestão desses adulterantes e que em alguns casos como, por exemplo, o formol, pode apresentar efeito cumulativo no organismo (RIISPOA, 1997).

As análises realizadas para verificar a ação das substâncias químicas conservadoras em diferentes tempos de estocagem foram executadas pelos métodos oficiais, no qual, se tem como referência e comparativo para os testes posteriores o sinal do branco (leite sem conservantes). Para cada adulterante foram realizados três testes com as concentrações propostas, indicadas na Tabela 04 e três repetições para cada uma das concentrações nos tempos 0 horas, 24 horas e 48 horas.

Tabela 04 – Aplicação de testes qualitativos dos conservadores químicos nos seguintes tempos de estocagem: 0h, 24h e 48h.

Referência	Concentração do conservador (%)	0h	24h	48h
Branco	Sem conservadores	N	N	N
P1	0,001	N	N	N
P2	0,002	P	N	N
P3	0,003	P	N	N
F1	0,001	N	N	N
F2	0,002	P	P	P
F3	0,003	P	P	P
H1	0,02	N	N	N
H2	0,03	P	P	P
H3	0,04	P	P	P

Testes qualitativos para o peróxido, formol e hipoclorito, no qual foram utilizados as letras N, para determinar o resultado negativo e a letra P para indicar o resultado positivo.

Fonte: Autoria Própria

Com base nas análises, foi perceptível que o peróxido de hidrogênio apresentou resultados positivos a partir do limite de detecção (0,002%), no entanto, ao decorrer do tempo, ou seja, a partir de 24 horas, ele não foi

mais detectado. De acordo com Simonaggio e colaboradores (2014), o peróxido, após agir no leite, se transforma em água e oxigênio e sua reação ocorre de forma rápida, o que faz deste, uma fraude difícil de ser detectada, tornando-se importante estipular o tempo em que se pode detectar resquícios dessa substância para realizar a análise química laboratorial com mais confiabilidade.

A detecção da adição fraudulenta de peróxido de hidrogênio é de extrema importância, visto que, se trata de uma substância tóxica, mesmo em baixas concentrações, implicando em alto risco à saúde do consumidor e representando significativos prejuízos à indústria de laticínios (GOULART et. al., 2019).

Com o formol e o hipoclorito de sódio, foi observado que essas substâncias mantiveram o padrão de testar positivo a partir do limite de detecção nos tempos 0, 24 e 48 horas. O que demonstra que, diferentemente do peróxido o formol não se degradou com o tempo persistindo na matéria prima. Silva (2013) obteve resultados similares sobre a constância do formol em diferentes tempos avaliados (0, 24, 48, 72 e 96 horas). Entretanto, as concentrações analisadas foram diferentes desse estudo, sendo utilizado: 0,005% para o formol; 0,1% para o peróxido de hidrogênio e 0,5% para o hipoclorito de sódio.

Por se tratar de uma substância carcinogênica mesmo em baixas concentrações, o formol teve sua incorporação em formulações de produtos saneantes proibida pela legislação, reduzindo um pouco mais a ocorrência desta fraude e fazendo com que este não seja mais classificado como um adulterante não intencional diferentemente do hipoclorito de sódio que é uma fraude comum devido ao seu baixo custo e amplo espectro de ação, sendo empregado na higienização de equipamentos de ordenha e laticínios (ANVISA, 2008; CORDS, DYCHDALA, RICHTER, 2001; TRONCO, 2008).

A utilização de substâncias químicas conservadoras no leite, visa eliminar ou até mesmo diminuir, a proliferação de microrganismos, visto que, a baixa carga bacteriana é uma das características que se espera de um leite de qualidade e a contagem total de bactérias é um dos principais indicadores de boas condições sanitárias do leite cru, dado que, pode ser afetada pela contaminação inicial durante o processo de ordenha e a taxa de multiplicação bacteriana que é influenciada por fatores como a temperatura de armazenamento e o tempo de estocagem (MACHADO; CASSOLI, 2016).

De acordo com a Tabela 05, é possível observar a redução de bactérias em diferentes tempos de incubação e em relação ao comportamento crescente das concentrações de peróxido de hidrogênio (P), formol (F) e hipoclorito de sódio (H), acompanhadas pela numeração correspondente a concentração já introduzida na Tabela 03.

Tabela 05– Redução dos conservadores em relação ao branco.

	0h		24h		48h	
Branco	100,00%	a	100,00%	a	100,00%	a
P1	-9,77%	a, b	-7,71%	b	-99,11%	e
P2	-21,24%	c	-77,57%	d	-99,75%	e
P3	-43,79%	d	-85,13%	d	-99,97%	e
F1	-13,55%	b, c	-96,52%	e	-99,85%	e
F2	-21,51%	c	-99,37%	e	-99,92%	e
F3	-24,29%	c	-99,62%	e	-99,99%	e
H1	-4,56%	a, b	-32,54%	c	-11,32%	b
H2	-0,09%	a	-34,06%	c	-67,78%	c
H3	-1,20%	a, b	-34,82%	c	-76,35%	d

Aplicação de testes quantitativos para verificar a redução de peróxido de hidrogênio, formol e hipoclorito de sódio em relação ao branco nos tempos 0h, 24h e 48h. Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autoria Própria

Ao analisarmos cada substância separadamente, é possível observar que o peróxido de hidrogênio (P) e o formol (F) apresentaram uma alta taxa de redução de bactérias, a partir do tempo de 24 horas, tendo percentuais de redução acima de 50% (cor em verde) e 90% (cor em azul). Além disso, foi possível verificar que quanto maior forem às concentrações a partir do limite de detecção (P3 e F3) maior será a eficiência desses conservante em reduzir as bactérias totais.

O hipoclorito de sódio (H) mantém essa mesma tendência apenas nas concentrações do limite de detecção (H2) e em uma concentração acima (H3), sendo possível uma redução de bactérias superior a 50% no tempo de 48 horas. No entanto, quando essa substância foi avaliada em uma concentração abaixo do limite de detecção (H1), nota-se que o maior percentual de redução ocorre no tempo de 24 horas e que após isso há um decaimento da eficácia desse conservante em reduzir bactérias.

A refrigeração do leite cru, por períodos prolongados na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer sua qualidade, considerando a possibilidade da presença de bactérias e a multiplicação de microrganismos sobre os componentes lácteos, podendo promover alterações no leite e comprometimento da sua

qualidade (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). Deste modo, quando analisou-se as reduções que ocorreram em cada tempo testado, foi possível determinar que alguns percentuais de redução apresentam estatísticas iguais entre si ou em relação ao branco, tornando-se necessário classificar essas similaridades por letras de acordo com o teste de Turkey, no qual, médias comparadas dentro de um mesmo tempo seguidas por pelo menos uma letra igual não se diferem entre si.

No tempo zero, a letra “A” indica que as amostras P1, H1, H2 e H3 apresentaram o mesmo percentual de redução em relação ao branco, enquanto que a letra “C” indica que P2, F1, F2 e F3 possuem percentuais de redução estaticamente iguais entre si. A única amostra que se difere de todas as outras apresentando uma maior redução é P3 classificada pela letra “D”.

Em 24 horas, é notável que nenhuma das amostras é semelhante ao branco, pois nenhuma apresenta a letra “A”. As amostras P2 e P3 apresentam um aumento significativo com reduções acima de 50% (destacadas em verde) e são classificadas pela letra “D”, enquanto que na coloração azul é possível verificar que F1, F2 e F3 apresentam elevados percentuais de redução (acima de 90%) e são marcadas pela letra “E”. H1, H2 e H3 foram indicados pela letra “C” e assim como os resultados do tempo zero, não apresentam reduções tão significativas, estando abaixo de 50%.

As amostras analisadas depois de 48 horas apresentaram elevados percentuais de redução, mostrando que quanto maior a exposição deste conservador, maiores foram as reduções de bactérias. De P1 a F3 tem-se percentuais acima de 90%, iguais (estatisticamente falando) e agrupados letra “E”. H2 e H3, apesar de apresentarem quantidades de redução diferentes e serem identificadas como letra “C” e letra “D”, respectivamente, obtiveram reduções acima de 50% e H1 apresentou o menor percentual de redução em relação aos demais valores, sendo classificado pela letra “B”.

Os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram que existe uma influência das concentrações mínimas de formol, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio na contagem total de bactérias, uma vez que, até mesmo em concentrações abaixo do limite de detecção, foi observado a capacidade de diminuir a quantidade de microrganismos. E que ao se utilizar o Peróxido na concentração de 0,001 o produtor terá uma alta eficácia de redução de bactérias no período de 48 horas e nunca irá ser pego, pois, essa concentração se encontra abaixo do limite de detecção.

A detecção em diferentes tempos de estocagem revela uma falha por meio da legislação que atualmente contempla o período de 48 e ajuda a entender que substâncias como o peróxido precisam de um monitoramento constante e mais eficaz, sendo que, a partir do tempo zero ele se degrada ficando imperceptível nas análises de 24/48 horas, porém, cumprindo seu efeito inibitório no crescimento de mesófilos em todos os tempos analisados.

Essa característica do peróxido de não ser mais detectável ao longo do tempo incentiva ainda mais as fraudes, pois, ao se utilizar essa substância o produtor terá o resultado esperado, que é reduzir a carga bacteriana, porém, não serão identificados vestígios dessas adulterações, necessitando assim, de um aperfeiçoamento e constantes pesquisas sobre os testes rápidos, para que estes se tornem práticos, eficientes e capazes de lidar com as particularidades de substâncias que são comumente utilizadas nas adulterações, tornando-se importante estipular o tempo em que se pode detectar resquícios de peróxido de hidrogênio para realizar as análises químicas laboratoriais com mais confiabilidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A crescente preocupação com a segurança alimentar favorece a elaboração de novos métodos e análises que visam a eliminação de adulterações nos produtos lácteos, tornando-se, necessário um controle rigoroso por meio das entidades competentes baseado na atual legislação.

Através dessa pesquisa foi possível verificar uma redução das bactérias totais no leite por meio das substâncias químicas conservadoras em diferentes tempos de estocagem e que o peróxido de hidrogênio diferentemente das outras amostras, apresenta a característica de não ser mais detectado a partir de 24 horas, porém, continua reduzindo a carga bacteriana.

A influência das concentrações mínimas de peróxido de hidrogênio, formol e hipoclorito de sódio na redução total de bactérias, mostra que esses agentes conservantes possuem altos percentuais de redução principalmente a partir de 24 horas e que quanto mais sensível for o método utilizado melhor será a determinação dessas concentrações, dado que, quanto mais baixos forem os limites de detecção mais qualidade este alimento terá e maiores serão as chances dessa fraude não chegar até o consumidor.

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de normas que possam suprir as brechas que a legislação apresenta em relação ao leite, visto que, o tempo de estocagem do leite contempla o prazo de até 48 horas e que durante esse tempo algumas substâncias se degradam podendo passar despercebidas em análises de rotina e que pesquisas em relação aos testes rápidos favorece a determinação de contaminantes no leite.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C. S.; SILVA, J. B. A. Fraude em Leite: Métodos de Detecção e Implicações para o Consumidor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 244-51, São Paulo- SP, 2014.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B. PENTEADO, M. D. V. C. Ciências Farmacêuticas. Vigilância Sanitária: **Tópicos sobre Legislação e Análise de Alimentos**. Guanabara e Koogan, 203p., Rio de Janeiro- RG, 2007.
- ANVISA. Resolução RDC nº 35, de 3 de junho de 2008. Dispõe Sobre Conservantes Permitidos para Produtos Saneantes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, nº 105, Brasília- DF, 2008.
- ANVISA. **Esclarecimentos Sobre os Riscos à Saúde das Substâncias Ureia e Formol e sua Adição ao Leite**. Informe técnico Nº 53, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA**. 154 p. Aprovado pelo Decreto nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1950.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA**. 154 p. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1952.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – R.I.I.S.P.O.A.** Aprovado pelo decreto n 30691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto 1255 de 25 de junho de 1962. Alterado pelo Decreto 2244 de 04/06/1997. Brasília-DF. 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Portaria nº 146 de 07 de março 1996. **Regulamento Técnico para fixação da Identidade e Qualidade do Leite UHT**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68, de 12 dezembro de 2006. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e Produtos lácteos. Departamento de Inspeção de Produto de Origem Animal**. Brasília-DF. 2006.
- BRASIL, 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, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Deflagrada Fraude em Leite em Santa Catarina**, 2014.

BRASIL, Instrução Normativa no 7 de 03 de maio de 2016. 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. 84, p.11, 2016.

BRASIL, Instrução Normativa no 76/77 de 26 de novembro de 2018. 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. 230, p.10, 2018.

BRITO, P. V. A. M; LANGE, C. C. Resíduos de Antibióticos no Leite. **Comunicado técnico, 44 EMBRAPA**, v.1, ed.1, p. 1-3, Juiz de Fora- MG-2005.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; ALCÂNTRA, L. A. P.; BONOMO, R. C. F. Métodos de Detecção de Fraude em Leite por Adição de Soro de Queijo. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1-7, 2007.

CHOULIARA, E.; GEORGOGIANNI, K. G.; KANELLOPOULOU, N.; KONTOMINAS, M. G. Effect of Ultrasonication on Microbiological, Chemical and Sensory Properties of Raw, Thermized and Pasteurized Milk. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 307–313, 2010.

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

DA REDAÇÃO. Leite Com Formol, Soda Cáustica e Água Oxigenada foi Vendido em SP. **Veja**, São Paulo- SP, 2014.

DÜRR, J.W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: Uma Oportunidade Única. In: DÜRR, J.W., CARVALHO, M.P., SANTOS, M.V. **O Compromisso com a Qualidade do Leite**. Editora UPF, p. 38-55, Passo Fundo- RS, 2004.

DÜRR, J.W. Como Produzir Leite de Qualidade. 4. ed. **SENAR**, Brasília- DR, 2012.

FAGUNDES C. M. Persistência de Antibióticos no Leite Bovino e em Condições Experimentais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, p. 27-30, 1981.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Faostat: statistics division**, 2016.

FURTADO, M. A. M. Palestra: Fraudes em Leite de Consumo. **I Simpósio de Qualidade do Leite e Derivados**, UFRJ, Seropédica, Rio de Janeiro- RJ, 2010.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; GONÇALVES, T. M.; FERREIRA SOUZA, J. J.; 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, Garanhuns- PE, 2009.

G1. **Depoimentos Revelam Como Funcionava Fraudes no Leite.** Globo.com, 2007.

GASQUES, J. G.; BASTOS, E. T.; TUBINO, M. A. A.; ARAUJO, W. V. Brasil Projeções do Agronegócio 2019/2020 a 2029/2030. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. 11 ed., p. 6-11, Brasília-DF, 2020.

GOULART, V. C, BOTELHO, L. F. R., OLIVEIRA, R. S, FERREIRA, M. A. Comparação de Métodos Qualitativos para a Detecção de Peróxido de Hidrogênio em Leite Cru e UHT. **Revista do COLMEIA**. v. 1, nº.1, p. 51-60, 2019.

GRIZZOTTI, G. **Leite é Adulterado com Produto Cancerígeno no Rio Grande do Sul.** Jornal Hoje, 2013.

JAMAS, L. T.; SALINA, A.; ROSSI, R.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Parâmetros de Qualidade do Leite Bovino em Propriedades de Agricultura Familiar. **Revista Pesquisa Veterinária Brasil**, p. 573-578, 2018.

JENSEN, R. G. **Handbook of Milk Composition**, ed.; Academic Press, p. 115-221. New York, 1995.

LAUDA, D. P.; ROCCO, J. A. F. F. Estudo de um Sistema de Injeção Bi-propelente do Tipo Swirl Usando Querosene e Peróxido de hidrogênio como Oxidante. **Anais do 13º Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do ITA- XIII ENCITA**, São Jose dos Campos- SP, 2007.

MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D. Contagem Bacteriana Total (CBT) – 2016. **Mapa da Qualidade do Leite**. v. 2, 42 p. Piracicaba- SP, 2016.

MAREZE, J.; MARIOTO, L. R. M.; GONZAGA, N.; DANIEL, G. C.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Detecção de Adulterações do Leite Pasteurizado por Meio de Provas Oficiais: Detection of Pasteurized Milk Adulteration Through Official Methods. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1, p.283-290, Londrina- PR, 2015.

MENEZES, M. F. C; SIMEONI, C. P; ETCHEPARE, M. A; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e Conservação do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental-REGET**, v.1, p. 76-89, 2014.

MILHORANCE, F. **Não é só com Carne: Leite com Ureia e Óleo em vez de Azeite Estão Entre Fraudes de Alimentos no Brasil.** BBC, Londres, 2017.

MILLOGO, V.; SVENNERSTEN, K. S.; OUÉDRAOGO, G.A.; AGENÄS, S. Raw Milk Hygiene at Farms, Processing Units and Local Markets in Burkina Faso. **Food Control**, v. 21, p. 1070–1074, 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, Chicago, 2012.

NASCIMENTO, J.S. Introdução à microbiologia. **Biologia de Microrganismos**. v.1, p. 263-353, 2010.

NÖRNBERG, M. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; EDUARDO C TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic Activity Among Psychrotrophic Bacteria Isolated from Refrigerated Raw Milk. **International Journal of Dairy Technology**. v. 63, N. 1, 2010.

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

OLIVEIRA, C.A.F., FONSECA, L.F.L., GERMANO, P.M.L. Aspectos Relacionados à Produção, que Influenciam a Qualidade do Leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p.10-16, São Paulo- SP, 1999.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Artmed, v. 1 e 2, 2005.

PAIVA, C. A. V. Instruções Normativas para Melhoria da Qualidade do Leite no Brasil. **REPILeite: Rede de Pesquisa e Inovação em Leite**. Brasília-DF, 2018.

PEREZ, M. A. F. Validação de Métodos Analíticos: Como Fazer? Por que ela é Importante?. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 22, nº3, p. 1-9, 2010.

PINHEIRO, P. S. **Estudo Sobre a Influência do Tempo de Armazenamento e da Temperatura na Detecção de Formol Adicionado ao Leite**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) — Universidade de Brasília, Brasília- DF, 2016.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica de Leite CRU Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicrótróficas Proteolíticas. **Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 3, p. 645-651, Campinas- SP, 2006.

REIS, F. P. **Estatística Aplicada**. Universidade Federal de Viçosa, 103 f., Viçosa-MG, 2006.

RENTERO, N. **Anuário leite 2019**. EMBRAPA, v.1, ed. 1, p. 2-102. São Carlos-SP, 2019.

REVISTA ADITIVOS INGREDIENTES. **Intolerância a Lactose e Produtos Lácteos com Baixo Teor de Lactose**, 2017.

R.I.I.S.P.O.A. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** – Aprovado pelo decreto n 30691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto 1255 de 25 de junho de 1962. Alterado pelo Decreto 2244 de 04/06/1997. Brasília-DF. 1997

ROSA-CAMPO, A. A., ROCHA, J. E. S., BORGO, L. A., MENDONÇA, M. A. Avaliação Físico-química e Pesquisa de Fraudes em Leite Pasteurizado Integral tipo C Produzido na Região de Brasília, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Distrito Federal- DF, 2011.

SANTOS, S. T. **Avaliação dos Limites de Detecção para Substâncias Antimicrobianas e Redutores de Acidez com Base nos Métodos Qualitativos Oficiais de Análise em Leite**. 43 f., Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Federal de Goiás, Itumbiara- GO, 2019.

SILVA, P. H. F. et al. **Físico-química do Leite e Derivados** – Métodos Analíticos. p.31-35, Juiz de Fora- MG, 1997.

SILVA, A.C.O., HOOD, C.; SILVA, F.E.R.; MÁRSICO, E.T. Detecção de Fraudes em Leite Beneficiado e Verificação dos Métodos Analíticos para Análise de Leite Fluido. **Encontro de Iniciação à Científica**. Prêmio UFF Vasconcelos. Universidade Federal Fluminense, Niterói- RJ, 2010.

SILVA, L. C. C. **Capacidade de Detecção de Adulterações e Suficiência das Provas Oficiais para Assegurar a Qualidade do Leite Pasteurizado**. 96 f., Tese (Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2013.

SIMONAGGIO, D. SANTANA, E. R. R, OLIVEIRA, E. C. Avaliação da eficiência da detecção da fraude por adição de peróxido de hidrogênio no leite, **XXIV Seminário de Iniciação científica** – Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

SOARES, F. A. C. **Composição do Leite: Fatores que Alteram a Qualidade Química**. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 1-7, Porto Alegre- RS, 2013.

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.

SPIGLIATTI, S. **PF Prende 25 pessoas por fraude em leite longa vida**. 2007.

SPINOSA H. S & TÁRRAGA K. M. Considerações Gerais sobre os Antimicrobianos. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. Editora: Guanabara Koogan, 5.ed., p.409-417, Rio de Janeiro- RJ, 2014.

TRONCO, V. M. **Manual Para Inspeção da Qualidade do Leite**. Editora UFSM, Santa Maria- RS, 2008.

VEIGA, V. J. **Criação de Gado Leiteiro na Zona Bragantina**. EMBRAPA, v.1, ed.1, p.12-149. Belém-PA, 2006.

VIDAL, A. N. C e NETTO, A. S. **Obtenção e Processamento do Leite e Derivados**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 220 p. São Paulo- SP, 2018.

VILELA, D; RESENDE, J. C.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A Evolução do Leite no Brasil em Cinco Décadas. **Revista de Política Agrícola**. V. 1, ed.1, p.5-24, 2017

APÊNDICE A – Resultados completos da CT de bactérias

Resultados da Contagem Total de bactérias (CT) do leite sem Peróxido (Branco) e fraudado (P1, P2 e P3).												
Repetição	Branco			P1			P2			P3		
	Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48
1	550000,0	4500000,0	455000000,0	490000,0	4000000,0	4030000,0	425000,0	1010000,0	1160000,0	300000,0	675000,00	145000,00
2	520000,0	4800000,0	450000000,0	480000,0	4000000,0	4000000,0	435000,0	980000,0	1100000,0	310000,0	685000,00	155000,00
3	560000,0	4300000,0	460000000,0	500000,0	4500000,0	4080000,0	422000,0	1050000,0	1180000,0	305000,0	660000,00	140000,00
Soma	1630000,00	13600000,00	1365000000,00	1470000,00	12500000,00	12110000,00	1282000,00	3040000,00	3440000,00	915000,00	2020000,00	440000,00
Média	543333,3	4533333,3	455000000,00	490000,0	4166666,6	4036666,6	427333,3	1013333,3	1146666,6	305000,0	673333,33	146666,67
DP	20816,66	251661,15	5000000,00	10000,00	288675,13	40414,52	6806,86	35118,85	41633,32	5000,00	12583,06	7637,63
CV	3,83%	5,55%	1,10%	2,04%	6,93%	1,00%	1,59%	3,47%	3,63%	1,64%	1,87%	5,21%

Resultados da Contagem Total de bactérias (CT) do leite sem Formol (Branco) e fraudado (F1, F2 e F3).												
Repetição	Branco			F1			F2			F3		
	Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48
1	550000,00	4500000,00	455000000,00	470000,00	160000,00	675000,00	430000,00	30000,00	335000,00	400000,00	17500,00	25000,00
2	520000,00	4800000,00	450000000,00	440000,00	140000,00	655000,00	400000,00	25000,00	350000,00	450000,00	16500,00	24000,00
3	560000,00	4300000,00	460000000,00	500000,00	170000,00	690000,00	450000,00	30000,00	345000,00	380000,00	18000,00	27000,00
Soma	1630000,00	13600000,00	1365000000,00	1410000,00	470000,00	2020000,00	1280000,00	85000,00	1030000,00	1230000,00	52000,00	76000,00
Média	543333,33	4533333,33	455000000,00	470000,00	156666,67	673333,33	426666,67	28333,33	343333,33	410000,00	17333,33	25333,33
DP	20816,66	251661,15	5000000,00	30000,00	15275,25	17559,42	25166,11	2886,75	7637,63	36055,51	763,76	1527,53
CV	3,83%	5,55%	1,10%	6,38%	9,75%	2,61%	5,90%	10,19%	2,22%	8,79%	4,41%	6,03%

Resultados da Contagem Total de bactérias (CT) do leite sem Hipoclorito (Branco) e fraudado (H1, H2 e H3).												
Repetição	Branco			H1			H2			H3		
	Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48
1	550000,0	4500000,0	455000000,0	545000,0	3050000,0	400000000,0	550000,0	2950000,0	145000000,0	540000,0	2900000,0	105000000,0
2	520000,0	4800000,0	450000000,0	500000,0	3000000,0	420000000,0	500000,0	3000000,0	140000000,0	520000,0	3000000,0	100000000,0
3	560000,0	4300000,0	460000000,0	510000,0	3100000,0	390000000,0	580000,0	3000000,0	155000000,0	550000,0	2950000,0	118000000,0
Soma	1630000,00	13600000,00	1365000000,00	1555000,00	9150000,00	1210000000,00	1630000,00	8950000,00	440000000,00	1610000,00	8850000,00	323000000,00
Média	543333,3	4533333,3	455000000,0	518333,3	3050000,0	403333333,3	543333,3	2983333,3	146666666,6	536666,6	2950000,0	107666666,6
DP	20816,66	251661,15	5000000,00	23629,08	50000,00	15275252,32	40414,52	28867,51	7637626,16	15275,25	50000,00	9291573,24
CV	3,83%	5,55%	1,10%	4,56%	1,64%	3,79%	7,44%	0,97%	5,21%	2,85%	1,69%	8,63%

APÊNDICE B – Valores das contagens em % de redução em relação ao Branco (leite sem conservadores)

% de redução na CT de bactérias dos conservadores comparados com o branco nos respectivos tempos de plaqueamento									
Repetição	P1			P2			P3		
	Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
1	-10,9091	-11,1111	-99,1143	-22,7273	-77,5556	-99,7451	-45,4545	-85,0000	-99,9681
2	-7,6923	-16,6667	-99,1111	-16,3462	-79,5833	-99,7556	-40,3846	-85,7292	-99,9656
3	-10,7143	4,6512	-99,1130	-24,6429	-75,5814	-99,7435	-45,5357	-84,6512	-99,9696
Média	-9,7719	-7,7089	-99,1128	-21,2388	-77,5734	-99,7480	-43,7916	-85,1268	-99,9678
DP	1,8036	11,0587	0,0016	4,3440	2,0010	0,0066	2,9508	0,5501	0,0020

% de redução na CT de bactérias dos conservadores comparados com o branco nos respectivos tempos de plaqueamento									
Repetição	F1			F2			F3		
	Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
1	-14,5455	-96,4444	-99,8516	-21,8182	-99,3333	-99,9264	-27,2727	-99,6111	-99,9945
2	-15,3846	-97,0833	-99,8544	-23,0769	-99,4792	-99,9222	-13,4615	-99,6563	-99,9947
3	-10,7143	-96,0465	-99,8500	-19,6429	-99,3023	-99,9250	-32,1429	-99,5814	-99,9941
Média	-13,5481	-96,5248	-99,8520	-21,5127	-99,3716	-99,9245	-24,2924	-99,6163	-99,9944
DP	2,4898	0,5231	0,0022	1,7373	0,0944	0,0021	9,6907	0,0377	0,0003

% de redução na CT de bactérias dos conservadores comparados com o branco nos respectivos tempos de plaqueamento									
Repetição	H1			H2			H3		
	Tempo em horas			Tempo em horas			Tempo em horas		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
1	-0,9091	-32,2222	-12,0879	0,0000	-34,4444	-68,1319	-1,8182	-35,5556	-76,9231
2	-3,8462	-37,5000	-6,6667	-3,8462	-37,5000	-68,8889	0,0000	-37,5000	-77,7778
3	-8,9286	-27,9070	-15,2174	3,5714	-30,2326	-66,3043	-1,7857	-31,3953	-74,3478
Média	-4,56	-32,54	-11,32	-0,09	-34,06	-67,78	-1,20	-34,82	-76,35
DP	4,06	4,80	4,33	3,71	3,65	1,33	1,04	3,12	1,79