



UNICEPLAC
CENTRO UNIVERSITÁRIO

Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC
Curso de Medicina Veterinária
Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da eficácia de protocolos oficiais, kit para detecção de antibióticos e qualidade físico-química de leites intencionalmente fraudados.

Gama-DF
2024

Gabriel Kieling Carballo

Avaliação da eficácia de protocolos oficiais, kit para detecção de antibióticos e qualidade físico-química de leites intencionalmente fraudados.

Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC.

Orientadora: Prof.^a Dra. Stefania Márcia de Oliveira Souza

Gama-DF
2024

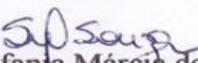
GABRIEL KIELING CARBALLO

Avaliação da eficácia de protocolos oficiais, kit para detecção de antibióticos e qualidade físico-química de leites intencionalmente fraudados.

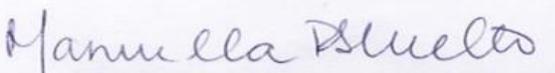
Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC.

Gama-DF, 02 de Julho de 2024.

Banca Examinadora


Prof. Dra. Stefania Márcia de Oliveira Souza
Orientadora


Prof. Margaret Medeiros
Examinador


Prof. Manuella Rodrigues de Souza Mello Examinador

Avaliação da eficácia de protocolos oficiais, kit para detecção de antibióticos e qualidade físico-química de leites intencionalmente fraudados.

Gabriel Kieling Carballo¹
Stefania Márcia de Oliveira Souza²

Resumo:

A fraude no leite é um problema que compromete a qualidade e segurança da matéria prima e consequentemente o produto final comercializado. Este trabalho avaliou a eficácia de testes físico-químicos oficiais, de lactofermentação, específicos para detecção de fraudes e de antibióticos em fraudes intencionais em diferentes tipos de leite UHT (integral, semidesnatado, desnatado e zero lactose), usando amido, bicarbonato de sódio, hipoclorito de sódio P.A. e Penicilina G em cinco tratamentos com concentrações distintas. Os testes específicos foram eficazes para detectar as fraudes, exceto para hipoclorito de sódio P.A em concentrações menores que 1%. O método de acidez titulável em Dornic foi ineficaz para amido e Penicilina G, enquanto o método de densidade relativa a 15°D teve resultados insatisfatórios para hipoclorito e antibióticos. O teste de lactofermentação não detectou coágulos, mas mostrou espessamento com amido e mudança de cor com hipoclorito de sódio P.A acima de 2,0%. Em suma, embora alguns métodos específicos sejam eficazes na detecção de fraudes, há limitações significativas para testes físico-químicos que devem ser considerados complementares, devido a sua baixa sensibilidade a fraudes em concentrações reduzidas.

Palavras-chave: Fraude em leite; Qualidade do leite; Análise físico-química.

Abstract:

Milk fraud is a problem that compromises the quality and safety of the raw material and, consequently, the final product sold. This study evaluated the effectiveness of official physicochemical tests, lactofermentation tests, specific tests for detecting fraud and antibiotics in intentional fraud in different types of UHT milk (whole, semi-skimmed, skimmed and zero lactose), using starch, sodium bicarbonate, sodium hypochlorite P.A. and Penicillin G in five treatments with different concentrations. The specific tests were effective in detecting fraud, except for sodium hypochlorite P.A. at concentrations of less than 1%. The Dornic titratable acidity method was ineffective for starch and Penicillin G, while the relative density method at 15°D had unsatisfactory results for hypochlorite and antibiotics. The lactofermentation test did not detect clots, but showed thickening with starch and color change with sodium hypochlorite P.A above 2.0%. In short, although some specific methods are effective in detecting fraud, there are significant limitations to physicochemical tests which should be considered complementary, due to their low sensitivity to fraud at low concentrations.

Keywords: Milk fraud; Milk quality; Physicochemical analysis.

¹Graduando do Curso Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - Uniceplac. E-mail: gabrielkieling.gkc@gmail.com.

² Professora Doutora do Curso Medicina Veterinária do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - Uniceplac. E-mail: stefania.souza@uniceplac.edu.br.

1 INTRODUÇÃO

O termo "leite" refere-se ao produto resultante da ordenha completa e ininterrupta de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas, em condições higiênicas adequadas. Estes cuidados com o leite cru bovino abrangem o manejo do gado leiteiro, os procedimentos de ordenha, conservação e transporte, visando garantir a qualidade do produto (BRASIL, 2020).

Segundo o Anuário Leite (2021), o leite é reconhecido por sua riqueza em nutrientes, proteínas, sais minerais e gorduras, o que tem impulsionado sua produção e estimulado um cuidado especial com sua qualidade. Para atender à demanda crescente de leite e expandir os mercados, é essencial que todos os elos da cadeia produtiva sejam qualificados, garantindo assim a produção segura e de qualidade dos alimentos (BRASIL *et al.*, 2013).

O leite UHT (Ultra High Temperature), representando aproximadamente 62% do consumo total no Brasil, é submetido a um processo térmico rigoroso e envasado em condições estéreis. Este tipo de leite é responsável por 87% do volume de leite comercializado na forma líquida e constitui 28% do destino do leite formalmente produzido no país, estando presente em 90% dos lares (ANUÁRIO LEITE, 2021).

De acordo com a Portaria nº 370/1997 do MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária), a denominação de venda do leite UHT se justifica quando o mesmo passa pelo processo de homogeneização, tratamento térmico de 2 a 4 segundos a uma temperatura entre 130°C e 150°C, sendo imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado em condições assépticas em embalagens estéreis e herméticas. A embalagem deve conter em seu rótulo, também, o teor de gordura presente no produto após passar pelo processo de padronização, podendo ser classificado como integral, semidesnatado ou desnatado, para isso requer níveis mínimos de 3g/100g para leite integral, semidesnatado de 0,6 a 2,9g/100g e desnatado no máximo 0,5g/100g (BRASIL, 1997).

Ademais, existe um novo mercado em expansão voltado para indivíduos com diferentes graus de intolerância à lactose, quadro que ocorre pela insuficiência ou ausência da enzima lactase e que impede a digestão correta do dissacarídeo lactose. Isso demonstra a importância de atender essa parcela da população desenvolvendo produtos zero lactose e pesquisas que promovam maior conhecimento sobre a qualidade destes alimentos (SILVA, 2016).

A Instrução Normativa nº 77/2018 do MAPA estabelece como obrigação a análise laboratorial de cada compartimento do tanque presente no veículo de transporte no momento de recebimento do leite, analisando não só os aspectos físico - químicos do leite fluido cru, mas também a presença de neutralizantes de acidez, reconstituíntes de densidade ou índice crioscópico, e substâncias conservadoras (BRASIL, 2018). Para isso, o MAPA possui um manual oficial que contém protocolos analíticos para controle de qualidade do leite e produtos lácteos (BRASIL, 2018). Nele estão descritos os métodos de análise propostos para detectar diferentes tipos de adulterantes, conservantes e contaminantes (BRASIL, 2019).

Outro aspecto com impacto industrial e na saúde do consumidor está na presença de antibióticos em leite fluído utilizado não somente para tratamentos em rebanhos leiteiros, mas também adicionado para mascarar contaminação microbiana na matéria-prima comercializada (BRITO e LANGE, 2005). A importância de avaliar a presença de antibióticos no leite está em seu impacto industrial por dificultar/inviabilizar a produção de derivados como queijos, iogurtes e outros produtos fermentados, podendo também impactar na qualidade final do derivado. Além disso, a pasteurização realizada no leite tem pouca ou nenhuma eficiência na eliminação destes resíduos, logo é um risco a comercialização deste produto, tendo em vista que este resíduo de antibiótico presente no leite pode desencadear quadros alérgicos ou de intoxicação em seus consumidores. (BRITO e LANGE, 2005)

De acordo com Francis (1989) a eliminação de antibióticos no leite a partir de administração parenteral varia pelo tipo de antibiótico utilizado, sendo aminoglicosídeos e ceftiofur classificados como baixa eliminação, sulfonamidas, penicilinas e tetraciclina classificadas como média eliminação e princípios ativos como tilosina, eritromicina e enrofloxacina classificados como alta eliminação. Além disso, no Brasil, a Instrução Normativa nº 162/2022 estabelece o limite máximo de resíduos (LMR) de insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal e a concentração máxima descrita para Benzilpenicilina/Benzilpenicilina Procaína no leite bovino e caprino é de 4 mcg/L, valor bem abaixo dos demais antibióticos descritos para controle na legislação (BRASIL, 2022).

Com base no exposto, esta pesquisa objetivou avaliar a eficácia dos testes oficiais de

detecção de fraudes e seu impacto sobre os padrões de acidez titulável, densidade e lactofermentação em leites UHT integral, semidesnatado, desnatado e zero lactose intencionalmente fraudados com amido, bicarbonato de sódio, cloro/hipoclorito e Penicilina G em diferentes concentrações.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção, acondicionamento e transportes do leite

Foram adquiridos 12 litros de leite integral, Semidesnatado, Desnatado e Zero-lactose, da mesma marca e lote, em um estabelecimento comercial do Distrito Federal. Estes foram transportados em suas próprias embalagens até o laboratório de análises físico-químicas do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC.

2.2 Análises de densidade, acidez titulável e lactofermentação

As amostras previamente fraudadas foram submetidas ao método oficial de análise de acidez titulável e densidade a 15°C, com base no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal do MAPA (BRASIL, 2019).

Os valores obtidos foram comparados aos estabelecidos pelo RIISPOA (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal), o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 (BRASIL, 2017).

Também foi realizado o teste de lactofermentação, adicionando 10 mL do leite fraudado em tubos de ensaio estéreis e incubados a 37°C por 24 horas (BEHMER, 1999).

2.3 Testes de detecção de fraude

Para a realização do teste de detecção de amido foi utilizada a solução lugol (iodo + iodeto de potássio). Após a fervura de 5mL do leite fraudado e seu resfriamento em água quente, foram acrescentadas 5 gotas de solução lugol, a coloração azul apresentada na solução é indicativo de fraude por amido (PEREIRA *et al.*, 2001).

Para a detecção de bicarbonato de sódio foi utilizada uma solução de álcool-éter acetona (11mL de éter + 7mL de álcool + 0,1 mL de acetona) que ao ser adicionada ao leite deveria desestabilizar a solução resultando na formação de grumos, o não aparecimento de grumos e a obtenção de uma solução homogênea semitransparente é indicativo de fraude por Bicarbonato de sódio. Assim, foi adicionado em um tubo de ensaio 5mL da solução e 5mL de leite previamente

fraudado para obtenção dos resultados (PEREIRA *et al.*, 2001).

Na realização dos testes de detecção de hipoclorito foi utilizado o iodeto de potássio a 10%, que ao reagir com o hipoclorito presente no leite fraudado promove o desenvolvimento de coloração alaranjada, resultado da liberação de iodo. Por isso, foi adicionado 1ml de cada tratamento juntamente com 1 ml de iodeto de potássio a 10% em tubos de ensaio, onde foram novamente homogeneizados para observação da coloração formada e obtenção dos resultados (PEREIRA *et al.*, 2001).

Na realização dos testes de detecção de antibióticos foi utilizado o Kit Trisensor, da marca (Unisensor ®). Trata-se de um teste imunoenzimático que é capaz de detectar todos os compostos das três principais famílias de antibióticos, sendo elas: Beta-lactâmicos, Tetraciclinas e Sulfonamidas. As amostras de leite fraudadas com Penicilina G em diferentes concentrações, foram homogeneizadas individualmente e adicionadas a microtubos de teste, seguidas de incubação a 40°C por três minutos. Depois, as fitas reativas foram adicionadas e incubadas por mais três minutos. Ao final do processo as fitas foram analisadas conforme orientação do fabricante.

2.4 Protocolo com amido, bicarbonato de sódio, hipoclorito e Penicilina G

As soluções foram preparadas em diferentes concentrações de amido, bicarbonato de sódio e hipoclorito dando origem a cinco tratamentos. A solução inicial do tratamento (T0) é composta somente por leite UHT Integral, Semidesnatado, Desnatado ou Zero lactose (controle negativo), e os demais tratamentos nas concentrações 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% de cada fraude (solução de leite UHT + amido e solução de leite UHT + bicarbonato e solução de leite UHT + hipoclorito).

Para realização da fraude intencional com Penicilina G foram utilizadas as concentrações 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005% e 0,006%, além da solução controle negativo (T0). Vale salientar que o tratamento T1 (0,002% = 4.000 ui/L) representa o limite máximo de resíduo de Penicilina G aceito no leite cru bovino, no Brasil.

Os tratamentos correspondem a T1, T2, T3, T4, T5, respectivamente, conforme descritos nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1. Composição dos tratamentos adicionados com Amido para cada tipo de leite utilizado.

Tratamentos	Diluição	Solução Leite + Amido Teste de Acidez Dornic	Solução Leite + Amido Teste de Densidade
T0	-	50ml de leite	500ml de leite
T1	0,1%	49,95 mL de leite + 0,05 g de Amido	499,5 mL de leite + 0,5 g de Amido
T2	0,5%	49,75 mL de leite + 0,25 g de Amido	497,5 mL de leite + 2,5 g de Amido
T3	1,0%	49,50 mL de leite + 0,50 g de Amido	495,0 mL de leite + 5,0 g de Amido
T4	2,0%	49 mL de leite + 1,0 g de Amido	499,0 mL de leite + 10,0 g de Amido
T5	5,0%	47,5 mL de leite + 2,5 g de Amido	475,0 mL de leite + 25,0 g de Amido

Fonte: Do autor, 2024.

Tabela 2. Composição dos tratamentos adicionados com Bicarbonato de sódio para cada tipo de leite utilizado.

Tratamentos	Diluição	Solução Leite + Bicarbonato de Sódio Teste de Acidez Dornic	Solução Leite + Bicarbonato de Sódio Teste de Densidade
T0	-	50ml de leite	500ml de leite
T1	0,1%	49,95 mL de leite + 0,05 g de Bicarbonato de Sódio	499,5 mL de leite + 0,5 g de Bicarbonato de Sódio
T2	0,5%	49,75 mL de leite + 0,25 g de Bicarbonato de Sódio	497,5 mL de leite + 2,5 g de Bicarbonato de Sódio
T3	1,0%	49,50 mL de leite + 0,50 g de Bicarbonato de Sódio	495,0 mL de leite + 5,0 g de Bicarbonato de Sódio
T4	2,0%	49,0 mL de leite + 1,0 g de Bicarbonato de Sódio	499,0 mL de leite + 10,0 g de Bicarbonato de Sódio
T5	5,0%	47,5 mL de leite + 2,5 g de Bicarbonato de Sódio	475,0 mL de leite + 25,0 g de Bicarbonato de Sódio

Fonte: Do autor, 2024.

Tabela 3. Composição dos tratamentos adicionados com Hipoclorito de Sódio para cada tipo de leite utilizado.

Tratamentos	Diluição	Solução Leite + Hipoclorito de Sódio Teste de Acidez Dornic	Solução Leite + Hipoclorito de Sódio Teste de Densidade
T0	-	50ml de leite	500ml de leite
T1	0,1%	49,95 mL de leite + 0,05 ml de Hipoclorito de Sódio	499,5 mL de leite + 0,5 ml de Hipoclorito de Sódio
T2	0,5%	49,75 mL de leite + 0,25 ml de Hipoclorito de Sódio	497,5 mL de leite + 2,5 ml de Hipoclorito de Sódio
T3	1,0%	49,50 mL de leite + 0,50 ml de Hipoclorito de Sódio	495,0 mL de leite + 5,0 ml de Hipoclorito de Sódio
T4	2,0%	49,0 mL de leite + 1,0 ml de Hipoclorito de Sódio	499,0 mL de leite + 10,0 ml de Hipoclorito de Sódio
T5	5,0%	47,5 mL de leite + 2,5 ml de Hipoclorito de Sódio	475,0 mL de leite + 25,0 ml de Hipoclorito de Sódio

Fonte: Do autor, 2024.

Tabela 4. Composição dos tratamentos adicionados com Penicilina G para cada tipo de leite utilizado.

Tratamentos	Diluição	Solução Leite + Penicilina G Teste de Acidez Dornic	Solução Leite + Penicilina G Teste de Densidade
T0	-	50ml de leite	500ml de leite
T1	0,002%	49,999 mL de leite + 0,001 ml de Penicilina G	499,99 mL de leite + 0,01 ml de Penicilina G
T2	0,003%	49,9985 mL de leite + 0,0015 ml de Penicilina G	499,985 mL de leite + 0,015 ml de Penicilina G
T3	0,004%	49,998 mL de leite + 0,002 ml de Penicilina G	499,97 mL de leite + 0,02 ml de Penicilina G
T4	0,005%	49,9975 mL de leite + 0,0025 ml de Penicilina G	499,975 mL de leite + 0,025 ml de Penicilina G
T5	0,006%	49,997 mL de leite + 0,003 ml de Penicilina G	499,97 mL de leite + 0,03 ml de Penicilina G

Fonte: Do autor, 2024.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstram que amostras fraudadas com Amido produziram alterações discretas e distintas no leite integral e no leite zero lactose no teste de acidez titulável. Quando comparado aos resultados do teste controle (CT), a variação dos resultados se

mantiveram entre 0,5 a 1,5°D, no caso do leite integral reduzindo de 16,5°D para 15,0°D e no leite zero lactose aumentando de 15,0°D para 16,5°D, resultados ainda dentro dos padrões. Os tratamentos realizados com leite semidesnatado e desnatado apresentaram alterações ainda mais discretas, apenas em T5, conforme demonstra a tabela 5.

No teste de densidade relativa a 15°C, levando em conta as peculiaridades de cada tipo de leite utilizado para a realização dos tratamentos, todos obtiveram um acréscimo significativo de densidade ao serem fraudados com amido. Vale salientar que todos os tipos de leite apresentaram ao menos um tratamento com valores de densidade relativa acima do que é estipulado pela regulamentação. Além disso, o leite desnatado e o leite zero lactose apresentaram valores de densidade relativa acima dos valores de referência no T0 (controle negativo) e com a adição do amido no T5 não foi possível mensurar o valor utilizando-se do termolactodensímetro devido ao aumento excessivo de densidade.

Com relação ao teste de detecção específico para o amido, todos os tratamentos responderam positivamente, com exceção do T0. Ademais, no teste de lactofermentação, apenas os tratamentos T0 e T1 não tiveram alterações em sua composição, nos tratamentos de T2 - T5 de todos os tipos de leite foi observada mudança acentuada na conformação do leite incubado, tendo estes aspecto mais espesso, porém sem formação de gás, desta forma não sendo indicativo de contaminação por coliformes, que implicaria na formação de coágulo gelatinoso e gás.

Os tratamentos produzidos com adição de Bicarbonato de Sódio apresentaram duplo padrão de resposta aos testes de acidez titulável. Todos os tipos de leite apresentaram redução da acidez nos tratamentos iniciais, com exceção do leite zero lactose que manteve T1 igual ao T0.

Nos tratamentos T2-T5 (T3-T5 no leite integral) houve um aumento acentuado e constante da acidez, sendo que todos os leites apresentaram valores acima do estipulado pela legislação em ao menos dois tratamentos. Dentre eles, podemos salientar que o leite zero lactose obteve mais resultados acima do padrão (14°D - 18°D), valores iguais ou maiores a 20°D para T2-T5.

Além disso, no teste de densidade relativa a 15°C, todos obtiveram um acréscimo significativo de densidade ao serem fraudados com bicarbonato de sódio. Vale salientar que todos os tipos de leite apresentaram ao menos três tratamentos com valores de densidade relativa acima do que é estipulado pela regulamentação. Além disso, o leite desnatado e o leite zero lactose

apresentaram valores de densidade relativa acima dos valores de referência a partir do T1 e com a adição do bicarbonato de sódio nos tratamentos T4-T5 não foi possível mensurar o valor utilizando-se do termolactodensímetro em nenhum dos tipos de leite avaliados.

Para os testes de detecção do bicarbonato de sódio, apenas os tratamentos T0 e o tratamento T1 do leite integral apresentaram presença de grumos indicando ausência de fraude, já em relação a formação de uma solução homogênea semi-transparente o resultado foi menos evidente ao utilizar-se o leite zero lactose, em comparação aos demais leites testados. No teste de lactofermentação, todos os tratamentos realizados permaneceram inalterados após o processo de incubação, indicando ausência de contaminação ou, possivelmente, neutralização das bactérias presentes.

Os testes de acidez titulável das fraudes de hipoclorito obtiveram valores iguais ou muito próximos ao T0 para os tratamentos até T3, enquanto que acima dessa concentração foi observado uma redução considerável da acidez, obtendo valores iguais ao mínimo (14°D) ou menores, com uma redução de até 3,0 °D do T4 para o T5, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5. Resultados da avaliação de acidez titulável em graus Dornic por fraude e concentração para cada tipo de leite UHT

Padrão Dornic °D	Amido				Bicarbonato de Sódio				Hipoclorito			
	14°D - 18°D				14°D - 18°D				14°D - 18°D			
Tratamento	I	SD	D	ZL	I	SD	D	ZL	I	SD	D	ZL
T0	16,5	16,0	15,0	15,0	14,5	15,0	15,0	15,5	15,0	15,0	15,0	15,5
T1	16,5	16,0	15,0	15,0	13,5	14,0	14,5	15,5	15,0	15,0	14,5	15,0
T2	15,5	16,0	15,0	16,0	13,5	15,0	16,5	20,0	14,5	15,0	14,0	15,0
T3	15,5	16,0	15,0	16,0	15,0	18,5	19,0	22,5	14,0	15,0	14,0	15,0
T4	15,5	16,0	15,0	16,0	20,0	28,0	30,0	24,0	12,5	14,0	12,0	14,0
T5	15,0	15,5	15,5	16,5	35,0	41,5	51,0	48,0	10,0	11,0	11,0	11,0

Legenda: Leite Integral (I), Leite Semi-desnatado (SM), Leite Desnatado (D), Leite Zero Lactose (ZL).

Fonte: Do autor, 2024.

Tabela 6. Resultados da avaliação de densidade em g/mL por fraude e concentração para cada tipo de leites UHT

Padrão Densidade (g/mL)	Amido				Bicarbonato de Sódio				Hipoclorito			
	1028 g/mL - 1034 g/mL				1028 g/mL - 1034 g/mL				1028 g/mL - 1034 g/mL			
Tratamento	I	SD	D	ZL	I	SD	D	ZL	I	SD	D	ZL
T0	1030,5	1032,8	1034,8	1034,6	1030,4	1032,4	1034,0	1033,6	1030,4	1032,8	1033,6	1033,6
T1	1030,5	1033,0	1034,8	1034,8	1031,0	1033,0	1035,0	1034,6	1030,2	1032,8	1033,4	1033,6
T2	1030,8	1034,8	1035,6	1035,6	1034,0	1036,0	1036,8	1035,6	1030,2	1032,6	1034,4	1034,6
T3	1032,8	1035,8	1036,6	1036,6	1035,0	1037,0	1040,0	1038,6	1030,2	1032,8	1034,4	1033,4
T4	1033,8	1036,8	1039,6	1039,6	>1042,6	>1042,6	>1042,6	>1042,6	1031,0	1032,6	1034,4	1033,6
T5	1039,8	1038,8	>1042,6	>1042,6	>1042,6	>1042,6	>1042,6	>1042,6	1030,0	1032,6	1034,4	1034,4

Fonte: Do autor, 2024.

Já os testes de densidade relativa a 15°C apresentaram alterações muito discretas, tendo em vista que o maior aumento observado foi de 0,8 g/mL no T5 em relação ao T0 no leite desnatado e no leite zero lactose, conforme demonstra a tabela 6.

Na realização da detecção do hipoclorito foi observado que nos tratamentos de T2-T5 houve a mudança de coloração esperada, indicando a presença da fraude, com exceção do T2 no leite integral que não apresentou alteração de cor. Nos tratamentos T1 de todos os tipos de leite também não houve alteração, permanecendo com a coloração natural expressa pelo T0 (controle negativo). Os testes de lactofermentação não apresentaram formação de coágulos, porém, todos os tratamentos T4 e T5 apresentaram coloração em tons alaranjados, o que sugere a adulteração.

Dentre os resultados da fraude intencional com Penicilina G, foi observado que nenhum tratamento apresentou alterações de densidade relativa com a utilização do termolactodensímetro e no teste de acidez titulável os tratamentos se apresentaram discretamente alterados ou inalterados, sendo que o leite zero lactose apresentou a maior alteração com aumento de 1,5 °D do T5 em relação ao controle negativo, ainda mantendo-se dentro do padrão regulamentado.

Tabela 7 - Resultados da avaliação de acidez titulável e densidade para leites UHT fraudados com Penicilina G em diferentes concentrações:

Padrão	Dornic (°D)				Densidade			
	14°D - 18°D				1028 g/mL - 1034 g/mL			
Tratamento	I	SD	D	ZL	I	SD	D	ZL
T0	15,0	16,0	15,0	15,0	1030,2	1033,2	1034,0	1033,2
T1	15,0	16,0	15,0	15,0	1030,2	1033,2	1034,0	1033,2
T2	15,0	16,0	15,0	15,0	1030,2	1033,2	1034,0	1033,2
T3	15,0	16,0	15,0	15,0	1030,2	1033,2	1034,0	1033,2
T4	15,0	16,0	15,0	16,0	1030,2	1033,2	1034,0	1033,2
T5	15,0	16,0	16,0	16,5	1030,2	1033,2	1034,0	1033,2

Fonte: Do autor, 2024.

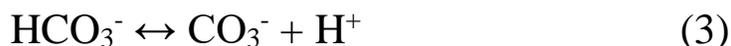
Utilizando-se do kit de detecção de antibióticos foi possível confirmar a presença da Penicilina G em todos os tratamentos intencionalmente fraudados e os tratamentos (T0-T5) se mantiveram inalterados após a realização do teste da lactofermentação, o que sugere que o antibiótico aplicado na fraude intencional foi suficiente para evitar a proliferação microbiana .

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho constatou que o teste de Dornic possui sensibilidade na detecção de fraudes com bicarbonato de sódio e hipoclorito em altas concentrações. Os resultados de Cintra (2019) divergem com os valores encontrados no presente estudo, visto que ao fraudar amostras de Leite Integral UHT em concentrações acima de 1% hipoclorito o autor relata mudanças significativas acidez titulável da amostra em questão, contudo os resultados observados neste trabalho só demonstraram mudanças significativas de acidez titulável em concentrações acima de 2%, para leite integral e desnatado, e 5% para leite semi desnatado e zero lactose.

Contudo, os resultados encontrados no teste de acidez titulável Dornic para os tratamentos realizados com bicarbonato de sódio corroboram com os resultados encontrados no estudo de Cintra (2019) que relata diminuição da acidez em tratamentos com até 0,5% de bicarbonato de sódio e aumento da acidez, utilizando-se do método Dornic, em tratamentos acima de 1% de bicarbonato de sódio.

De acordo com Dias (2009), a adição de CO₂ no leite, por sua dissociação na água contida no leite, forma ácido carbônico e o mesmo se dissocia em ânion bicarbonato e H⁺, como demonstra a Imagem 1. Este mecanismo inibe o desenvolvimento pela substituição do O₂, pela acidificação da solução aquosa formada e por afetar o metabolismo e multiplicação das bactérias contidas na solução.



Reação de dissociação do Dióxido de Carbono em água. Fonte: Autor.

Logo os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que ao adicionar altas concentrações de Bicarbonato de sódio ao leite, após a alcalinização e o tamponamento fraco que o leite apresenta em pH entre 8-9 ao ser alcalinizado, de acordo com Carneiro *et al.* (2021), a dissociação do bicarbonato de sódio na água presente no leite causa a acidificação, pois tem como produto a formação do ácido carbônico.



Reação de dissociação do Bicarbonato de sódio em água. Fonte: Autor.

Em seus estudos, Wanderley *et al.* (2013) relata que ao realizar a fraude intencional no leite utilizando de 0,25% de amido, a solução não sofreu alterações perceptíveis aos métodos analíticos, e ao fraudar com 0,06% de bicarbonato de sódio, a solução não apresentou alterações no teste de densidade relativa. Os resultados do presente estudo reafirmam que baixas concentrações destas duas substâncias não refletem grandes alterações ao mensurar sua densidade, todavia, alterações significativas (maior ou igual a 2g/mL em relação ao T0) já são perceptíveis ao utilizar-se de concentrações maiores de 1% para amido e 0,5% para bicarbonato de sódio.

Além disso, de acordo com Panciere e Ribeiro (2021) a molécula de gordura possui densidade relativa de 0,930 g/cm³, ou seja, menor que a densidade da água, portanto, pequenas

alterações de densidade como as apresentadas nos resultados deste trabalho pela adição de baixas concentrações de amido e bicarbonato de sódio podem facilmente ser confundidas com o resultado obtido pelo desnatado do leite e esta condição só é possível confirmar através de análises complementares, como a mensuração da gordura do leite pelo butirômetro, por exemplo.

De acordo com Fagnani (2022) a apresentação de um leite sem formação de coágulo, como apresentado nos testes por adição de bicarbonato de sódio, hipoclorito de sódio e antibióticos deste estudo, é um forte indicador de adulteração por antibióticos e/ou conservantes, o que corrobora com os resultados obtidos, embora o bicarbonato de sódio não seja um conservante, seus resultados podem ser consequência do tratamento térmico UHT e indicar uma manipulação livre de contaminantes na fabricação do bicarbonato de sódio adicionado.

Em relação a mudança da coloração dos tratamentos T4 e T5, com adição de hipoclorito de sódio, no teste de lactofermentação a literatura não apresenta referências que justifiquem tal reação.

O estudo de Netto *et al.* (2005) realizou o levantamento dos fármacos mais utilizados nos rebanhos leiteiros do Paraná, identificando a penicilina como o medicamento mais frequentemente empregado. Este uso extensivo pode ser atribuído ao seu constante emprego no tratamento de diversas infecções bacterianas comuns em vacas leiteiras, incluindo a mastite, uma inflamação das glândulas mamárias que afeta a produção e a qualidade do leite.

Em Souza *et al.* (2016), os autores relatam que ao analisar bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica em Bocaiuva-MG, os resultados obtidos indicam que o índice de resistência microbiana foi maior na utilização da penicilina G (73%) e a sensibilidade foi maior na utilização da Gentamicina (96%).

Contudo, de acordo com Freitas *et al.* (2005) ao realizar testes de resistência microbiana em fazendas pernambucanas, onde a utilização da gentamicina no tratamento de infecções por mastite no rebanho leiteiro é mais frequente, obteve resultado de alta resistência à gentamicina (97%), o que sugere que uma relação diretamente proporcional na frequência da utilização de um fármaco com o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes ao mesmo.

Estes resultados reforçam a importância da testagem do leite para diferentes classes de antibióticos e alertam sobre a utilização indiscriminada de antibióticos na cadeia de produção de leite

exigindo estratégias eficazes de manejo e uso racional destes fármacos.

O presente trabalho também corrobora com esta visão ao relatar a dificuldade de detecção de resíduos de antibióticos sem a utilização de testes específicos como o método SNAP ou kit de fitas reativas, tendo em vista que testes como o método Dornic de acidez titulável e o teste de densidade relativa a 15° mostraram-se ineficazes.

5 CONCLUSÃO

Os testes específicos de detecção utilizados se mostraram eficazes para as fraudes com amido, Penicilina G e Bicarbonato (com exceção do T1-leite integral) e parcialmente eficaz com hipoclorito para os tratamentos estipulados neste estudo.

Em fraudes com amido e resíduos de antibiótico no leite o método analítico de acidez titulável em Dornic mostrou-se pouco eficaz. Assim como, em fraudes com hipoclorito e resíduos de antibiótico no leite, o método analítico de densidade relativa a 15°D obteve resultados pouco expressivos.

Vale salientar que o duplo padrão obtido na testagem de acidez titulável Dornic dificulta a interpretação do resultado do teste e torna-se importante estudos mais aprofundados sobre esse comportamento de inversão do pH titulável quando a solução é exposta a concentrações maiores de 1% de bicarbonato de sódio.

Neste estudo foi possível observar também que o teste de lactofermentação apenas sofreu alterações nas fraudes com amido por conta do espessamento da solução e do hipoclorito em concentrações acima de 2% por conta da mudança de coloração sofrida, contudo o não aparecimento de coágulos de nenhuma natureza indica a adulteração por conservantes ou antibióticos e os resultados obtidos neste estudo corroboram com os parâmetros de avaliação estipulados para o teste.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a realização dos testes específicos para detecção são eficazes e indispensáveis para a confirmação da presença de fraudes no leite, contudo, certas substâncias em baixas concentrações podem dificultar sua detecção. Testes como acidez titulável Dornic e densidade relativa a 15°D são complementares e apenas indicam possíveis adulterações quando a fraude é realizada em grandes concentrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de Pentead, M. D. V. C. Ciências Farmacêuticas. **Vigilância Sanitária: Tópicos sobre Legislação e Análise de Alimentos**. Rio de Janeiro. Guanabara e Koogan, p. 203, 2007.

ANUÁRIO LEITE 2021. **Saúde única e total**: O conceito saúde única, associado à biossegurança, ganha força na pecuária de leite com a adoção de protocolos que asseguram saúde para o rebanho, para o homem e proteção ao meio ambiente. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2024.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Portaria nº 370 de 4 de setembro de 1997**. Dispõe o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, 08 de setembro, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017**. Dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, 29 de março, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa 76 de 26 de novembro de 2018**. Dispõe os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, 30 de novembro, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – 2. Ed. – Brasília: MAPA, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Decreto 10.468, 18 de agosto de 2020**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem animal. - RIISPOA. Diário Oficial da União: Seção 1, Brasília, DF, n. 104, p.2, 18 de agosto, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Instrução Normativa 162 de 01 de julho de 2022**. Estabelece a ingestão diária aceitável (IDA), a dose de referência aguda (DRfA) e os limites máximos de resíduos (LMR) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, 06 de julho, 2022.

BRASIL, R. B; NICOLAU, E. S; SILVA, M. A.P; LIMA, L. M. P. **Leite Instável Não Ácido e fatores que afetam a estabilidade do leite**. Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO, 2013.

BRITO, M. A. V. P; LANGE, C. C. **Resíduos de antibióticos no leite.** Comunicado Técnico 44. Juiz de Fora, MG, Dezembro, 2005

CARNEIRO, L. C. M; PINTO, C. B. A; GOMES, E. R; PAULA, I. L; POMBO, A. F. W; STEPHANI, R; CARVALHO, A. F; PERRONE, I. **A química e a tecnologia do doce de leite: uma revisão.** Research, Society and Development, v. 10, n. 11, 2021

CINTRA, A. M. **Fraudes Intencionais em Leite Integral UHT:** sensibilidade dos testes físico-químicos Alizarol e Dornic. Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac. Gama-DF, 2019.

DIAS, B. M. **Influência da adição de CO₂ ao leite sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal.** Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2009.

FAGNANI, R. **Conversas sobre leite e derivados.** Londrina- Editora Científica, 2022. FRANCIS,

P. G. **Update on mastitis.** III. Mastitis therapy. Br Vet. 1989.

FREITAS M. F. L; JUNIOR, J. W. P; STAMFORD, T. L. M; RABELO, S. S. A; SILVA, D. R; FILHO, V. M. S; SANTOS, F. G. B; SENA, J; MOTA, R. A. **Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de Staphylococcus coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco.** Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005

MAREZE, J.; MARIOTO, L. R. M.; GONZAGA, N.; DANIEL, G. C.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. **Deteção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 36, n. 1, p.283-290, ago. 2015. Anual.

NETTO, D. P; LOPES, M. O; OLIVEIRA, M. C. S; NUNES, M. P; JUNIOR, M. M; BOSQUIROLI, S. L; BENATTO, A; BENINI, A; BOMBARDELLI, A. L. C; FILHO, D. V; 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, no. 1, p. 145-151, Jan./Março, 2005.

PANCIERE, B. M. ; RIBEIRO, L. F. **Deteção e ocorrência de fraudes no leite fluido ou derivados.** GETEC, v.10, n.26, p.1-17. 2021.

PEREIRA, M. N. ; SCUSSEL, V. M. **Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle.** Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v.16, n.2, p.170-182, 2017.

SCHERER, T. **Verificação quantitativa dos métodos qualitativos oficiais para deteção de fraude em leite.** Centro Universitário Univates, Lageado, dez. 2015.

SILVA, A. C. **Desenvolvimento de doce de leite sem adição de sacarose e sem lactose.** Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2016

SOUZA, K, S, S; OLIVEIRA, Y. C. M; DUARTE, A. F. V; OLIVEIRA, T, C; VELOSO, A, L, C; OLIVEIRA, P, M, C; FERNANDES, N, S, F. **Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica.** Cad. Ciênc. Agrá., v. 8, n. 2, p. 83-89, 2016.

PEREIRA, D. B. C. ; SILVA, P. H. F. da ; COSTA JÚNIOR, L. C. G. ; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite - Métodos analíticos.** 2. ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001. v. 01. 234 p.

WANDERLEY, C. H. ; SILVA, A. C. O. ; SILVA, F. E. R. ; MÁRSICO, E. T. ; JUNIOR, C. A. C. **Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido.** Revista de Ciências da Vida, v. 33, n. 1/2, p. 54- 63, 2013.