

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**INTERFERÊNCIA DOS ADULTERANTES, SACAROSE E AMIDO,
NA ANÁLISE DO LEITE CRU POR ESPECTROSCOPIA PELA
TRANSFORMADA DE FOURIER**

Daniela Cristina Solo de Zaldivar Ribeiro

Belo Horizonte

Escola de Veterinária - UFMG

2017

Daniela Cristina Solo de Zaldivar Ribeiro

**INTERFERÊNCIA DOS ADULTERANTES, SACAROSE E AMIDO,
NA ANÁLISE DO LEITE CRU POR ESPECTROSCOPIA PELA
TRANSFORMADA DE FOURIER**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

BELO HORIZONTE

Escola de Veterinária - UFMG

2017

R484i Ribeiro, Daniela Cristina Solo de Zaldivar, 1973-
Interferência dos adulterantes, sacarose e amido, na análise do leite cru por
espectroscopia pela Transformada de Fourier / Daniela Cristina Solo de Zaldivar Ribeiro.
– 2017.
33 p. : il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Composição – Teses. 3. Fourier, Espectroscopia
por transformada de – Teses. 4. Sacarose – Teses. 5. Amido – Teses. I. Fonseca, Leorges
Moraes da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

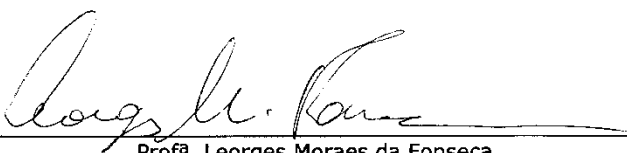
CDD – 637.1

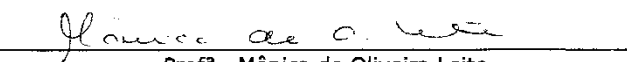
FOLHA DE APROVAÇÃO

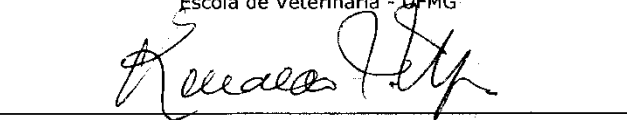
DANIELA CRISTINA SOLO DE ZALDIVAR RIBEIRO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 07 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Profª. Leorges Moraes da Fonseca
Presidente - Orientador


Profª. Mônica de Oliveira Leite
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Renaldo Travassos Martins
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Realizar um sonho, vencer uma etapa proposta no caminho da vida, ou simplesmente se alegrar com a conquista, me enche o coração de gratidão. Quero agradecer a todos que contribuíram para essa realização.

Agradeço ao meu orientador professor Leorges Moraes da Fonseca pelos ensinamentos, pela acolhida e confiança. Aos professores do DTIPOA pela disponibilidade em ensinar e participar do processo, em especial às professoras Mônica Leite, Mônica Pinho, Cláudia Penna e Cléia Ornellas e aos professores Wagner Santos, Ronon Rodrigues e Renaldo Martins. Ao professor João Paulo Haddad pelo grande auxílio nas análises estatísticas. Aos funcionários do LabUFMG pela disponibilidade e generosidade na realização do experimento. Aos funcionários, Maura e Marco, pelo apoio nas análises complementares. Aos funcionários da Fazenda e da Escola pela contribuição. Aos colegas da pós, em especial Wanessa e Juliana, que fizeram do processo algo, também, divertido.

Agradeço o apoio financeiro da FAPEMIG (CVZ-APQ-01179-14), CNPQ (PQ-2 309801/2014-1) e FUNDEP/ Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da EV-UFMG.

Agradeço aos amigos pelo carinho, às amigas que cuidaram dos meus filhos para que eu pudesse me dedicar e aos amigos da VISA Pará de Minas pela torcida.

Agradeço à minha família; meu marido que compreendeu minha ausência e torceu por mim, aos meus filhos, Iara e Luan, para quem o exemplo de amor aos estudos é minha inspiração. Ao meu pai e à minha mãe que me ensinaram a sonhar e me ajudaram para que fosse possível. Sou muito grata a todos.

Obrigada!

SUMÁRIO

	RESUMO.....	8
1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	OBJETIVOS.....	10
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1	COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	10
3.2	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE.....	12
3.3	CONTAGEM BACTERIANA TOTAL DO LEITE.....	12
3.4	CONTROLE DE QUALIDADE DO LEITE.....	13
3.5	FRAUDES NO LEITE.....	14
3.5.1	Fraudes por adição de reconstituintes da densidade.....	14
3.6	RECONSTITUINTES DA DENSIDADE.....	15
3.6.1	Amido.....	15
3.6.2	Sacarose.....	15
3.7	ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO PARA ANÁLISE DE LEITE.....	16
3.8	CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE LEITE.....	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	17
4.2	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	18
4.3	ANÁLISES REALIZADAS.....	18
4.3.1	Contagem Bacteriana Total.....	19
4.3.2	Contagem de Células Somáticas.....	19
4.3.3	Composição Centesimal.....	19
4.3.4	Análise microbiológica do amido P.A.....	20
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1	CONTROLE ESTATÍSTICO DA AMOSTRA.....	21
5.2	PADRÕES DE QUALIDADE.....	21
5.3	COMPOSIÇÃO DO LEITE ADULTERADO COM AMIDO.....	24
5.4	COMPOSIÇÃO DO LEITE ADULTERADO COM SACAROSE.....	25
5.5	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	27
5.6	CCS E CBT DO LEITE ADULTERADO COM RECONSTITUINTES DA DENSIDADE.....	27
6.	CONCLUSÕES.....	29
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru controle e do leite adicionado com amido e sacarose, nas três concentrações e nos seis tempos de leitura	22
Tabela 2 - Coeficientes da regressão linear múltipla dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de leite cru adulterado com amido, nos seis tempos de leitura e na temperatura de 25°C em relação a 7°C	24
Tabela 3 - Coeficientes da regressão linear múltipla dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de leite cru adulterado com sacarose, nos seis tempos de leitura e na temperatura de 25°C em relação a 7°C	25
Tabela 4 - Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru adicionado com amido e sacarose analisados por FTIR	26
Tabela 5 - Valores médios de CCS e CBT no leite cru controle e no leite adicionado com amido e sacarose nas três concentrações, nos seis tempos de leitura e conservados às temperaturas de 7°C e 25°C	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição centesimal média do leite de vaca	11
Quadro 2 - Requisitos físico-químicos do leite cru refrigerado	13

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do amido	15
Figura 2- Estrutura da sacarose	16
Figura 3 - Esquema da preparação das amostras	18
Figura 4 - Perfil crioscópico do leite cru e do leite adicionado com amido e sacarose, nas três concentrações e nos seis tempos de armazenamento	23
Figura 5 - Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru com adição de amido, armazenado por sete dias e conservado às temperaturas de 7°C e 25°C	25
Figura 6 - Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru com adição de sacarose, armazenado por sete dias e conservado às temperaturas de 7°C e 25°C	26

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar as leituras de composição do leite cru obtidas por espectrofotometria FTIR, e a contagem de células somáticas e bacteriana total por citometria de fluxo, após adição de amido e sacarose. O leite cru foi adulterado com três concentrações de amido e sacarose (0,1%, 0,5% e 1%) em frascos contendo bronopol ou azidiol e armazenados a duas temperaturas ($7 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$). As análises foram realizadas após 0, 3, 24, 48, 72 e 168 horas de armazenamento. O modelo de regressão linear múltipla foi utilizado para análise estatística. A adição de amido e sacarose resultou em mudança significativa ($p < 0,05$) para todas as variáveis dependentes. O amido causou aumento na leitura de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), CCS e CBT e diminuição da caseína, do nitrogênio ureico do leite (NUL) e do ponto de congelamento. A adição de sacarose levou ao aumento dos resultados da lactose, ST, SNG e NUL, enquanto a proteína, caseína, ponto de congelamento e CCS diminuíram. Este trabalho evidencia a importância do monitoramento de adulterantes reconstituíntes no leite por afetarem os resultados analíticos da qualidade do leite, obtidos por métodos eletrônicos.

Palavras-chave: leite cru, adulterante, amido, sacarose, análise composicional.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the raw milk composition readings obtained by FTIR spectrophotometry, and somatic cells count and total bacterial count by flow cytometry after starch and sucrose addition. The raw milk was adulterated with three concentrations of starch and sucrose (0.1%, 0.5% and 1%) in vials containing bronopol or azidiol and stored at two temperatures ($7 \pm 2^\circ\text{C}$ and $25 \pm 2^\circ\text{C}$). The analyzes were performed after 0, 3, 24, 48, 72 and 168 hours of storage. Multiple linear regression model was used for statistical analysis. The addition of starch and sucrose resulted in a significant change ($p < 0.05$) for all dependent variables. Starch resulted in an increase in the IR results for fat, protein, lactose, total solids (TS), solids nonfat (SNF), SCC and TBC and decrease in casein, milk urea nitrogen (MUN) and freezing point. The addition of sucrose led to increased IR results for lactose, TS, SNG and MUN, while protein, casein, freezing point and SCC decreased. This work evidences the importance of the adulterants monitoring in milk since they affect the analytical results of milk quality, obtained by electronic methods.

Keywords: raw milk, FTIR, adulterant, starch, sucrose, compositional analysis.

1-INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos da natureza e seu elevado valor nutritivo, rico em proteínas, açúcares, gorduras, vitaminas, sais minerais e compostos com alta digestibilidade, determina sua qualidade nutricional e suas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas. As análises físico-químicas visam avaliar o valor alimentar ou rendimento industrial e ainda detectar possíveis fraudes no leite (Santos *et al.*, 2011).

O setor laticinista tem passado por uma crescente demanda por produtos lácteos de alta qualidade, levando à progressiva adaptação desse importante segmento às exigências do mercado consumidor (Oliveira, 2011). A determinação dos principais constituintes do leite é importante para estabelecer o valor do leite, fornecer informações ao consumidor e para o controle de qualidade. O conteúdo da gordura e proteína total no leite tem importância econômica porque em muitos países o comércio de leite é baseado nesses componentes e na contagem de células somáticas (Brandão *et al.*, 2010).

A qualidade dos alimentos é um problema mundial, sendo imprescindível a detecção de produtos fraudados e de qualidade inferior no mercado. Nas indústrias de laticínios, os principais prejuízos com as fraudes são a redução do rendimento de alguns produtos lácteos, a diminuição do valor nutricional, a alteração da qualidade dos produtos beneficiados e o risco aos consumidores em virtude da presença de substâncias que podem causar mal à saúde, tais como agentes antimicrobianos, reconstituintes de densidade e neutralizante de acidez, entre outras (Abrantes *et al.*, 2014).

Em 2002, a IN 51 determinou novas variáveis de avaliação do leite cru refrigerado como critérios de qualidade do leite. De acordo com essa instrução normativa, análises de composição (teores de gordura, proteína e sólidos totais), contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e resíduo de drogas veterinárias de todo leite cru produzido no país e processado em estabelecimento sob fiscalização federal deveriam ser realizadas mensalmente em um dos laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 2002).

Para atender a essa demanda nacional, no mesmo ano, criou-se a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL). Os laboratórios integrantes da RBQL contam com equipamentos eletrônicos modernos para análises rápidas e precisas que proporcionem informações de qualidade em um tempo adequado, contribuindo para o contínuo crescimento do setor da pecuária leiteira do Brasil.

Em dezembro de 2011, o MAPA, através da Instrução Normativa 62 (Brasil, 2011), prorroga os prazos para atender os limites de CCS e CBT no leite cru refrigerado, no intuito de aproximar os padrões nacionais dos internacionais e melhorar a qualidade do leite nacional, tornando os produtos mais competitivos e seguros nos mercados interno e externo (Henrics *et al.*, 2014). Em maio de 2016, a IN7 prorroga em mais dois anos os prazos para os índices de CCS e CBT serem alcançados (Brasil, 2016).

A IN62 determina a pesquisa diária de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade e de inibidores do crescimento microbiano. Contudo, nem todas as indústrias realizam a pesquisa específica dessas substâncias. No entanto, as fraudes mais praticadas ao leite são o aumento de volume por adição de água, a adição de reconstituintes da densidade, neutralizantes da acidez e substâncias conservantes. Somada à motivação financeira, a prática de fraudar o leite pode ser

incitada pela dificuldade na detecção das fraudes utilizando-se apenas as provas de rotina (Silva, 2013).

Abrantes *et al.* (2014) revisaram as principais fraudes que alteram a qualidade do leite e os métodos mais utilizados para sua detecção e reforçou a necessidade do desenvolvimento de métodos eficazes para verificação da qualidade do leite.

2-OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar a possível interferência da adição de amido e sacarose na análise composicional do leite, realizada com a técnica da espectroscopia no infravermelho pela Transformada de Fourier.

3-REVISÃO DE LITERATURA

3.1- Composição do leite

O leite é uma combinação de diversos elementos sólidos em água, principalmente os lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Os sólidos totais (ST) ou extrato seco total (EST) engloba todos os componentes do leite com exceção da água. Por sólidos não gordurosos (SNG) compreendem-se todos os componentes do leite, menos a água e a gordura. O índice mínimo de SNG ou SNF (*solids non fat*) é de 8,4% como requisito físico-químico, segundo a IN62. Os componentes do leite permanecem em equilíbrio e esse conhecimento é a base para os testes que são realizados com o objetivo de apontar a ocorrência de problemas que alteram a composição do leite. Uma redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia, por exemplo, levantar suspeitas de adição fraudulenta de água ao leite. Essas alterações das propriedades físicas do leite são provavelmente detectáveis em laboratório. A composição do leite pode variar com o estágio de lactação, raça das vacas, alimentação, temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária (Brito *et al.*, 2016).

A composição média do leite (Quadro1) é de 87,3% de água, 4,6% de lactose, 3,25% de proteínas, 3,9% de gordura, 12,7% de sólidos totais, 8,8% de sólidos não gordurosos e o restante entre sais minerais e vitaminas (Silva *et al.*, 1997). Os componentes do leite, suas distribuições e interações são determinantes para a estrutura, as propriedades funcionais e para a aptidão do seu processamento (Brito *et al.*, 2016). A determinação da composição centesimal do leite é fundamental para as indústrias de laticínios por ser fator preponderante para o rendimento industrial de queijos, manteiga, leite em pó, creme de leite, requeijão e outros produtos (Leite, 2006).

Quadro 1 – Composição centesimal média do leite de vaca

Constituinte	Teor (%)
Água	87,3
Lactose	4,6
Gordura	3,9
Proteína	3,25
Sólidos Totais	12,7
Sólidos não gordurosos	8,8

Fonte: Silva *et al.* (1997)

As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela maior parte das características físicas (estrutura e cor) encontradas nos produtos lácteos (Brito *et al.*, 2016). A proteína verdadeira corresponde a todos os compostos nitrogenados do leite, exceto a fração não protéica. A uréia, um componente não proteico do leite, é uma pequena molécula neutra que se difunde facilmente pelas membranas celulares. Uma vez que o leite é secretado pelas células alveolares da glândula mamária, a ureia se difunde para dentro ou para fora das células secretoras, entrando em equilíbrio com a ureia plasmática. O nitrogênio não proteico representa entre 5% e 6% do total de nitrogênio do leite, sendo composto de 30-50% de nitrogênio ureico, e o restante formado pela creatina, creatinina, ácido úrico, aminoácidos e amônia. O nitrogênio proteico representa 95% do total de nitrogênio e é formado por 80% de caseína e 20% de proteínas do soro (Beserra, 2007).

Segundo Oliveira (2011), a concentração de nitrogênio ureico no leite (NUL) é uma ferramenta útil para avaliar o estado nutricional e o desempenho reprodutivo das vacas. Valores médios de ureia no leite do rebanho menores que 12 mg/dL refletem deficiência protéica ou excesso de carboidratos na dieta. Por outro lado se a média de uréia no rebanho estiver acima de 18 mg/dL perdas severas devem estar ocorrendo, i.e., perda energética para eliminação da uréia, menor taxa de concepção, deficiência imunológica, desperdício de proteína e contaminação ambiental. O aumento nas concentrações de nitrogênio não protéico no leite também determina um menor rendimento industrial para produção de queijos, pela associação com maior tempo de coagulação.

Fatores como tempo e temperatura de conservação das amostras destinadas a análises e o uso de conservantes interferem na composição centesimal do leite e na avaliação da qualidade por métodos eletrônicos. Leite (2006) analisou amostras de leite cru conservadas sob refrigeração por até dez dias, e não observou efeito sobre os resultados médios obtidos na composição centesimal, indicando que as amostras adicionadas de bronopol, armazenadas entre 4 e 10°C, poderiam ser analisadas em até dez dias após a coleta.

Em estudo da variação da composição dos sólidos totais no leite cru por influência da idade da amostra, em equipamento de espectroscopia no infravermelho, Ribas *et al.* (2004) encontraram um declínio na concentração de gordura a partir do sétimo dia. A proteína se alterou a partir do sexto dia, enquanto a lactose praticamente não se alterou e os sólidos totais apresentaram declínio a partir do sexto dia.

3.2-Contagem de Células Somáticas no leite

As células somáticas compreendem células brancas ou leucócitos, presentes no leite em resposta a danos do tecido, além de células epiteliais de descamação, resultado de um processo natural de reposição de células dentro da glândula mamária, ou ainda, de lesão física. A Contagem de células somáticas (CCS) é a medida mais usada para o monitoramento do estado inflamatório das glândulas mamárias e pode ser mensurada no leite proveniente de quartos individuais, vacas individuais, todo o rebanho ou um grupo de rebanhos (Philpot e Nickerson, 2002).

A mastite, inflamação da glândula mamária, caracteriza-se por causar alterações significativas na composição do leite, aumento na concentração de células somáticas e redução na produção. Para os produtores, essa redução na produção significa menor retorno financeiro. Para as indústrias, a ocorrência de tais alterações significa numerosos problemas no processamento, diminuição do rendimento, da qualidade e da estabilidade dos produtos lácteos (Fonseca, 2005; Leite, 2006; Evangelista, 2008).

Como resultado de uma resposta inflamatória da glândula mamária proveniente de trauma ou lesão do úbere, irritação química ou, sobretudo, infecção causada por microrganismos, especialmente os de origem bacteriana, mudanças intensas são observadas nas concentrações tanto dos principais componentes do leite como proteína, gordura e lactose, quanto dos componentes encontrados em menores concentrações, como minerais (Evangelista, 2008).

3.3- Contagem Bacteriana Total no leite

O leite pode se contaminar por um pequeno número de microrganismos, provenientes dos canais lactíferos, da cisterna da glândula e canal do teto (Fonseca e Santos, 2000). No caso de ordenha higiênica e de animais sadios, a contagem bacteriana é baixa, podendo variar de 500 a 1000 UFC/mL. Entretanto, em condições inadequadas da saúde da glândula mamária, do sistema de manejo e das condições de higiene adotadas na fazenda, este número pode se elevar até vários milhões (Fonseca e Santos, 2000; Evangelista, 2008).

A ordenha de animais com tetos sujos e/ou úmidos está diretamente associada a uma alta CBT no leite, com uma alta contagem de coliformes ou mesmo de bactérias psicrotróficas. Um correto manejo de ordenha, com ênfase na preparação dos tetos antes da ordenha (limpeza, *pré-dipping* e secagem completa dos tetos), associado a um programa de controle de mastite, são fundamentais para a obtenção de um leite de alta qualidade (Mendes, 2006). Outras possíveis fontes de bactérias são as superfícies da ordenhadeira mecânica, do sistema de transporte e armazenamento do leite. Portanto, deve-se estar sempre atento ao programa de limpeza e sanitização, além da correta manutenção do equipamento de ordenha (Santos e Fonseca, 2001).

A qualidade microbiológica do leite influencia o processamento tecnológico e pode acarretar problemas em relação à saúde pública. Tecnicamente, diversos prejuízos devido à alta carga

microbiana têm sido enumerados. Entre eles, destacam-se os problemas com acidificação e coagulação, gelificação, sabor amargo, coagulação sem acidificação, aumento de viscosidade, alteração de cor, produção de sabores e odores variados, entre outros. Estas alterações causam redução da vida de prateleira e diminuição do rendimento industrial. Além dos problemas de qualidade nas indústrias, as condições inadequadas de manejo na ordenha, no armazenamento e no transporte do leite podem acarretar risco à saúde pública, devido à ação de bactérias patogênicas, especialmente quando o leite é consumido cru (Evangelista, 2008).

3.4- Controle de Qualidade do Leite

O controle de qualidade do leite cru refrigerado no estabelecimento industrial beneficiador deve contemplar, de acordo com a IN 62/2011, a realização diária das seguintes análises: temperatura, teste do álcool/alizarol 72%v/v, acidez titulável, índice crioscópico, densidade relativa a 15°C, teor de gordura, pesquisa da fosfatase alcalina e peroxidase (quando a matéria-prima for proveniente de usina), determinação do teor de sólidos totais e sólidos não gordurosos (Quadro 2) (Brasil, 2011).

Além dessas provas, a legislação determina a pesquisa diária de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade e de inibidores do crescimento microbiano. Contudo, a grande maioria das indústrias não realiza a pesquisa específica dessas substâncias, avaliando o leite recebido apenas por meio de algumas análises físico-químicas (Silva, 2013).

Quadro 2 – Requisitos físico-químicos do leite cru refrigerado

Requisitos	Teor (%)
Matéria gorda (g/100g)	mín.3,0
Densidade relativa a 15/15° (g/ml)	1,028 a 1,034
Acidez titulável em g de ácido láctico/100ml	0,14 a 0,18
Sólidos não gordurosos (g/100g)	mín.8,4
Índice crioscópico	-0,530°H a -0,550°H
Proteína total	mín.2,9

Fonte: Brasil, 2011.

Dentre as análises do controle de qualidade do leite, a aferição da crioscopia e da densidade são utilizadas para identificar fraudes por adição de água e de reconstituintes. A adição de água ao leite diminui sua densidade e aproxima a crioscopia de 0°C, enquanto a adição de reconstituintes provoca o efeito contrário e objetiva recompor estes parâmetros (Silva, 2013).

3.5- Fraudes no leite

O leite é um dos alimentos mais envolvido em fraudes. O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) considera fraudado, adulterado ou falsificado o leite que for adicionado de água, substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição (Brasil, 1952). A fraude causa prejuízo na alimentação dos consumidores, concorrência ilegal e ainda se reflete no futuro, pois a impressão de que o leite não é de qualidade controlável pode levar à redução do seu consumo. Então, além de lesar o consumidor economicamente, por fornecer um produto de qualidade inferior à declarada, a adulteração do leite pode representar risco à saúde, dependendo do tipo de substância utilizada na fraude. Um dos mais graves exemplos ocorreu no ano de 2008, na China. A fraude consistiu na adição da substância melamina ao leite para simular um aumento no seu teor proteico. Foram reportadas seis mortes e mais de 300 mil pessoas adoeceram (Silva, 2013).

No Brasil, em 2007, foi descoberto um esquema de adulteração em indústrias de Minas Gerais. Essa operação deflagrada pela Polícia Federal juntamente com o Ministério Público, conhecida como “Operação Ouro Branco”, investigou fraude em leite UHT. As fraudes incluíram substâncias conservantes, neutralizantes e reconstituíntes, soro de queijo e água adicionados ao leite cru (G1, 2007).

Outra fraude muito difundida ocorreu no Sul do Brasil, em 2013, conhecida como “Operação Leite Compensado”. Na sétima fase da operação, o Ministério Público declarou que a fraude consistia na adição de água e sal no leite cru, para aumentar o volume e diminuir o ponto de congelamento (G1, 2014). Em julho de 2016, a décima primeira fase da operação teve como objetivo combater a adulteração do leite por meio de água e amido de milho, usado para aumentar o volume do leite, e por meio de água oxigenada e ácido sórbico, para controlar crescimento microbiano (Gaúcha, 2016).

Em 2014, foi deflagrada a chamada “Operação Leite Adulterado”, no Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com o objetivo de investigar e punir os envolvidos em adulteração de leite com sal, soda cáustica, citrato e peróxido de sódio (Brasil, 2014).

3.5.1- Fraudes por adição de reconstituíntes da densidade

De acordo com a IN 62, não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes no leite. Mesmo que a adição desses elementos não cause problemas de saúde humana, por não serem tóxicos, a legislação não permite sua adição ao leite (Rosa-Campos *et al.*, 2011).

A principal fraude detectada continua sendo a adição de água com o objetivo de aumentar o volume. Essa fraude pode ser rapidamente detectada por provas de rotina como densidade e crioscopia. A adição de água reduz a densidade do leite e aumenta seu ponto de congelamento (PC), enquanto a adição de reconstituíntes produz o efeito inverso. Para mascarar a adição de água são utilizadas substâncias denominadas reconstituíntes da densidade como sal, açúcar e farinha (Tronco, 2008).

Segundo Souza *et al.* (2011), a adição de água e reconstituíntes não representa risco à saúde do consumidor, mas por promover uma diluição dos seus componentes, promove uma redução no seu valor nutricional. Para Rosa-Campos *et al.* (2011), o uso de sacarose e amido como aditivos do leite é uma fraude muito comum. Eles analisaram 72 marcas de leite pasteurizado e não

encontraram nenhuma adição de amido, porém a adição de sacarose ocorreu em larga escala, sendo encontrada em 100% das amostras de algumas marcas.

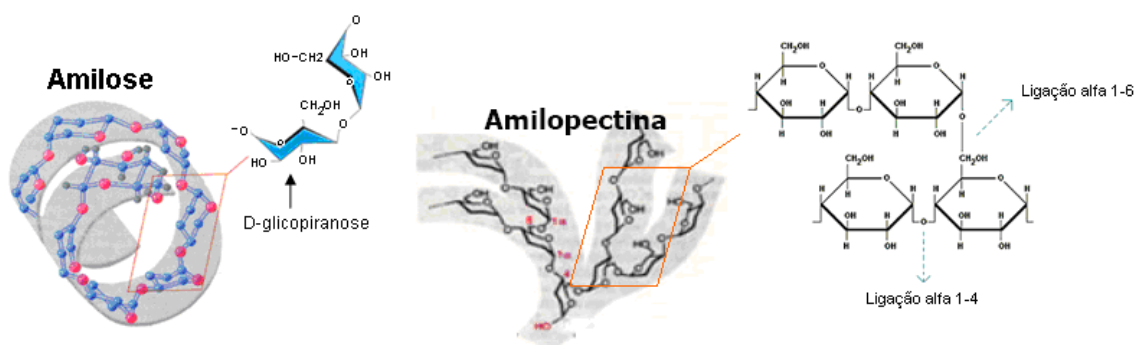
Fernandes e Maricato (2010) não identificaram nenhuma amostra com presença de amido, peróxido de hidrogênio e cloretos, ao passo que Freitas Filho et al. (2009) constataram a presença de amido, cloro e peróxido de hidrogênio em amostras de leite cru.

3.6- Reconstituintes da densidade

3.6.1- Amido

O amido é um polímero da glicose ($C_6H_{10}O_5$) $_n$, o qual constitui um importante material de reserva de energia das plantas, sendo constituído por dois polímeros que diferem na estrutura da molécula: a amilose (10-20%) e a amilopectina. (80-90%). A amilose é constituída de 250 a 300 resíduos de D-glicopirranose (forma cíclica da glicose com seis átomos no anel, sendo cinco carbonos e um oxigênio) ligadas por pontes glicosídicas α -1,4, que conferem à molécula uma estrutura helicoidal. A amilopectina é constituída por aproximadamente 1400 resíduos de α -glicose ligados por pontes glicosídicas α -1,4, ocorrendo também ligações α -1,6, que dão a ela uma estrutura ramificada (Método..., 2001).

Figura 1- Estrutura do amido

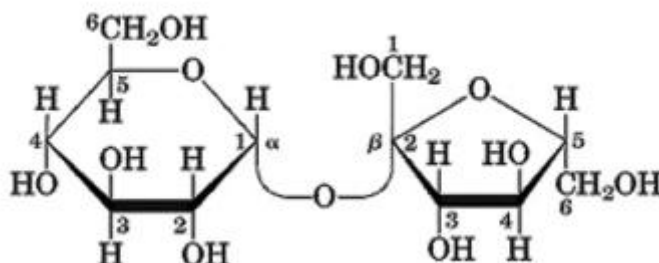


Fonte: MET POA/12/01/01

3.6.2- Sacarose

A sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ou α -D-glicopiranoside- β -D-fructofuranosil é um glicídio formado por duas moléculas, uma de glicose e uma de frutose. Comercialmente é extraída da cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), que pode conter de 14% a 24% de sacarose, ou da beterraba (*Beta vulgaris*). A sacarose é muito solúvel na água e forma soluções altamente saturadas (Manhani et al., 2014).

Figura 2- Estrutura da sacarose



Fonte: Manhani *et al.* (2014)

3.7- Espectrofotometria no infravermelho para análise de leite

O princípio fundamental de todos os analisadores de infravermelho se baseia na capacidade de absorção de radiação, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como gordura, proteína e lactose. Os grupos carbonila (C=O) das ligações éster dos triglicerídeos absorvem radiação no comprimento de onda de 5,73 μ m, os grupos amida (CONH) das ligações peptídicas das proteínas em 6,46 μ m e os grupos hidroxila (OH) da lactose em 9,53 μ m (Biggs *et al.*, 1987).

A técnica que revolucionou os laboratórios de análise de leite fluido foi a espectroscopia de infravermelho médio, também chamada de MIR (mid infrared), que apresenta grandes vantagens em relação às técnicas anteriores, como a determinação simultânea de proteína, gordura e lactose em uma única amostra sem tratamento prévio, rapidez analítica e possibilidade de automatização total do processo (Rodriguez-Otero *et al.*, 1997).

Como técnica de análise quantitativa para o controle de alimentos e produtos industrializados, a espectroscopia no infravermelho obteve crescimento após o advento da Transformação de Fourier e a utilização do interferômetro de Michelson, o que tornou o método mais rápido e robusto (Saliba *et al.*, 2003).

Silveira *et al.* (2004) compararam métodos de referência e métodos eletrônicos para determinação da composição do leite e não observaram diferenças entre os dois métodos quanto aos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais das amostras individuais e do tanque de resfriamento.

Os principais componentes do leite são sólidos totais, gordura, proteína, caseína, nitrogênio ureico (NUL), lactose e células somáticas e a sua determinação por meio de métodos convencionais é bastante demorada e trabalhosa. Por isso, vários trabalhos vêm sendo realizados para comparação da espectroscopia de infravermelho com as metodologias de referência, para evidenciar a aplicabilidade desta tecnologia como uma alternativa mais rápida para a análise de leite cru. Nos laboratórios oficiais da RBQL, a análise da composição centesimal dos constituintes do leite cru refrigerado é realizada em equipamentos eletrônicos com grande capacidade de análise. Esses equipamentos realizam a análise por absorção infravermelha com

modelos baseados em filtros, sendo os mais recentes baseados em tecnologia de Infravermelho por Transformada Fourier - FTIR (Oliveira, 2012).

Os métodos qualitativos e quantitativos para a detecção da maioria dos adulterantes possuem baixo rendimento analítico, alta dependência de mão-de-obra e requerem utilização de reagentes, o que dificultam a implementação de programas de monitoramento em larga escala. Dificilmente uma indústria consegue analisar o leite de todos os seus produtores para todos os adulterantes já descritos. Entretanto, estudos têm demonstrado o grande potencial da utilização da metodologia de Fourier Transform Infrared (FTIR) no controle de qualidade e monitoramento da autenticidade do leite cru.

Santos *et al.* (2013) utilizaram a espectroscopia de infravermelho médio e ferramentas quimiométricas para detecção de adulteração de leite. Amostras comerciais de leite pasteurizado foram adulteradas com soro de leite, peróxido de hidrogênio, urina sintética, ureia e leite sintético em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a espectroscopia MIR pode fornecer uma metodologia alternativa à triagem de práticas fraudulentas de adulteração do leite de vaca.

3.8- Citometria de fluxo para análise de leite

Nas análises realizadas em alimentos, o interesse por métodos rápidos e automatizados tem crescido nas últimas décadas. Equipamentos que se baseiam na citometria de fluxo, como o BactoScan (Foss Electric A/S, Hillerød, Dinamarca) e BactoCount (Bentley Instruments Incorporated, Chaska, Estados Unidos da América) foram desenvolvidos visando à análise de rotina da qualidade microbiológica do leite cru. Entretanto, estes equipamentos se limitam a estimar a contagem bacteriana total ou a contagem de células somáticas, não fornecendo outras informações, como a diferenciação microbiana (Leite, 2006; Oliveira, 2012).

Os equipamentos comumente empregados em laboratórios de controle da qualidade do leite e em indústrias de laticínios geralmente se baseiam na mensuração de pulsos eletrônicos após a emissão de fluorescência a partir da incidência de uma fonte de radiação *laser* em um marcador intercalado no DNA (celular ou bacteriano, dependendo do objeto da análise). A intensidade e a altura dos pulsos de fluorescência são gravadas e usadas como parâmetros seletivos. Os pulsos selecionados são, então, traduzidos em contagens (Delta..., 2007).

Evangelista (2008) verificou em seu estudo que a citometria de fluxo, comparada com as técnicas de microscopia direta e contagem padrão em placas, foi capaz de detectar maior contagem bacteriana em amostras de leite cru, pasteurizado e esterilizado.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LabUFMG).

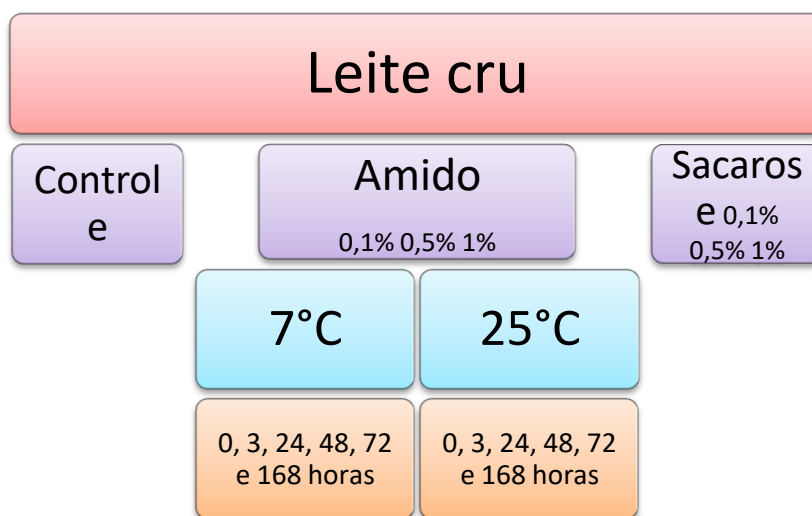
4.2- Preparo das amostras

No período de agosto a outubro de 2016, foram realizadas seis coletas de leite cru na Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé – MG. O leite, proveniente da ordenha completa das oito primeiras vacas da linha de ordenha, foi coletado diretamente em galão plástico e imediatamente transportado até o LabUFMG e, conforme a Fig.1, submetido às adulterações com as seguintes substâncias e quantidades: sacarose P.A. (0,1%, 0,5% e 1%) e amido P.A. (0,1%, 0,5% e 1%).

O leite adulterado foi armazenado em frascos contendo bronopol para a conservação das amostras analisadas para composição e CCS e também armazenado em frascos contendo azidiol para conservação das amostras analisadas para CBT. As amostras foram conservadas em temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e refrigeradas ($7\pm 2^{\circ}\text{C}$) e analisadas nos tempos 0, 3, 24, 48, 72 e 168 horas.

Seis repetições foram feitas, totalizando 1008 amostras, incluindo 864 amostras adulteradas (6 repetições x 2 adulterantes x 3 concentrações x 6 tempos de armazenamento x 2 temperaturas x 2 equipamentos (citometria e FTIR)) e 144 amostras sem adulterante para controle.

Figura 3 - Esquema da preparação das amostras



4.3- Análises realizadas

Foram realizadas análises de composição centesimal (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, nitrogênio ureico do leite e caseína), crioscopia, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total, em equipamentos eletrônicos.

O amido foi analisado para contagem de mesófilos e leveduras, segundo IN 62/2003.

4.3.1- Contagem Bacteriana Total

A contagem bacteriana total foi efetuada em equipamento eletrônico BactoScan FC® (Foss Electric A/S, Hillerød, Dinamarca) que tem por princípio a citometria de fluxo.

O BactoScan™ FC é baseado na tecnologia de citometria fluxo, que permite análises precisas e instantâneas das bactérias no leite. A citometria de fluxo é uma técnica que conta e caracteriza partículas e células. Uma suspensão de células é corada e flui através de um tubo capilar. Os aglomerados de bactérias são separados em bactérias individuais. Durante o período de incubação, as bactérias são coradas com um meio de coloração específico para o DNA (neste trabalho, brometo de etídio). Para a mensuração, o material da amostra é exposto a um feixe de luz gerado por um laser, que resulta na emissão da fluorescência. O dispositivo eletrônico conta os pulsos e os exibe em um diagrama de análise de altura de pulso no monitor do computador (Foss, 2016).

O equipamento foi calibrado de acordo com o método de Contagem Padrão em Placa de referência, definido pela norma Internacional (IDF 100B: 1991), permitindo a conversão da contagem bacteriana individual em UFC/mL, em atendimento às Instruções Normativas (Brasil, 2002; Brasil, 2011).

4.3.2- Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas foi realizada no citômetro do equipamento CombiScope FTIR 400®, por meio do SomaScope (Delta Instruments, Drachten, Holanda). Uma alíquota da amostra, pré-aquecida a 40° C, é aspirada para o interior do equipamento e conduzida a uma seringa contendo o corante tampão. O instrumento requer o uso do corante fluorescente para corar o DNA das células. Em seguida, 50 µL da amostra são conduzidos por um fluido carreador para o citômetro de fluxo, onde recebem incidência de raio laser. A luz emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda adequados e é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas. O histograma resultante representa o número de células no eixo vertical e o tamanho das células no eixo horizontal (Delta..., 2007).

A calibração de CCS foi feita utilizando-se três amostras padrão com CCS em diferentes níveis. As amostras padrão foram fornecidas pelo laboratório LANAGRO-MG, credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

4.3.3- Composição centesimal

A análise composicional e crioscopia foram realizadas no equipamento CombiScope FTIR 400®, por meio do LactoScope FTIR (Delta Instruments, Drachten, Holanda).

A amostra de leite, aquecida a 40°C, é agitada e homogeneizada para reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura. Posteriormente, recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e em seguida, quantificada e transformada automaticamente em teores de componentes, tendo como referência a curva de calibração (Delta..., 2007).

A calibração do instrumento refere-se ao ajuste do sinal instrumental de modo que, a cada nível do componente em quantificação, a média de resultados individuais dados pelo instrumento seja o mais próximo do valor verdadeiro da concentração do componente (IDF, 1991). A calibração do equipamento CombiScope™ FTIR (Delta Instruments) foi realizada por meio de 14 amostras padrão de leite cru com diferentes faixas de composição para gordura, proteína, lactose e EST. Para ureia foram utilizadas 6 amostras e para caseína 8 amostras. A calibração foi feita utilizando-se o programa de calibração do próprio equipamento. As amostras padrão foram fornecidas pelo laboratório Valacta (Dairy Production Centre of Expertise, Quebec, Canadá).

A calibração para leitura da crioscopia foi feita com amostras-padrão fornecidas pelo laboratório DQCI SERVICES (Dairy Quality Control Incorporated, Estados Unidos), credenciado pela Secretaria de Agricultura do Estado de Mineápolis dos Estados Unidos. As amostras padrão foram fornecidas juntamente com os laudos contendo os resultados das análises realizadas no laboratório de origem.

4.3.4- Análise microbiológica do amido P.A.

O amido foi analisado no Laboratório de Análises Microbiológicas do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, para contagem de mesófilos e leveduras, segundo a IN62/2003. Para análise microbiológica, 25 gramas do amido foram diluídos em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Foram feitas diluições em série até a diluição de 10^{-3} . Foi semeado 1 mL de cada diluição em placas de Petri, em seguida foram vertidos os meios BDA (batata-dextrose-ágar) para contagem de fungos e leveduras e PCA (Agar padrão para contagem) para contagem de bactérias mesófilas. Movimentos suaves em superfície plana foram feitos para misturar o inóculo. Após solidificação do meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas a 36°C por 48 horas, para contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis. Para contagem de bolores ou leveduras, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por sete dias. Após esse período, as colônias foram contadas (Brasil, 2003).

4.4-Delineamento Experimental

Segundo Sampaio (2010), quando a variável independente é estudada dentro de uma faixa estreita de variação, ocasionando uma variação linear na resposta observada, justifica-se o estudo por meio do modelo de regressão linear. Quando há mais de duas variáveis envolvidas, aplica-se a regressão linear múltipla (Triola, 2008).

O desenho experimental desse trabalho escolhido foi de Regressão Linear Múltipla, com intervalo de confiança de 95%. É um método para análise de uma relação que envolve mais de duas variáveis e quando os dados amostrais se ajustam bem à equação de regressão, permite ser usada para previsões.

O formato geral da equação de Regressão Linear Múltipla está representado:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \varepsilon,$$

onde:

Y = Variável dependente a ser prevista

X_i = Variáveis independentes

β_0 = constante

β_i = coeficientes parciais de regressão

ε = erro

A equação expressa uma relação linear entre uma variável dependente Y (chamada de variável resposta) e duas ou mais variáveis previsoras X (chamada de variáveis explanatórias ou variáveis independentes).

Nesse trabalho, as variáveis dependentes foram os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos (SNG), nitrogênio ureico do leite (NUL), caseína, ponto de congelamento (PC), Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT). As variáveis independentes foram as substâncias adicionadas ao leite (amido ou sacarose), a quantidade adicionada (0, 0,1%, 0,5% e 1%), a temperatura de conservação das amostras (7°C e 25±2°C) e o tempo de leitura (0, 3, 24, 48, 72 e 168 horas).

Para esse delineamento experimental foi aplicado o pacote estatístico STATA 12.0 (Stata Corp., 2011).

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-Controle estatístico da amostra

As seis repetições do experimento obtiveram valores P muito próximos de zero em todos os parâmetros (variáveis dependentes) analisados, com exceção da leitura de CBT que foi significativa apenas na última repetição. Esse resultado indica que a origem da amostra foi controlada e as variáveis que poderiam influenciar nos resultados de composição do leite como estágio de lactação, ordem de parto, manejo das vacas, alimentação, raça das vacas, intervalo entre ordenhas e produção de leite foram controladas pelas repetições realizadas (Brito *et al.*, 2016). O R^2 ajustado foi alto para todas as variáveis dependentes analisadas (Tabelas 2 e 3), exceto para a análise de CBT no leite adulterado com sacarose, indicando que a equação de regressão múltipla se ajustou bem aos dados amostrais (Triola, 2008).

5.2-Padrões de qualidade

Com base nos requisitos da IN62/2011, o leite controle está dentro dos padrões físico-químicos exigidos pela norma. Os valores de NUL e caseína também estão dentro da normalidade.

As médias dos parâmetros físico-químicos do leite adicionado com amido e sacarose estão apresentadas na Tabela 1. O aumento ou diminuição nos índices foram significativos e confirmam o que foi demonstrado com a regressão linear múltipla, realizada como modelo estatístico para correlacionar as diversas variáveis.

Tabela 1 – Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru controle e do leite adicionado com amido e sacarose, nas três concentrações e nos seis tempos de leitura

		CONTROLE	AMIDO			SACAROSE		
Parâmetros			0,1%	0,5%	1,0%	0,1%	0,5%	1,0%
Gordura (g/100g)	0h	3,36	3,39	3,43	3,44	3,37	3,36	3,35
	3h	3,36	3,40	3,43	3,44	3,38	3,37	3,36
	24h	3,37	3,40	3,43	3,44	3,38	3,37	3,36
	48h	3,36	3,38	3,43	3,44	3,37	3,36	3,35
	72h	3,37	3,39	3,43	3,44	3,37	3,37	3,36
	168h	3,34	3,36	3,38	3,43	3,36	3,34	3,35
Proteína (g/100g)	0h	3,35	3,36	3,36	3,37	3,35	3,34	3,33
	3h	3,35	3,36	3,36	3,37	3,35	3,34	3,33
	24h	3,35	3,36	3,36	3,37	3,35	3,34	3,33
	48h	3,35	3,36	3,37	3,37	3,35	3,35	3,34
	72h	3,35	3,36	3,36	3,37	3,36	3,34	3,33
	168h	3,35	3,36	3,36	3,37	3,35	3,35	3,33
Lactose (g/100g)	0h	4,65	4,67	4,70	4,76	4,71	4,92	5,19
	3h	4,66	4,68	4,72	4,77	4,71	4,93	5,19
	24h	4,65	4,66	4,71	4,76	4,70	4,92	5,19
	48h	4,65	4,67	4,72	4,78	4,71	4,92	5,19
	72h	4,65	4,67	4,72	4,78	4,71	4,92	5,19
	168h	4,66	4,68	4,73	4,78	4,71	4,93	5,19
Sólidos Totais (g/100g)	0h	12,32	12,39	12,46	12,54	12,38	12,57	12,80
	3h	12,34	12,40	12,47	12,54	12,40	12,58	12,81
	24h	12,34	12,38	12,46	12,53	12,39	12,58	12,81
	48h	12,33	12,39	12,48	12,54	12,39	12,58	12,81
	72h	12,34	12,40	12,48	12,56	12,40	12,58	12,81
	168h	12,32	12,38	12,45	12,55	12,39	12,56	12,81
SNG (g/100g)	0h	9,00	9,03	9,07	9,14	9,06	9,28	9,55
	3h	9,01	9,04	9,09	9,15	9,07	9,28	9,54
	24h	9,00	9,03	9,08	9,13	9,05	9,28	9,54
	48h	9,01	9,04	9,10	9,16	9,07	9,29	9,56
	72h	9,01	9,04	9,09	9,16	9,07	9,28	9,55
	168h	9,01	9,05	9,11	9,17	9,07	9,29	9,55
NUL (mg/dL)	0h	14,32	14,41	9,87	5,83	14,90	15,06	14,97
	3h	14,64	14,82	10,73	5,30	15,04	15,41	14,94
	24h	14,14	14,43	10,38	6,02	15,15	14,99	14,63
	48h	14,97	15,00	10,94	5,88	15,60	15,44	14,66
	72h	15,11	15,01	10,91	5,87	15,20	15,70	15,25
	168h	15,33	14,72	12,04	7,71	15,71	15,78	15,66
Caseína (g/100g)	0h	2,63	2,62	2,61	2,60	2,63	2,63	2,62
	3h	2,63	2,62	2,61	2,60	2,62	2,62	2,62
	24h	2,63	2,62	2,61	2,60	2,62	2,63	2,62
	48h	2,63	2,62	2,61	2,60	2,62	2,62	2,62
	72h	2,62	2,62	2,61	2,60	2,63	2,62	2,62
	168h	2,63	2,62	2,61	2,61	2,62	2,62	2,62
PC (°H)	0h	-0,550	-0,552	-0,556	-0,562	-0,555	-0,576	-0,601
	3h	-0,551	-0,553	-0,558	-0,563	-0,556	-0,576	-0,601
	24h	-0,550	-0,551	-0,556	-0,561	-0,555	-0,576	-0,601
	48h	-0,550	-0,553	-0,557	-0,563	-0,555	-0,576	-0,601
	72h	-0,550	-0,552	-0,557	-0,563	-0,555	-0,576	-0,601
	168h	-0,547	-0,549	-0,555	-0,560	-0,553	-0,572	-0,598

As leituras de lactose foram ligeiramente superiores no leite adicionado com amido, em relação ao leite controle. No entanto, após a adição de sacarose, as leituras de conteúdo de lactose atingiram valores tão elevados como 5,19%.

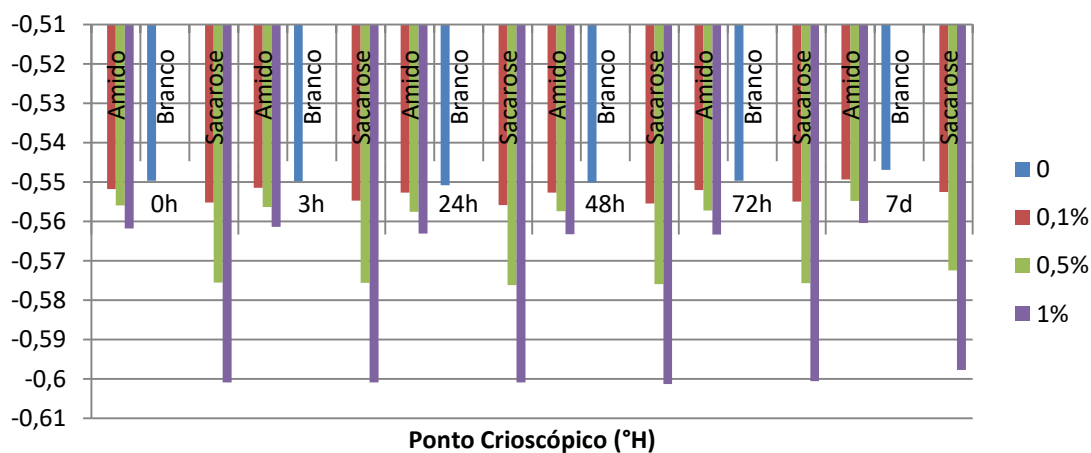
O aumento da leitura da lactose pelo FTIR pode ter sofrido interferência com adição do amido e sacarose, devido à sobreposição dos espectros absorptivos dos sacarídeos.

A crioscopia é uma propriedade física inerente à composição do leite e está relacionada somente às substâncias verdadeiramente dissolvidas no mesmo, isto é, à lactose e aos minerais (Fonseca e Fonseca, 2003).

O ponto de congelamento do leite diminuiu com o aumento da concentração de sacarose, e isto foi devido ao aumento da quantidade de substância solúvel. Como uma propriedade coligativa, o ponto de congelamento está correlacionado com a pressão de vapor na solução de acordo com a Lei de Raoult. Por outro lado, uma vez que as moléculas de amido são mais longas e têm um peso molecular mais elevado do que a sacarose, espera-se que a adição de amido ao leite tenha menor efeito no ponto de congelamento.

Conforme mostrado na Figura 4, o leite adicionado com sacarose apresentou um perfil crioscópico fora dos padrões, e mais intenso quando comparado com a adição de amido. A menor quantidade adicionada, 0,1%, já foi suficiente para reduzir o ponto de congelamento.

Figura 4 – Perfil crioscópico do leite cru e do leite adicionado com amido e sacarose, nas três concentrações e nos seis tempos de armazenamento



5.3-Composição do leite adulterado com amido

O leite adulterado com amido teve diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os parâmetros analisados (Tabela 2). O aumento na quantidade adicionada de adulterante foi significativo para alterar todos os resultados, com exceção dos valores de NUL e CCS que foram expressivos somente quando o amido foi adicionado acima de 0,5%.

O índice de gordura aumentou com adição do amido, porém uma queda foi observada no sétimo dia de armazenamento. Ribas *et al.* (2004) também encontraram redução da gordura no leite cru, após sete dias de armazenamento.

Os valores de proteína também aumentaram com a adição do amido, principalmente a partir do segundo dia. A lactose, a partir de 24 horas, aumentou significativamente no leite adulterado com amido. Os sólidos totais e não gordurosos também aumentaram e reduziu-se o ponto de congelamento. Os valores de NUL foram significativamente menores quando o amido foi adicionado a 0,5% e 1%, mesmo que estes valores tenham aumentado a partir do segundo dia. O amido adicionado ao leite causou uma redução nos valores de caseína.

Tabela 2 - Coeficientes da regressão linear múltipla dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de leite cru adulterado com amido, nos seis tempos de leitura e na temperatura de 25°C em relação a 7°C

Variáveis dependentes	Temperatura	Tempo					Quantidade			R ² ajustado
	25°C	3h	24h	48h	72h	168h	0,1%	0,5%	1%	(%)
Gordura	0,017*	0,008	0,002	-0,028	0,006	-0,0233*	0,275*	0,060*	0,077*	98,21
Proteína	0,001*	-0,0005	-0,0003	0,0035*	0,0021*	0,004*	0,009*	0,012*	0,019*	95,77
Lactose	0,006*	-0,001	0,0115*	0,0078*	0,0086*	0,0141*	0,015*	0,061*	0,116*	97,82
Sólidos	0,024*	0,004	0,015	0,008	0,019*	-0,003	0,057*	0,136*	0,209*	98,14
SNG	0,007*	-0,004	0,011*	0,012*	0,012*	0,019*	0,028*	0,080*	0,144*	97,82
NUL	0,809*	0,074	0,278	0,603*	0,653*	1,28*	-0,02	-3,941*	-8,652*	90,13
Caseína	0,003*	0,000	0,000	0,002	-0,002	0,001	-0,007*	-0,016*	-0,023*	88,6
PC	-0,0009*	-0,000	-0,001*	-0,000*	-0,001*	-0,001*	-0,002*	-0,007*	-0,013*	97,69
CCS	-6,361*	-2,4	-8,333	-8,8*	-11,15*	-10,733*	4,194	25,75*	55,805*	89,56
CBT	415,227*	-53,25	-118,45	-120,033	106,983	996,6*	512,041*	1830,306*	3113,889*	79,4

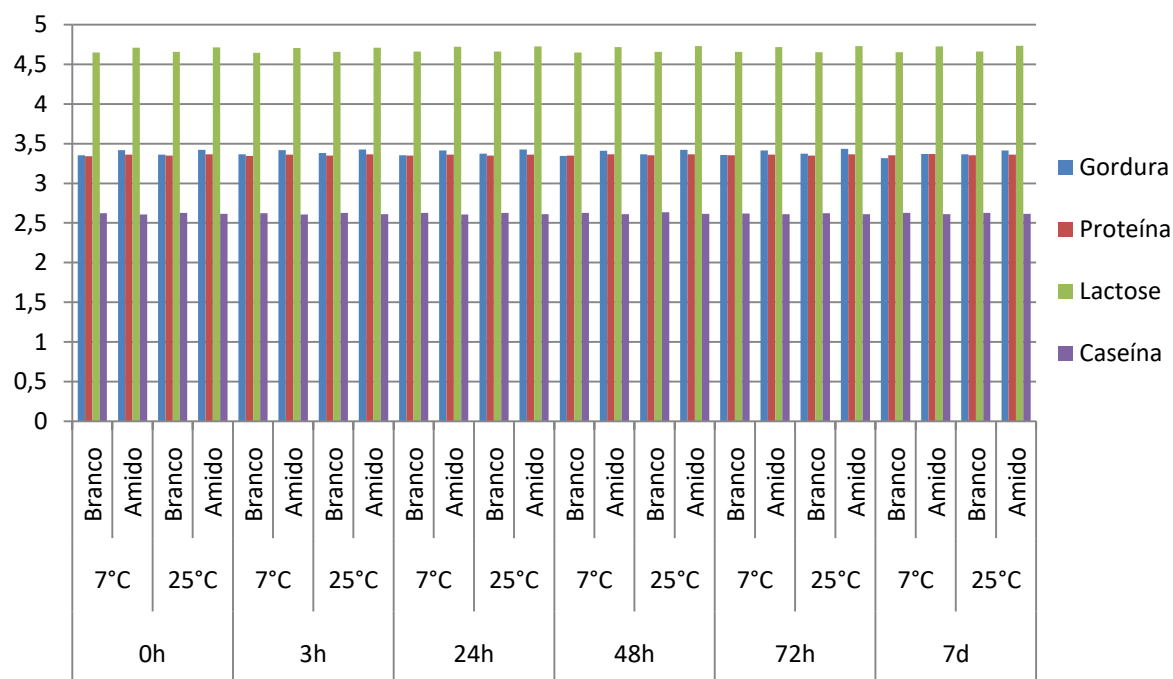
*p<0,05

O coeficiente de determinação múltipla, representado por R^2 , é uma medida do quanto à equação de regressão múltipla se ajusta aos dados amostrais. Um ajuste muito bom resulta em R^2 próximo de 1. Porém, à medida que mais variáveis são incluídas na análise, mais o R^2 cresce, e isso pode incorrer em erros. Por isso, o uso do R^2 ajustado é o mais indicado, pois é feito um ajuste, uma modificação, para levar em conta o número de variáveis e o tamanho amostral.

O valor de P é uma medida da significância global da equação de regressão múltipla. Quando o valor de P é pequeno indica que a equação tem boa significância e é adequada para previsões.

Os valores médios da gordura, proteína, lactose e caseína estão na Figura 5 e, segundo a IN 62/2011, os valores estão dentro da normalidade, mesmo quando adicionado de amido. A análise estatística realizada identificou alterações nos mesmos componentes, nas leituras realizadas pelo FTIR.

Figura 5 - Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru com adição de amido, armazenado por sete dias e conservado às temperaturas de 7°C e 25°C



Leite cru controle = branco

Valores em g/100g

5.4- Composição do leite adulterado com sacarose

A composição do leite adulterado com sacarose, observada na tabela 3, apresentou alteração em todos os parâmetros analisados ($p < 0,05$), exceto para os teores de gordura e CBT.

O teor de proteína apresentou uma diminuição quando a sacarose foi adicionada acima de 0,5%. A lactose, os sólidos totais e não gordurosos tiveram aumentos expressivos com a adulteração por sacarose. O ponto de congelamento reduziu, principalmente após 24 horas de armazenamento. Os valores de NUL foram maiores à medida que o tempo e a quantidade de sacarose também aumentavam e a adição da sacarose também reduziu os valores de caseína, principalmente após o terceiro dia de armazenamento.

Oliveira (2011) encontrou aumento nos valores de NUL no leite cru armazenado à temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, a partir do terceiro dia, e relacionou o achado a uma possível degradação bacteriana da proteína.

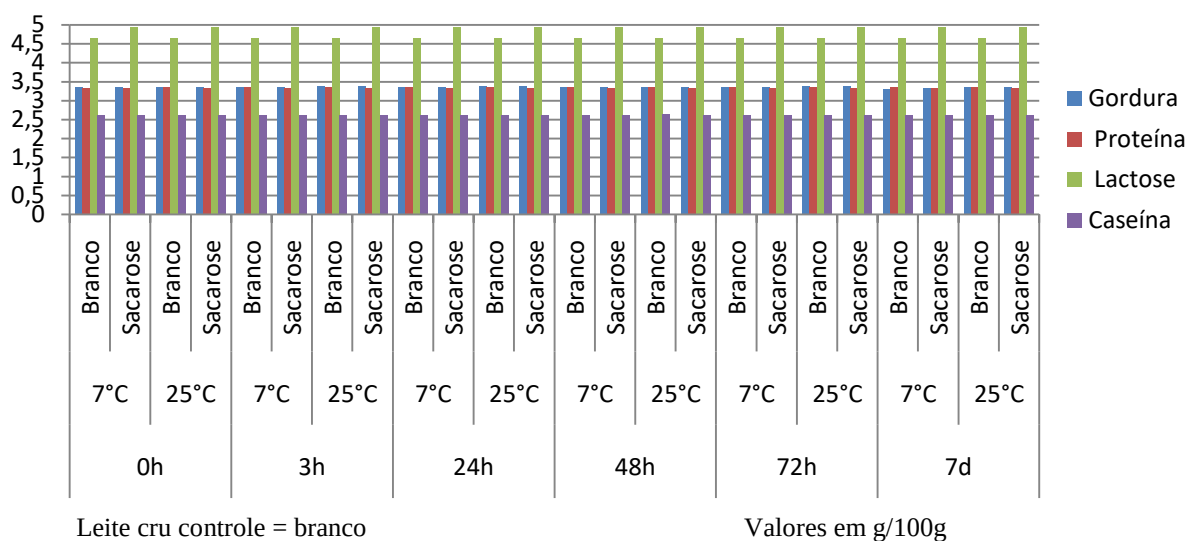
Tabela 3 - Coeficientes da regressão linear múltipla dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de leite cru adulterado com sacarose, nos seis tempos de leitura e na temperatura de 25°C em relação a 7°C

Variáveis dependentes	Temperatura	Tempo					Quantidade			R ² ajustado
	25°C	3h	24h	48h	72h	168h	0,1%	0,5%	1%	(%)
Gordura	0,012*	0,007	0,0005	-0,028	0,007	-0,011*	0,009*	-0,0002	-0,003	98,88
Proteína	0,002*	0,0005	0,001	0,006*	0,004*	0,006*	0,002*	-0,075*	-0,019*	95,48
Lactose	0,003*	-0,003	0,006*	0,002	0,001	0,004*	0,051*	0,268*	0,534*	99,84
Sólidos	0,021*	0,010	0,017*	0,009	0,145*	0,000	0,060*	0,243*	0,476*	99,08
SNF	0,004*	-0,003	0,007*	0,008*	0,007*	0,105*	0,057*	0,273*	0,539*	99,61
NUL	0,545*	-0,102	0,223	0,414*	0,562*	0,852*	0,515*	0,646*	0,265*	79,83
Caseína	0,003*	-0,001	-0,002	0,0005	-0,004*	-0,003*	-0,003*	-0,003*	-0,004*	89,24
PC	-0,0006*	-0,0005	-0,001*	-0,0004*	-0,0004*	-0,0004*	-0,005*	-0,027*	-0,053*	99,75
CCS	-2,522	-1,05	0,633	-6,016*	-7,9*	-4,933*	-4,041*	-5,083*	-6,416*	92,83
CBT	381,205*	0,633	-3,9	7	94,567	1013,117*	86,014	23,458	21,486	33,09

*p<0,05

Segundo a IN 62/2011, os valores médios da gordura, proteína, lactose e caseína, na Figura 6, estão dentro da normalidade, mesmo quando adicionado de sacarose. Porém, o equipamento FTIR identificou alterações nas leituras dos mesmos componentes, segundo a análise estatística realizada.

Figura 6 - Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru com adição de sacarose, armazenado por sete dias e conservado às temperaturas de 7°C e 25°C



5.5- Influência da temperatura de conservação das amostras

A conservação das amostras a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) levou ao aumento dos valores de gordura, lactose, sólidos, SNF, MUN, caseína, CBT e diminuiu os valores de CCS e ponto de congelamento, quando comparada à conservação sob refrigeração ($7\pm 2^{\circ}\text{C}$), nos leites adulterados com amido ou sacarose.

A Tabela 4 demonstra a correlação das temperaturas às variáveis dependentes (parâmetros físico-químicos) comparando as médias obtidas no leite controle e nas amostras adulteradas.

Tabela 4- Média dos parâmetros físico-químicos do leite cru controle e do leite adicionado com amido e sacarose, nas três concentrações e conservados a 7°C e 25°C

	CONTROLE		AMIDO			SACAROSE		
Parâmetros			0,1%	0,5%	1%	0,1%	0,5%	1%
Gordura (g/100g)	7°C	3,35	3,38	3,41	3,44	3,37	3,35	3,35
	25°C	3,37	3,40	3,43	3,44	3,37	3,37	3,36
Proteína (g/100g)	7°C	3,35	3,36	3,36	3,37	3,35	3,34	3,33
	25°C	3,35	3,36	3,36	3,37	3,35	3,34	3,33
Lactose (g/100g)	7°C	4,65	4,67	4,71	4,77	4,70	4,92	5,19
	25°C	4,66	4,67	4,72	4,78	4,71	4,92	5,19
Sólidos Totais (g/100g)	7°C	12,32	12,37	12,45	12,54	12,39	12,56	12,80
	25°C	12,35	12,40	12,48	12,54	12,40	12,59	12,82
SNG (g/100g)	7°C	9,01	9,03	9,09	9,15	9,06	9,28	9,55
	25°C	9,01	9,04	9,09	9,16	9,07	9,28	9,55
NUL (mg/dL)	7°C	14,53	14,36	10,55	5,14	14,80	15,04	14,92
	25°C	14,97	15,10	11,07	7,05	15,73	15,75	15,12
Caseína (g/100g)	7°C	2,63	2,62	2,61	2,60	2,62	2,62	2,62
	25°C	2,63	2,62	2,61	2,61	2,63	2,63	2,62
PC (°C)	7°C	-0,530	-0,532	-0,537	-0,543	-0,535	-0,555	-0,580
	25°C	-0,531	-0,533	-0,538	-0,543	-0,536	-0,556	-0,580

5.6- CCS e CBT do leite adulterado com reconstituintes da densidade

A adulteração por amido levou ao aumento da leitura de CBT quando adicionado acima de 0,5% e aumento da leitura de CCS à medida que a quantidade adicionada também aumentava. No leite adicionado de sacarose houve uma redução na CCS (Tabela 3), significativamente verificada na regressão linear múltipla.

A CCS foi influenciada pelo tempo de armazenamento, ocorrendo diminuição nos valores a partir do segundo dia e uma queda mais acentuada quando armazenada a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Leite (2006) encontrou redução na CCS a partir do quinto dia de armazenamento a 30°C , em leite cru. Leite (2006) e Oliveira (2011) sugeriram que a diminuição encontrada de CCS à temperatura

ambiente se devesse ao fato da refrigeração, entre 4 e 10°C, conservar a integridade da célula somática.

O valor da CBT das amostras adulteradas aumentou expressivamente a partir do sétimo dia e também no armazenamento à temperatura ambiente, conforme observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios de CCS e CBT no leite cru controle e no leite adicionado com amido e sacarose nas três concentrações, nos seis tempos de leitura e conservados às temperaturas de 7°C e 25°C

Temperatura(°C)	AMIDO								SACAROSE					
	CONTROLE		0,1%		0,5%		1%		0,1%		0,5%		1%	
Tempo(h)	CCS	CBT	CCS	CBT	CCS	CBT	CCS	CBT	CCS	CBT	CCS	CBT	CCS	CBT
7°C	71	5	76	151	99	683	132	1199	67	6	66	6	64	7
0h	68	7	78	150	95	710	145	1297	70	7	61	7	68	9
3h	73	6	80	161	98	668	134	1255	68	9	67	9	66	13
24h	73	4	74	148	97	676	130	1127	63	6	62	6	66	6
48h	60	4	69	147	99	660	131	1086	71	4	64	7	62	6
72h	67	4	71	151	99	702	116	1249	63	5	62	5	59	6
168h	84	3	86	149	108	680	138	1181	69	4	78	4	65	3
25°C	68	134	71	368	91	859	118	1373	64	200	63	150	62	148
0h	76	7	76	157	98	698	143	1335	68	7	69	9	73	10
3h	67	6	77	156	104	680	126	1216	71	7	68	8	67	9
24h	84	6	74	146	98	633	130	1151	66	7	66	7	68	12
48h	67	11	71	142	93	653	119	1175	63	12	63	21	60	21
72h	62	50	67	408	87	878	114	1297	61	107	61	96	55	99
168h	54	725	63	1197	68	1614	78	2063	55	1064	54	757	51	735

CCS – (x1000 CS/mL)

CBT – (x1000 UFC/mL)

A adição do amido no leite cru levou a um aumento expressivo na CBT desde a primeira leitura (tempo 0h). Suspeitou-se de uma possível contaminação do reagente utilizado. Porém, feito a análise de mesófilos (valor encontrado de 10^3 UFC/g) e leveduras (não houve crescimento), o amido não estava além dos padrões legais. Segundo Rosa e Silva (2009), para amido é admissível valores entre 10^4 e 10^6 UFC/g em contagem padrão em placas (CPP).

A maior contagem bacteriana observada na citometria de fluxo pode ser explicada pelo fato de que este método enumera a totalidade de bactérias viáveis, assim como das bactérias não viáveis; diferentemente da CPP, em que apenas bactérias viáveis que crescem em condições de cultivo em placas (nutrientes disponíveis no meio, tensão de oxigênio, temperatura e tempo de incubação) são contadas (Evangelista, 2008).

No processo de obtenção do amido há a possibilidade da ocorrência de microrganismos não viáveis devido ao processamento e desidratação.

6-CONCLUSÕES

O leite adulterado com reconstituintes da densidade teve seus parâmetros físico-químicos e microbiológicos alterados significativamente.

O perfil desses parâmetros no leite adulterado com amido difere do leite adulterado com sacarose. A adição de amido alterou os resultados esperados da composição do leite cru em uma direção e intensidade diferentes, quando comparado com a sacarose, com interferência nos principais componentes.

A análise por infravermelho do leite cru adicionado com reconstituintes da densidade, usados como adulterantes, apresentou resultados divergentes para a análise composicional, talvez devido a comprimentos de onda absorptivos superpostos.

Os resultados encontrados corroboram para a preocupação quanto à conservação das amostras para envio aos laboratórios. Tanto a temperatura quanto o tempo de armazenamento influenciaram nos resultados analíticos da composição do leite, adulterado ou não.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES MR, CAMPÊLO CS, SILVA JBA. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo, 2014; 73(3): 244-51.
- BESERRA, E.E.A. *Efeito do nitrogênio ureico no leite sobre a eficiência reprodutiva de vacas da raça Girolando*. 2007. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- BIGGS, D. A.; JOHNSON, G.; SJAUNJA, L. O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.208, p.21-29, 1987.
- BRASIL. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal* – RIISPOA. Brasília: MAPA. 1952. 154p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.51, de 18/09/2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p.13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 26/08/2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p.14.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62, de 29/12/2011. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 dez. 2011b. Seção I, p.6.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.7, de 03/05/2016. Altera o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, 04 mai. 2016. Seção I, p.11.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Operação Leite Adulterado I e II. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/08/operacao-leiteadulterado-i-e-ii>>. Acesso em 03 jan 2017.
- BRANDÃO, M. C. M. P.; CARMO, A. P.; BELL, M. J. V. *et al.* Characterization of milk by infrared spectroscopy. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 65, n.373, p.30-33, 2010.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E. *et al.* Composição do leite. Agência de Informação EMBRAPA. Agronegócio do Leite. EMBRAPA. Disponibilidade < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acessado em: 02 dez. 2016.

DELTA INSTRUMENTS. An Advanced Instruments Company. *LactoScope FTIR user's guide*. Milk and Liquid Dairy Product Analyzer. Netherlands: Delta Instruments, 2007. 138p.

EVANGELISTA, D. T. *Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos*. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FERNANDES, V.G.; MARICATO, E. Análises físico-químicas de amostras de leite cru de um laticínio em Bicas-MG. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 65, n. 375, p. 3-10, 2010.

FONSECA, C.S.P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais*. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

FONSECA, L.M.; FONSECA, C.S.P. Índice crioscópico – Qual a importância deste parâmetro na qualidade do leite? *Artigos Técnicos* – ReHagro. 2003.

FOSS. Central Milk Testing. Disponível em: <<http://foss.dk/industry-solution/products/bactoscan-fc>>. Acessado em: 27 dez. 2016.

FREITAS FILHO, J.R.; SOUZA FILHO, J.S.; GONÇALVES, T.M. *et al.* Caracterização físico-química do leite “in natura” comercializado informalmente no município d Garanhuns-PE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v.3, n.2, p. 38-46, 2009.

GAÚCHA BLOG NEWS. MP deflagra a 11ª Operação Leite Compensado e a 4ª Operação Queijo Compensado no RS. 2016. Disponível em: <<http://wp.clicrbs.com.br/casodepolicia/2016/07/05/mp-deflagra-a-11a-operacao-leite-compensado-e-a-4a-operacao-queijo-compensado-no-rs/?topo=52,1,1,171,e171>>. Acessado em: 02 dez.2016

G1. Operação Leite Compensado 7 tem 16 presos e posto interditado no RS. G1, Rio Grande do Sul. 2014. Disponível em: < <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/campo-e-lavoura/noticia/2014/12/operacao-leite-compensado-7-tem-16-presos-e-posto-interditado-no-rs.html>>. Acessado em: 20 ago. 2015.

G1. Depoimentos revelam como funcionava fraude do leite. 2007. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL161409-5598,00.html>>. Acessado em: 03 dez. 2016.

HENRICKS, S. C.; MACEDO, R. E. F. M.; KARAM, L. B. Influência de indicadores de qualidade sobre a composição química do leite e influência das estações do ano sobre esses parâmetros. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v.12, n.3, p.199-208, jul./set., 2014.

IDF. *International IDF Standard 100B: 1991: Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C*. Bruxelas, 1991, 3 f.

LEITE, M. O. *Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol*. 2006. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MANHANI, T.M.; CAMPOS, M.V.M.; DONATI, F.P. Sacarose, suas propriedades e os novos edulcorantes. *Revista Uniara*, v.17, n.1, julho 2014, p. 113-125.

MENDES, M. H. A. F. *Produção higiênica do leite: Boas Práticas Agrícolas*. Curso de Pós-graduação "Lato Sensu": Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal. 2006. 42 f. Universidade Castelo Branco, Brasília.

MÉTODO DE ENSAIO - MET POA/12/01/01. *Pesquisa de Amido em Leite Fluido e Desidratado*. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal. 2001.

OLIVEIRA, M. C. P. P. *Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): validação da análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite*. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, M.C.P.P.; SILVA, N.M.A.; BASTOS, L.P.F. *et al.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for MUN analysis in normal and adulterated Milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.5, p.1360-1366, 2012.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Vencendo a luta contra a mastite. Westfalia Landtechnik do Brasil Ltda. 2002. 192 p.

RIBAS, N. P.; HARTMANN, W.; MONARDES, H. G. *et al.* Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. V.33, n.6, p.2343-2350, 2004 (Supl.3).

RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. Analysis of dairy products by nearinfrared spectroscopy: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, n.8, p.2815-2818, 1997.

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

ROSA E SILVA, F.; LOBO, V.L.S.; FILIPPI, M.C.C.; PRABHU, A. S. Quantificação da carga microbiana em diferentes tipos de arroz comercial. 2009. Agência de Informação Embrapa. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/anais452_000g1t8u59u02wx5ok0ctponzb9l3hyh.pdf Acesso em: 17 ago. 2016.

SALIBA, E. O. S.; GONTIJO NETO, M. M.; RODRIGUES, N. M. *et al.* Predição da Composição Química do Sorgo pela Técnica de Espectroscopia de Refletância no Infravermelho Próximo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.3, 2003.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010. 265p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. *Importância e efeito de bactérias psicrotólicas sobre a qualidade do leite*. *Higiene Alimentar*, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

SANTOS, N. A. F.; LACERDA, L. M.; RIBEIRO, A.C.; LIMA, M. F. V. *et al.* Avaliação da composição e qualidade físico-química do leite pasteurizado padronizado comercializado na Cidade de São Luiz, MA. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.78, n.1, p.109-113, jan./mar., 2011.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, London, v. 138, n. 1, p. 19-24, 2013.

SILVA, L. C. C. *Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado*. 2013. 99f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SILVA, P.H.F., PEREIRA, D.B.C., OLIVEIRA, L.L., COSTA JÚNIOR, L.C.G., *Físico-Química do Leite e Derivados: Métodos Analíticos*. Oficina de Impressão Gráfica, Juiz de Fora, 1997.

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

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

STATA CORP. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP.

TRIOLA, M.F. Introdução à Estatística. 10ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 696p.

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