



Universidade de Brasília

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

**INTERFERÊNCIA DE CONSERVANTES E NEUTRALIZANTES
ADICIONADOS AO LEITE SOBRE O DESEMPENHO DE UM TESTE
RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE FORMOL E SOBRE A MICROBIOTA
LÁTICA**

Gabriela Barbosa Alves de Souza

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA
DEZEMBRO/2019



Gabriela Barbosa Alves de Souza

**INTERFERÊNCIA DE CONSERVANTES E NEUTRALIZANTES
ADICIONADOS AO LEITE SOBRE O DESEMPENHO DE UM TESTE
RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE FORMOL E SOBRE A MICROBIOTA
LÁTICA**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Medicina Veterinária apresentado junto a
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA
DEZEMBRO/2019

Souza, Gabriela Barbosa Alves de

Interferência de conservantes e neutralizantes adicionados ao leite sobre o desempenho de um teste rápido para detecção de formol e sobre a microbiota láctica

33 páginas.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Gabriela Barbosa Alves de Souza

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Interferência de conservantes e neutralizantes adicionados ao leite sobre o desempenho de um teste rápido para detecção de formol e sobre a microbiota láctica

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Gabriela Barbosa Alves de Souza
e-mail: gabiisbarbosa@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: SOUZA, Gabriela Barbosa Alves de

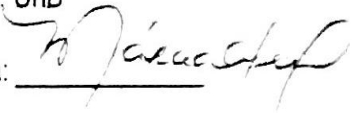
Título: Interferência de conservantes e neutralizantes adicionados ao leite sobre o desempenho de um teste rápido para detecção de formol e sobre a microbiota láctea

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 02 / 12 / 19

Banca Examinadora


Profª. Drª. Márcia Ferreira de Aguiar Instituição: UnB

Julgamento: Aprovada Assinatura: 

Profº. Drº. Ernandes Rodrigues de Alencar Instituição: UnB

Julgamento: Aprovada Assinatura: 

MSc. Jaqueline Lamounier Ribeiro Instituição: UnB

Julgamento: Aprovada Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por me proporcionarem a oportunidade e incentivo para fazer um curso que sempre sonhei, pela dedicação e carinho desde sempre.

À minha orientadora Prof.^a. Dr.^a. Márcia de Aguiar Ferreira, por ser uma professora e profissional inspiradora que me instigou a procurar essa área e me acolheu, ensinou e me ajudou sempre que precisei.

À Jaqueline Lamounier e Sabina Santos por toda ajuda, paciência, ensinamentos e apoio durante a pesquisa.

À Dannyelle van Landuyt e ao Leonardo Richard pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

E por fim, ao meu amigo e companheiro Vinnícius Curvello por me apoiar, incentivar e me ajudar durante toda a minha graduação.

RESUMO

O leite é um dos principais alimentos produzidos e consumidos no mundo devido às suas características nutricionais e organolépticas, porém é alvo de fraudes pelo aumento do volume e tentativas de mascarar a má qualidade microbiológica e físico-química. As substâncias fraudulentas mais usadas são a água, o soro de leite, os reconstituintes da densidade e do índice crioscópico, os neutralizantes como bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio e, as substâncias conservantes como cloro, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e formaldeído. O formol atua no desenvolvimento de micro-organismos, podendo alterar a microbiota do leite, entretanto a análise oficial para a sua detecção no leite é laboriosa e demorada. Essa pesquisa objetivou analisar a interferência de substâncias químicas adulterantes (peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio) e da lactose no desempenho de um teste rápido (Formfix2.0®) para detecção de formol no leite, e os efeitos dessas mesmas substâncias sobre o desenvolvimento de dois isolados de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*). Os resultados mostraram que a metodologia oficial foi capaz de detectar o formol adicionado ao leite a partir da menor concentração (0,001%) e que a lactose e a adição das substâncias químicas não interferem no desenvolvimento da reação. Por outro lado, o reagente Formfix2.0® detectou o formol adicionado apenas a partir da concentração 0,01% nos leites com e sem lactose. Observou-se ainda que, tanto o peróxido de hidrogênio quanto o hidróxido de sódio interferiram na reação do teste rápido a partir das concentrações de 0,05% e 0,5% respectivamente, causando resultados falsos negativos. Com relação à avaliação do efeito dessas substâncias sobre as bactérias ácido lácticas (BAL) o peróxido de hidrogênio teve efeito bactericida sobre os dois isolados apenas na concentração de 0,1% e após 24h. O hipoclorito de sódio reduziu as contagens dos dois isolados já a partir da menor concentração (0,01%) e no tempo zero, mas apenas sobre o *Lc. lactis* apresentou efeito bactericida na concentração de 0,1% e após 48 horas. Finalmente, o hidróxido de sódio não exerceu efeito bactericida sobre os isolados em nenhuma das concentrações e tempos avaliados. Os resultados obtidos nos estudos realizados permitem concluir que o teste rápido avaliado apresenta limitações na detecção de formol no leite, mas poderia ser utilizado como um teste de triagem e que as fraudes por substâncias conservantes e neutralizantes podem alterar significativamente a microbiota láctica do leite com impactos nas características nutricionais e nos processos tecnológicos do leite.

Palavras-chave: fraudes no leite; formaldeído; Formfix 2.0®; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactococcus lactis*;

ABSTRACT

Milk is one of the main foods produced and consumed in the world due to its nutritional and organoleptic characteristics, but it is the target of fraud due to the increase in volume and attempts to mask the poor microbiological and physicochemical quality. The most commonly used fraudulent substances are water, whey, cryoscopic density and index replenishers, neutralizers such as sodium bicarbonate or sodium hydroxide, and preservatives such as chlorine, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide and formaldehyde. Formaldehyde acts on the development of microorganisms and may alter the milk microbiota, however the official analysis for its detection in milk is laborious and time consuming. This research aimed to analyze the interference of adulterating chemicals (hydrogen peroxide, sodium hypochlorite and sodium hydroxide) and lactose in the performance of a rapid test (Formfix2.0®) for detection of formaldehyde in milk, and the effects of these substances on the development of two isolates of lactic acid bacteria (*Lactobacillus rhamnosus* and *Lactococcus lactis*). The results showed that the official methodology was able to detect the formaldehyde added to milk from the lowest concentration (0.001%) and that the lactose and the addition of the chemical substances do not interfere in the reaction development. On the other hand, Formfix 2.0 reagent detected added formaldehyde only from the 0.01% concentration in lactose and lactose free milks. It was also observed that both hydrogen peroxide and sodium hydroxide interfered in the rapid test reaction from concentrations of 0.05% and 0.5% respectively, causing false negative results. Regarding the evaluation of the effect of these substances on lactic acid bacteria (LAB), the hydrogen peroxide had bactericidal effect on both isolates only at the concentration of 0.1% and after 24h. Sodium hypochlorite reduced the counts of both isolates already from the lowest concentration (0.01%) and at time zero, but only on *Lc. lactis* presented bactericidal effect at a concentration of 0.1% and after 48 hours. Finally, sodium hydroxide had no bactericidal effect on the isolates at any of the concentrations and times evaluated. The results of the studies show that the rapid test evaluated has limitations in the detection of formaldehyde in milk, but could be used as a screening test and that preservative and neutralizing fraud can significantly alter the lactic microbiota of milk with impact in nutritional characteristics and technological processes of milk.

Keywords: milk frauds; formaldehyde; Formfix 2.0®; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactococcus lactis*;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite sem lactose (A) e com lactose (B), pelo teste Formfix2.0®. 11
- Figura 2** – Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite, adulterado com peróxido de hidrogênio, pelo teste Formfix2.0®.....12
- Figura 3** – Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite, adulterado com hipoclorito de sódio, pelo teste Formfix2.0®.....14
- Figura 4** – Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite, adulterado com hidróxido de sódio, pelo teste Formfix2.0®.....15
- Figura 5** – Efeito do peróxido de hidrogênio a 0,1% sobre o desenvolvimento de isolados de *Lactobacillus rhamnosus* em 0, 24 e 48 horas (A, B e C, respectivamente) e de *Lactococcus lactis* em 0, 24 e 48 horas (D, E e F, respectivamente).....17
- Figura 6** – Efeito do hipoclorito de sódio a 0,1% sobre o desenvolvimento de isolados de *Lactobacillus rhamnosus* em 0, 24 e 48 horas (A, B e C, respectivamente) e de *Lactococcus lactis* em 0, 24 e 48 horas (D, E e F, respectivamente)..... 18
- Figura 7** – Efeito do hidróxido de sódio a 0,1% sobre o desenvolvimento de isolados de *Lactobacillus rhamnosus* em 0, 24 e 48 horas (A, B e C, respectivamente) e de *Lactococcus lactis* em 0, 24 e 48 horas (D, E e F, respectivamente).....21

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultados observados no teste do reagente FormFix2.0® na detecção de formol adicionado em leites com e sem lactose.....12
- Tabela 2** – Resultados observados no teste do reagente FormFix2.0® na detecção de formol adicionado em leite contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio..... 12
- Tabela 3** – Resultados observados no teste do reagente FormFix2.0® na detecção de formol adicionado em leite contendo diferentes concentrações de hipoclorito de sódio..... 13
- Tabela 4** – Resultados observados no teste do reagente FormFix2.0® na detecção de formol adicionado em leite contendo diferentes concentrações de hidróxido de sódio..... 14
- Tabela 5** – Resultados das contagens de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* inoculados em leite refrigerado contendo peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio em concentrações de 0,01% e 0,1%, por um período de 48 horas..... 16

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Tratamentos para avaliação da interferência da lactose na detecção de formol adicionado ao leite.....6
- Quadro 2** – Composição dos tratamentos de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formol adicionados ao leite UAT.....8
- Quadro 3** – Composição dos tratamentos de hipoclorito de sódio ($NaClO$) e formol adicionados ao leite UAT.....8
- Quadro 4** – Composição dos tratamentos de hidróxido de sódio ($NaOH$) e formol adicionados ao leite UAT.....8
- Quadro 5** – Volumes de peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio adicionados ao leite inoculado com BAL.....10

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
Primeiro estudo: Interferência de lactose, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio no desempenho de testes para detecção de formol adicionado no leite.....	6
Segundo estudo: Efeito da adição de peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio no desenvolvimento de bactérias ácido lácticas inoculadas no leite	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
Primeiro estudo.....	10
Segundo estudo.....	15
5 CONCLUSÕES	19
6 REFERÊNCIAS.....	20

1. INTRODUÇÃO

Leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017a). É um dos principais alimentos produzidos e consumidos no mundo devido às suas características nutricionais e organolépticas, sendo a matéria-prima para a produção de diversos derivados lácteos (HOCHMÜLLER et al., 2016 apud DESCONSI et al., 2014).

Devido à sua composição, é um meio de cultura ideal para micro-organismos e, portanto, são considerados para o consumo humano apenas os produtos termicamente tratados (BRASIL, 2017a). O balanço anual da Associação Brasileira do Leite Longa Vida (ABLV) de 2017 relata que o consumo de leite UAT atingiu 7,026 bilhões de litros, o que significa um aumento de 2,8% em relação ao ano anterior (EMBRAPA, 2018).

A qualidade do leite obtido é uma constante preocupação, tanto de técnicos e autoridades ligados à área de saúde e laticínios bem como dos consumidores. Um dos problemas mais graves são as fraudes de diversos tipos, que causam prejuízos econômicos, riscos à saúde dos consumidores e até problemas para as indústrias, pelo baixo rendimento de derivados. Sendo, portanto, a investigação de adulterações no leite imprescindível, tanto pela questão econômica quanto pela de saúde pública (KARTHEEK, et al. 2011; MAREZE, 2015).

As fraudes no leite visam o aumento do volume, para ganhos financeiros, e mascarar a má qualidade microbiológica e as alterações físico-químicas, como altos níveis de acidez, para prolongar a viabilidade. As substâncias mais adicionadas são água ou soro de leite, reconstituintes da densidade como sal, açúcar e amido, conservantes como hipoclorito, peróxido de hidrogênio ou formaldeído e neutralizantes da acidez como bicarbonato de sódio, citrato de sódio ou hidróxido de sódio (SILVA, 2013; GONDIM, 2017).

Casos de fraude no leite pelo Brasil despertaram um alerta nos órgãos fiscalizadores, no setor produtivo e nos consumidores. Em 2007, foi realizada a Operação Ouro Branco, a qual indiciou duas cooperativas em Minas Gerais por adulteração complexa, elaborada para enganar a fiscalização em produto final que era repassado a vários estados do Brasil (PORTAL G1, 2007). Em 2013, o Ministério

Público do Rio Grande do Sul e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) deflagraram a “Operação Leite Compen\$ado”, para investigar adulterações em algumas cidades do estado por adição de água e ureia (ANVISA, 2013; GRIZOTTI, 2013;).

Em 2014 a Operação Longa Vida, da Polícia Federal, investigou quatro laticínios no estado de Pernambuco por suspeita de adição de neutralizantes. As fraudes mais recorrentes, descobertas pelas investigações, foram adições de água e ureia, que acabava por adicionar formol devido a composição, para aumento de volume e de proteína e adição de hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio para reutilização de leite deteriorado ou para prolongar a vida de prateleira pela redução da multiplicação bacteriana (NOGUEIRA, 2015). Essas práticas, além de proibidas pela legislação e de apresentar risco à saúde de consumidores, causam diminuição do consumo de leite, prejudicam a imagem do setor e contribuem para o aumento do mercado de leite informal (SILVA, 2013; BREITENBACH et al., 2018).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos oxidantes mais versáteis que existem com efeito superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio sendo usado para os mais variados fins. Entre as aplicações envolvidas com o uso do peróxido de hidrogênio na forma isolada, tem-se hidrólise de formaldeído, de carboidratos e inibição de crescimento de bactérias (MATTOS et al., 2003).

O hidróxido de sódio (NaOH), ou soda cáustica, é obtido a partir do cloreto de sódio por eletrólise e outros processos industriais. Por ser bastante solúvel em água é muito utilizado na fabricação de detergentes e para a limpeza dos equipamentos de fabricação, principalmente os de produtos de origem animal, tanto de leite como para produção de carne, para remoção de resíduos de matéria orgânica. É uma substância corrosiva para todos os tecidos, que ao entrar em contato com estes provoca queimaduras severas. O hidróxido de sódio pode ser utilizado como aditivo alimentar com a função de “regulador de acidez”, para ajuste de pH. Porém, pela legislação brasileira de alimentos, não tem uso autorizado para o grupo de produtos “leite e produtos lácteos” (ANVISA, 2007).

O hipoclorito de sódio (NaClO) é um composto halogenado, alcalino (pH: 9,0), de baixo custo e ação rápida, com propriedades de ação detergente, bactericida e dissolução de matéria orgânica. É um dos princípios ativos mais comumente utilizados na higienização e desinfecção de instalações e equipamentos

de propriedades e indústrias leiteiras, possibilitando presença de resíduos acidentais, que ainda assim é considerado fraude, e acesso a essa substância para adição proposital no leite. É corrosivo para pele e mucosas, podendo provocar irritação no trato gastrointestinal se ingerido (CAMARGO et al., 2008; SILVA, 2013).

O formaldeído (H_2CO) é um gás incolor, inflamável e com forte odor, produzido a partir do metanol. Em sua forma líquida, misturado à água e álcool, é chamado de formalina ou formol, com concentração de 37 a 50% de formaldeído. O formol é tóxico se ingerido, inalado ou tiver contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. Por isso, a partir de julho de 2004, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou este composto *como carcinogênico (Grupo 1)*, tumorigênico e teratogênico por produzir efeitos na reprodução em humanos e em estudos experimentais demonstraram ser também, para algumas espécies de animais. Os tipos de câncer associados ao formol são os de nasofaringe, nasossinusal e há fortes evidências para leucemia (ANVISA, 2013).

O formol pode ainda inibir o desenvolvimento da microbiota natural do leite e de seus derivados, além de outros alimentos (GONDIM et al., 2017). As bactérias ácido lácticas (BAL) fazem parte desta microbiota e representam a base da tecnologia para a produção de diversos derivados do leite como fermentados e queijos. Ainda, diversas espécies de BAL apresentam potencial inibitório ou antagonista frente a diversos micro-organismos patogênicos e seu consequente uso em potencial na tecnologia de alimentos, como incorporação na ração de peixes como inibidor de patógenos, diminuição de níveis de aflatoxina em produtos lácteos e produção de queijos artesanais (SANTOS et al., 2014; SILVA, 2016; BONIN; PENTEADO; QUEIROZ, 2019; RIBEIRO, 2019).

Diversas espécies de BAL são reconhecidas como probióticos, que são definidos como micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, fornecem benefícios para a saúde do hospedeiro além da nutrição básica, como o controle da microbiota intestinal e sua estabilização após o uso de antibióticos, produção de compostos antimicrobianos, estimulação do sistema imune, entre outros. Além disso, devem conseguir atravessar viavelmente o trato gastrointestinal e ter capacidade de proliferação no intestino para promover todos esses benefícios (FAO/WHO, 2002; SAAD, 2006).

A legislação brasileira determina, por meio das Instruções Normativas nº76 e nº77 (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b), que os leites cru refrigerado, cru refrigerado tipo A, pasteurizado e pasteurizado tipo A, não devem apresentar substâncias estranhas à sua composição, tais como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico e, no caso do leite cru refrigerado o estabelecimento deve realizar o controle diário do volume de cada compartimento do tanque do veículo transportador. Não há citação nessas legislações sobre a frequência das análises de pesquisa de substâncias químicas nos leites após o beneficiamento, ficando implícito que o programa de autocontrole da indústria deverá contemplar essas análises.

Devido às provas de detecção de algumas substâncias utilizadas em fraudes serem muito laboriosas, a realização rápida e na frequência determinada pela legislação se torna difícil, dificultando a sua implantação por parte das indústrias e não sendo realizadas, resultando no acesso dos consumidores a um produto adulterado e que apresenta risco à saúde (MAREZE, 2015). A detecção de formol no leite, de acordo com a metodologia oficial, consiste em uma destilação com posterior fervura (BRASIL, 2017b) despendendo muito tempo para sua realização (de 60 a 90 minutos). O reagente Formfix2.0® foi desenvolvido pela Macofren Tecnologias Químicas LTDA, e de acordo com o fabricante, permite a detecção de formol no leite em apenas cinco minutos por meio de reação colorimétrica.

Considerando os aspectos apresentados, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a interferência de substâncias conservantes, neutralizantes e da lactose no desempenho de um teste rápido para detecção de formol no leite e, o efeito destes conservantes e neutralizantes no desenvolvimento de bactérias ácido lácticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar interferência de substâncias conservantes e neutralizantes na detecção de formol adicionado ao leite pelo teste rápido Formfix2.0® comparado à metodologia oficial e efeitos sobre desenvolvimento de Bactérias Ácido Lácticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a interferência da lactose no desempenho do teste rápido Formfix 2.0 na detecção de formol adicionado ao leite, comparado à metodologia oficial de detecção.
- Verificar se a presença de substâncias químicas como o peróxido de hidrogênio, o hipoclorito de sódio e o hidróxido de sódio interferem no desempenho do teste rápido Formfix 2.0®, na detecção de formol adicionado ao leite comparado ao da metodologia oficial de detecção.
- Avaliar os efeitos do peróxido de hidrogênio, do hipoclorito de sódio e do hidróxido de sódio sobre o desenvolvimento de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus rhamnosus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados leites ultra alta temperatura (UAT ou UHT - *Ultra High Temperature*) nas versões integral (seis litros), integral sem lactose (quatro litros) e desnatado (cerca de um litro e meio). Todos os leites foram submetidos às análises físico-químicas para avaliação de sua adequação para utilização na pesquisa, quanto aos teores de gordura, de extrato seco desengordurado e de acidez titulável (BRASIL, 1997). Os estudos foram realizados no Laboratório de Análises de Leite e Derivados (LabLeite), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB), no período de maio a setembro de 2019.

Primeiro estudo: Interferência de lactose, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio no desempenho de testes para detecção de formol adicionado no leite.

Avaliação da interferência da lactose na detecção de formol

Foram realizados oito tratamentos com formol (35%) em leite integral UAT com e sem lactose (Quadro 1), sendo que as concentrações foram obtidas através da fórmula $C_{inicial} \cdot V_{inicial} = C_{final} \cdot V_{final}$, na qual C corresponde a concentração e V a volume.

Quadro 1. Tratamentos para avaliação da interferência da lactose na detecção de formol adicionado ao leite.

Tratamentos	Concentrações de formol	Volumes utilizados		
		Leite sem lactose	Leite com lactose	Formol
T0	0%	400 mL	400 mL	-
T1	0,001%	399,99 mL	399,99 mL	0,01 mL
T2	0,005%	399,95 mL	399,95 mL	0,05 mL
T3	0,01%	399,90 mL	399,90 mL	0,10 mL
T4	0,03%	399,70 mL	399,70 mL	0,30 mL
T5	0,05%	399,50 mL	399,50 mL	0,50 mL
T6	0,1%	398,92 mL	398,92 mL	1,08 mL
T7	0,5%	394,60 mL	394,60 mL	5,40 mL

Os tratamentos T0 e T1 foram submetidos à metodologia oficial de detecção de formol estabelecida pelo Manual de Métodos Oficiais para Análises de Produtos

de Origem Animal (BRASIL, 2017b) em uma repetição e todos os tratamentos ao teste rápido Formfix2.0® em três repetições.

A metodologia oficial de detecção de formol consiste em separar 100 mL de leite homogeneizado em balão de destilação, adicionado de 100 a 150 mL de água destilada e 2 mL de ácido fosfórico p.a; em seguida procedeu-se ao processo de destilação que resultou em cerca de 50 mL de destilado. Deste volume, 1 mL foi transferido para tubo de ensaio contendo 5 mL de solução de ácido cromotrópico a 0,5%, seguido de aquecimento em banho-maria durante 15 minutos; posteriormente, avaliar a coloração formada, que violácea é considerada reação positiva e castanho/marrom é considerada negativa.

O Formfix2.0® é um reagente líquido e incolor, que na presença de formol desenvolve a cor violeta, e na ausência o leite permanece com sua coloração inalterada. O teste consiste em acrescentar 1 mL do reagente em 1 mL da amostra do leite a ser avaliado, com tempo de reação de 5 minutos, de acordo com as instruções do fabricante.

Avaliação da interferência de substâncias químicas na detecção de formol

Nessa etapa, foi utilizado leite UAT integral. As substâncias químicas utilizadas para avaliar interferência foram o peróxido de hidrogênio (30%), hipoclorito de sódio (3,5%) e hidróxido de sódio (10%), concentrações conforme os Quadros 2, 3 e 4 respectivamente, sendo a concentração de formol mantida constante (0,1%); as concentrações de peróxido de hidrogênio, de hipoclorito de sódio e de hidróxido de sódio também foram calculadas pela fórmula $C_{inicial} \cdot V_{inicial} = C_{final} \cdot V_{final}$.

Todos os tratamentos submetidos ao teste Formfix2.0® foram realizados em três repetições; para a metodologia oficial apenas o tratamento com maior concentração de peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio (T6) foi avaliado e em uma repetição. No caso de serem observadas interferências nessa concentração as demais seriam avaliadas.

Quadro 2. Concentrações dos tratamentos de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formol adicionados ao leite.

Tratamentos	Composição				
	Leite UAT	Formol		Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	
	Volume	Concentração	Volume	Concentração	Volume
T0	125 mL	-	-	-	-
T0'	124,59 mL	-	-	0,1%	0,41mL
T0''	124,66 mL	0,1%	0,33 mL	-	-
T1	124,65 mL	0,1%	0,33 mL	0,005%	0,020 mL
T2	124,63mL	0,1%	0,33 mL	0,01%	0,041 mL
T3	124,47 mL	0,1%	0,33 mL	0,05%	0,20 mL
T4	124,26 mL	0,1%	0,33 mL	0,1%	0,41 mL
T5	122,6 mL	0,1%	0,33 mL	0,5%	2,07 mL
T6	120,52 mL	0,1%	0,33 mL	1,0%	4,15 mL

Quadro 3. Concentrações dos tratamentos de hipoclorito de sódio ($NaClO$) e formol adicionados ao leite.

Tratamentos	Composição				
	Leite UAT	Formol		Hipoclorito de Sódio ($NaClO$)	
	Volume	Concentração	Volume	Concentração	Volume
T0	125 mL	-	-	-	-
T0'	121,43 mL	-	-	0,1%	3,57 mL
T0''	124,66 mL	0,1%	0,33 mL	-	-
T1	124,5 mL	0,1%	0,33 mL	0,005%	0,17 mL
T2	124,32 mL	0,1%	0,33 mL	0,01%	0,35 mL
T3	122,89 mL	0,1%	0,33 mL	0,05%	1,78 mL
T4	121,11 mL	0,1%	0,33 mL	0,1%	3,56 mL
T5	106,86 mL	0,1%	0,33 mL	0,5%	17,81 mL
T6	89,05 mL	0,1%	0,33 mL	1,0%	35,62 mL

Quadro 4. Concentrações dos tratamentos de hidróxido de sódio ($NaOH$) e formol adicionados ao leite.

Tratamentos	Composição				
	Leite UAT	Formol	Hidróxido de Sódio ($NaOH$)		
	Volume	Concentração	Volume	Concentração	Volume
T0	125 mL	-	-	-	-
T0'	123,75 mL	-	-	0,1%	1,25 mL
T0''	124,66 mL	0,1%	0,33 mL	-	-
T1	124,608 mL	0,1%	0,33 mL	0,005%	0,062 mL
T2	124,546 mL	0,1%	0,33 mL	0,01%	0,124 mL
T3	124,05 mL	0,1%	0,33 mL	0,05%	0,62 mL
T4	123,43 mL	0,1%	0,33 mL	0,1%	1,24 mL
T5	118,44 mL	0,1%	0,33 mL	0,5%	6,23 mL
T6	112,21mL	0,1%	0,33 mL	1,0%	12,46 mL

Segundo estudo: Efeito da adição de peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio no desenvolvimento de bactérias ácido lácticas inoculadas no leite

Para a realização desse estudo foram utilizados isolados de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus rhamnosus* provenientes de leite de búfalas, pertencentes ao acervo de bactérias ácido lácticas do Laboratório de Análises de Leite e Derivados, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília., estocados em caldo Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Vandhani Ind. Lbs Marg, Mumbai, Índia) e Glycerol 30% (Glicerina bidestilada, CEATOX, São Paulo, Brasil) e mantidos em freezer -80°C.

Recuperação dos isolados de BAL e preparo dos inóculos

Inicialmente, realizou-se a recuperação dos isolados de *Lc. lactis* e *Lb. rhamnosus* em caldo MRS a 37°C por 48 horas; após esse período, os isolados foram semeados em Ágar MRS e incubadas a 37° C por 48 horas. A partir das colônias formadas, foram preparados os inóculos de cada um dos isolados de acordo com o tubo 1 da escala de *McFarland*, afim de se obter contagens de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL aproximadamente. Os inóculos foram submetidos a diluições decimais seriadas em solução salina (NaCl) a 0,85 % até $3,0 \times 10^6$ UFC/mL. Em seguida, 300 mL de leite UAT desnatado foram inoculados com 3,0 mL de cada um dos inóculos, de forma a se obter diluição contendo aproximadamente $3,0 \times 10^4$ UFC/mL e, a partir desta se chegar até a diluição $3,0 \times 10^1$ UFC/mL. Finalmente, foram selecionadas as diluições de 10^3 e 10^1 para semeadura pelo método *pour plate* em ágar MRS, em duplicata e incubadas a 37° C por 24 horas para controle negativo dos inóculos.

Adição de substâncias conservantes e neutralizantes

A partir do inóculo de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL, o leite era distribuído em alíquotas de 20 mL para a adição das substâncias químicas testadas, peróxido de hidrogênio (30%), hipoclorito de sódio (5%) e hidróxido de sódio (10%), nas concentrações de 0,01% e 0,1%.

As concentrações foram obtidas por meio da fórmula $C_{inicial} \cdot V_{inicial} = C_{final} \cdot V_{final}$, em que C corresponde a concentração e V a volume, resultando nos volumes descritos no Quadro 5. Os inóculos de *Lc. lactis* e *Lb. rhamnosus* foram mantidos em temperatura de refrigeração ($7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e avaliados no tempo zero (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48). Os resultados das contagens foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

Para minimizar riscos de contaminação, todos os processos descritos foram feitos em capela de fluxo laminar. Além disso, o leite utilizado foi submetido ao processo de esterilização laboratorial e semeado pelo método de plaqueamento por superfície com 1,0 mL para garantir sua inocuidade.

Quadro 5. Volumes de peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio e de hipoclorito de sódio adicionados ao leite previamente inoculado com bactérias ácido lácticas.

Concentração	Leite (mL)	Peróxido de Hidrogênio (mL)	Hidróxido de Sódio (mL)	Hipoclorito de Sódio (mL)
0,01%	20	0,006	0,02	0,04
0,1%	20	0,067	0,2	0,4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises físico-químicas dos leites UAT utilizados indicaram que as amostras se apresentaram dentro dos padrões de normalidade (BRASIL, 1997) para utilização nos estudos propostos.

Primeiro estudo

A metodologia oficial foi capaz de detectar o formol adicionado em todos os tratamentos realizados. Os resultados obtidos na avaliação da interferência da lactose no desenvolvimento da reação do Formfix2.0® estão contidos na Tabela 1.

Foram observadas diferenças nas tonalidades de cor dos tratamentos contendo as diferentes concentrações de formol, sendo as tonalidades mais intensas correspondentes às maiores concentrações de formol (Figura 1). Ao entrar em contato com o leite, o reagente Formfix2.0® precipita a proteína causando um aspecto granuloso e isso se dá, provavelmente, pela presença de ácido clorídrico

em sua composição. A reação positiva que forma coloração violeta é facilmente distinguível do resultado negativo, que mantém a coloração natural do leite.

Tabela 1. Resultados observados no teste do reagente Formfix2.0® na detecção de formol adicionado em leites com e sem lactose.

Tratamentos	Concentrações de formol	Leites	
		Sem Lactose	Com Lactose
T0*	0%	-	-
T1*	0,001%	-	-
T2	0,005%	-	-
T3	0,01%	+	+
T4	0,03%	+	+
T5	0,05%	+	+
T6	0,1%	+	+
T7	0,5%	+	+

*Tratamentos em menores concentrações, 0% e 0,001%, sem lactose e com lactose submetidos à metodologia oficial com resultados correspondentes a negativo e positivo respectivamente.

As concentrações de 0,001% e 0,005% de formol (T1 e T2) apresentaram resultados falso negativos nos leites com e sem lactose, dentro do tempo estipulado pelo fabricante do teste, que é de cinco minutos. Após transcorridos 10 minutos, observou-se que o tratamento contendo a concentração de 0,005% de formol em leite com lactose adquiriu uma coloração clara, entretanto não pode ser considerado como resultado positivo por não estar contemplada no prospecto informativo do fabricante, tanto em relação ao tempo da reação quanto a cor desenvolvida (Figura 1).



Figura 1: Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite sem lactose (A) e com lactose (B), pelo teste Formfix2.0®.

Os resultados da avaliação da interferência do peróxido de hidrogênio na detecção de formol adicionado ao leite pelo reagente Formfix2.0® estão contidos na Tabela 2. Observou-se que o peróxido de hidrogênio interferiu no desenvolvimento da reação colorimétrica já a partir da concentração 0,05% (T3). Os tratamentos T3, T4, T5 e T6 apresentaram resultados falso negativos, entretanto após 10 minutos observou-se desenvolvimento discreto de cor nos tratamentos T3 e T4, e após 1 hora e 20 minutos em T5 e T6, portanto muito acima do tempo estipulado pelo fabricante (Figura 2).

Tabela 2. Resultados observados no teste do reagente FormFix2.0® na detecção de formol adicionado em leite contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

Tratamentos	Concentrações	Resultados	
		Até 5min	Após 5min
T0	Leite UAT	-	-
T0'	Leite UAT + H ₂ O ₂ 0,1%	-	-
T0''	Leite UAT + formol 0,1%	+	+
T1	Leite UAT + formol 0,1% + H ₂ O ₂ 0,005%	+	+
T2	Leite UAT + formol 0,1% + H ₂ O ₂ 0,01%	+	+
T3	Leite UAT + formol 0,1% + H ₂ O ₂ 0,05%	-	+
T4	Leite UAT + formol 0,1% + H ₂ O ₂ 0,1%	-	+
T5	Leite UAT + formol 0,1% + H ₂ O ₂ 0,5%	-	+
T6*	Leite UAT + formol 0,1% + H ₂ O ₂ 1,0%	-	+

*Tratamento submetido à metodologia oficial.

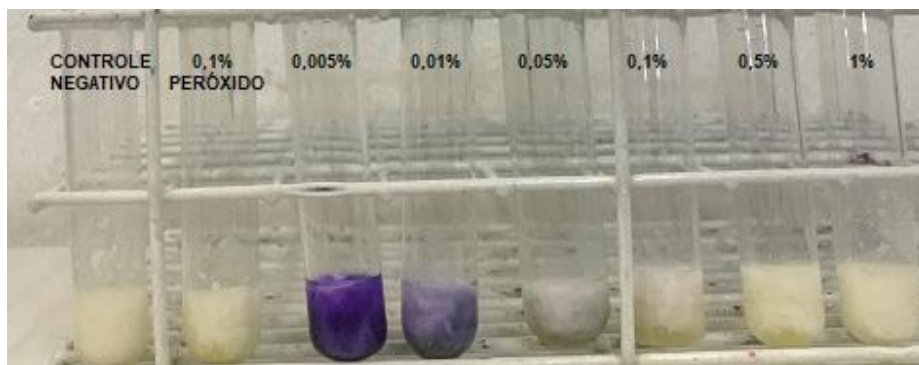


Figura 2: Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite, adulterado com peróxido de hidrogênio, pelo teste Formfix2.0®.

Em pesquisa realizada por Sousa (2016), que avaliou uma versão preliminar desse mesmo reagente (Formfix®), a presença do peróxido de hidrogênio também interferiu no desempenho do teste, porém produzindo resultados falso negativos no leite com formol a partir da concentração de 0,5%.

Segundo Mattos et al. (2003), a decomposição de peróxido de hidrogênio libera oxigênio molecular e calor, e em soluções diluídas, o calor é facilmente absorvido pela água presente, mas em soluções mais concentradas, o calor aumenta a temperatura e acelera a taxa de decomposição do reagente. Diferentemente do que ocorreu durante o teste, o que pode indicar uma interferência pelo formol, pela composição do leite ou pela composição do próprio teste no tempo de decomposição do peróxido de hidrogênio.

Mattos et al. (2003) ainda afirmam que a decomposição de peróxido de hidrogênio pode ser aumentada com o incremento da temperatura, e sua taxa de decomposição aumenta aproximadamente 2,5 vezes para cada 10 °C de aumento na temperatura, o que pode explicar não ter interferido no resultado da metodologia oficial, que se mostrou positiva na maior concentração de peróxido de hidrogênio adicionado (T6). Os autores ainda descrevem que o peróxido de hidrogênio pode ser utilizado para oxidar formaldeído tanto em meio ácido quanto em meio alcalino, o que explicaria a interferência na coloração esperada do teste, já que este possui ácido em sua composição.

Com relação à avaliação da interferência do hipoclorito de sódio, os resultados mostraram que essa substância não interferiu no desenvolvimento da reação do teste Formfix2.0®, em nenhum dos tratamentos testados (Tabela 3 e Figura 3). Na análise com a metodologia oficial, observou-se que a maior concentração de hipoclorito de sódio testada (1,0%), não foi capaz de interferir na detecção de formol no leite.

Tabela 3. Resultados observados no teste do reagente FormFix2.0® na detecção de formol adicionado em leite contendo diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Tratamentos	Concentrações	Resultados	
		Até 5min	Após 5min
T0	Leite UAT	-	-
T0'	Leite UAT + NaClO 0,1%	-	-
T0''	Leite UAT + formol 0,1%	+	+
T1	Leite UAT + formol 0,1% + NaClO 0,005%	+	+
T2	Leite UAT + formol 0,1% + NaClO 0,01%	+	+
T3	Leite UAT + formol 0,1% + NaClO 0,05%	+	+
T4	Leite UAT + formol 0,1% + NaClO 0,1%	+	+
T5	Leite UAT + formol 0,1% + NaClO 0,5%	+	+
T6*	Leite UAT + formol 0,1% + NaClO 1,0%	+	+

*= Tratamento submetido à metodologia oficial.

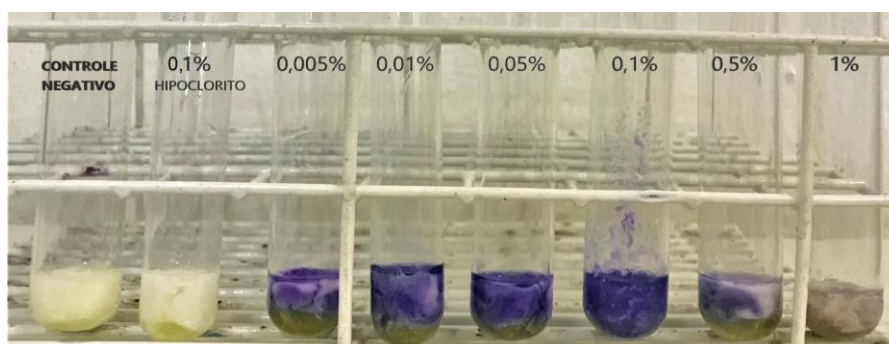


Figura 3: Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite, adulterado com hipoclorito de sódio, pelo teste Formfix2.0®.

Na avaliação do efeito do hidróxido de sódio na detecção de formol adicionado ao leite as concentrações de 0,5% (T5) e de 1,0% (T6) apresentaram resultados falso negativos conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados observados no teste do reagente FormFix2.0® na detecção de formol adicionado em leite contendo diferentes concentrações de hidróxido de sódio.

Tratamentos	Concentrações	Resultados	
		Até 5min	Após 5min
T0	Leite UAT	-	-
T0'	Leite UAT + NaOH 0,1%	-	-
T0''	Leite UAT + formol 0,1%	+	+
T1	Leite UAT + formol 0,1% + NaOH 0,005%	+	+
T2	Leite UAT + formol 0,1% + NaOH 0,01%	+	+
T3	Leite UAT + formol 0,1% + NaOH 0,05%	+	+
T4	Leite UAT + formol 0,1% + NaOH 0,1%	+	+
T5	Leite UAT + formol 0,1% + NaOH 0,5%	-	+
T6*	Leite UAT + formol 0,1% + NaOH 1,0%	-	+

*Tratamento submetido à metodologia oficial com resultado positivo.

Entretanto, após cinco minutos, os tratamentos T5 e T6 apresentaram leve mudança na coloração, porém ainda considerados negativos devido a ultrapassar o tempo estipulado pelo fabricante.

A adição de hidróxido de sódio alterou de forma bem perceptível o desenvolvimento da coloração roxa que se apresentou menos intensa (Figura 4) quando comparada com os demais tratamentos. Isso pode ser devido ao fato deste composto apresentar pH extremamente alcalino, em torno de 13,5 (WIKIPEDIA), podendo atuar como um neutralizante do ácido presente na composição do reagente FormFix2.0®, interferindo na intensidade da cor da reação.

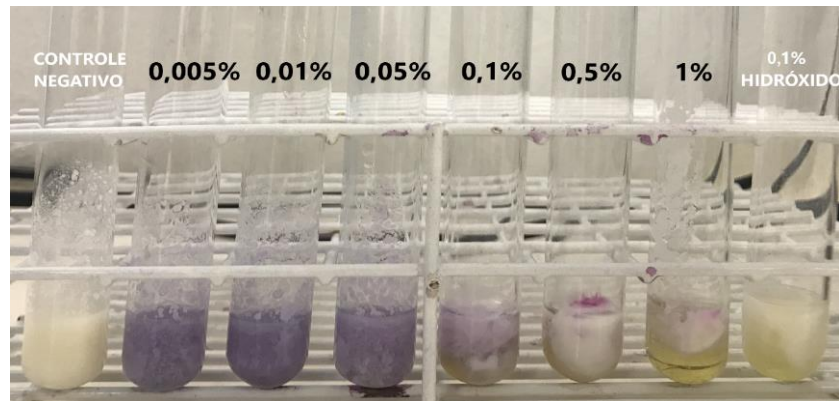


Figura 4: Desenvolvimento da reação colorimétrica observada na detecção de formol adicionado ao leite, adulterado com hidróxido de sódio, pelo teste Formfix2.0®.

Segundo estudo

Os resultados obtidos na inoculação dos isolados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* em concentrações de peróxido de hidrogênio, do hipoclorito de sódio e do hidróxido de sódio estão contidos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados das contagens de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* inoculados em leite refrigerado contendo peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio em concentrações de 0,01% e 0,1%, por um período de 48 horas.

	Substâncias	Concentrações	T0 (UFC/mL)	T24 (UFC/mL)	T48 (UFC/mL)	
<i>Lb. rhamnosus</i>		0%	14	14	14	
	H ₂ O ₂	0,01%	5	6	12	
		0,1%	10	0	0	
	NaClO	0,01%	10	7,5	9,5	
		0,1%	6,5	7,5	8	
	NaOH	0,01%	2,5	4	7,5	
		0,1%	4,5	3,5	4,5	
	<i>Lc. lactis</i>		0%	7	7	7
		H ₂ O ₂	0,01%	13	7	6,5
			0,1%	9,5	0	0
NaClO		0,01%	3	4	3,5	
		0,1%	0,5	2,5	0	
NaOH		0,01%	5,5	8	4	
		0,1%	2,5	5	3,5	

Legenda: H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; NaClO= hipoclorito de sódio; NaOH= hidróxido de sódio; T0= tempo zero; T24= 24 horas de refrigeração; T48= 48 horas de refrigeração

Em relação ao efeito do peróxido de hidrogênio sobre o desenvolvimento dos isolados testados, observou-se que a concentração de 0,01% produziu redução das contagens de *Lb. rhamnosus* já no tempo zero e posteriormente, ocorreu desenvolvimento da bactéria em 24 e 48 horas, sendo que nesse período a contagem praticamente igualou-se a do inóculo. Entretanto, na concentração de 0,1%, apesar da baixa redução na contagem no T0, a partir de 24 horas de armazenamento observou-se que o peróxido de hidrogênio apresentou efeito bactericida sobre a bactéria ácido láctica. Por outro lado, no desenvolvimento do isolado de *Lc. lactis*, o peróxido de hidrogênio na concentração de 0,01% não alterou

a contagem inicial. Porém assim como para *Lb. rhamnosus*, na concentração de 0,1% também apresentou redução total após 24 horas de refrigeração.

Silva et al. (2015) descreveram que o peróxido de hidrogênio em concentração de 0,003%, não foi detectado no leite após 24 horas em refrigeração, devido sua rápida degradação, o que poderia permitir o crescimento bacteriano após esse período. A figura 5 mostra a ação do peróxido de hidrogênio na concentração de 0,1%, nos tempos 0, 24 e 48 horas de armazenamento sobre o desenvolvimento de *Lb. rhamnosus* e *Lc. lactis*.

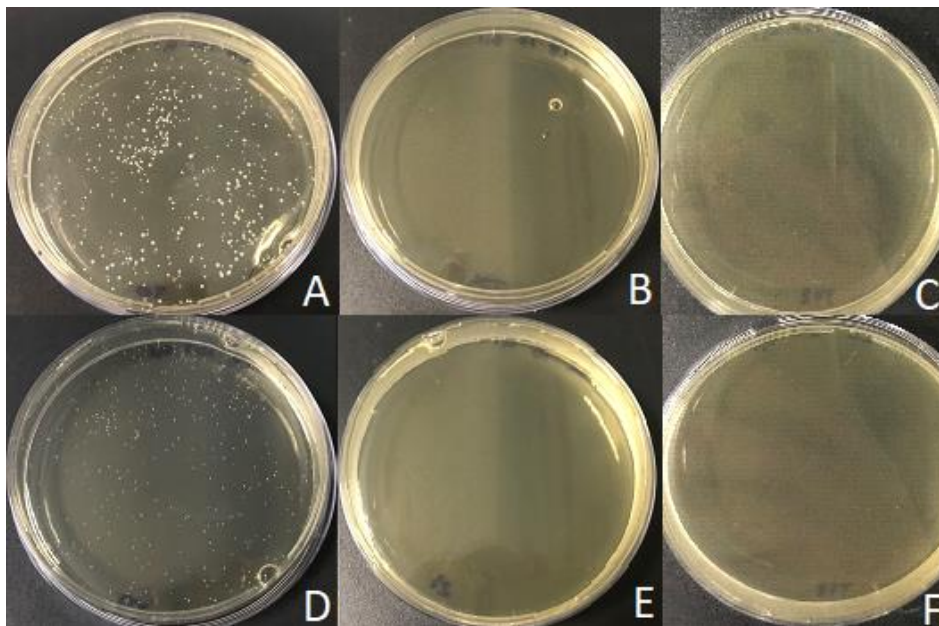


Figura 5: Efeito do peróxido de hidrogênio a 0,1% sobre o desenvolvimento de isolados de *Lactobacillus rhamnosus* em 0, 24 e 48 horas (A, B e C, respectivamente) e de *Lactococcus lactis* em 0, 24 e 48 horas (D, E e F, respectivamente).

As duas concentrações de hipoclorito de sódio não foram capazes de interromper o desenvolvimento de *Lb. rhamnosus*, apenas reduzindo as contagens que se mantiveram estáveis nos períodos avaliados. Entretanto, observou-se que o isolado de *Lc. lactis* foi mais afetado pelas duas concentrações de hipoclorito sendo que, a concentração de 0,1% foi capaz de eliminar o microrganismo em 48 horas (Figura 6).

Ribeiro (2019), avaliou que isolados de *Lc. lactis* apresentaram capacidade de se desenvolver em todos os valores de pH testados e em todos os períodos, se apresentando mais resistente do que *Lb. rhamnosus*, principalmente em pH alcalino,

ambiente semelhante ao inóculo adicionado de hipoclorito de sódio, pois essa substância apresenta pH em torno de 12 (CAMARGO et al., 2008). Silva et al. (2015) demonstraram a capacidade do hipoclorito de sódio de promover significativa redução nas contagens microbiológicas de aeróbios mesófilos em leite cru, que também não foram detectadas após 48 horas.

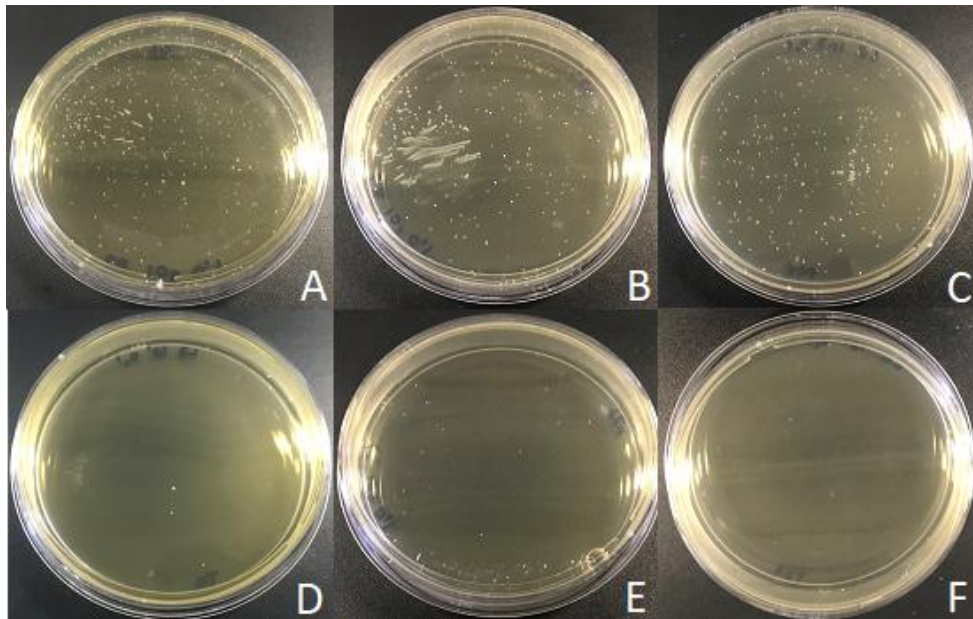


Figura 6: Efeito do hipoclorito de sódio a 0,1% sobre o desenvolvimento de isolados de *Lactobacillus rhamnosus* em 0, 24 e 48 horas (A, B e C, respectivamente) e de *Lactococcus lactis* em 0, 24 e 48 horas (D, E e F, respectivamente).

O hidróxido de sódio, nas concentrações utilizadas, não exerceu efeito bactericida sobre os dois isolados em nenhuma das concentrações avaliadas e, em nenhum dos tempos de armazenamento. O hidróxido de sódio também é considerado uma base forte com pH em torno de 13,5 (WIKIPEDIA) entretanto, as concentrações avaliadas podem não ter alterado significativamente o meio a ponto de inviabilizar o desenvolvimento dos isolados de *Lc. lactis* e de *Lb rhamnosus* (Figura 7).

Silva et al. (2015) também relataram um efeito insignificante de redução nas contagens de aeróbios mesófilos ao adicionarem hidróxido de sódio ao leite, pois, segundo os autores, não é utilizado para reduzir contaminação bacteriana, e sim para mascará-la através da redução do valor de acidez no método Dornic, já que este não mensura a real concentração de ácido láctico. *Lb. rhamnosus* se mostrou

mais resistente ao hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, neste estudo, do que ao formol na avaliação de Morais (2019), na mesma concentração de 0,1%.

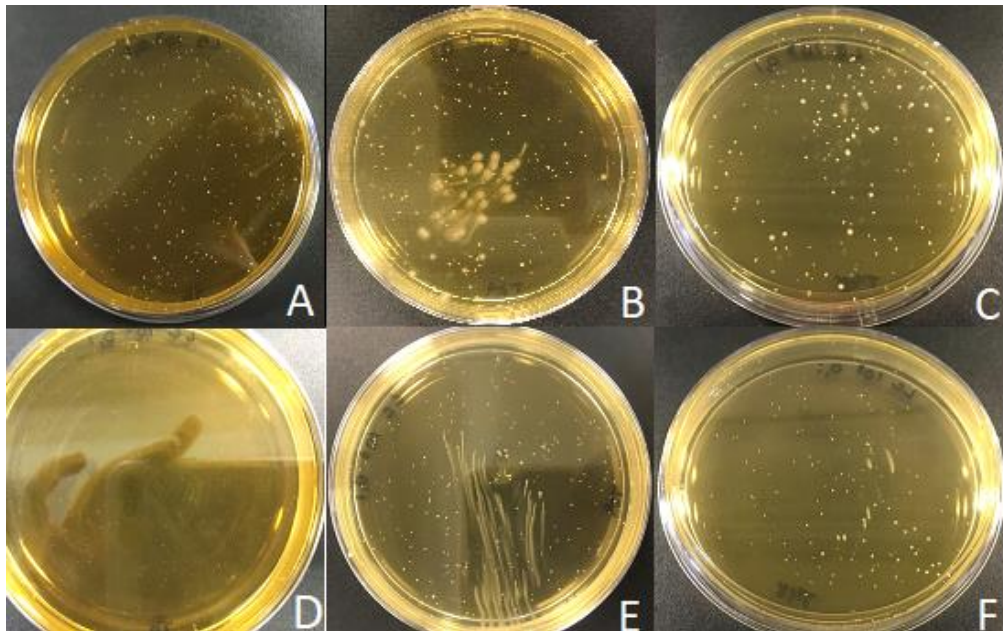


Figura 7: Efeito do hidróxido de sódio a 0,1% sobre o desenvolvimento de isolados de *Lactobacillus rhamnosus* em 0, 24 e 48 horas (A, B e C, respectivamente) e de *Lactococcus lactis* em 0, 24 e 48 horas (D, E e F, respectivamente).

5. CONCLUSÕES

O teste rápido Formfix2.0® não apresentou o mesmo desempenho que a metodologia oficial na detecção de formol adicionado ao leite, pois as substâncias químicas testadas foram capazes de interferir no desenvolvimento da reação colorimétrica do teste. Por ser de fácil execução e rápido, a sua aplicação como um teste de triagem não deveria ser descartada, mas são necessários estudos mais específicos, afim de determinar a sensibilidade e especificidade do reagente.

A pesquisa de substâncias químicas conservantes e neutralizantes no leite deve fazer parte dos controles de qualidade das indústrias, pois nas concentrações avaliadas nesta pesquisa foram capazes de reduzir e até inibir, o desenvolvimento de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus rhamnosus*, significando que podem interferir nos processos tecnológicos de produção de derivados lácteos fermentados e conseqüentemente acarretar prejuízos econômicos, além de alterações nas características nutricionais destes produtos.

6. REFERÊNCIAS

ANVISA. **Esclarecimentos sobre os riscos à saúde das substâncias ureia e formol e sua adição ao leite.** Informe técnico N° 53, 2013.

ANVISA. **Hidróxido de Sódio (soda caustica) – INS 524.** Informe técnico nº 33 de 25 de outubro de 2007.

BONIN, M. C. B.; PENTEADO, A. L.; QUEIROZ, S. C. N. **Avaliação da atividade antagonista de bactérias ácido lácticas e seus metabólitos frente a patógenos de origem animal.** Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 5, n. 10, p. 18511-18525 oct. 2019.

BRASIL. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT (UHT).** Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 08 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA.** 106 p. Aprovado pelo Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2017a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. P. 26. Brasília, 2017b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado.** Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 26 nov. 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 77. **Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial.** Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 26 nov. 2018b.

BREITENBACH, R. et al. **Whose fault is it? Fraud scandal in the milk industry and its impact on product image and consumption – The case of Brazil.** Food research international, Elsevier. 475-481. 2018.

CAMARGO, S. E. A.; BLANCO, T. M.; LIMA, R. Y.; RODE, S. M.; CAMARGO, C. H. R. **Avaliação do pH das soluções de hipoclorito de sódio 1% e 2,5% e digluconato de clorexidina 2% em função do tempo.** Revista Odonto • Ano 16, n. 31, jan. jun. 2008, São Bernardo do Campo, SP. 2008.

EMBRAPA. **Anuário leite 2018**. Página 60. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36560390/anuario-do-leite-2018-e-lancado-na-agroleite>>. Acesso em: 20 nov. 2019

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 11 p. 2002.

GONDIM, C. S. et al. **Detection of several common adulterants in raw milk by MID-infrared spectroscopy and one-class and multi-class multivariate strategies**. Food Chemistry 230, 68–75. Elsevier, 2019.

GRIZOTTI, G. **Ministério Público faz operação contra adulteração de leite no RS**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2013/05/ministerio-publico-faz-operacao-contradulteracao-de-leite-no-rs.html>>. Acesso em 8 de nov. de 2019.

HOCHMÜLLER, A. L. H. et al. **Estudo exploratório em leites UHT para verificação de ocorrência de adulteração**. Revista Interdisciplinar de Ensino, Pesquisa e Extensão vol. 4 nº1, 2016.

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

KONDYLI, E.; SVARNAS, C.; SAMELIS, J.; KATSIARI, M.C. **Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds**. Small Ruminant Research. v. 103, p. 194-199, 2012.

MAREZE, J. et al. **Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais**. Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 36, n. 1, supl, p. 283-290, ago. 2015.

MATTOS, I. L. et al. **Peróxido de hidrogênio: importância e determinação**. Química nova, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MORAIS, D. V. L. **Fraude do leite por adição de formol: avaliação de um teste rápido para detecção e efeito sobre bactérias ácido lácticas**. 27 páginas. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

NOGUEIRA, E. **Amostras de leite adulterado em Pernambuco tinham soda cáustica e água oxigenada**. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-12/amostras-de-leite-adulterado-em-pernambuco-tinham-soda-caustica-e-agua>>. Acesso em: 8 de nov. de 2019.

PORTAL O GLOBO MINAS. **PF realiza operação de combate a leite adulterado.** Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/economia/pf-realiza-operacao-de-combate-ao-leite-adulterado-4146311>>. Acesso em: 8 de nov. de 2019.

PORTAL G1. **Depoimentos revelam como funcionava fraude do leite.** Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL161409-5598,00-DEPOIMENTOS+REVELAM+COMO+FUNCIONAVA+FRAUDE+DO+LEITE.html>>. Acesso em 8 de nov. de 2019.

RIBEIRO, J. L. **Potencial tecnológico, probiótico e antagonista da microbiota láctica de leite de búfalas.** Dissertação (Mestrado – Saúde Animal). Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019.

SAAD, S. M. I. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SANTOS, I. P.; MELO, T. A.; SOUSA, F. M. O. **Análise microbiológica e identificação de adulterantes em leite *in natura* e pasteurizado comercializado em Jequié-BA.** Revista Interscientia. V. 7, N. 1, P. 66-82. JAN-JUN/2019.

SILVA, L. C. C. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado.** 2013. 96 folhas. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de ciências agrárias, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. 2013.

SILVA et al. **Substâncias conservantes e neutralizantes no leite: sensibilidade analítica das provas oficiais específicas, provas inespecíficas, inibição microbiana e persistência de resíduos no leite.** Ciência Rural, Santa Maria, v.45, n.9, p.1613-1618, set, 2015.

SILVA et al. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais.** 2016. 82 páginas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. 2016.

SOUSA, R. E. **Avaliação de um teste rápido para a detecção de formol no leite cru.** 2016. 29 folhas. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília. 2016.

WIKIPEDIA. **pH.** Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/PH#Solu%C3%A7%C3%A3o_aquosa_de_hidr%C3%B3xido_de_s%C3%B3dio_0,1_mol_L-1>. Acesso em 20 de nov. de 2019.