

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**RESÍDUOS DE FORMOL EM LEITE CRU: INTERFERÊNCIA DE
OUTRAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NA DETECÇÃO E EFEITOS
SOBRE A MICROBIOTA**

Sônia Maria Batista Alves Bonéfácio
Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA - DF
JULHO/2016



SÔNIA MARIA BATISTA ALVES BONEFÁCIO

**RESÍDUOS DE FORMOL EM LEITE CRU: INTERFERÊNCIA DE
OUTRAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NA DETECÇÃO E EFEITOS
SOBRE A MICROBIOTA**

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

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

BRASÍLIA - DF
JULHO/2016

Bonefácio, Sônia Maria Batista Alves

Resíduos de formol em leite cru: interferência de outras substâncias químicas na detecção e efeitos sobre a microbiota / Sônia Maria Batista Alves Bonefácio; orientação de Márcia de Aguiar Ferreira. – Brasília, 2016.

30 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Sônia Maria Batista Alves Bonefácio

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Resíduos de formol em leite cru: interferência de outras substâncias químicas na detecção e efeitos sobre a microbiota.

Ano: 2016

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.

Sônia Maria Batista Alves Bonefácio
e-mail: soniavet2003@yahoo.com.ar

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: BONEFÁCIO, Sônia Maria Batista Alves

Título: Resíduos de formol em leite cru: interferência de outras substâncias químicas na detecção e efeitos sobre a microbiota

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

Aprovado em / /

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Márcia de Aguiar Ferreira Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____ Assinatura: _____

M.V. Dr^a Sabrina dos S. Costa Poggiani Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____ Assinatura: _____

M.V. Clóvis Augusto Versalli Serafini Instituição: Min. Agricultura, Pecuária e
Abastecimento

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade. ”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente, agradeço primeiramente a Deus, que foi o que me deu força nos diversos momentos de dificuldade e desespero.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a Márcia de Aguiar Ferreira por transmitir seus conhecimentos e por fazer da minha monografia uma experiência positiva.

A minha mãe Sebastiana e meus irmãos Silvana, Julio Cesar, Sheila e Cintia que sempre me motivaram a me qualificar.

Ao meu pai João (*in memoriam*), que infelizmente não pode estar presente neste momento tão feliz da minha vida, mas que não poderia deixar de dedicar a ele, pois se hoje estou aqui, devo a ele e por seus ensinamentos e valores passados. Obrigada por tudo! Saudades eternas!

Ao meu querido e amado Renato, que se tornou meu esposo no decorrer deste curso e sempre esteve do meu lado.

Ao meu pequeno filho Caleb que nasceu no decorrer do curso, para que eu sirva de espelho na sua vida meu filho amado.

A minha sogra Honorata que sempre me apoiou e incentivou a ser forte e continuar a lutar, as minhas cunhadas Rivana e Rute que sempre me ajudaram nos momentos difíceis.

Foram muitos amigos durante estes anos, mas quero agradecer a uma em especial Rosélia de Lima Sousa Araújo que conheci durante o curso e se tornou uma grande amiga, obrigada por todo o apoio durante estes anos.

Rander Esteves e Paula Waeny pela ajuda durante o projeto neste final de curso.

Aos amigos, sejam do curso de Medicina Veterinária ou não, que me apoiaram e que sempre estiveram ao meu lado durante esta longa caminhada.

A Jaqueline Laumonier técnica do laboratório de análises de leite e derivados pela paciente e ajuda nesta etapa final do curso.

A Médica Veterinária Sabrina Costa por sua contribuição na correção deste trabalho, paciência e por aceitar compor minha banca.

A Stefany Costa Páscoa por me ajudar com as fotos do meu trabalho.

A estes dedico meu trabalho, sem a ajuda, confiança e compreensão de todos, este sonho não teria se realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE SIGLAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1.Primeiro estudo	6
3.2. Segundo estudo	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
5. CONCLUSÕES	12
6. REFERÊNCIAS	13

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Resultados observados nos tratamentos de leite cru + formol + álcool com reagente FORMFIX®	10
Figura 2- Resultados observados nos tratamentos de leite cru com álcool e com cetona pelo reagente FORMFIX®	10
Figura 3- Placas de contagens de aeróbios mesófilos e bolores/leveduras em leite cru sem e com a adição de formol	11
Figura 4- Placas de contagens de bactérias ácido lácticas em leite cru com a adição de formol	12

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Concentrações (%) e volumes (mL) dos tratamentos no leite cru com formol e álcool	7
Quadro 2 – Concentrações (%) e volumes (mL) dos tratamentos no leite cru com álcool	8
Quadro 3 – Concentrações (%) e volumes (mL) dos tratamentos no leite cru com cetona	8
Quadro 4 – Concentrações (%) de formol adicionado ao leite cru	9
Tabela 1 – Efeito das diferentes concentrações de formol adicionado ao leite cru, sobre as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores/ leveduras e bactérias ácido lácticas.....	11

LISTA DE ABREVIATURAS

A/M – Aeróbios / Mesófilos

BAL – Bactérias ácido lácticas

B/L – Bolores/Leveduras

C. inicial – Concentração inicial

V. inicial – Volume inicial

C. final – Concentração final

V. final – Volume final

UFC/mL – Unidade formadora de colônia/mL

LISTA DE SIGLAS

FAL - Fazenda Escola Água Limpa

FAV - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LABLEITE - Laboratório de Análises de Leite e Derivados

LANAGRO/RS – Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL- Mililitros

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

UnB - Universidade de Brasília

RESUMO

A pesquisa de substâncias químicas adicionadas ao leite com o intuito de mascarar a sua qualidade, faz parte da rotina de análises para o controle de qualidade. A adição de formol ao leite representa uma constante preocupação dos órgãos responsáveis pela fiscalização e por garantir a saúde dos consumidores. De acordo com a legislação brasileira é proibida a utilização de substâncias químicas para a conservação do leite. A detecção de formol no leite por meio da metodologia convencional é laboriosa, demorada, exige vários equipamentos e vidrarias adequados, além de reagentes específicos. O teste rápido FORMFIX® é simples e rápido e recentemente lançado no mercado, não havendo até o momento, informações sobre a sua especificidade ou a interferência de outras substâncias químicas na reação. O objetivo deste trabalho foi avaliar se substância química como o álcool e cetona interferem no resultado da detecção de formol adicionado ao leite cru, por meio da metodologia convencional e do reagente FORMFIX®; ainda, buscou-se estabelecer a ação inibitória do formol sobre a microbiota do leite cru. Foram realizados tratamentos a partir da adição ao leite cru com e sem formol, das seguintes concentrações de álcool e cetona: 0,005%; 0,05%; 0,5%; 0,1%; e 1,0%. Para avaliação de atividade sobre a microbiota adicionou-se ao leite cru, diferentes concentrações de formol (0,005%; 0,05%; 0,1%; 0,01%) seguido de inoculação em meio de cultura para contagem de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras. Os resultados mostraram que concentrações a partir de 0,01% de formol são capazes de promover reduções significativas nas contagens de aeróbios mesófilos (de $4,8 \times 10^3$ UFC/mL para $5,0 \times 10$ UFC/mL); concentrações a partir de 0,05% inibem bolores e leveduras (de $7,2 \times 10^3$ UFC/mL para $6,0 \times 10^2$ UFC/mL) e o formol a 0,005% reduziu as contagens de bactérias ácido lácticas de $1,06 \times 10^5$ UFC/mL para $4,60 \times 10^2$ UFC/mL e nas concentrações subsequentes inibir totalmente o desenvolvimento de BAL's. Ainda, nas concentrações utilizadas, o álcool e cetona não interferem no desempenho do reagente FORMFIX® para a detecção de formol adicionado ao leite.

Palavras-chave: fraude no leite; álcool no leite; cetona; fiscalização de leite; Formaldeído.

ABSTRACT

Investigation of chemicals added to milk in order to mask its quality, takes part of routine analysis for quality control. Addition of formalin is a constant concern of the agencies responsible for monitoring and ensuring the health of consumers. Brazilian law prohibits the use of chemical substances in order to preserve milk. Formaldehyde detection based on the conventional method is laborious, time consuming, requires several suitable equipment and glassware, as well as specific reagents. Prompt test FORMFIX® is simple and fast and has recently been release into the market. To date, there is no information about its specificity or interference from other chemicals. The aim of this study was to evaluate whether alcohol and ketone interfere on formaldehyde detection added to raw milk through conventional methodology and FORMFIX® reagent; also sought to establish the inhibitory action of formaldehyde on raw milk microbiota. Treatments were based on the addition to raw milk with and without formaldehyde, and the following concentrations of alcohol and ketone: 0.005%; 0.05%; 0.5%; 0.1%; and 1.0%. To assess the effect on raw milk microbiota, different formaldehyde concentrations (0.005%, 0.05%, 0.1%, 0.01%) followed by inoculation in dry culture medium for aerobic mesophilic count and yeasts and molds. Results revealed that formalin concentrations as low as 0.01% are able to significantly reduce mesophilic aerobic counts (4.8×10^3 CFU / mL to 5.0×10 CFU / ml); Concentrations from 0.05% inhibited yeasts and molds (7.2×10^3 CFU / mL to 6.0×10^2 CFU / ml) and 0.005% formalin reduced lactic acid bacteria counts from 1.06×10^5 CFU / ml to 4.60×10^2 CFU / mL and subsequent concentrations completely inhibited BAL's development. Moreover, based on concentrations used, alcohol and ketone did not interfere with FORMFIX® reagent for formaldehyde detection added to milk.

Key-words: Milk fraud; alcohol in milk; ketone; milk oversight; Formaldehyde.

1.INTRODUÇÃO

O leite desempenha um importante papel na produção de alimentos da dieta humana, devido ao seu elevado valor nutritivo como fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas. No Brasil a produção de leite em 2014 foi a quinta maior do mundo. (IBGE, 2015). A qualidade do leite que chega à indústria de processamento depende dos parâmetros de composição, características físico-químicas e higiene do leite cru (HAYES & BOOR, 2001). A legislação vigente brasileira estabelece os padrões de qualidade para o leite cru e beneficiado produzido e proíbe a adição de qualquer substância química na conservação do leite (BRASIL, 1952; BRASIL, 2011).

O leite é um dos alimentos frequentemente envolvidos em fraudes (MOORE; SPINK; LIPP, 2012). O regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem animal (RIISPOA) considera fraudado o leite que for adicionado de água, substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição; sofrer subtração de qualquer dos seus componentes; estiver cru e for vendido como pasteurizado ou for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade (BRASIL, 1997). Práticas fraudulentas são utilizadas na tentativa de mascarar a má qualidade microbiológica do leite e suas decorrentes alterações físico-químicas. Essas fraudes têm como objetivos principais aumentar o volume e controlar as alterações provocadas pelos microrganismos, com a finalidade de evitar prejuízos ao produtor (TRONCO, 2008).

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

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

O formaldeído é um gás produzido a partir do metanol que, em sua forma líquida (misturado à água e álcool) é denominado de formalina ou formol e que tem função estabilizante, em outras áreas como por exemplo, a sua utilização para preservar amostras de tecidos para análises histopatológicas, na construção civil durante envernizamento de madeira e na agricultura como conservante para forragem e desinfetante (INCA, 2016). Devido a sua solubilidade em água, o formaldeído é rapidamente absorvido no trato respiratório e gastrointestinal e metabolizado, sendo considerado tóxico se inalado e, carcinogênico se ingerido (INCA, 2016). Os tipos de câncer associados à exposição crônica ao formaldeído são os de nasofaringe, nasossinusal e leucemia (OMS, 2004; ANVISA, 2013).

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

Para a indústria, a presença desses resíduos no leite é particularmente prejudicial, já que eles podem interferir na produção de derivados que envolvem a adição de culturas lácticas por inibir sua multiplicação durante a fabricação desses produtos (TRONCO, 2008). O formaldeído também não é rotineiramente empregado na higienização de utensílios e equipamentos na produção e beneficiamento do leite (OLIEMAN, 2003). Contudo, é uma substância comprovadamente cancerígena, mesmo em baixas concentrações (NCI, 2011). O efeito do formaldeído em humanos após exposição de curta duração nas respectivas concentrações vão desde 2ppm irritação aos olhos, nariz e garganta, 3 -5 ppm lacrimação e intolerância por algumas pessoas, 10 – 20 ppm dificuldade na respiração e forte lacrimação, 25 -50 ppm edema pulmonar, pneumonia, perigo a vida, 50 -100 ppm pode causar a morte. (ANVISA, 2013).

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

(13%) e peróxido de hidrogênio (20%) em 15 amostras de leite cru (FREITAS FILHO et al., 2009). ROSA-CAMPOS et al. (2011) pesquisaram fraudes por adição de neutralizantes e conservantes em 72 amostras de leite pasteurizado produzido no Distrito Federal e detectaram 7 amostras positivas para peróxido de hidrogênio. Fimino et al. (2010) analisaram 60 amostras de leite cru refrigerado em Minas Gerais e detectaram a presença de formol em 13% e de nitrato em 40% destas. Mendes et al. (2010) estudos com leite informal produzido em Mossoró-RN não detectaram fraudes por adição de reconstituintes, neutralizantes ou conservantes.

Em 2013, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em conjunto com o Ministério Público do Rio Grande do Sul, desencadeou a Operação Leite Compen\$ado com o objetivo de coibir a fraude no leite cru que era realizada por um grupo de transportadores do interior do Rio Grande do Sul com adição de água e ureia agrícola. A ureia agrícola é um fertilizante utilizado para fornecer nitrogênio as plantas, no processo de fabricação da ureia, utiliza-se um produto que possui formol em sua composição (GRIZOTTI, 2013). Em 2014 foi deflagrada a chamada Operação Leite adulterado I e II no estado de Santa Catarina, e a III envolvendo os estados de Santa Catarina e Rio grande do Sul, com o objetivo de investigar e punir os envolvidos em adulteração de leite (BRASIL, 2014).

Os testes analíticos realizados nas indústrias devem ter as mesmas metodologias oficiais preconizadas na legislação vigente, entretanto a metodologia oficial para formaldeído é laboriosa e demorada, dificultando sua realização pelas indústrias e, retardando ações corretivas para o controle da qualidade interno e para a fiscalização (BRASIL, 2006).

O reagente qualitativo FORMFIX® (Macrofren Tecnologias Químicas/CDT/UnB) detecta a presença de formol no leite, em 3 minutos, a partir de reação colorimétrica e, se apresenta como uma ferramenta viável para indústrias e fiscalização, para análises de triagem do leite cru, tendo sido validado em 2015, pelo Laboratório de Produtos de Origem Animal, do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul – LANAGRO/RS.

Segundo Arcuri et al.(2006), a contaminação bacteriana do leite cru pode ocorrer a partir do próprio animal, do meio ambiente e do pessoal

responsável pela obtenção e manipulação do leite, e a presença dos microrganismos varia qualitativa e quantitativamente em função das condições de higiene existentes.

Sabe-se que a microbiota do leite é constituída por microrganismos desejáveis para o desenvolvimento do queijo e por aqueles que eventualmente, podem ser patogênicos para o consumidor, incorporados por contaminações cruzadas após a ordenha ou mesmo antes, na presença de mastite, sendo a composição específica desta microbiota sempre uma incógnita (BARREIRA, 2008).

Microrganismos aeróbios mesófilos (AM) são todos aqueles capazes de se desenvolverem em temperaturas de 35 a 37°C em condições de aerobiose. Esses microrganismos indicam a qualidade com que o alimento foi obtido ou processado, e sua presença em altas contagens é indicativa de procedimentos higiênicos inadequados na produção, no beneficiamento ou na conservação, dependendo da origem da amostra (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

Considera-se também que todos os microrganismos potencialmente patogênicos de origem alimentar em humanos são mesófilos. Embora com limitações, a contagem dos microrganismos AM tem uma especial importância na microbiologia alimentar, podendo ser utilizada para aferir a qualidade higiênica, determinar a aceitabilidade organoléptica, verificar a aplicação de boas práticas de fabricação e ainda, como indicador de segurança alimentar (PONCIANO, 2010).

O leite é considerado um bom substrato para o desenvolvimento de diversos microrganismos, dentre os quais, uma variada gama de leveduras com distintas características biológicas. Em geral, as leveduras são consideradas saprotróficas, fazendo parte da microbiota residente, entretanto, em alguns casos, elas podem provocar infecções na glândula mamária (DORNELES, 2010). Os bolores, quando em altas contagens, podem representar perigo à saúde devido à produção de micotoxinas, e ainda provocarem a deterioração dos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo, causando significativo prejuízo econômico (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

Bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente

desenvolvem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KONDYLI et al., 2012).

Essas bactérias são amplamente utilizadas na tecnologia de fabricação de diversos produtos lácteos como iogurtes, cremes, queijos frescos e maturados, por exemplos, pois, o seu metabolismo gera a produção de diversas substâncias que conferem sabores, odores e texturas específicas.

Pesquisas comprovam o potencial probiótico de diversas BAL e alimentos que propõem melhorias à saúde do consumidor, principalmente contendo microrganismos ditos probióticos, são amplamente comercializados. Os probióticos são alimentos suplementados com microrganismos vivos (*Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium*) e que, consumidos regularmente em quantidades suficientes, devem produzir efeitos benéficos à saúde e ao bem estar; além dos efeitos nutricionais habituais que beneficiam o hospedeiro por meio da melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal (VARAVALLO et al., 2008; COSTA et al., 2013).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interferência do álcool etílico e acetona na detecção de formol pela metodologia convencional e pelo reagente FORMFIX® em leite cru e, a ação do efeito inibitório do formol sobre os microrganismos deteriorantes e benéficos presentes no leite cru.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a interferência de substâncias químicas na detecção de formol adicionado ao leite cru.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a interferência do álcool na detecção de formol adicionado ao leite, pelas metodologias convencionais e pelo reagente FORMFIX®.

- Verificar a ocorrência de reação falso positiva pelo reagente FORMFIX® na detecção de álcool etílico e cetona adicionados ao leite cru.
- Determinar a ação do formol sobre o desenvolvimento de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores, leveduras e bactérias ácido lácticas, naturalmente presentes em leite cru.

3. MATERIAIS E METÓDOS

O leite cru (cerca de três litros) foi coletado diretamente, do tanque de resfriamento, da Fazenda Escola Água Limpa, (FAL/UnB), acondicionado em recipiente estéril e transportado em caixa isotérmica até o Laboratório de Análises de Leite e Derivados (Lableite) da Faculdade da Agronomia e Veterinária (FAV) da UnB.

Nesta propriedade o leite é ordenhado duas vezes ao dia, com ordenhadeira mecânica do tipo balde ao pé, sendo armazenado no tanque de resfriamento por no máximo 24 horas em temperatura adequada e devidamente homogeneizado conforme preconiza a legislação (BRASIL, 2011).

Antes da coleta, foi realizado o teste de alizarol para verificar a estabilidade da amostra; no laboratório foram realizadas as análises a fim de confirmar a sua qualidade para utilização na pesquisa. Foram avaliados os teores de proteínas, gordura, lactose, densidade e sólidos não gordurosos, utilizando o equipamento ultrassônico EKOMILK®. A crioscopia foi realizada em equipamento crioscópico LAKTRON®, a acidez pelo método Dornic conforme preconizado pela Instrução Normativa N°. 68 (BRASIL, 2006).

3.1 Primeiro Estudo

Esse estudo teve como objetivos avaliar a interferência do álcool na detecção de formol adicionado ao leite cru, pelas metodologias convencionais e

pelo reagente FORMFIX® e, verificar a ocorrência de reação falso positiva pelo reagente na detecção de álcool etílico e cetona adicionados ao leite cru.

Para avaliação da interferência do álcool, foram realizados seis tratamentos (T0, T1, T2, T3, T4 e T5) que consistiram na adição de álcool nas concentrações de: 0,005%; 0,05%; 0,5%; 0,1%; e 1,0% ao leite cru, mantendo-se constante a concentração de formol (0,1%) conforme apresentado no Quadro 1. Os cálculos das concentrações de álcool e formol adicionados foram determinados pela fórmula: $C_{inicial} \cdot V_{inicial} = C_{final} \cdot V_{final}$, onde: C = concentração e V= volume.

Cada tratamento foi submetido à metodologia convencional, conforme preconizado pela IN 68/2006, que consistindo em transferir 100 ml de leite previamente adicionado de formaldeído e álcool etílico, para balão de 250 mL de destilação acrescido de 100 mL de água destilada, seguido da acidificação com 2 mL de ácido fosfórico P.A. e destilação lenta. Em seguida foi retirado 50 mL do destilado e em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL de solução de ácido cromotrópico 0.5% a 1 mL do destilado, seguido de aquecimento em banho maria, em temperatura de ebulição, por 15 minutos. A reação positiva para a presença de formaldeído e caracterizada pela coloração violácea (BRASIL, 2006). E ao teste com o reagente FORMFIX® conforme as indicações do fabricante, adicionando 1mL do reagente a 25 mL de leite. As análises com o reagente foram realizadas em quintuplicatas, considerando-se positivo as reações com coloração violeta e, negativas as com coloração rosa.

Quadro 1. Concentrações (%) e volumes (mL) dos tratamentos no leite cru com formol e álcool.

T0	Leite cru (225 mL)
T0'	Formol 0,1% (0,6 mL) + leite cru (224,40 mL)
T1	Formol 0,1% (0,6 mL) + álcool 0,005% (0,010 mL) + leite cru (224,39 mL)
T2	Formol 0,1% (0,6 mL) + álcool 0,05% (0,12 mL) + leite cru (224,28 mL)
T3	Formol 0,1% (0,6 mL) + álcool 0,1% (0,24 mL) + leite cru (224,16 mL)
T4	Formol 0,1% (0,6 mL) + álcool 0,5% (1,2 mL) + leite cru (223,20 mL)
T5	Formol 0,1% (0,6 mL) + álcool 1,0% (2,4 mL) + leite cru (222,00 mL)

Para avaliação da ocorrência de reações falso positivas para o álcool e cetona pelo FORMFIX®, também foram realizados seis tratamentos (T0, T1, T2, T3, T4 e T5), em quintuplicata, que consistiram na adição de álcool e de cetona nas concentrações de: 0,005%; 0,05%; 0,5%; 0,1% e 1,0%, ao leite cru, conforme demonstrados nos Quadros 2 e 3. Os cálculos das concentrações de álcool e cetona adicionados ao leite cru foram determinados pela fórmula: $C_{inicial} \cdot V_{inicial} = C_{final} \cdot V_{final}$, onde: C = concentração e V = volume.

Quadro 2. Concentrações (%) e volumes (mL) dos tratamentos com álcool.

T0	Leite cru (125 mL)
T1	Álcool 0,005% (0,0065 mL) + leite cru (124,99 mL)
T2	Álcool 0,05% (0,067 mL) + leite cru (124,93 mL)
T3	Álcool 0,1% (0,13 mL) + leite cru (124,87 mL)
T4	Álcool 0,5% (0,67 mL) + leite cru (124,33 mL)
T5	Álcool 1,0% (1,34 mL) + leite cru (123,66 mL)

Quadro 3. Concentrações (%) e volumes (mL) dos tratamentos com cetona.

T0	Leite cru (125 mL)
T1	Cetona 0,005% (0,0065 mL) + leite cru (124,99 mL)
T2	Cetona 0,05% (0,106 mL) + leite cru (124,89 mL)
T3	Cetona 0,1% (0,21 mL) + leite cru (124,79 mL)
T4	Cetona 0,5% (1,06 mL) + leite cru (123,94 mL)
T5	Cetona 1,0% (2,12 mL) + leite cru (122,88 mL)

3.2 Segundo Estudo

Esse estudo teve como objetivo determinar a ação do formol sobre o desenvolvimento de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores, leveduras e bactérias ácido lácticas, naturalmente presentes em leite cru

Os tratamentos avaliados (T0, T1, T2, T3 e T4) estão contidos no Quadro 4. Os cálculos das concentrações de formol adicionado ao leite cru, também foram determinados pela fórmula: $C_{inicial} \cdot V_{inicial} = C_{final} \cdot V_{final}$.

Para as análises microbiológicas, as alíquotas de leite fraudado foram submetidas à diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% e semeadas para aeróbios mesófilos (AM) e bolores e leveduras (B/L) utilizando-se o sistema Rida®Count Aerobic Count Plates e Rida®Count Yeast & Mold, respectivamente, conforme indicações do fabricante. Para bactérias ácido lácticas (BAL) utilizou-se o sistema Petrifilm™ AC conforme Nero et al, (2006). Todos os resultados das contagens foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

Quadro 4. Concentrações de formol adicionadas ao leite cru.

T0	Leite cru (150 mL)
T1	Formol 0,005% (0,02 mL) + leite cru (149,98 mL)
T2	Formol 0,01% (0,04 mL) + leite cru (149,96mL)
T3	Formol 0,05% (0,20 mL) + leite cru (149,8 mL)
T4	Formol 0,1% (0,40 mL) + leite cru (149,6 mL)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises físico-químicas do leite cru estavam de acordo com os padrões exigidos pela Instrução Normativa Nº. 62/2011 do MAPA, indicando, portanto, leite apto para utilização na pesquisa.

Os resultados obtidos no primeiro estudo de avaliação da interferência do álcool na detecção de formol adicionado ao leite cru, pela metodologia convencional e pelo reagente FORMFIX®, não se observou alteração nos resultados, ou seja, a presença de álcool não produziu alteração nas reações, portanto não interferindo nos resultados de ambas as metodologias.

No teste com o FORMFIX® foi possível observar que no tratamento T0' que continha apenas leite cru e formol a 1,0%, a reação colorimétrica indicou positividade (coloração violeta); nos tratamentos seguintes, nos quais foram acrescentadas diferentes concentrações de álcool (0,005%; 0,05%; 0,5%; 0,1% e 1,0%) a coloração também foi violeta, indicando reação positiva que e a não

interferência do álcool na detecção do formol adicionado ao leite. Essas reações colorimétricas podem ser visualizadas na Figura 1.

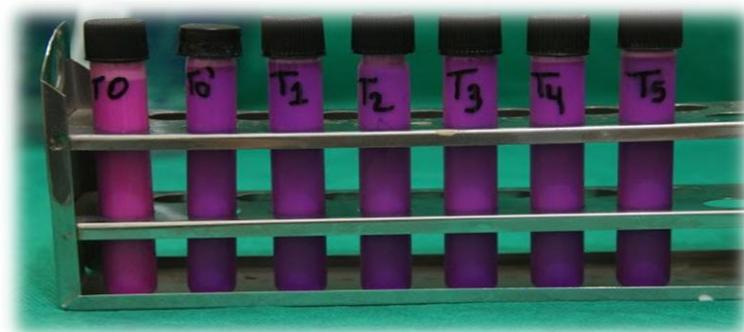


Figura 1. Resultados observados nos tratamentos de leite cru + formol + álcool com reagente FORMFIX®.

Em teste de seletividade para validação do reagente FORMFIX® realizado pelo LANAGRO/RS, também não foram observadas interferências do álcool na reação para detecção de formol adicionado ao leite.

Na avaliação da ocorrência de resultados falso positivos do reagente FORMFIX® para cetonas e álcool, nenhum dos tratamentos realizados mostrou reação positiva, ou seja, o reagente não foi capaz de detectar essas substâncias químicas adicionadas ao leite cru, nas concentrações analisadas, que foram de 0,005%; 0,05%; 0,5%; 0,1% e 1,0%. Como pode ser observada na Figura 2, em todos os tratamentos a reação foi negativa, indicada pela coloração rosa.

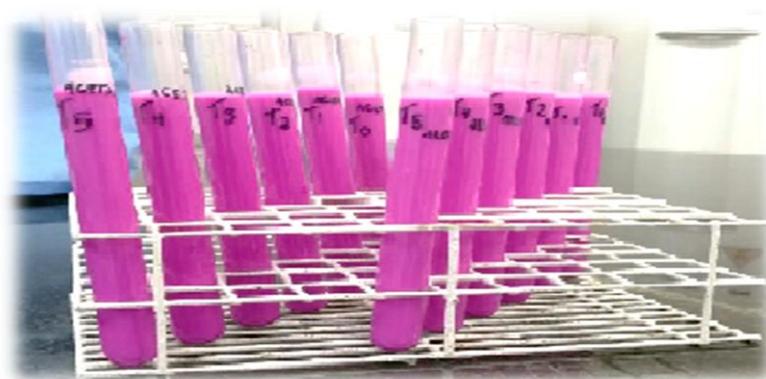


Figura 2. Resultados observados nos tratamentos de leite cru com álcool e com acetona pelo reagente FORMFIX®.

Nos testes conduzidos pelo LANAGRO/RS foi observada reação positiva à cetonas a partir de 3 ppm, indicando que o reagente poderia detectar essa substância se adicionada ao leite, entretanto não há relatos da ocorrência de fraude por adição de cetonas ao leite.

Nos testes realizados no Lableite não se observou a detecção do reagente para a substância cetona nas concentrações analisados.

No segundo estudo, os resultados demonstraram que o formol 0,005% não apresentou efeito inibitório significativo (pelo menos 1 log) sobre o desenvolvimento dos microrganismos pesquisados (Figura 3 e Tabela 1).

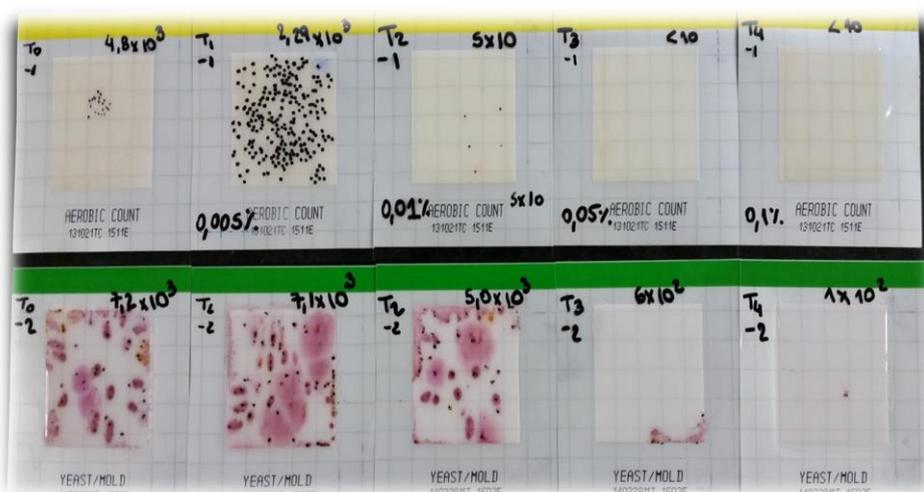


Figura 3. Placas de contagens de aeróbios mesófilos e bolores/leveduras em leite cru sem e com a adição de formol.

Tabela 1. Efeito das diferentes concentrações de formol adicionado ao leite cru, sobre as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores/ leveduras e bactérias ácido lácticas.

Tratamentos (concentração%)	Aeróbios mesófilos (UFC/mL)	Bolores / leveduras (UFC/mL)	Bactérias ácido lácticas (UFC/mL)
T0 (sem formol)	$4,8 \times 10^3$	$7,2 \times 10^3$	$1,06 \times 10^5$
T1 (0,005%)	$2,29 \times 10^3$	$7,1 \times 10^3$	$4,60 \times 10^2$
T2 (0,01%)	$5,0 \times 10$	$5,0 \times 10^3$	<10
T3 (0,05%)	<10	$6,0 \times 10^2$	<10
T4 (0,1%)	<10	$1,0 \times 10^2$	<10

A partir da concentração de formol a 0,005%, a redução nas contagens de aeróbios mesófilos foi de 3 ciclos logs (de $2,29 \times 10^3$ UFC/mL para $5,0 \times 10$ UFC/mL), porém a contagem de bolores e leveduras permaneceu praticamente inalterada. Já nas concentrações subsequentes (0,05% e 0,1%) as contagens de aeróbios mesófilos foram < 10 UFC/mL e de bolores e leveduras a redução foi de 1 ciclo de log.

Cavaletti (2013) avaliou o efeito inibitório sobre a microbiota de aeróbios mesófilos em leite cru causado por substâncias químicas neutralizantes e conservantes, também constatou redução de 3 logs nas contagens, entretanto a autora manteve o leite adicionado de formol, em refrigeração durante 24 horas. Em nossa pesquisa, foi realizada a semeadura imediatamente após a adição de formol ao leite cru, indicando que a ação inibitória é imediata.

Com relação às contagens de BAL, observou-se uma redução significativa, já a partir da concentração 0,005% de formol (de $1,06 \times 10^5$ UFC/mL para $4,60 \times 10^2$ UFC/mL), correspondendo a três ciclos de log; nas concentrações de formol 0,05%, 0,01% e 0,1% as inibições foram totais no desenvolvimento de BAL's, indicando que o formol é capaz de inibir a microbiota láctica, mesmo em concentrações baixas (Figura 4).

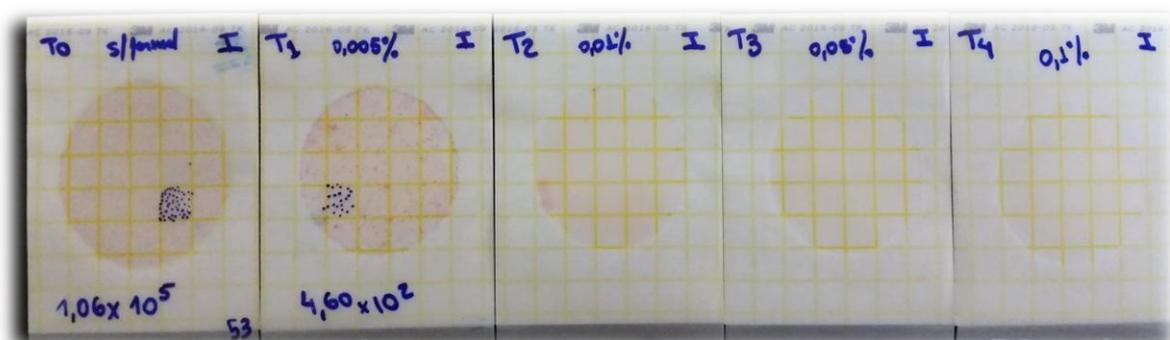


Figura 4. Placas de contagens de bactérias ácido lácticas em leite cru sem adição de formol (T0) e com a adição de formol (T1, T2, T3 E T4).

A detecção da adição fraudulenta de formol é de extrema importância, visto que se trata de uma substância carcinogênica mesmo em baixas concentrações,

implicando em alto risco à saúde do consumidor (NCI, 2011) e por representar significativos prejuízos à indústria laticinista.

5. CONCLUSÕES

O álcool não interfere na detecção de formol adicionado ao leite.

Os resultados obtidos nessa pesquisa indicaram que o reagente FORMFIX® não é reativo ao álcool e cetonas, nas concentrações analisadas, não sendo indicado para a detecção dessas substâncias em leite cru.

O formol, mesmo quando adicionado ao leite em baixas concentrações, tem ação inibitória sobre a microbiota indesejável e desejável.

6. REFERÊNCIAS

ANVISA; Esclarecimento sobre os riscos à saúde das substâncias ureia e formol e sua adição ao leite. Informe técnico n.53, 2013. Disponível em:

<HTTP://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+noticias+anos/2013+noticias/anvisa+avalia+risco+da+presenca+de+formol+e+urea+no+leite>. Acesso em: 13 maio 2016.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

BARREIRA, A.C.R. **Avaliação da qualidade do leite de ovelha na Beixa Baixa com base em contagem de células somáticas**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa, p.121, 2008.

BRASIL, Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. ed. MAPA. Brasília, DF: **Diário Oficial da União Federativa do Brasil**, 14 de dezembro de 2006, seção 1, p.8-30, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa 62, de 29 de setembro de 2011. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. **Diário Oficial da União**. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n 30.691 de 29 de março de 1952. Alterado pelo Decreto 2244 de 04 de junho de 1997. Altera o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – R.I.I.S.P.O.A. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 105, p 11555, 05 jun. 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. 154 p. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1952.

CAVALETTI, L.C.S. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado**. 2013. 96 f. Tese (ciência animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CITADIN, Angela Schedler et al. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, 2009.

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.

DORNELES, A.S. **Fungos e bactérias em leite de ovelhas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, 182p. 4ª ed .1996. Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. Microbiologia dos Alimentos, São Paulo: Editora Atheneu, p.182. 2005.

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

G1. Depoimento revelam como funcionava fraude do leite. 2007. Disponível em: <http://g1.globo.com/noticias/brasil/0,,MUL161409-5598,00.html> acesso: 10 junho,2012.

GRIZOTTI, G. **Ministério Público faz operação contra adulteração de leite no RS. 2013**. 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: 10 de junho de 2016.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. (Eds.). **Applied dairy microbiology**, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. 2015. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf acesso em: 20 maio 2013.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795. Acesso: 10 de junho de 2016.

KARTHEEK, M.; A.; SMITH, A.; KOTTAI MUTHU, A.; MANAVAN, 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.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/08/operacao-leite-adulterado-i-e-ii>

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

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

NASCIMENTO, M. S.; SOUZA, P. A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicotróficos e prova da redutase em leite cru resfriado. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 97, p. 81-86, 2002.

NCI, National Cancer Institute, United States Of America. Formaldehyde and Cancer Risk. 2011. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/risk/formaldehyde#r2>. Acesso em: 10 maio.2016.

NERO, L.A., BELOTI, V., BARROS, M.A.F., ORTOLANI, M.B.T., TAMANINI, R.; FRANCO, B.D.G.M. Comparison of Petrifilm™ aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. n. 14, p. 249–257, 2006.

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

PEREIRA, D. A. Fatores impactantes na qualidade de leites de tanques comunitários. 2011.
<<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=25156&secao=Colunas%20e%20Artigos>>.

PONCIANO, R.J.F. **Avaliação da qualidade higiênica da produção de leite de pequenos ruminantes e de queijo fresco da região do Rabaçal**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar). Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa

ROSA-CAMPOS A.A., ROCHA J.E.S., BORGIO L.A., MENDONÇA M.A. Avaliação físico-química e pesquisa de fraude em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. **Rev Inst Latic Cândido Tostes**. n.66, v.379, p.30-4. 2011.

SANTOS, J. M. D. (2010). Leite cru refrigerado: características físico-químicas, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicotróficos. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

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

SPIGLIATTI, S. PF prende 25 por fraude em leite longa vida. 2007. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral/pf-prende-25-por-fraude-em-leite-longa-vida,68731.0.htm>.

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

VARAVALLO, M.A.; THOMÉ, J.N.; TESHIMA, E. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, jan./jun.2008.