



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO PARA A DETECÇÃO DE  
FORMOL NO LEITE CRU.**

Rander Esteves de Sousa

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Aguiar Ferreira

BRASILIA – DF

JULHO/2016



RANDER ESTEVES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO PARA A DETECÇÃO DE  
FORMOL NO LEITE CRU.**

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

**Orientador (a):** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA – DF  
JULHO/2016

Sousa, Rander Esteves

Avaliação de um teste rápido para a detecção de formol no leite cru. /  
Rander Esteves de Sousa; orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia de Aguiar Ferreira. –  
Brasília, 2016.

Nº de pag.: 29

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

### **Cessão de direitos**

Nome do autor: Rander Esteves de Sousa

Título da monografia de conclusão de curso: Avaliação de um teste rápido para a  
detecção de formol no leite cru.

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.

---

Rander Esteves de Sousa

E-mail: [rande.com@gmail.com](mailto:rande.com@gmail.com)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Sousa, Rander Esteves

Título: Avaliação de um teste rápido para a detecção de formol no leite cru

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 08/07/2016

Banca Examinadora

Profa. Dra. Márcia de Aguiar Ferreira

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

MV. Alexandre Gomes Fernandes

Instituição: Min. Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

MSc. Kamila Ferreira Costa Serafini

Instituição: Aliment Consultoria

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus que sempre guiou meus passos e me permitiu alcançar meu sonho de realizar este curso e chegar até este momento.

Agradeço a minha mãe Antonina e meu pai Anísio que sempre lutaram por mim e minha irmã para que nunca nos faltasse nada, e sempre o fizeram com muita garra e honradez.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Márcia de Aguiar Ferreira que me acolheu com muito carinho e me guiou com maestria até este momento único.

À equipe do LabLeite da Universidade de Brasília, nas pessoas da técnica de laboratório Jaqueline Lamounier e da médica veterinária Sabrina dos Santos Costa Poggiani, que estavam ao meu lado para me guiar nos experimentos.

Às colegas e amigas, Sonia Batista e Paula Waeny, que me acompanharam e auxiliaram na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ismar Silva Santana que abriu minha primeira porta para projetos e estágios, que me permitiram aprender muito e me preparar para o futuro que me aguardava.

A fotografa Stefany Costa Páscoa pelas excelentes fotos deste e de outros trabalhos.

Aos muitos amigos que esta graduação me trouxe e que estarão sempre comigo.

*Temos o destino que merecemos.  
O nosso destino está de acordo com os nossos méritos.  
Albert Einstein*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1 Origem e coleta das amostras .....	6
3.2 Primeiro estudo.....	6
3.3 Segundo estudo.....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
5. CONCLUSÃO .....	14
6. REFERÊNCIAS .....	15

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

QUADRO 1 - Composição dos tratamentos do teste com formol .....	19
QUADRO 2 - Composição dos tratamentos com formol e peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) adicionados ao leite cru .....	20
TABELA 1 - Códigos de cores e classificação dos resultados em categorias (negativo, suspeito e positivo) .....	22



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Resultados das reações colorimétricas para pesquisa de formol adicionado ao leite utilizando reagente FormFix® .....21
- Figura 2 - Resultados da avaliação da interferência do peróxido de hidrogênio na detecção pelo reagente FormFix®, de formol adicionado ao leite cru.....23
- Gráfico 1 - Comportamento dos componentes das cores.....22

## LISTA DE ABREVIações

® - Marca registrada

°C – Graus Celsius

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

CMYK – ciano, magenta, yellow, key

FAL – Fazenda Agua Limpa

FAV – Faculdade de Agronomia e Veterinária

IARC – International Agency for Research on Cancer

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário

LTDA - Limitada

m/v – massa/volume

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mL - mililitros

MP – Ministério Público

Nº - Número

PCFL - Programa Nacional de Combate à Fraude no Leite

PNQL – Programa Nacional de Qualidade do Leite

SFA - Superintendência Federal da Agricultura

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SIPOA - Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal

UnB – Universidade de Brasília

## RESUMO

A detecção das fraudes no leite cru é fundamental para assegurar um produto que atenda aos parâmetros de qualidade esperados. As principais substâncias adicionadas incluem água, reconstituintes, conservantes e neutralizantes. Tanto o formaldeído quanto o peróxido de hidrogênio são utilizados em adulterações por inibirem a atividade microbiana, mascarando a acidez e provocando um aumento artificial no tempo de estocagem e na vida de prateleira do leite. O FormFix<sup>®</sup> é um produto que busca aliar praticidade e rapidez na detecção de formol adicionado no leite e permite resultados imediatos, facilitando a inspeção e a análise de um maior número de amostras. Este trabalho objetivou realizar avaliação comparativa entre a metodologia convencional e o reagente FormFix<sup>®</sup> para detecção de formol no leite. Foram realizados tratamentos com diferentes concentrações de formol adicionado ao leite cru (0,005%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1%, 0,5% e 1,0%); cada tratamento foi submetido a cinco repetições para o teste com o reagente Formfix<sup>®</sup> e, a uma repetição pela metodologia convencional. Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia convencional apresentou limite de detecção de formol, a partir da concentração 0,005%, enquanto que o reagente FormFix<sup>®</sup> foi visualmente reativo (coloração violácea) a partir da concentração 0,05%. Por ser um teste colorimétrico de fácil leitura e de rápida execução, o reagente FormFix<sup>®</sup> representa uma boa opção como teste de triagem para detecção de formol no leite, utilizando-se a categorização estabelecida para resultados negativo, suspeito e positivo.

**Palavras chave:** formaldeído, água oxigenada, laticínios, fiscalização, adulteração.

## ABSTRACT

Detection of fraud in raw milk is essential to ensure a product that meets the expected quality parameters. The major added substances include water, restoratives, preservatives and neutralizers. Either formaldehyde as hydrogen peroxide are both used in adulterations since they work paralyzing microbial activity, disguising the acidity and causing an artificial increase at the storage time and at the shelf life of these products. The FormFix® is a product which aims to combine practicality and speed of detection of formaldehyde in the milk and allows immediate results, facilitating inspection and the analysis of a larger number of samples. This study aimed to carry out a comparative analysis between conventional methodology and FormFix® reagent for formaldehyde detection in milk. Treatments were performed with different formaldehyde concentrations added to raw milk (0.005%, 0.01%, 0.03%, 0.1%, 0.5% e 1.0%). Each sample was submitted to five repetitions of the test using the FormFix® reagent and one test with the conventional methodology to formaldehyde detection. The results showed that the conventional methodology presented formaldehyde detection limit from the concentration 0.005%, while the FormFix® reagent was visually reactive (violet color) from 0.05% concentration. Therefore once this test is a colorimetric assay of easy reading and quickly performance, the FormFix® present a good option for screening test to detection of formalin in the milk, using the categorization established for negative results, suspect and positive.

**Keywords:** Formaldehyde, hydrogen peroxide, dairy, inspection, adulteration.

## INTRODUÇÃO

As fraudes no leite acarretam prejuízos aos laticínios devido à diminuição tanto no rendimento como no valor nutricional, à alteração da qualidade do produto e, principalmente, aos riscos aos consumidores em decorrência da adição de substâncias nocivas à saúde. A detecção das fraudes no leite cru é fundamental para assegurar um produto que atenda aos parâmetros de qualidade esperados. Diversas técnicas são utilizadas na rotina para a detecção das fraudes, sendo que novas metodologias são desenvolvidas a partir da necessidade, ou seja, em resposta a recentes tipos de fraude que esteja sendo utilizado (OLIVEIRA, 2013)

As principais substâncias adicionadas ao leite incluem a água, reconstituintes como açúcar, farinha ou soro de leite, conservantes como cloro, hipoclorito, peróxido de hidrogênio ou formaldeído e neutralizantes como bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio. Apesar da legislação determinar a pesquisa diária dessas substâncias, a avaliação do leite pelas indústrias geralmente é realizada apenas por análises físico-químicas como densidade e crioscopia. Contudo, estas fraudes muitas vezes são calculadas para impedir sua identificação por provas de rotina não específicas (SILVA, 2013).

Fraudes por adição de substâncias conservantes ao leite têm sido recorrentes no Brasil, o que demonstra a ocorrência de falhas no controle de qualidade das indústrias e/ou dos órgãos de fiscalização. Os problemas associados a essa prática variam entre prejuízo das características sensoriais e dos processos tecnológicos que envolvem a utilização de culturas lácticas e problemas de toxicidade para consumidores (SILVA, 2013).

Assim como qualquer outro alimento comercializado no país, a qualidade do leite e de seus derivados é regulamentada pelos órgãos oficiais responsáveis por assegurar a segurança alimentar da população (DURR, 2004). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA é o órgão responsável pela fiscalização da fabricação dos produtos de origem animal, incluindo o leite, conforme disciplina a Lei n. 1283, de 18 de dezembro de 1950, em seus art. 1º e 3º, alínea "a".

À Anvisa e aos órgãos de Vigilância Sanitária cabem a fiscalização desses produtos no comércio, conforme art. 3º, alínea “g” e art. 4º, alínea “d” da Lei 1283/50 (Informe Técnico ANVISA 53/2013). Dentro do Programa Nacional de Qualidade do Leite - PNQL do Ministério da Agricultura, de aplicação obrigatória pelas empresas, segundo a Instrução Normativa nº 62/2011, mensalmente são colhidas amostras de leite cru refrigerado de cada propriedade rural fornecedora dos estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF). As análises são realizadas em laboratórios credenciados da Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite. São 10 laboratórios localizados em Goiânia (GO), Passo Fundo (RS), Curitiba (PR), Belo Horizonte (MG), Juiz de Fora (MG), Concórdia (SC), Piracicaba (SP), Recife (PE), Pelotas (RS) e Passo Fundo (RS) (MAPA, 2014; BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014b).

Algumas operações realizadas pelo MAPA merecem destaque no Brasil, como foi o caso em 2013 da Operação “Leite Compen\$ado” que aconteceu no Rio Grande do Sul. Com o intuito de aumentar o volume do leite era adicionada água sem tratamento e para reconstituir os padrões do leite, neste caso a proteína, era adicionada ureia agrícola que contem formol em sua composição, sendo este último, substância proibida pela Organização Mundial da Saúde. Foram contaminados com formaldeído, aproximadamente 100 milhões de litros de leite em um ano, e o lucro com a fraude foi de R\$ 9,5 milhões (GRIZOTTI, 2013).

Com as notificações de detecção de fraudes ocorridas no estado do Rio Grande do Sul, o Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPOA/SC) intensificou as ações de fiscalização e verificação oficial por meio de análises do leite cru refrigerado no estado, utilizando como base o Programa Nacional de Combate à Fraude no Leite (PCFL), incluindo a pesquisa de formaldeído nas análises de leite cru.

Em agosto de 2014, devido a novas denúncias de adulteração no leite, foi deflagrada a chamada Operação Leite Adulterado I e II, uma ação conjunta do SIPOA/SC, Superintendência Federal da Agricultura em Santa Catarina - SFA/SC e do Ministério Público de Santa Catarina - MP/SC, com base nas denúncias recebidas, nos históricos das empresas e nos resultados das análises. O objetivo foi a investigação mais específica a alguns laticínios do estado de Santa Catarina, onde foram constatadas fraudes. Os principais produtos adulterantes suspeitos

foram o peróxido de hidrogênio, a soda cáustica, o álcool etílico e o citrato (MAPA, 2014).

O formaldeído e o peróxido de hidrogênio são utilizados, recorrentemente, em fraudes de leite que visam inibir a atividade microbiana (ROSA-CAMPOS et al, 2011). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) caracteriza o formaldeído como sendo um gás produzido mundialmente, em grande escala, a partir do metanol. É também conhecido como formalina, metil aldeído, metileno glicol, oxido de metileno, metanal, formalida 40, morbicida, formalite, aldeído fórmico, Yde, Ivalon, Karsan, Lysoform, oxometano, oximetileno e em sua forma líquida (misturado à água e álcool) é chamado de formalina ou formol (INCA, 2016).

A ingestão de formol puro causa imediata e intensa dor na cavidade oral e faringe; dores abdominais com náuseas, vômitos e possível perda de consciência. Também podem ser observados sintomas como proteinúria, acidose, hematemesis, hematúria, anúria, vertigem, coma e morte por falência respiratória. A partir de julho de 2004, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer - IARC classificou este composto como carcinogênico (Grupo 1), tumorogênico e teratogênico por produzir efeitos na reprodução em humanos (Informe Técnico ANVISA 53/2013).

O peróxido de hidrogênio é uma substância transparente com aparência da água e tem odor característico (MATTOS, 2003). Quando hidrolisado, libera oxigênio, água e calor, o que pode levar à combustão espontânea se em contato com matéria orgânica ou metais, como o cobre e o bronze (LAUDA, 2007). É miscível com água em todas as proporções, geralmente comercializado como solução aquosa com concentrações entre 20 e 60% (m/v) e estável sob temperatura ambiente se devidamente armazenado. Sua taxa de decomposição aumenta aproximadamente 2,5 vezes para cada 10°C de incremento na temperatura, sendo recomendado o armazenamento sob temperatura ambiente ou refrigeração. Essa substância é aprovada para tratamento de leite nos Estados Unidos da América, entretanto a sua concentração não pode exceder 0,05%. Devido ao excesso de peróxido de hidrogênio residual ser prejudicial aos humanos, é necessário que seja efetivamente controlado dentro dos limites permitidos. (ABBAS, 2010). No Brasil a sua adição ao leite é proibida pela legislação (BRASIL, 1952).

A busca pela melhoria da qualidade do leite por parte dos setores envolvidos com a produção leiteira tem sido uma constante. Esta qualidade é um pré-requisito para garantir aos produtores uma melhor remuneração e a permanência efetiva dos mesmos na atividade. Para a indústria resulta em melhoria de segurança dos alimentos, além de um maior rendimento e aumento da vida de prateleira dos produtos fabricados (FIALHO, 2012).

Entretanto, algumas metodologias para pesquisa de substâncias adulterantes do leite, como a pesquisa para detecção de formol, são extremamente laboriosas, complexas e demoradas, muitas vezes inviabilizando que sejam realizadas em maior frequência, especialmente pelas indústrias. Por estes e outros motivos, várias fraudes passam despercebidas, resultando no acesso dos consumidores a um produto adulterado e que apresenta risco à saúde (MAREZE, 2015).

O FormFix<sup>®</sup> é um produto desenvolvido pela Macofren Tecnologias Químicas LTDA com a proposta de facilitar a detecção de formol em leite, por meio de uma reação colorimétrica rápida e prática. Se apresenta em forma líquida translúcida e, em presença de formol estabelece uma reação colorimétrica resultando em tons que variam desde róseo pálido (resultado negativo) até a coloração arroxeadada (resultado positivo), devendo ser devidamente acondicionado e mantido sob refrigeração.

Segundo Ofício N<sup>o</sup>.005/2015 do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul - LANAGRO/RS que realizou experimentos preliminares com o reagente, foi verificada a capacidade de detecção do formol, e interferência do peróxido de hidrogênio e de cetonas. Estas informações compreendem alguns dos critérios necessários para sua validação conforme resolução n<sup>o</sup> 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Diante do exposto, essa pesquisa teve como objetivo avaliar o desempenho do reagente Formfix<sup>®</sup>, em comparação à metodologia convencional, na detecção de resíduos de formol presente em leite cru e, a ocorrência de interferência pelo peróxido de hidrogênio.



## **Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do teste rápido e qualitativo Formfix® para a detecção de formol em leite cru.

## **Objetivos específicos**

- Avaliar o desempenho do reagente FormFix® na detecção de formol adicionado ao leite cru, em comparação à metodologia convencional.
- Verificar a ocorrência de interferência de peróxido de hidrogênio na detecção de formol adicionado ao leite cru pelo FormFix® e, na produção de resultados falso negativos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Origem e coleta de amostras*

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.

A ordenha é feita duas vezes ao dia, com ordenhadeira mecânica do tipo balde ao pé. O leite contido no tanque de resfriamento apresentava tempo de armazenamento menor que 24 horas, sendo o acumulado da segunda ordenha (período da tarde) do dia anterior e o leite proveniente da primeira ordenha (período da manhã) ocorrida no dia de coleta e se apresentava devidamente homogêneo e em temperatura adequada conforme preconiza a legislação (BRASIL, 2011).

Antes da coleta, foi realizado o teste de alizarol<sup>1</sup> para verificar a estabilidade proteica. 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<sup>®</sup>. A crioscopia foi realizada em equipamento crioscópico LAKTRON<sup>®</sup>, a acidez pelo método Dornic<sup>2</sup> conforme preconizado pela Instrução Normativa N<sup>o</sup>. 68 (BRASIL, 2006).

### **Primeiro estudo**

*Avaliação do limite de detecção de formol em leite cru pelo FormFix<sup>®</sup>*

---

<sup>1</sup>TEC-LAB, Hexis Científica LTDA, Indaiatuba, SP, Brasil.

<sup>2</sup>TEC-LAB, Hexis Científica LTDA, Jundiaí, SP, Brasil

No Quadro 1 estão descritos os tratamentos realizados; a solução inicial do tratamento (T0) era composta somente por leite cru (controle negativo), e as concentrações 0,005%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,5%, 0,1% e 1,0% de formol<sup>3</sup> adicionadas ao leite cru, corresponderam aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7, respectivamente. Os volumes de formol foram obtidos por meio da fórmula:  $C_{inicial} \cdot V_{inicial} = C_{final} \cdot V_{final}$ , onde: C = concentração e V= volume.

**Quadro 1.** Composição dos tratamentos do teste com formol.

TRATAMENTOS	DILUIÇÃO	SOLUÇÃO LEITE + FORMOL
T0	-	225mL de leite (controle negativo)
T1	0,005%	224,97 mL de leite + 0,03 mL de formol
T2	0,01%	224,94 mL de leite + 0,06 mL de formol
T3	0,03%	224,82 mL de leite + 0,18 mL de formol
T4	0,05%	224,70 mL de leite + 0,30 mL de formol
T5	0,1%	224,40 mL de leite + 0,60 mL de formol
T6	0,5%	221,96 mL de leite + 3,04 mL de formol
T7	1,0%	218,92 mL de leite + 6,08 mL de formol

Todos os tratamentos foram submetidos à metodologia convencional em uma repetição, e ao teste rápido em cinco repetições. A metodologia convencional utilizada é estabelecida pela Instrução Normativa N° 68/2006 e consiste em diluir a amostra com água destilada e após a acidificação com ácido fosfórico<sup>4</sup>, submeter a solução a um processo de destilação. Da solução resultante é coletado um mL e adicionado a cinco mL de solução de ácido cromotrópico<sup>5</sup> e ácido sulfúrico<sup>6</sup>.

Para o teste rápido com o reagente FormFix<sup>®7</sup>, foram seguidas as orientações do fabricante, para adição de 1,0 mL de reagente em 25 mL de leite, sendo que a leitura do resultado é colorimétrica: coloração rosa significa negativo para a presença de formol e, violácea indica positivo. Os resultados das cinco repetições, de cada tratamento com o FormFix<sup>®</sup> foram comparados e registrados por meio de equipamento fotográfico, de marca e modelo Canon EOS Rebel T3i, para o registro da cor.

<sup>3</sup>Vetec Química Fina LTDA, Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ

<sup>4,6</sup>Cromoline Química Fina LTDA, Diadema, SP

<sup>5</sup>TEC-LAB, Hexis Científica LTDA, SP

## Segundo estudo

### *Pesquisa de interferência da detecção em presença de Peróxido de Hidrogênio*

No Quadro 2 estão descritos os tratamentos avaliados sendo incluídos três controles: T0 (somente leite); T0' (leite com 0,1% de peróxido de hidrogênio<sup>8</sup>); e T0'' (leite com 0,1% de formol). As concentrações de peróxido de hidrogênio avaliadas foram: 0,005%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,5%, 0,1% e 1,0%, correspondendo a T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7, respectivamente; a concentração de formol foi mantida constante (0,1%) e foi estabelecida devido a positividade na detecção comprovada em estudos anteriores. Os resultados foram verificados e analisados de acordo com a alteração da coloração.

**Quadro 2.** Composição dos tratamentos com formol e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) adicionados ao leite cru.

TRATAMENTO	COMPOSIÇÃO
T0	Leite cru (125 mL)
T0'	Leite cru (124,63 mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (*) 0,1% (0,36 mL)
T0''	Leite cru (124,66 mL) + formol 0,1% (0,33mL)
T1	Leite cru (124,64 mL) + formol 0,1% (0,33mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,005% (0,018 mL)
T2	Leite cru (124,63 mL) + formol 0,1% (0,33mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01% (0,037 mL)
T3	Leite cru (124,55 mL) + formol 0,1% (0,33mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% (0,110 mL)
T4	Leite cru (124,48 mL) + formol 0,1% (0,33mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,05% (0,184 mL)
T5	Leite cru (124,29 mL) + formol 0,1% (0,33mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,1% (0,368 mL)
T6	Leite cru (122,82 mL) + formol 0,1% (0,33mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5% (1,838 mL)
T7(**)	Leite cru (120,98 mL) + formol 0,1% (0,33mL) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0% (3,676 mL)

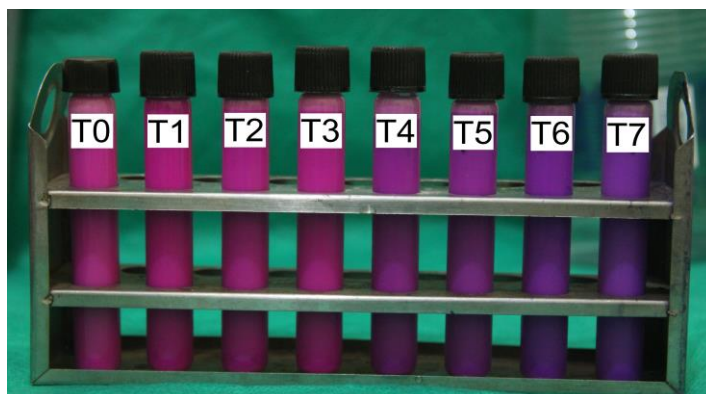
(\*) Peróxido de hidrogênio; (\*\*) Tratamento também submetido à metodologia convencional.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises físico-químicas do leite cru utilizado indicaram que as amostras se apresentaram dentro dos padrões de normalidade (BRASIL, 2011) para utilização nos estudos propostos.

Na avaliação do limite de detecção de formol em leite cru pelo FormFix®, quanto à percepção visual (Figura 1), no tratamento T1 (formol 0,005%) foi possível observar uma coloração rosa mais acentuada, em relação ao controle negativo (T0). Em T2 e T3 verificou-se uma maior intensidade, mas ainda de tonalidade rosa; assim como observado em T1, essas nuances só puderam ser notadas na comparação com o controle negativo. A metodologia convencional foi capaz de detectar concentrações de formol de 0,005% diluído em leite, corroborando os resultados obtidos por SILVA, 2013.

A partir do tratamento T4 (formol 0,05%) a reação apresentou coloração em tom violáceo permitindo a diferenciação mais objetiva, em relação ao controle negativo; nos demais tratamentos a tonalidade violeta foi se consolidando, atingindo tom roxo, a partir de T6 (formol 0,5%).



**Figura 1.** Resultados das reações colorimétricas para pesquisa de formol adicionado ao leite utilizando reagente FormFix®.

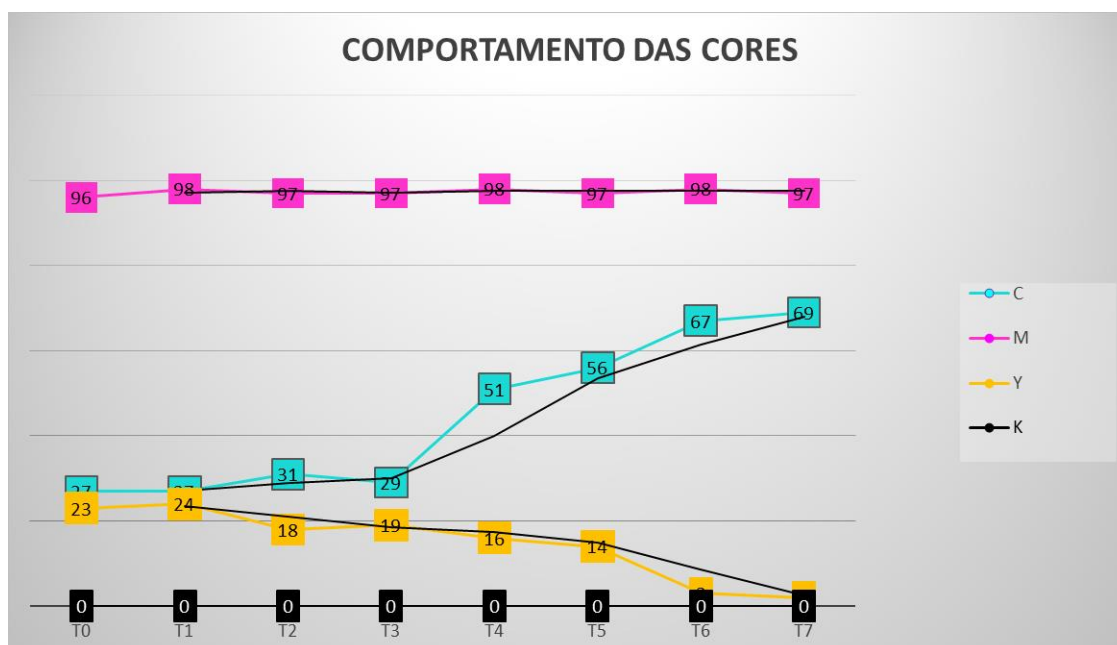
Estes resultados indicam uma maior eficiência da detecção pelo reagente em soluções com concentração de formol a partir de 0,05% que expressaram a coloração arroxeadada com intensidade suficiente para permitir sua

diferenciação quanto aos tons róseos obtidos em concentrações menores e da prova negativa.

Os resultados dos testes com os tratamentos T0 a T7 foram registrados em imagem e analisados em seguida com o auxílio do programa Adobe Photoshop CC 2014, que resultou nos códigos de cor constantes na Tabela 1 e distribuídos no Gráfico 1.

**Tabela 1.** Códigos de cores e classificação dos resultados em categorias (negativo, suspeito e positivo).

Tratamentos		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Cor									
Códigos	C	27	27	31	29	51	56	67	69
	M	96	98	97	97	98	97	98	97
	Y	23	24	18	19	16	14	3	2
	K	0	0	0	0	0	0	0	0
Situação		Negativo	Suspeito	Suspeito	Suspeito	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo



**Gráfico 1.** Comportamento dos componentes das cores

Por se tratar de uma metodologia que busca praticidade para aplicação a campo, a avaliação dos resultados consistiu na visualização da coloração resultante da reação entre o produto FormFix® e amostras fraudadas em laboratório, mimetizando uma situação real onde o responsável pela análise não dispõe de equipamentos específicos. A análise com o programa Photoshop CC atuou como um método auxiliar de percepção de cor, permitindo a codificação destas para verificação dos componentes de cada tom obtido, bem como a avaliação das alterações.

No *software* Photoshop CC®, foram utilizadas as ferramentas “redução de ruído” e “desfoque de superfície” nas fotos, que resultou em maior uniformidade das cores, minimizando os efeitos da curvatura e luminosidade sobre a superfície dos tubos. Com a ferramenta “conta-gotas” foram coletadas as cores para formação da paleta que em seguida foi dividida em três grupos correspondentes às faixas de tonalidade “positivo”, “negativo” e “suspeito”.

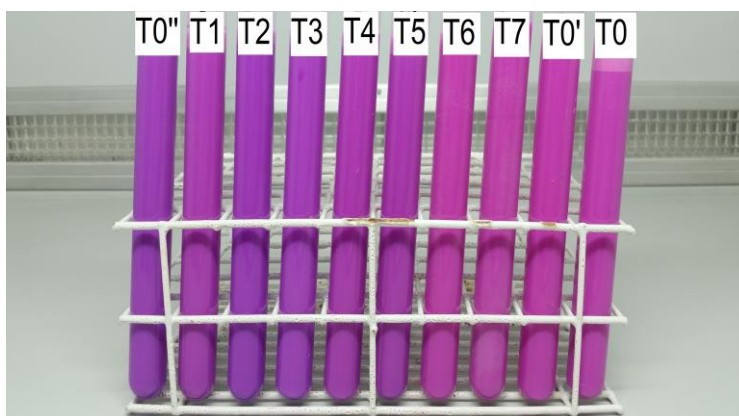
Para efeitos de padronização, utilizou-se a tabela CMYK de codificação de cores, a qual considera como cores primárias o Ciano, Magenta, Yellow e o Black (K=Key) como cor auxiliar. Neste sistema, o branco corresponde a ausência de cor e o preto, á adição destas cores. O somatório destes componentes resulta em uma escala utilizada por equipamentos de impressão, uma vez que a elaboração de uma paleta de cores se torna necessária para comparação dos resultados (PEDROSA, 2003; RIBEIRO,2003).

Na análise dos resultados obtidos com o programa Photoshop CC foi possível verificar alterações quanto ao componente Ciano (C), que apresentou aumento dos valores à medida que a tonalidade se acentuava. Observou-se também, uma maior elevação dos valores de C a partir do tratamento T4 passando de uma média simples de 29, para valores a partir de 51, corroborando a avaliação visual, onde foi possível a diferenciação da coloração em relação a prova negativa. O Amarelo (Y) apresenta característica inversa, reduzindo seus valores à medida que a cor tende ao roxo e demonstrou maior variação entre os tratamentos T5 e T6, onde passou de 14 para valores abaixo de três.

A categorização em resultado negativo, suspeito e positivo foi realizada com base no resultado visual. O negativo condiz com a amostra T0 (sem formol), enquanto que as amostras T1, T2 e T3 foram classificadas como resultado

suspeito considerando a adulteração realizada, pois a mudança na cor em comparação ao resultado negativo não se mostrou evidente, mesmo estando a amostra sabidamente adulterada. A partir de T4 a coloração arroxeadada se tornou perceptível, expressando resultados positivos. Esses resultados indicam que o reagente FormFix<sup>®</sup> apresenta potencial para a detecção de formol em leite cru em concentrações baixas, porém requer adequações na sua formulação que permita a identificação do resultado positivo nessas concentrações.

Na pesquisa com peróxido de hidrogênio, verificou-se interferência na reação de detecção de formol adicionado ao leite cru pelo FormFix<sup>®</sup> nos tratamentos T6 e T7, nos quais as concentrações de peróxido eram de 0,5% e 1,0% respectivamente, ou seja, cinco e dez vezes maiores do que a concentração de formol na solução (Figura 2). A metodologia oficial realizada com a solução do tratamento T7 teve como resultado a mudança de coloração, indicando a presença de formol na solução.



**Figura 2.** Resultados da avaliação da interferência do peróxido de hidrogênio na detecção pelo reagente FormFix<sup>®</sup>, de formol adicionado ao leite cru.

Segundo Mattos et al., 2003, o peróxido de hidrogênio pode ser utilizado para oxidar formaldeído tanto em meio ácido:  $\text{HCHO} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ , quanto em meio alcalino:  $2\text{HCO} + 2\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow 2\text{HCOONa} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2$ , o que pode explicar a interferência na coloração esperada. O peróxido reage com o formaldeído resultando em ácido fórmico e água, o que pode ter reduzido a quantidade de formol na solução.

O mesmo autor descreve que a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio aumenta aproximadamente 2,5 vezes a cada 10°C de aumento de



temperatura, podendo esta característica justificar a não interferência na metodologia oficial, uma vez que durante a destilação, a ebulição e evaporação ocorreram sempre acima de 90°C, possivelmente resultando da decomposição do peróxido.

Junkermann e Schwab em 1978, patentearam um procedimento para detoxificação de formaldeído a base de peróxido de hidrogênio para águas residuais, consistindo na mistura do peróxido à água em presença de solução alcalina. O processo pode ser realizado de outra forma, onde a água a ser tratada pode ser inicialmente aquecida a 50°C e, em seguida realizar a adição de uma quantidade de peróxido de hidrogênio equivalente a 35% da quantidade de formaldeído presente demonstrando a importância da temperatura e quantidade de peróxido na ação do peróxido de hidrogênio.

Murphy et al, 1989, avaliaram o uso de reação Fenton-like que utiliza ferro para catalisação da reação de neutralização de formol em águas residuais de indústrias, verificando que a relação de peróxido/formol para a neutralização de 95% do formol, em 90 minutos a 25°C foi de 6:1, próximo à concentração dos reagentes no tratamento T6 (0,5% e 0,1% de peróxido e formol, respectivamente); os autores explicam que este excesso de peróxido provavelmente se deve pela reação de auto decomposição deste, que reduz a quantidade de peróxido disponível.

## CONCLUSÃO

O reagente FormFix<sup>®</sup> se mostrou eficiente na detecção de formol adicionado ao leite cru, porém em concentrações maiores das observadas na metodologia convencional. Entretanto, a facilidade na execução da análise e a rapidez na obtenção dos resultados, podem ser considerados fatores compensatórios que justifiquem a sua utilização como um teste de triagem, utilizando-se a categorização estabelecida para resultados negativo, suspeito e positivo.

O peróxido de hidrogênio quando recém adicionado ao leite cru e na presença de formol, interfere no resultado do teste quando em concentrações acima de 0,5% e presença de formol em concentrações de até 0,1%, expressando um resultado falso-negativo pelo surgimento de uma coloração rósea.

## REFERÊNCIAS

1. ABBAS, M. E. et al. Fluorometric determination of hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system. **Food chemistry**, v. 120, n. 1, p. 327-331, 2010.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, Brasília, 29 dez. 2011. Seção 1, p. 6.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento . Decreto nº 30.691 de 29/03/1952 e alterado pela última vez pelo Decreto nº 6.385, de 27 de fevereiro de 2008. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 27 fev. 2008. Seção 1, p. 10785.
4. BRASIL. Portaria nº 113, de 9 de julho de 2014. Credencia o Centro de Pesquisa em Alimentação – CEPA, nome empresarial Fundação Universidade de Passo Fundo. Diário Oficial da União, Brasília, nº 130, de 10 de julho de 2014, Seção 1, pág.: 11.
5. BRASIL. Portaria nº 311, de 27 de agosto de 2014. Credencia o Laboratório de Qualidade do Leite, da Embrapa Clima Temperado , nome empresarial Empresa Brasileira da Pesquisa Agropecuária. Diário Oficial da União, Brasília, nº 165, de 28 de agosto de 2014, Seção 1, pág.: 32.
6. BRASIL. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 29 mai. 2003. Seção 1, p. 56.

7. DE MATTOS, Ivanildo Luiz et al. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.
8. DURR, J.W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: DURR, J.W., CARVALHO, M.P., SANTOS, M.V. O Compromisso com a Qualidade do Leite. Passo Fundo: Editora UPF, 2004, v.1, p. 38-55.
9. FIALHO, T. L., et al. Evolução da qualidade do leite em cooperativas da região do Alto Paranaíba perante a Instrução Normativa 51. Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes", Mar/Abr, nº 385, 67: 53-57, 2012.
10. 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: 30 maio, 2016.
11. INCA Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde. In: Formol ou Formaldeído. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=795](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=795) . Acesso em: 07 de junho, 2016.
12. Informe Técnico, ANVISA, 2013. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe%2BT%25C3%25A9cnico%2B53\\_risco%2Bde%2Bureia%2Be%2Bformol%2Bno%2Bleite.pdf/49915d61-509a-4782-a45c-2f1a5e7117f0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe%2BT%25C3%25A9cnico%2B53_risco%2Bde%2Bureia%2Be%2Bformol%2Bno%2Bleite.pdf/49915d61-509a-4782-a45c-2f1a5e7117f0).
13. JUNKERMANN, H; SCHWAB, H. U.S. Pat. 4104162 A (1978).
14. LAUDA, Diogo Ponte, and José Atílio Fritz Fidel Rocco. "Estudo de um sistema de injeção bi-propelente do tipo Swirl usando querosene e peróxido de hidrogênio como oxidante." 2007.
15. MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/11/fiscalizacao-do-leite-e-constante-em-todo-o-pais> .

16. 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> .
17. 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.
18. MURPHY, Andrew P. et al. A Fenton-like reaction to neutralize formaldehyde waste solutions. ***Environmental science & technology***, v. 23, n. 2, p. 166-169, 1989.
19. OLIVEIRA, M. C. Influência de variáveis climáticas e possibilidade de fraude em parâmetros da IN 62 utilizados pelos programas de pagamento por qualidade de leite. 2013. viii, 80 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103786>>.
20. PEDROSA, I. Da cor à cor existente. Rio de Janeiro: Léo Christiano Editorial Ltda. 2003 – 9ª Edição.
21. RIBEIRO, M. Planejamento Visual Gráfico. Brasília: LGE Editora, 2003 – 8ª Edição.
22. ROSA-CAMPO, A. A., ROCHA, J. E. S., BORGIO, L. A., MENDONÇA, M. A. Avaliação Físico-química e Pesquisa de Fraudes em Leite Pasteurizado Integral tipo C Produzido na Região de Brasília, Distrito Federal. DF, 2011.
23. 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 (Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.