



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO SOBRE A INFLUÊNCIA DO TEMPO DE  
ARMAZENAMENTO E DA TEMPERATURA NA DETECÇÃO DE  
FORMOL ADICIONADO AO LEITE**

Priscila Souza Pinheiro  
Orientadora: Profª Drª Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA - DF  
DEZEMBRO/2016



**PRISCILA SOUZA PINHEIRO**

---

**ESTUDO SOBRE A INFLUÊNCIA DO TEMPO DE  
ARMAZENAMENTO E DA TEMPERATURA NA DETECÇÃO DE  
FORMOL ADICIONADO AO LEITE**

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia de Aguiar Ferreira

BRASÍLIA - DF  
DEZEMBRO/2016

PP654e Pinheiro, Priscila Souza  
Estudo sobre a influência do tempo de armazenamento e da temperatura na detecção de formol adicionado ao leite. / Priscila Souza Pinheiro; orientador Márcia de Aguiar Ferreira. -- Brasília, 2016.  
29 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Fraude. 2. Formaldeído no leite. 3. Câncer. 4. FORMFIX®. 5. Fiscalização. I. Ferreira, Márcia de Aguiar, orient. II. Título.

### **Cessão de Direitos**

Nome do Autor: Priscila Souza Pinheiro

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Estudo Sobre a Influência do Tempo de Armazenamento e da Temperatura na Detecção de Formol Adicionado ao Leite

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.

---

Priscila Souza Pinheiro  
E-mail: priscilapinheiro35@gmail.com

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome do autor: PINHEIRO, Priscila Souza

Título: Estudo sobre a influência do tempo de armazenamento e da temperatura na detecção de formol adicionado ao leite

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 13/12/2016

Banca Examinadora

Profª. Drª. Márcia de Aguiar Ferreira

Instituição: Universidade de Brasília


Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

M. V. Alexandre Gomes Fernandes

Instituição: Minist. da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Prof. Dr. Sérgio Lúcio Salomon Cabral Filho

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADO

Assinatura: 

## AGRADECIMENTOS

Toda a honra e toda a glória sejam dadas a Deus, a quem agradeço todos os dias por me colocar no lugar onde está a minha benção e por seu imensurável amor. Ele é o motivo da minha alegria, por ter me dado esta oportunidade de ingressar na Universidade de Brasília e realizar mais um sonho.

Agradeço a minha maravilhosa mãe, Izabel, que sempre me incentivou e esteve ao meu lado, acreditando no meu potencial e na minha capacidade de vencer, mesmo nos momentos quando não acreditei. Sua sabedoria e amor são meus alicerces.

Ao meu pai, Paulo e aos meus irmãos, Lucas e Gabriel, que sempre foram meu apoio, dividindo comigo os meus anseios e somando as alegrias.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Aguiar Ferreira, a quem dedico o meu carinho por ter sido amiga e compreensiva, além de proporcionar a oportunidade de realizar este trabalho e enriquecer minha experiência acadêmica.

À Jaqueline Lamounier e à Médica Veterinária Dr<sup>a</sup>. Sabrina Costa, do Laboratório de Análises de Leite e Derivados, pela enorme paciência e pelo apoio na realização dessa pesquisa.

À amiga Nayara Dantas, pela ajuda proporcionada nos momentos em que precisei durante a realização do projeto.

Aos meus amigos, que me incentivaram a persistir e a lutar, me dando todo o apoio, carinho e cuidados nos momentos difíceis em que passei durante o decorrer dos anos da minha graduação.

A todos os professores que fizeram parte do meu crescimento intelectual, transferindo seus conhecimentos e proporcionando experiências acadêmicas teóricas e práticas únicas.

A estes dedico a minha admiração e a realização deste trabalho, pois o sucesso só foi possível com a ajuda, paciência e compreensão de cada um.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1 Primeiro Estudo.....	7
3.2 Segundo Estudo.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5. CONCLUSÕES.....	15
6. REFERÊNCIAS.....	16

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Tratamentos avaliados para a detecção de formol adicionado ao leite cru refrigerado por 96 horas.....	8
QUADRO 2 – Tratamentos térmicos avaliados para a detecção de formol adicionado ao leite.....	9
QUADRO 3 – Tratamentos avaliados para a detecção de formol adicionado ao leite com diferentes teores de gordura e lactose.....	10
TABELA 1 – Efeito dos diferentes tratamentos térmicos e das concentrações de formol adicionado ao leite cru sobre as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos.....	13

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

® - Marca registrada

A/M – Aeróbios / Mesófilos

C. final – Concentração final

C. inicial – Concentração inicial

IN – Instrução Normativa

LTDA – Limitada

mL – mililitros

Nº - Número

UFC/mL – Unidade formadora de colônia/mL

V. final – Volume final

V. inicial – Volume inicial



## LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
FAL – Fazenda Escola Água Limpa  
FAV – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária  
IARC – International Agency for Research on Cancer  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
LabLeite - Laboratório de Análises de Leite e Derivados  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MP – Ministério Público  
PCFL - Programa Nacional de Combate à Fraude no Leite  
PNQL – Programa Nacional de Qualidade do Leite  
SFA – Superintendência Federal da Agricultura  
UAT – Ultra Alta Temperatura  
UnB - Universidade de Brasília

## RESUMO

Dentre os produtos de origem animal, o leite tem elevado valor nutricional e constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades, devendo apresentar condições sanitárias adequadas, ser isento de qualquer forma de contaminação ou substância estranha. Entretanto, a adição de substâncias químicas com o intuito de mascarar a qualidade do leite tem sido uma prática recorrente no país. A fraude por adição de formol tem por objetivo reduzir ou eliminar o desenvolvimento de microrganismos presentes no leite, evitando assim as alterações decorrentes da sua multiplicação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a persistência do formol adicionado ao leite mantido em refrigeração ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por vários períodos (0, 24, 48, 72 e 96 horas) e, se o aquecimento do leite à temperaturas próximas da pasteurização (em torno de  $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) e fervura, interferem na sua detecção por meio da metodologia convencional e pelo teste rápido FORMFIX®. Também, foi avaliada a interferência da gordura e da lactose na detecção de formol no leite pelo FORMFIX®. As concentrações de formol adicionado ao leite cru foram de 0,1% e de 1%. Os resultados obtidos demonstraram a persistência do formol adicionado ao leite cru refrigerado, nas concentrações utilizadas e até o período máximo avaliado (96 horas). Os tratamentos térmicos aplicados ao leite adicionado de formol não eliminaram o formol, nas concentrações utilizadas, sendo possível sua detecção. Finalmente, observou-se que apenas a gordura produziu uma moderada alteração na reação colorimétrica positiva pelo FORMFIX®, sendo recomendada a comparação com controles positivos ou negativos, durante a execução do teste. Conclui-se que é possível a detecção de formol adicionado ao leite cru refrigerado por 96 horas e que o teste rápido FORMFIX® pode ser utilizado em análises de triagem para a pesquisa dessa substância em leite com diferentes teores de gordura.

**Palavras-chave:** fraude; formaldeído no leite; câncer; FORMFIX®; fiscalização.

## ABSTRACT

Among the products of animal origin, milk has a high nutritional value and is one of the main sources of protein in the feeding of young animals and human of all ages, must present adequate sanitary conditions and must be free from contamination or foreign matter. However, the addition of chemicals to mask milk quality has been a recurring practice in the country. The fraud by formal addition aims to reduce or eliminate the development of microorganisms present in milk, thus avoiding the changes due to their multiplication. The objective of this work was to evaluate the persistence of formaldehyde added in refrigerated milk ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) for several periods (0, 24, 48, 72 and 96 hours) and, if milk heating at temperatures close to pasteurization (Around  $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) and boiling, interfere in its detection by means of the conventional methodology and the FORMFIX® rapid test. Also, the interference of fat and lactose in the detection of formaldehyde in milk by FORMFIX® was evaluated. The concentrations of formaldehyde added to raw milk were 0,1% and 1%. The results showed the persistence of the formaldehyde added to the refrigerated raw milk at the concentrations used and up to the maximum period evaluated (96 hours). The thermal treatments applied to the milk added of formaldehyde did not eliminate the formaldehyde, in the concentrations used, being possible its detection. Finally, it was observed that only the fat produced a moderate alteration in the positive colorimetric reaction by FORMFIX®, being recommended the comparison with positive or negative controls, during the execution of the test. It is concluded that it is possible to detect formaldehyde added to the raw milk refrigerated for 96 hours and that the FORMFIX® rapid test can be used in screening tests to investigate this substance in milk with different fat contents.

**Keywords:** fraud; formaldehyde in milk; cancer; FORMFIX®; oversight.

## 1. INTRODUÇÃO

De alto valor nutritivo, o leite possui em sua composição proteínas de alto valor biológico, carboidrato, ácidos graxos, sais minerais, vitaminas essenciais e água, sendo a principal fonte de cálcio entre os alimentos, além de fornecer energia pela presença de lipídios e lactose (WANDERLEY et al., 2013). Com sabor suave e próprio, agradável e ligeiramente adocicado, é um alimento amplamente consumido pela população de todas as faixas etárias (RODRIGUES et al., 2013).

A produção de leite no Brasil em 2014 correspondeu 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 Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) são ferramentas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que visam garantir a qualidade e a segurança do leite fornecido aos consumidores brasileiros e de outros países (DURR, 2004; BRASIL, 2009).

A preocupação com a alimentação saudável, com a melhora da qualidade de vida e a busca por uma dieta mais adequada vem demonstrando um crescente consumo de leite e derivados, conjuntamente com uma maior atenção à qualidade desses alimentos (RODRIGUES et al., 2013). O consumidor está cada vez mais interessado em conhecer a forma como foi produzido, desde a origem da matéria-prima até o produto que chega à mesa, exigindo do Governo vigente a responsabilidade de atestar tanto a qualidade quanto a segurança do alimento (BRASIL, 2009).

Em toda a cadeia produtiva, que inclui a produção na propriedade rural, transporte, beneficiamento e comercialização, o leite fluido pode estar sujeito a alterações, sejam elas intencionais ou não, sendo a adição de substâncias

fraudulentas um dos fatores que mais interferem na qualidade e principalmente na segurança alimentar (FURTADO, 2010; WANDERLEY et al., 2013).

Na fraude do leite são utilizadas inúmeras substâncias, dentre elas o formol, que atua como conservante reduzindo a microbiota presente, prolongando assim sua vida útil (FURTADO, 2010; RODRIGUES et al., 2013; WANDERLEY et al., 2013; ABRANTES et al., 2014).

O formol é uma solução aquosa, proveniente de uma mistura de formaldeído, água e álcool, que contém de 35 a 40% de formaldeído e 10 a 15% de metanol. Devido à suas características de reatividade, ausência de coloração, baixo custo e pureza, é um composto amplamente utilizado na indústria química e de papel, processos têxteis e de madeira, produção de resinas, agente esterilizante, estabilizante, composto presente em fertilizantes e defensivos agrícolas, agente de produtos de limpeza, embalsamação de peças anatômicas e uso em laboratórios (ANVISA Informe Técnico 53/2013; CAFE, 2015; ABRAF, 2016; INCA, 2016).

No Brasil, diversos autores relataram a presença de substâncias conservantes no leite. Souza et al., 2011 pesquisaram a ocorrência de fraudes em 100 amostras de leite Ultra Alta Temperatura (UAT) em seis estados brasileiros (Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Goiás) e encontraram 44 amostras positivas para a presença de formaldeído, 30 para peróxido de hidrogênio e 12 para cloro. Em Garanhuns, no estado do Pernambuco, 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 sete amostras positivas para peróxido de hidrogênio. Firmino 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% das amostras. Por outro lado, Mendes et al., 2010 estudando leite informal produzido em Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte, não detectaram fraudes por adição de reconstituintes, neutralizantes ou conservantes.

Algumas operações realizadas pelo MAPA merecem destaque, como foi o caso em 2013 da Operação “Leite Compen\$ado”, que ocorreu no estado do

Rio Grande do Sul. Com o intuito de aumentar o volume do leite, água sem tratamento era adicionada, e para reconstituir os padrões do leite, neste caso o teor de proteína, era adicionada ureia agrícola, que contém formol em sua composição. 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). A adição de ureia agrícola ao leite cru é uma prática utilizada pelos fraudadores na intenção de mascarar a adição de água, o que leva não só a perdas nutritivas como também danos à saúde, já que em sua formulação a ureia agrícola contém formol (ANVISA Informe Técnico 53/2013).

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

Devido a novas denúncias de adulteração no leite, em agosto de 2014 foi deflagrada a chamada Operação Leite Adulterado I e II, uma ação conjunta da 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 de 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 (BRASIL, 2014).

Todos os estados são acompanhados mensalmente através do Programa Nacional de Combate à Fraude no Leite (PCFL). Os resultados encontrados fora dos padrões desencadeiam ações imediatas pelo MAPA, que atuam em conjunto com o Ministério Público Federal ou Estadual e também Polícia Federal, para responsabilizar e punir os envolvidos.

Os efeitos da ingestão de formol ainda não são bem definidos pela literatura (CAFE, 2015), o que demanda uma maior atenção e preocupação em realizar novos estudos. Soffritti et al., 2002 citado por Cittadin-Soares & Fortunato, 2010 em estudo com ratos, após 104 semanas concluíram que a administração

de formaldeído diluído em água potável revelou efeitos carcinogênicos, demonstrados através do aumento da incidência de tumores mamários malignos, adenomas de células testiculares, neoplasias e lesões oncológicas no estômago e intestinos.

Alguns sintomas característicos podem ser citados, devido à intoxicação relacionada ao seu forte odor irritante e a rápida absorção pelos tratos respiratório e gastrointestinal, como irritação nos olhos, nariz e garganta, lacrimação, tosse, fortes dores de cabeça, falta de ar, e em casos de exposição crônica, edema pulmonar, conjuntivite, dermatite e ulcerações, além de sinais advindos da ingestão acidental, como fortes dores abdominais acompanhadas por náuseas e vômitos, diarreia e ulcerações com necrose na mucosa gastrointestinal (ANVISA Informe Técnico 53/2013; INCA, 2016).

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) em 2004 classificou o formaldeído como carcinogênico do Grupo 1, tumorogênico e teratogênico por causar efeitos na reprodução em humanos e em estudos experimentais com animais (ANVISA Informe Técnico 53/2013; INCA, 2016).

A metodologia convencional para detecção da adição de formol ao leite fluido preconizado pela Instrução Normativa N° 68/2006 é um teste que exige certo tempo para a sua realização, onde o formaldeído é separado do leite por destilação e depois aquecido com ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico, originando um produto de condensação que oxidado posteriormente transforma-se em um composto p-quinoidal de coloração violeta (BRASIL, 2006).

A Macofren Tecnologias Químicas LTDA (Centro de Desenvolvimento Tecnológico/UnB) desenvolveu o reagente qualitativo FORMFIX®, de maneira que a pesquisa de formaldeído no leite seja mais rápida e simples, com a obtenção do resultado em poucos minutos, sendo possível a sua realização a qualquer momento, desde a coleta na propriedade até o beneficiamento na indústria. Esse teste apresenta-se como uma alternativa à metodologia convencional, sendo recomendado como um teste de triagem (SOUSA, 2016; BONEFÁCIO, 2016).

O leite e seus derivados são produtos que possuem características específicas e são perecíveis, portanto, exigem controles rígidos, principalmente quanto à necessidade de refrigeração. Assim, a manutenção da cadeia do frio e o

controle da qualidade são de fundamental importância para assegurar que as propriedades dos produtos não sejam alteradas, acarretando em problemas relativos à segurança alimentar dos consumidores.

De acordo com a Instrução Normativa N° 62/2011, entende-se por Leite Cru Refrigerado o produto refrigerado e mantido nas temperaturas máximas de 7°C na propriedade rural, em tanque comunitário e a 10°C no estabelecimento processador, transportado em carro tanque isotérmico para Posto de Refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado, para ser processado. O tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser no máximo de 48 horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas. A eventual passagem do Leite Cru Refrigerado por um Posto de Refrigeração implica sua refrigeração em equipamento a placas até temperatura não superior a 4°C, admitindo-se sua permanência nesse tipo de estabelecimento pelo período máximo de seis horas (BRASIL, 2011).

O controle da qualidade do leite deve envolver um controle laboratorial rigoroso respeitando o que é preconizado pela legislação vigente, entretanto, os resultados das análises precisam ser obtidos de forma mais rápida e com menor custo operacional, o que incide também à qualificação de recursos humanos incluindo um planejamento que permita uma constante atualização e aperfeiçoamento. Sendo assim o controle fiscal deve ser adequado à realidade atual e as metodologias de análise revisadas com maior frequência (FURTADO, 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a persistência do formol adicionado ao leite fluido por meio da metodologia convencional estabelecida pela Instrução Normativa N° 68/2006 (BRASIL, 2006) e pelo teste rápido FORMFIX®, simulando situações de variação de tempo de armazenamento anterior ao beneficiamento, pasteurização e evidenciar a eficácia do reagente proposto como alternativa na detecção de fraude por adição de formol.



## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a influência do tempo de armazenamento e da temperatura na detecção de formol em leite cru.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a persistência do formol adicionado ao leite e mantido em temperatura de refrigeração por até 96 horas, por meio da metodologia convencional e pelo reagente FORMFIX®.
- Avaliar o efeito do aquecimento do leite às temperaturas próximas a de pasteurização rápida e da fervura, sobre o formol adicionado ao leite cru, através da metodologia convencional e pelo reagente FORMFIX®.
- Avaliar a interferência de componentes do leite, como a gordura e a lactose, na detecção de formol adicionado ao leite, pelo reagente FORMFIX®.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos dos dois estudos foram realizados no Laboratório de Análises de Leite e Derivados (LabLeite), da Faculdade da Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da UnB.

#### 3.1 Primeiro Estudo

##### 3.1.1 Avaliação da persistência do formol adicionado ao leite cru refrigerado e armazenado por diferentes períodos.

O objetivo desse experimento foi verificar a persistência do formol adicionado ao leite cru e mantido em temperatura de refrigeração por até 96 horas.

O leite cru (seis litros) foi coletado diretamente do tanque de resfriamento da Fazenda Escola Água Limpa (FAL/UnB), correspondente ao volume ordenhado no mesmo dia e logo após a ordenha. Após a coleta foi realizado o teste de alizarol para verificar a estabilidade proteica do leite. O mesmo foi acondicionado em recipiente estéril, mantido refrigerado a aproximadamente 7°C e transportado em caixa isotérmica até a chegada ao LabLeite.

Após a homogeneização do leite foram realizadas análises físico-químicas para determinação dos teores de proteínas (3,14%), gordura (3,83%), lactose (5,45%), densidade (1,033 g/mL) e sólidos não gordurosos (9,29%), utilizando o equipamento ultrassônico EKOMILK®. A crioscopia (-0,543°H) foi feita em equipamento crioscópico LAKTRON®. A acidez pelo método Dornic (18°D) e a peroxidase (positiva) foram avaliadas conforme preconizado pela Instrução Normativa N°68/2006 (BRASIL, 2006). Os resultados dessas análises confirmaram que o leite cru estava apto para a utilização no estudo (BRASIL, 2011).

Para o experimento, 1000 mL de leite cru foram adicionados de formol a fim de se obter concentração final de 0,1% e outros 1000 mL a 1%, a partir da fórmula:  $C_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \cdot V_{\text{final}}$ , onde: C = concentração e V= volume. As

concentrações de formol foram selecionadas a partir de estudos realizados por Sousa, 2016 e por Bonéfácio, 2016. Em seguida, cada solução obtida foi distribuída em cinco frascos de 200 mL que foram mantidos em refrigeração a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e, constituíram os tratamentos contidos no Quadro 1. Cada tratamento foi submetido à pesquisa de formol pela metodologia convencional contida na IN N° 68/2006 e pelo reagente FORMFIX®.

Para as análises com FORMFIX®, conforme recomendações do fabricante foram adicionados 1,0 mL do reagente a 25 mL de leite, sendo considerado como resultado positivo o aparecimento de coloração violeta e como negativo, a coloração rosa. Essa metodologia foi realizada em triplicata.

A metodologia convencional consistiu em medir 100 mL de leite homogeneizado e juntamente com 100 a 150 mL de água, foi acidificado com 2,0 mL de ácido fosfórico e submetido à destilação; 1,0 ml do destilado recolhido eram transferidos para tubo de ensaio e acrescido de 5,0mL de solução de ácido cromotrópico a 0,5 % e aquecido em banho-maria durante 15 minutos, sendo considerado como resultado positivo o desenvolvimento de coloração violácea (BRASIL, 2006).

**QUADRO 1** - Tratamentos avaliados para a detecção de formol adicionado ao leite cru refrigerado por 96 horas

<b>Tratamentos</b>	<b>Concentrações de formol (%)</b>	<b>Tempo (horas)</b>
Controle Negativo	sem formol	0
T0	0,1	0
T24	0,1	24
T48	0,1	48
T72	0,1	72
T96	0,1	96
T0'	1,0	0
T24'	1,0	24
T48'	1,0	48
T72'	1,0	72
T96'	1,0	96

Legenda: T= tratamento

### 3.1.2 Avaliação da persistência do formol adicionado ao leite cru refrigerado e submetido a tratamentos térmicos.

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito do aquecimento do leite às temperaturas próximas a de pasteurização rápida e da fervura, sobre o formol adicionado ao leite cru.

Da mesma forma como descrito no item 3.1.1 foram preparadas duas soluções de 1000 mL cada, com concentrações finais de formol de 0,1% e de 1%.

Para avaliar a estabilidade do formol adicionado ao leite cru durante aquecimento semelhante à pasteurização, foram aplicadas temperaturas de  $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , por cerca de 20 segundos, seguido de resfriamento até  $4^{\circ}\text{C}$  e, de fervura a partir da ebulição por cerca de quatro segundos, seguido de resfriamento até  $32^{\circ}\text{C}$ . Antes e após cada tratamento térmico, foi realizada a semeadura para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos utilizando-se o meio de cultura Plate® Count Agar (PCA) e as pesquisas de peroxidase e fosfatase alcalina a fim de avaliar a eficiência dos aquecimentos. Os tratamentos avaliados estão contidos no Quadro 2.

**QUADRO 2** - Tratamentos térmicos avaliados para a detecção de formol adicionado ao leite

<b>Tratamentos</b>
T1 = Controle negativo leite cru (250 mL)
T2 = Controle negativo leite pasteurizado (250 mL)
T3 = Controle negativo leite fervura (250 mL)
T4 = Leite pasteurizado com 0,1% de formol (250 mL)
T5 = Leite pasteurizado com 1,0% de formol (250 mL)
T6 = Leite fervido com 0,1% de formol (250 mL)
T7 = Leite fervido com 1,0% de formol (250 mL)

Legenda: T= tratamento

Os tratamentos térmicos foram realizados em capela de exaustão para evitar o escape do odor irritante do formol. O aquecimento foi proporcionado através de Bico de Bunsen e os béqueres de vidro apoiados sobre um tripé de ferro protegidos por uma tela de amianto. A aferição da temperatura se deu por

meio de termômetro de mercúrio e o tempo cronometrado em relógio digital. O resfriamento foi imediato, por imersão em bacia com água gelada e gelo reciclável e acondicionamento em freezer para atingir a temperatura desejada o mais rápido possível.

A pesquisa para detecção de formol adicionado ao leite foi realizada conforme descrito no item anterior.

### 3.2 Segundo Estudo

#### 3.2.1 Avaliação da interferência do teor de gordura e da lactose na detecção de formol adicionado ao leite.

O objetivo desse experimento foi avaliar a interferência de componentes do leite, como a gordura e a lactose, na detecção de formol adicionado ao leite, pelo reagente FORMFIX®.

Para os tratamentos avaliados foram utilizados leites UAT integral, semidesnatado, desnatado e desnatado sem lactose, adquiridos no comércio local (Quadro 3). As concentrações de formol selecionadas foram de 0,1% e de 1,0% e, os cálculos das diluições de formol foram obtidos a partir da fórmula:

$$C_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \cdot V_{\text{final}}$$

**QUADRO 3** - Tratamentos avaliados para a detecção de formol adicionado ao leite com diferentes teores de gordura e lactose

<b>Tratamentos e Concentrações de formol (%)</b>
T1 = Controle negativo leite sem formol
T2 = Controle positivo leite com 0,1% de formol
T3 = Controle positivo leite com 1,0% de formol
T4 = Leite integral com 0,1% de formol
T5 = Leite integral com 1,0% de formol
T6 = Leite semidesnatado com 0,1% de formol
T7 = Leite semidesnatado com 1,0% de formol
T8 = Leite desnatado com 0,1% de formol
T9 = Leite desnatado com 1,0% de formol
T10 = Leite sem lactose com 0,1% de formol
T11 = Leite sem lactose com 1,0% de formol

Legenda: T= tratamento

A metodologia utilizada para a detecção de formol foi por meio do reagente FORMFIX®, conforme indicações do fabricante e em triplicatas, para proporcionar maior segurança nos resultados.

A metodologia convencional preconizada pela IN N° 68/2006 (BRASIL, 2006) foi realizada no intuito de comprovar a presença de formol nas amostras e também para evidenciar sua eficácia na detecção de formol em leites com diferentes teores de gordura e de lactose.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no primeiro experimento demonstraram a persistência do formol adicionado ao leite cru refrigerado em todos os tempos avaliados. Não se observou variações nas tonalidades das reações colorimétricas referentes às metodologias utilizadas, indicando que não houve degradação da substância química nas concentrações avaliadas.

O FORMFIX® se apresenta em forma líquida translúcida e em presença de formol estabelece uma reação colorimétrica resultando em tons que variam desde um róseo-pálido (resultado negativo) até a uma coloração arroxeada (resultado positivo) (SOUSA, 2016). Por sua vez, a metodologia convencional resulta em coloração violeta para resultado positivo e coloração âmbar para resultado negativo (BRASIL, 2006).

As variações de tempo escolhidas reproduziram os tempos de armazenamento em temperatura de refrigeração permitido na propriedade e também na indústria, que pode chegar a 96 horas. A Instrução Normativa N° 62 (BRASIL, 2011) estabelece que seja realizado o resfriamento prévio do leite na propriedade, anterior ao beneficiamento e que a estocagem em refrigeração pode ser por no máximo 48 horas. E ao chegar à indústria, dependendo do fluxograma, o leite é armazenado por períodos que chegam a mais 48 horas.

A refrigeração é eficiente na diminuição de microrganismos mesófilos, porém pode ocorrer o crescimento de microbiota psicrófila, que possui atividade deteriorante, produzindo proteases e lipases termorresistentes (FURTADO, 2010; SANTOS, 2010), sendo talvez esse o objetivo da fraude por adição de conservantes como o formol, principalmente em situações onde o tempo de armazenamento é extrapolado ao permitido pela legislação.

No segundo experimento, para avaliar se o aquecimento do leite em temperaturas próximas a de pasteurização rápida e à fervura interferem na detecção do formol adicionado, por meio das análises com o reagente FORMFIX® e pela a metodologia convencional, os resultados mostraram que o tratamento térmico não é capaz de degradar essa substância química. Isso demonstra que o formol tem a capacidade de persistir na matéria prima e no produto beneficiado, representando um grave risco à saúde do consumidor.

Conforme Cafe, 2015 o formaldeído decompõe-se em metanol e monóxido de carbono apenas quando em temperaturas superiores a 150°C, indicando que o sistema UAT aplicado ao leite fluido não elimina a adição do formol.

Para avaliar a eficiência da simulação de pasteurização, foram realizadas as provas para pesquisa de fosfatase alcalina e peroxidase, e para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (A/M). Nos tratamentos com temperatura de pasteurização, os resultados foram negativos para a presença de fosfatase alcalina, evidenciando que a temperatura mínima de 72°C foi alcançada, porém, também foram negativos para peroxidase, indicando aquecimento acima de 80°C. O leite submetido à temperatura de fervura também se apresentou negativo para as duas enzimas. As contagens de A/M estão contidas na Tabela 1, comprovando a eficiência dos tratamentos térmicos e a ação do formol sobre a microbiota mesofílica.

**TABELA 1** - Efeito dos diferentes tratamentos térmicos e das concentrações de formol adicionado ao leite cru sobre as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos

Tratamentos	Contagens (UFC/mL)
T1 = Controle negativo leite cru	1,8 x 10 <sup>5</sup>
T2 = Controle negativo leite pasteurizado	1,0 x 10 <sup>2</sup>
T3 = Controle negativo leite fervura	50
T4 = Leite pasteurizado com 0,1% de formol	0
T5 = Leite pasteurizado com 1,0% de formol	0
T6 = Leite fervido com 0,1% de formol	0
T7 = Leite fervido com 1,0% de formol	0

Legenda: T= tratamento

Bonefácio, 2016 avaliou a ação inibitória do formol sobre a microbiota do leite cru em diferentes concentrações e detectou que a partir da concentração de formol a 0,005% a redução nas contagens de aeróbios mesófilos foi de 3 ciclos logs (de 2,29 x 10<sup>3</sup> UFC/mL para 5,0 x 10<sup>0</sup> UFC/mL).

Silva et al., 2015 em pesquisa que 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.

A adição de substâncias que inibem o desenvolvimento de microrganismos no leite cru representa um problema para a indústria de laticínios, inviabilizando a produção de derivados na qual é necessário o uso de culturas lácticas.

No segundo estudo, os resultados obtidos pelo reagente FORMFIX® foram positivos nas duas concentrações de formol, apresentando a coloração violácea característica de reação positiva. Entretanto, observaram-se variações de tonalidades. Nas análises realizadas com leite UAT integral com teor  $\geq 3,0\%$  de gordura, nas duas concentrações de formol testadas, houve uma percepção visual de coloração violácea menos acentuada em relação àquelas apresentadas nos leites UAT semidesnatado e desnatado. A coloração observada na análise do leite UAT sem lactose desnatado apresentou-se equivalente ao resultado colorimétrico do leite UAT desnatado.

Os resultados encontrados sugerem uma interferência da gordura na reação colorimétrica do reagente FORMFIX®, pois foi evidenciado que quanto menor o teor de gordura mais intensa a coloração apresentada. Entretanto, a diferença de coloração foi bastante sutil, e não interferiu na percepção visual como resultado positivo.

A metodologia convencional para detecção da adição de formol ao leite (BRASIL, 2006) também foi realizada e todos os resultados foram positivos, apresentando a coloração violeta característica.

Os testes diagnósticos para detecção de fraude por adição de formol são de suma importância e sua aplicação incorporada em toda a cadeia produtiva proporciona maior segurança, desde o momento em que o leite é coletado na propriedade rural até a saída como produto final, sendo necessário um processo de produção cada vez mais controlado (FIRMINO et al., 2010).

## 5. CONCLUSÕES

Essa pesquisa demonstrou que o tempo de armazenamento e a refrigeração por até 96 horas não interfere na detecção do formol adicionado ao leite, por meio da metodologia convencional e do reagente FORMFIX®.

O formol persiste no leite mesmo após aquecimento à temperatura de fervura, indicando que o risco à saúde do consumidor representado pela presença dessa substância química, não é eliminado com os tratamentos térmicos aplicados ao leite fluido, podendo permanecer nos seus derivados.

A gordura e a lactose não interferem no desempenho da metodologia convencional e do teste rápido avaliado, na detecção de formol adicionado ao leite.

## 6. REFERÊNCIAS

ABRAF. Associação Brasileira dos Produtores de Formol e Derivados. Disponível em: <http://www.abraf.org.br/utilizacao.php>. Acesso: 03 de outubro de 2016.

ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C. S.; SILVA, J. B. A. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 2014; 73(3): 244-51.

ANVISA. Esclarecimentos 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/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). Acesso em 05 de outubro de 2016.

BONEFÁCIO, S. M. B. A. **Resíduos de formol em leite cru: Interferência de outras substâncias químicas na detecção e efeitos sobre a microbiota**. 2016. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dez. de 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Operação Leite Adulterado I e II. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/08/operacao-leite-adulterado-i-e-ii>. Acesso em 05 de outubro de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes. 2009. Secretaria de Defesa Agropecuária, Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes. Brasília, DF.

CAFE, T. M. **Análise crítica dos métodos de remoção de formaldeído de efluentes domésticos e industriais**. 2015. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro.

CITTADIN-SOARES, E. C.; FORTUNATO, J. J. **Toxicidade do formaldeído: Uma revisão sistemática da Literatura**; 2010. Pôster. Laboratório de Neurociências. Universidade do Sul de Santa Catarina, Campus Tubarão.

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.

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 da Poma MG. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Set/Out, nº 376, 65: 5-11, 2010 Pág. 5.

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 microbiológica do leite ‘in natura’ comercializado informalmente no município de Garanhuns – PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.03, n.02, p. 38-46, 2009.

FURTADO, M. A. M. Palestra: Fraudes em leite de consumo. In: I SIMPÓSIO DE QUALIDADE DO LEITE E DERIVADOS, UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, 16 a 19 de Agosto de 2010. Disponível em: <http://r1.ufrj.br/simleite/Marco%20Furtado.pdf>. Acesso em 03 de outubro de 2016.

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: 06 de outubro 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](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf). Acesso em: 06 de outubro de 2016.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. In: Formol ou formaldeído. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=795](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795). Acesso: 03 de outubro de 2016.

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.

RODRIGUES, E.; CASTAGNA, A. A.; DIAS, M. T.; ARONOVICH, M. **Qualidade do leite e derivados: Processos, processamento tecnológico e índices**. 2013. Niterói: Programa Rio Rural. Manual Técnico, 37. 53 f. ISSN 1983-5671. Rio de Janeiro.

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. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, n.66, v.379, p.30-4. 2011.

SANTOS, J. M. **Leite cru refrigerado: Características físico-químicas, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicrófilos**. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais.

SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R.; PEREIRA, J. R.; RIOS, E. A.; RIBEIRO JUNIOR, J. C.; BELOTI, V. Preservatives and neutralizing substances in milk: analytical sensitivity of official specific and nonspecific tests, microbial inhibition effect, and residue persistence in milk. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.9, p.1613-1618, set, 2015.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; LAMBERTINI, L.; LAURIOLA, M.; PADOVANI, M.; MALTONI, C.; **Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Formaldehyde and Acetaldehyde in Rats**; Annals New York Academy of Sciences, 982: 87–105, 2002.

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.

SOUSA, R. E. **Avaliação de um teste rápido para a detecção de formol no leite cru**. 2016. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.

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

WANDERLEY, C. H.; SILVA, A. C. O.; SILVA, F. E. R.; MÁRSICO, E. T.; CONTE JUNIOR, C. A. Avaliação da Sensibilidade de Métodos Analíticos Para Verificar Fraude em Leite Fluido. **Revista de Ciências da Vida**, RJ, EDUR, v. 33, n. 1, jan. / jun., p. 54-63, 2013.