



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**JÚLIA DE MORAES
OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO E ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE
ADIÇÃO DE ETANOL EM LEITE**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO**

Brasília – DF1º/2022

**UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

JÚLIA DE MORAES OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE
ADIÇÃO DE ETANOL EM LEITE**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharelado(a) em Química Tecnológica

**Orientador: Márcio Antônio Mendonça
1º/2022**

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a minha mãe, a qual me proporcionou as melhores condições para chegar até aqui e o que sou hoje é, justamente, por causa de cada minuto que ela me colocou como prioridade: meu futuro, minha saúde, meus sonhos e minha felicidade. Juntamente com os meus avós que me criaram com todo amor me ensinando o que é fé e cuidado.

Minha jornada dentro dessa graduação teve altos e baixos, entretanto nunca estive sozinha. Sempre estive acompanhada pelos meus amigos de curso e universidade: Alessandro, Arthur, Ana Beatriz, Igor, Ricardo, Miguel, Gabriel, Millene, Gabriela, Bruna, Ana Camargo, Matheus e muitos outros que eu corro risco de esquecer nessa longa lista de companheiros para vida.

Àqueles que estiverem presentes como família e que hoje, na verdade, são a minha pequena família: Giovanna, Giuliane, Arthur e meu escolhido companheiro de vida, Athos. Sem eles, as desistências seriam inúmeras, para sempre serão meu porto seguro no caos da vida profissional e pessoal. Minha singela homenagem àqueles que queríamos que ainda estivessem aqui, cuidem de nós daí.

Fica aqui a minha homenagem também aos profissionais que me formaram como futura profissional competente e segura suficiente para exercer e devolver meu papel na ciência e minhas inspirações como química industrial: Bruna Oliveira, Felipe Feitosa, Igor Henrique, Maria Clara, Renato Oliveira e Renata Lima.

Por último, mas não menos importante, aos que compõem o corpo docente que abriu um mundo de vivências e oportunidades para mim. Foram esses professores e grandes pesquisadores que comprovam a grandiosidade da Universidade de Brasília.

Índice

1 . Introdução.....	6
2. Objetivos.....	7
3. Fundamentação teórica	7
3.1 Qualidade do leite e regulamentação no Brasil.....	7
3.2 Fraudes em leite fluido.....	8
3.4 Detecção de etanol	9
3.6. Métodos analíticos qualitativos	11
4. Metodologia	12
4.1 Soluções de Análise	12
4.2 Preparo de Amostra.....	13
4.3. Procedimentos de Análise Final.....	14
5. Resultado e Discussões.....	16
5.2 Soluções ácidas de digestão.....	17
5.3 Temperatura e tempo de reação.....	18
6. Conclusão.....	18
7. Considerações Finais.....	21
8. Referências.....	22

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação gráfica da montagem do aparato montado.....	11
Fluxograma 1: Fluxograma de procedimento de análise desenvolvido.....	16
Figura 2: Coloração esperada das soluções sem e com a presença de etanol, respectivamente.....	16
Quadro 1: Quadro comparativo entre o método oficial e o desenvolvido conforme objetivos propostos.....	20

1 . Introdução

A qualidade do leite produzido no Brasil é tema recorrente de debates nas últimas décadas, envolvendo os setores público e privado. O leite, sendo um produto com uma alta perecibilidade, torna-o suscetível às alterações de suas características físicas, químicas e biológicas durante sua manipulação, colocando em risco a saúde do consumidor final. Sendo assim, como outros produtos de origem animal comercializados no Brasil, possui órgão responsável pela sua regulamentação, definindo parâmetros de qualidade desde a obtenção, transporte, armazenamento até a recepção na indústria (DURR, 2004; BRASIL, 2018).

Dentre as adulterações destaca-se a adição de substâncias redutoras voláteis como etanol a fim de reconstituir a densidade do leite fluido resultando na necessidade de uma análise de pesquisa da presença dessa substância (ABRANTES, CAMPÊLO, SILVA, 2014). É indicado um método oficial pelo Manual de Métodos Oficiais de Análise de Produtos de Origem Animal publicado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2019, todavia a complexidade de arranjos instrumentais, reagentes concentrados e quantidade de amostra torna o método laborioso diante da realidade e necessidade da indústria de lácteos na recepção da matéria prima.

Portanto, desenvolver e adaptar uma metodologia de determinação qualitativa de álcool etílico em leite fluido sendo uma alternativa para o método credenciado. é o objetivo ao longo da pesquisa por meio do estudo das variações de volume, tempo, temperatura e concentrações da solução sulfocrômica e soluções ácidas trabalhadas na digestão da amostra de leite. Manteve-se o emprego de métodos qualitativos colorimétricos, caracterizados por serem convencionais e consolidados no setor para a pesquisa de substâncias adulterantes (IAL, 2008), em que a diferenciação de coloração indica somente presença e ausência atendendo às exigências da legislação (BRASIL, 2018) quando a cor alaranjada se mantém. Em caso de presença do adulterante, observa-se a mudança da cor característica da solução para esverdeada (MAPA, 2019; MAPA, 2014).

2. Objetivos

Centraliza-se a adaptação de uma metodologia de determinação qualitativa colorimétrica de álcool etílico em leite fluido como foco principal do estudo, de modo que promova praticidade, eficiência e acessibilidade considerando as análises de rotina da qualidade do leite fluido.

Parte-se da proposta de reduzir a quantidade de amostra de leite necessária para a análise de presença de etanol juntamente com a redução do número soluções indicadas para o procedimento. Além de propor trabalhar o tempo de realização da análise, dificilmente determinado em função da necessidade de montagem instrumental e tratamento da amostra de leite. Consequentemente, espera-se uma determinação tempo necessários de interpretação de resultados, o qual evite resultados duvidosos.

Assim, por meio da pesquisa voltada para análise de variações de volume, concentração, tempo e temperatura tanto do tratamento da amostra de leite até a solução de análise sulfocrômica é possível discutir e assegurar ao atendimento dos parâmetros exigidos pela legislação conforme a necessidade de otimização de processos dentro da indústria de lácteos.

3. Fundamentação teórica

3.1 Qualidade do leite e regulamentação no Brasil

Com o objetivo de melhorar e assegurar o setor leiteiro com produto de qualidade tanto para o mercado nacional quanto para o reconhecimento internacional surge, em 2002, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite regulamentando a inspeção do leite e derivados desde a obtenção da matéria prima até a expedição do produto. Ademais, determina que o leite cru fornecido por todos os produtores do país deve ser analisado mensalmente por laboratórios credenciados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável por regulamentar e fiscalizar a qualidade do leite e seus derivados comercializados (BRASIL, 2017; DURR, 2004).

Por conseguinte, o MAPA simplifica o entendimento sobre os prazos e exigências de qualidade estabelecidos publicando, em 26 de novembro de 2018, a

Instrução Normativa 76 e Instrução Normativa 77 (MAPA, 2018). De modo que é promovido um plano mais sólido e duradouro de qualificação dos produtores de leite, tendo em vista que a busca por produtos lácteos que abasteçam o setor garantindo a segurança alimentar da população é a grande causa da regulamentação e fiscalização da produção de leite no país.

Dentre os parâmetros exigidos pelas Instruções Normativas de controle diário da qualidade do leite fluido para os estabelecimentos incluem a pesquisa de substâncias neutralizantes de acidez, reconstituintes de densidade ou do índice crioscópico e substâncias conservadoras. Ademais, trata-se do controle das condições de produção, conservação e transporte do leite cru, antes de chegar à indústria. Tais análises de pesquisa surgem devido aos casos de práticas fraudulentas envolvendo o mercado do leite no Brasil (MOORE; SPINK; LIPP, 2012).

3.2 Fraudes em leite fluido

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), 2020, considera o produto de origem animal fraudado quando há adição de ingredientes, aditivos, coadjuvantes de tecnologia ou substâncias com o objetivo de dissimular ou de ocultar alterações, deficiências de qualidade da matéria-prima ou defeitos na elaboração do produto. O leite é frequentemente envolvido em fraudes para justamente mascarar a má qualidade do produto sendo as principais ocorrências pela adição de água, de substâncias conservantes como o peróxido de hidrogênio, neutralizantes como o hidróxido de sódio e o bicarbonato de sódio e reconstituintes da densidade e crioscopia como: cloreto, sacarose, amido e álcool etílico (ABRANTES, CAMPÊLO, SILVA, 2014; Ministério da Saúde, 1997).

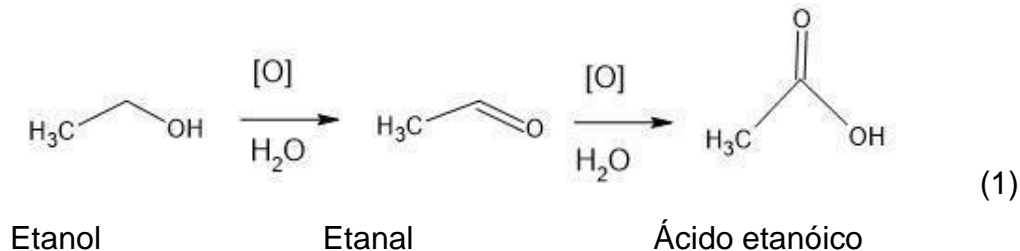
A adição de reconstituintes de densidade é utilizada para encobrir a aguagem do leite, isto é, quando há a adição de água em prol do aumento de volume do produto. A presença de água é detectada pela alteração nos valores de densidade e crioscopia, de modo que reduz o valor da densidade e aproxima do valor obtido para água no índice crioscópico (ABRANTES, CAMPÊLO, SILVA, 2014). Portanto, o álcool etílico surge como uma adição fraudulenta de reconstituente de densidade.

Em 2014, no estado do Rio Grande do Sul, durante as fiscalizações do Ministério da Agricultura em cooperativas da região devido a recorrências de fraudes

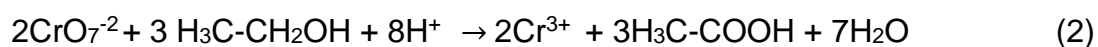
como a de adição de formol no leite foram detectados exemplos de fraudes de reconstituintes de densidade (ALMEIDA, 2013). Diante de toda operação envolvida, destaca-se no mesmo ano a disponibilização de um método de ensaio oficial disponibilizado pelo MAPA para a determinação qualitativa de álcool etílico em leite fluido direcionado para uma detecção eficiente frente a problemática das fraudes (MAPA, 2014).

3.4 Detecção de etanol

A presença de etanol no leite é detectada por meio de uma reação entre o álcool etílico, o qual sofre uma oxidação, e um agente oxidante - solução sulfocrômica - composta por dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4). A reação ocorre no carbono ligado à hidroxila (-OH) sofrendo o ataque do oxigênio presente no meio oxidante de forma que o composto formado é instável, com duas hidroxilas ligadas ao mesmo carbono. Conseqüentemente, ocorre a liberação de água e origina-se o primeiro produto: aldeído. A oxidação continua já que o oxigênio do meio ataca o carbono da carbonila (-C=O) formando um ácido carboxílico como produto conforme equação 1 (CLAYDEN, 2012, p.194).



A oxidação de álcoois primários como o etanol é causada pelo Cromo (VI) presente na solução sulfocrômica de coloração característica alaranjada, sendo reduzido para Cromo (III) com a coloração característica verde (equação 2). Dessa forma, é possível distinguir visualmente a diferença de coloração na indicação de presença de etanol em meio aquoso (CLAYDEN, 2012, p.194; BRAATHEN, 1997).



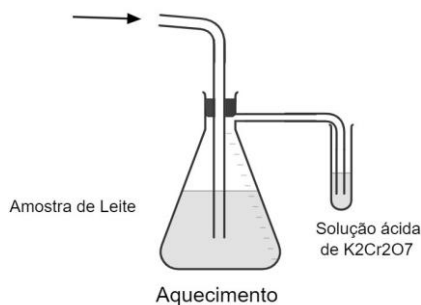
3.5. Método oficial de análise de detecção de etanol em leite fluido

O Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (MAPA, 2019) é publicado para orientar e determinar como devem ser realizadas as análises oficiais de alimentos como o leite fluido segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Substâncias redutoras voláteis como o etanol surgem na seção de métodos químicos para o leite fluido partindo do princípio da redução do cromo (VI) para o cromo (III) em que a hidroxila, em meio ácido, ligada ao carbono primário do álcool é oxidada alterando a coloração da solução sulfocrômica (MAPA, 2019).

Os equipamentos descritos como necessários para realização da análise são: balança analítica com resolução mínima de 0,01 g; bico de Bünsen ou placa aquecedora; kitassato de 500mL ou balão de fundo redondo com saída lateral de 500mL; pipeta graduada de 10mL; pipeta de Pasteur; proveta de 100mL; rolha de borracha para vedação da abertura superior do kitassato/balão com saída lateral; tubo de ensaio 20 x 200mm e tubo de silicone ou látex de 25 cm (MAPA, 2019; MAPA, 2014).

A realização da análise inicia-se com o preparo da solução sulfocrômica dissolvendo 1,5 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com ácido sulfúrico (H_2SO_4). Após o preparo da solução o procedimento segue para medir 100 mL de amostra e transferir para o balão de fundo redondo com saída lateral ou kitassato, depois deve-se adicionar 10mL de solução antiespumante (3%) - solução responsável por evitar a formação de espuma consequente do aquecimento do leite fluido- e misturar. Transferir 2mL da solução sulfocrômica para um tubo de ensaio e mergulhar dentro dele a ponta da pipeta de Pasteur acoplada ao balão/kitassato por um tubo de látex ou silicone, formando um sistema fechado (Figura 1). O próximo passo é aquecer a amostra do kitassato/balão fervendo por 5 minutos e observar a coloração da solução sulfocrômica do tubo de ensaio após o tempo determinado (MAPA, 2019; MAPA, 2014).

Figura 1: Representação gráfica da montagem do aparato montado.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Em caso de mudança da coloração para verde, o resultado é positivo para presença de álcool etílico na amostra, e qualquer outro resultado divergente é classificado como negativo (MAPA, 2019; MAPA, 2014).

Destaca-se que o procedimento deve ser realizado em local adequado com equipamentos de proteção coletiva e individual segundo as medidas de segurança que devem ser adotadas em ambientes laboratoriais (Ministério do Trabalho e Emprego, 2015). Portanto, o método exige que sua realização ocorra sob uma capela de exaustão de gases a utilização de equipamentos de proteção individual como jalecos, luvas e óculos de proteção. Assim como, toda manipulação deve ser feita por analista treinado, já que é notável a sensibilidade de montagem do aparato instrumental, a periculosidade dos reagentes envolvidos e a possibilidade de contaminações de amostra com manuseio incorreto exigindo maior atenção e disponibilidade de tempo para garantir resultados favoráveis.

3.6. Métodos analíticos qualitativos

O método qualitativo colorimétrico caracteriza-se como uma técnica em que o objetivo único é a identificação da presença de um determinado analito em uma amostra baseado na comparação de cores. As mudanças de colorações consequentes das reações envolvidas e específicas dos meios viabilizam a identificação e diferenciação por meio da comparação com uma coloração já conhecida (IAL, 2008; TRONCO, 2010).

Essa técnica de análise é muito empregada, atualmente, na detecção de adulterantes em leite fluido como alternativa e adaptação às necessidades de

cumprimento das análises requisitadas pela IN 77 (MAPA, 2018; KARTHEEK, 2011; IAL, 2008). Tais análises são realizadas na recepção do leite cru, conforme descrito na instrução normativa, de modo que combinado à característica de perecibilidade do leite, a técnica viabiliza resultados rápidos fazendo parte de diversos procedimentos analíticos desenvolvidos e em desenvolvimento (KARTHEEK, 2011).

Apesar da eficiência proposta por métodos qualitativos em conjunto do baixo custo e se apresentarem como testes consolidados na pesquisa de adulterantes em leite, ainda há a dependência da relação analito e as concentrações dos compostos de interesse nos produtos de origem animal e da interpretação de resultados conforme as técnicas sensoriais. Além disso, cada substância instrumentação, grande quantidade de amostras de leite e reagentes concentrados gerando resíduos perigosos. Destarte, não se exclui a necessidade de validação e acessibilidade do emprego de métodos convencionais instrumentais, os quais garantem um controle analítico dos resultados (MAPA, 2019; De Noni, 2004; IAL, 2008).

4. Metodologia

4.1 Soluções de Análise

A proposta de facilitar e desenvolver um método que reduza a quantidade de amostra, o tempo de realização e soluções utilizadas na análise, além de eliminar a necessidade de montagem de aparatos com diferentes vidrarias, inicia-se com a adaptação da solução sulfocrômica. A solução utilizada na detecção de etanol em leite como agente oxidante para mediar a reação foi baseada no método descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio do Método de Ensaio em Produtos de Origem Animal 42 determinação qualitativa de álcool etílico em leite fluido.

Inicialmente, foram produzidas 3 soluções sulfocrômica utilizadas e indicadas pela metodologia do MAPA na análise de presença de etanol em leite fluido (MAPA, 2019; MAPA, 2014). A primeira, conforme descrito pelo método, dissolvendo 1,5g de dicromato de potássio em 10 mL de água, transferindo

para um balão de 100 mL e completando com ácido sulfúrico concentrado. Na segunda, foram dissolvidos 1 g de dicromato de potássio em 30 mL de água destilada e completando com 20 mL de ácido sulfúrico PA ACS (Solução 1). Por fim, a terceira proporção preparada fora pesada 1 g de dicromato de potássio em 50 mL de água destilada, completando com 50 mL de ácido sulfúrico (Solução 2).

Considerando que o leite fluido é uma matriz complexa composta por um alto teor de lipídeos dificultadora do processo de oxidação foi aplicado um método de preparo de amostra partindo da digestão ácida mediada por uma solução, a qual evita perda de elementos voláteis como o etanol (KRUG, 2010). As soluções ácidas produzidas foram compostas por 40% (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 20% (v/v) de ácido sulfúrico (H_2SO_4) completando com água destilada em um balão volumétrico de 50 mL (Solução 3) e outra solução 40% (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 10% (v/v) de ácido sulfúrico (H_2SO_4) nomeada como Solução 4. A compatibilidade entre os dois ácidos, o poder oxidante de cada ácido e sua utilização comum nesse tipo de tratamento de amostra foi considerado. A análise é realizada em tubo de ensaio com a necessidade do emprego de banho termostatizados, chapas de aquecimento e/ou blocos digestores que viabilizem a decomposição completa da fração orgânica (SOUSA; CAMPOS; ORLANDO, 2015; KRUG, 2010). As soluções foram testadas em conjunto das variações de concentração da solução sulfocrômica e de volume de amostra de leite.

4.2 Preparo de Amostra

A amostra de leite utilizada, ao longo de todo o desenvolvimento, caracteriza-se como integral sob tratamento UHT em embalagem cartonada com capacidade de 1 litro sendo mantido sob refrigeração, em que o preparo para a realização da análise inicia-se com a adição de 1 mL da solução de ácido fosfórico e ácido sulfúrico à amostra. A digestão via úmida realizada sob aquecimento com uma solução ácida facilita a oxidação do material orgânico da amostra viabilizando que a reação de oxidação de interesse ocorra sem

interferências dos lipídeos presentes no leite (KOVACS, 1986).

Em seguida, a mistura de amostra em solução ácida é aquecida em diferentes temperaturas entre 40 e 70°C em uma placa aquecedora com agitação C-MAG HS7 com auxílio de um controlador de temperatura ETS D5 IKA ® posicionado no interior de um béquer de 1000 mL contendo aproximadamente 300 mL de água. A determinação do tempo necessário foi testada a partir de 1 até 5 minutos, prosseguindo a análise com adição de 1 mL da solução sulfocrômica preparada nas concentrações de 20% (v/v) e 50% (v/v) de ácido sulfúrico em 1% (v/v) de dicromato de potássio.

As amostras de leite de controle positivo, isto é, amostra com adição de etanol é preparada com 0,5 mL de Álcool Etílico 99,5% em um balão volumétrico de 50 mL com leite UHT integral sendo a amostra representativa de uma contaminação de 1%.

Os volumes utilizados de amostras de leite contaminadas e não contaminadas durante a realização dos testes de variação de concentração das soluções de análise, como a sulfocrômica e a ácida, foram variados em 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 e 0,01 mL.

4.3. Procedimentos de Análise Final

A execução do procedimento de análise conforme a adequação de concentrações de reagentes produzidos, combinado à definição da temperatura de aquecimento ótima e o tempo, no qual deve-se manter a mistura entre amostra e solução ácida de aberturas sob aquecimento, inicia-se com o preparo da amostra de leite.

A determinação da temperatura adequada para o procedimento de análise é realizada em uma variação de 10°C a partir de 40°C até 70°C considerando o ponto de ebulição do álcool etílico de 78°C (AIP, 1972) mantendo as amostras por 5 minutos em aquecimento em cada temperatura. O tempo de reação é contabilizado após a adição de 1 mL de solução sulfocrômica de 20% (v/v) de ácido sulfúrico em 1% (m/v) de dicromato de potássio observando a mudança de coloração nas misturas entre a amostra de leite (com e sem

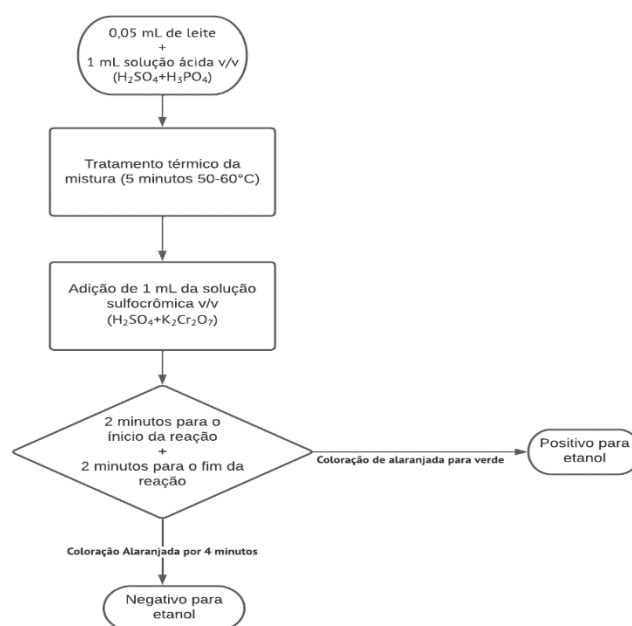
contaminação de 1% (v/v) de etanol) e a Solução 3 (composta por 40% (v/v) de ácido fosfórico e 20% (v/v) de ácido sulfúrico).

Portanto o procedimento segue como primeiro passo a adição de , em um tubo de ensaio, 1 mL de solução ácida composta pela mistura de ácido fosfórico e sulfúrico à 0,05 mL amostra de leite. Após agitação do tubo é iniciado o tratamento térmico da mistura em um arranjo instrumental ou equipamento adequado que permita controle da temperatura dentro da faixa de 50 a 60°C.

Em seguida, após manter durante 5 minutos a mistura sob aquecimento, ao remover o tubo de ensaio adiciona-se 1 mL da Solução 2. Deve-se aguardar 2 minutos para o início da reação, após mais 2 minutos a reação é dada como finalizada totalizando 4 minutos de reação.

Em caso de mudança de coloração da solução de alaranjada para esverdeada considera-se o resultado positivo para presença de álcool etílico nos primeiros dois minutos. Já quando a coloração alaranjada se mantém durante 4 minutos da adição da solução sulfocrômica para então início do aparente esverdeamento da solução, considera-se resultado negativo para presença de álcool etílico na amostra (Fluxograma 1).

Fluxograma 1: Fluxograma de procedimento de análise desenvolvida.



Fonte: elaborado pela autora (2022).

A diferença entre as cores ao final da reação é facilmente observada entre o alaranjado e o esverdeado (Figura 2). O procedimento, conforme descrito anteriormente, aliado aos reagentes que obtiveram o melhor resultado foi testado em triplicata.

Figura 2 : Coloração esperada das soluções sem e com a presença de etanol, respectivamente



Fonte: elaborado pela autora (2022)

5. Resultado e Discussões

5.1 Soluções Sulfocrômica

Cada solução foi testada em triplicata, considerando o processo de análise descrito com o preparo de amostra ao adicionar 1 mL de solução ácida, em

seguida, tratamento térmico durante 5 minutos em uma temperatura controlada dentro da faixa de 50 a 60° C.

A solução contendo 50% (v/v) de ácido sulfúrico (Solução 1) concentrado não apresentou colorações distinguíveis em um tempo de início de reação de aproximadamente 2 minutos com duração de mais 2 minutos, totalizando 4 minutos de reação, a partir da mudança de coloração de laranja amarelado para verde. O resultado se repete para todos os volumes de amostra de leite contaminada (contendo 1% de etanol) e amostra de leite não contaminada, conforme a variação de volume das amostras em 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 e 0,01 mL.

Já a Solução 2 contendo 20% (v/v) de ácido sulfúrico concentrado apresentou colorações facilmente diferenciáveis entre alaranjado e verde após 2 minutos mantendo por mais 2 minutos somente para o volume de amostra de 0,05 mL. Para 1; 0,5; 0,25; 0,1 e 0,01 mL de amostra, as colorações se mantiveram alaranjadas e apresentaram a coloração verde no tempo de 4 minutos simultaneamente impossibilitando concluir a presença de contaminação de etanol.

Durante a realização dos testes, a solução sulfocrômica preparada conforme indicado pelo MAPA foi utilizada como comparativo de colorações, todavia os resultados se assemelham à solução contendo 50% (v/v) de ácido sulfúrico.

5.2 Soluções ácidas de digestão

A solução composta por 40% (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 20% (v/v) de ácido sulfúrico (H_2SO_4) obteve resultados distinguíveis quando somada à adição da Solução 1 (solução sulfocrômica de 20% (v/v) de ácido sulfúrico concentrado em 1% (m/v) de dicromato de potássio) no volume 0,05 mL de leite de controle positivo e negativo. De modo que em volumes maiores como 1 e 0,5 mL a adição de dessa solução provoca a formação intensa de grumos dificultando a dissolução da solução de análise adicionada após o tratamento térmico.

Em contrapartida, quando ácido fosfórico na concentração de 40% (v/v) com 10% (v/v) de ácido sulfúrico ao ser adicionado, antes do tratamento térmico

e adição da Solução 1, obtém-se uma reação demorada com resultados idênticos para as duas amostras de leite com contaminação e sem contaminação de etanol. O resultado se repete para todos os volumes de amostra em cada análise, ou seja, indicando resultados falsos negativos.

5.3 Temperatura e tempo de reação

A análise é realizada em um frasco aberto, isto é, em tubo de ensaio o que faz necessário a combinação de um tratamento térmico, uma vez que favorece a digestão ácida da fração orgânica da amostra (KOVACS, 1986; SOUSA; CAMPOS; ORLANDO, 2015; KRUG, 2010).

As amostras aquecidas em temperaturas abaixo de 50°C apresentaram coloração alaranjada da solução sulfocrômica durante 4 minutos em que ambas, misturas de leite contendo ou não etanol adicionado à solução ácida, apresentaram após esse tempo coloração esverdeada indicando resultado falso positivo para presença de etanol na amostra de leite. Quando as amostras foram mantidas em aquecimento entre em uma faixa de temperatura de 50°C e 60°C durante 5 minutos, obteve-se em 2 minutos de reação a diferença de coloração nítida entre alaranjado e esverdeado nas misturas com duração de mais 2 minutos, totalizando 4 minutos de reação até a mistura contendo amostra de leite não contaminada com etanol aparentar início de coloração esverdeada. Ademais, os resultados nesta faixa de temperatura apresentaram repetibilidade satisfatórias.

Por fim, quando as amostras de leite são submetidas ao aquecimento acima de 60°C, após a adição de solução sulfocrômica, durante 5 minutos foram obtidos resultados falsos positivos para a presença de etanol, em que as misturas de amostras de leite e solução ácida rapidamente apresentaram a coloração esverdeada.

6. Conclusão

A metodologia desenvolvida ao longo do estudo é objetivada no aperfeiçoamento da análise de detecção de etanol em leite fluido em busca de tornar o método em uma alternativa ao oficializado. Ressalta-se neste o emprego de reagentes concentrados, arranjos instrumentais e maior volume de amostra.

Em suma, os testes aplicados à solução sulfocrômica com o melhor resultado

em uma solução composta por 20% (v/v) de ácido sulfúrico concentrado em 1% (m/v) de dicromato de potássio corrobora pelo menor emprego de reagentes concentrados responsáveis por resíduos danosos ao meio ambiente e ao profissional envolvido. Assim como, a solução para a digestão ácida da amostra de leite obteve-se melhor resultado com proporção menor de ácido sulfúrico em ácido fosfórico contendo concentrações de 20% (v/v) e 40% (v/v), respectivamente.

O volume de amostra foi avaliado em diferentes temperaturas e tempo de aquecimento de forma que 0,05 mL de amostra são suficientes para atingir o resultado de coloração distinguível entre alaranjado para ausência de contaminação de álcool e verde para presença de álcool em amostras de leite. Portanto, difere da quantidade de 100 mL de amostra indicada pelo método do manual publicado pelo MAPA em 2019.

Ademais, o tratamento da amostra exige um controle de temperatura entre 50 e 60°C após adição de 1 mL de solução ácida, exigindo equipamento adequado e um instrumento analítico como a micropipeta para coletado volume exato de amostra. Embora ainda não há exclusão de equipamentos, o método desenvolvido não exige tantos aparatos e arranjos instrumentais como kitassato, balão volumétrico, pipeta de Pasteur e tubo de silicone.

Por fim, a digestão da amostra para eliminar a interferência da composição complexa do leite sendo viabilizada por uma solução ácida e tratamento térmico realizada em tubo de ensaio eliminou a necessidade de um antiespumante (3%), responsável por evitar a formação de espuma do leite durante a ebulição.

Além disso, o tempo de reação de 4 minutos, somado aos 5 minutos de tratamento de amostra, promove a agilidade e acessibilidade exigida pela perecibilidade da amostra e atende à necessidade da indústria láctea de obter resultados rápidos e confiáveis na pesquisa de adulterantes, uma vez que os resultados foram satisfatórios para detecção qualitativa de etanols segundo a exigência da legislação (IAL, 2008; KARTHEEK, 2011, MAPA, 2018). Dito isso, é notável quando comparado aos objetivos propostos a metodologia adaptada atendeu às questões de redução de tempo de realização, de quantidade de amostra, das concentrações em relação as soluções envolvidas na análise e de

quantidade de instrumentos (Quadro 1).

Quadro 1 Quadro comparativo entre o método oficial e o desenvolvido conforme objetivos propostos

	Método oficial de análise de detecção de etanol em leite fluido (MAPA,2019)	Método desenvolvido
Quantidade de amostra de leite	100 mL	0,05 mL
Tempo de realização da análise	Indeterminado (montagem de aparato instrumental + preparo de amostra+ tempo de reação)	Total de 9 minutos
Concentração das soluções	Solução sulfocrômica: 1% de $K_2Cr_2O_7$ em 100 mL de H_2SO_4 Solução antiespumante 3%	Solução sulfocrômica: 1% (v/v) de $K_2Cr_2O_7$ em 20% (v/v) de H_2SO_4 Solução ácida: 40% (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 20% (v/v) de ácido sulfúrico (H_2SO_4)
Instrumentação necessária	1. Balança analítica com resolução mínima de 0,01 g; 2. Bico de Bunsen ou placa aquecedora; 3. Kitassato de 500mL ou balão de fundo redondo com saída lateral de 500mL; 4. Pipeta graduada de 10mL; 5. Pipeta de Pasteur; 6. Proveta de 100mL; 7. Rolha de borracha para vedação da abertura superior do kitassato/balão com saída lateral; 8. Tubo de ensaio 20 x 200mm; 9. Tubo de silicone ou látex de 25 cm.	1. Balança analítica com resolução mínima de 0,01 g; 2. Placa aquecedora ou outro equipamento que permita aquecimento controlado; 3. Micropipeta; 4. Tubo de ensaio de ensaio 20 x 200mm.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

7. Considerações Finais

Isto posto, o método atendeu aos objetivos iniciais de aperfeiçoamento e facilitar o que é indicado pela legislação. Embora os resultados foram satisfatórios para determinar os procedimentos de execução da análise, ainda não houve a total exclusão da necessidade de controle de temperatura de aquecimento e instrumentação analítica para a pequena quantidade de amostra.

O emprego de uma digestão da amostra pode ser minuciosamente estudado testando como, por exemplo, a utilização de catalisadores, evitando assim as soluções ácidas. Também se faz necessário uma validação de método qualitativo como o desenvolvido viabilizando o estudo do limite de detecção, a interferência de outros adulterantes e determinar detalhadamente as variáveis de tempo, volume e temperatura, visando assim ajustes e comprovação da eficácia da metodologia. (INMETRO, 2020).

8. Referências

1. ABRANTES MR, CAMPÊLO CS, SILVA JBA. **Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor**. Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo,2014; 73(3):244-51
 2. ALMEIDA, T. V. **Detecção de adulteração em leite: análises de rotina e espectroscopia de infravermelho**. 2013. 26f. Seminário (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
 3. BRAATHEN, CHRISTIAN. **Hálito Culpado: O Princípio Químico do Bafômetro**. *Química Nova na Escola*, n. 05, 1997.
 4. BRASIL. Decreto nº 9013, de 29 de março de 2017. **Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, 2017. ed. 62,p. 3, 2017.
 5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Método de Ensaio de Produtos de Origem Animal. Determinação Qualitativa de Álcool Etílico em Leite Fluido**. Brasília. MAPA, 2014.
 6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A**. Diário Oficial da União, n. 230, 30 nov. 2018a. Seção 1, p.9
 7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 77, de 26 de novembro de 2018. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial**. Diário Oficial da União, n. 230, 30 nov. 2018b. Seção 1, p. 10.
 8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. Brasília. MAPA, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 451, 19 de setembro de 1997. Regulamentos técnicos. **Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial

- da União, Brasília, 22 set. 1997. Seção 1, p. 21005-210112.
9. CLAYDEN, J.; GREEVES, N. J.; WARREN, S. **Organic chemistry**. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.
 10. D.E. Gray. **American Institute of Physics handbook**. New York. 1972.
 11. DE NONI, I. **Reference material needs for quality assessment of milk and dairy products. Accreditation and Quality Assurance**, v. 9, p. 226-231, 2004.
 12. 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.
 13. F. J. Krug. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**; 1ª ed., 2010.
 14. IAL (Instituto Adolfo Lutz). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.
 15. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. 2016.
 16. KARTHEEK, M.; SMITH, A.A.; MUTHU, A.K. & MANAVALAN, R. **Determination of adulterants in food: a review. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 629-636, 2011.
 17. KOVACS, M.I.P. **Determination of phosphorus in cereal lipids. Analytical Biochemistry**, v.154, p. 420-423, 1986.
 18. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Brasília. MAPA, 2020.
 19. 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**, Chicago, v. 77, n. 4, p.118-126, 2012.
 20. **NR 06 – Equipamento de Proteção Individual – EPI**. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego, 2015.
 21. SOUSA, R.A; CAMPOS, N.S.; ORLANDO, R. **Preparação de amostras**

para análise elementar, Apostila, UFJF, 2015.

23. TRONCO, M.V. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. UFSM, 4a ed., Santa Maria, 2010.