

SUFICIÊNCIA E SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA PROVA DO ETANOL NA PESQUISA DE OUTROS COMPOSTOS POTENCIAIS RECONSTITUINTES DO ÍNDICE CRIOSCÓPICO EM LEITE FRAUDADO COM INCLUSÃO DE ÁGUA

Sufficiency and analytical sensitivity of ethanol test in the research of other potential compounds restorative of cryoscopy index in milk defrauded with water inclusion

Bianca Pereira Dias¹, Isac Gabriel Cunha dos Santos¹, Cristiane Alves Nascimento¹, Cátia Maria de Oliveira Lobo¹, José Carlos Ribeiro Júnior^{1}*

RESUMO

A atual legislação que regulamenta a pesquisa de fraudes em leite, limita o método oficial para pesquisa de álcool etílico. Outros compostos alcoólicos e químicos, potenciais reconstituintes do índice crioscópico, podem então passar despercebidos pelo controle da qualidade das indústrias, uma vez que o método oficial poderia não ser suficiente na detecção destes. O objetivo do presente trabalho foi verificar se o método previsto para detecção de etanol é suficiente na detecção de outros compostos alcoólicos (metanol, propanol, butanol) e acetona, a sua sensibilidade analítica e a influência no potencial reconstituente de diferentes concentrações no índice crioscópico do leite. Este estudo mostrou que o método de pesquisa de etanol possui uma sensibilidade analítica considerada satisfatória (0,01%), e é ainda melhor para a pesquisa dos outros álcoois e acetona (0,005%). O potencial reconstituente do índice crioscópico do metanol foi superior em relação às outras substâncias avaliadas. A presença de etanol, metanol, propanol, butanol e acetona no leite indica que o produto foi duplamente fraudado: com água e então com uma dessas substâncias utilizadas para recompor a crioscopia e, mesmo em baixas concentrações, podem expor o consumidor a riscos químicos. A técnica recomendada pela legislação para pesquisa de etanol no leite, mostrou-se suficiente e sensível para a detecção de etanol e outros compostos alcoólicos e acetona, e pode ser utilizada pelo controle da qualidade das indústrias para a detecção dessas substâncias.

Palavras-chave: fraude; leite cru; metanol; qualidade; sensibilidade analítica.

1 Universidade Federal do Tocantins, Campus Araguaína, Rodovia BR153, km 112, Zona Rural, 77.804-970, Araguaína, TO, Brasil. Email: jcribeiro@uft.edu.br

* Autor para correspondência

Recebido / Received: 29/11/2020

Aprovado / Approved: 11/03/2021

ABSTRACT

The Brazilian legislation regulating the research of milk fraud limits the official method for researching ethyl alcohol. Other alcoholic and chemical compounds, potential restorative of the cryoscopy index, can then go unnoticed by the quality control of industries since the official method might not be sufficient in the detection of these compounds. The objective of this study was to verify whether the method of ethanol detection is efficient for the detection of other alcoholic compounds (methanol, propanol, butanol) and acetone, its analytical sensitivity, and the influence on the restorative potential of different concentrations in the cryoscopy index. This study showed that the ethanol research method has analytical sensitivity considered satisfactory (0.01%) and is even better for the research of other alcohols (0.005%) and acetone. The reconstitution of the cryoscopy index of methanol was superior to the other evaluated substances. The presence of ethanol, methanol, propanol, butanol, and acetone in milk indicates that the product has been doubly defrauded: with water and then with one of these substances used to remake cryoscopy and, even at low concentrations, may expose the consumer to risks. The technique recommended by the legislation for research of ethanol in milk proved to be sufficient and sensitive for the detection of ethanol, as well as other alcoholic compounds and acetone, so it can be used by the quality control of industries for the detection of these substances.

Keywords: analytical sensitivity; fraud; methanol; quality; raw milk.

INTRODUÇÃO

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) no artigo nº 235 define o leite como produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017). É um alimento indispensável para dieta humana devido ao seu alto valor nutricional (DÜRR *et al.*, 2004; RAYMUNDO *et al.*, 2017) já que possui componentes como proteínas, gordura, vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais (HAUG *et al.*, 2007).

O leite é alvo de uma variedade de fraudes, com três finalidades básicas: aumentar o volume, mascarar a acidez ou conservar o leite, podendo ocorrer mais de uma simultaneamente (BELOTI, 2015). A principal fraude realizada é a adição de água com o objetivo de aumentar o volume do leite, uma vez que, no Brasil a comercialização e remuneração dos produtores e indústrias, na

maioria, é realizada na forma de leite fluido. Assim, existe uma relação direta entre o volume produzido e a rentabilidade.

Dificilmente a inclusão de água é feita de forma isolada, já que pode ser detectada facilmente por provas de rotina, como o índice crioscópico e densidade (RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2013). Com isso, para mascarar a adição de água e devolver a normalidade dos padrões de qualidade, são adicionadas substâncias reconstituíntes, como o álcool etílico, cloreto de sódio, sacarose, citrato de sódio e amido (BELOTI *et al.*, 2015; CORRÊA *et al.*, 2015; GONZAGA *et al.*, 2015; TEIXEIRA, 2019), por exemplo.

A Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018a), determina que o leite cru e pasteurizado deve estar isento de substâncias utilizadas em fraudes, alterações e adulterações. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa nº 68 (IN-68) (BRASIL, 2006),

estabelecia os métodos analíticos oficiais para a pesquisa dessas substâncias em leite e para o controle de qualidade físico-química desses produtos. A Instrução Normativa nº 30 (IN-30) de 2018 (BRASIL, 2018b), revogou a IN-68/2006 e atualizou os métodos analíticos oficiais para a detecção de fraudes em leite, revalidando o método de pesquisa de álcool etílico em leite fluido, um importante reconstituente do índice crioscópico.

Esse método, portanto, prevê somente a pesquisa de etanol em leite. Outros compostos alcóolicos podem influenciar e recompor o índice crioscópico após a fraude inicial pela inclusão de água. No entanto, a prova para etanol pode não ser suficiente na detecção desses compostos.

Caso a prova para detecção do etanol não detecte compostos como o metanol, propanol, butanol e acetona, ou não tenha sensibilidade analítica suficiente para a pesquisa desses álcoois em pequenas quantidades, essas substâncias podem estar sendo utilizadas em fraudes e passando despercebidas pelo controle de qualidade das indústrias e das análises de fiscalização, uma vez que são de fácil aquisição.

Diante do exposto, objetivou-se no presente trabalho, verificar se o método de detecção de etanol é ou não suficiente para detecção de outros compostos alcóolicos (metanol, propanol, butanol e acetona), qual sua sensibilidade analítica e o potencial reconstituente de diferentes concentrações dessas substâncias (0,0005%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1%) no índice crioscópico do leite fluido.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado leite cru, recém ordenhado da fazenda experimental da Universidade Federal do Tocantins (UFT), campus Araguaína, no período de 09 de outubro ao dia 06 de novembro do 2019. Imediatamente

após a coleta, a amostra de leite cru, contendo aproximadamente 2 litros, foi encaminhada sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFT, onde foi homogeneizada manualmente e fracionada para a obtenção de 9 amostras de 200 mL. Em oito delas foram adicionadas concentrações variadas (0,0005%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1%) de etanol P.A. (Cromoline Química Fina, Diadema, São Paulo), metanol P.A. (Alphatec Química Fina, São José dos Pinhais, Paraná), propanol P.A. (Alphatec Química Fina, São José dos Pinhais, Paraná), butanol P.A. (Cromoline Química Fina, Diadema, São Paulo) e acetona P.A. (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, São Paulo). Uma amostra foi reservada ao controle negativo. Cada composto químico foi testado em repetição independente e isolada nesse experimento.

Em cada uma das alíquotas foi realizada a prova qualitativa do etanol conforme a Instrução Normativa nº 30 de 2018 (BRASIL, 2018b). Foram transferidos 100 mL de cada amostra, previamente adicionada dos compostos químicos e transferido para um balão de destilação, adicionado 10 mL de solução antiespumante (Cap-Lab, Ipiranga, São Paulo) a 3% e homogeneizado. Em um tubo de ensaio foram transferidos 2 mL de solução sulfocrômica (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, São Paulo) e mergulhado nessa solução a extremidade da pipeta de Pasteur acoplado ao balão de destilação por um tubo de silicone de modo a formar um sistema fechado. As amostras de leite experimentalmente fraudadas com diferentes concentrações compostos químicos foram colocadas em ebulição, em manta aquecedora, mantendo fervura e borbulhamento da solução sulfocrômica por 5 minutos. O resultado positivo foi atribuído quando foi verificada a mudança da coloração da solução sulfocrômica, oriunda da ação do álcool com o cromo⁺⁶. Em meio ácido, as

hidroxilas e carbonilas ligadas ao carbono primário ou secundário são oxidadas pela ação do ácido crômico, com consequente redução do cromo⁺⁶ em cromo⁺³, modificando a coloração da solução sulfocrômica (BRASIL, 2006; BELOTI, 2015). Os controles negativos de cada uma das alíquotas também foram testados.

Para a determinação do índice crioscópico (Crioscópio eletrônico digital microprocessado Microlak), o aparelho foi calibrado a cada repetição, como determina as instruções do fabricante, com as soluções padrões -0,422 °H e -0,621 °H. Utilizou-se 2,5 mL das amostras adulteradas para cada repetição. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, com as diferentes concentrações dos diferentes compostos em tubos apropriados. Os resultados finais foram obtidos pela média dos resultados das triplicatas e depois pela média das duas repetições. Os dados foram tabulados e analisados em Microsoft Excel v. 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises para pesquisa de etanol e outros compostos testados, nas diferentes concentrações, estão descritos na Tabela 1, mostrando que a prova foi suficiente

para detectar todas as substâncias adicionadas.

A prova mostrou diferença de sensibilidade entre a capacidade de detecção do etanol e das demais substâncias estudadas. A sensibilidade analítica para metanol, propanol, butanol e acetona foi de 0,005% e para etanol foi de 0,01% (Tabela 1). Dessa forma, como informa a IN30/2018 (BRASIL, 2018b), a prova é suficiente para detecção de etanol a uma sensibilidade analítica considerada satisfatória, e ainda duas vezes mais sensível para a pesquisa de metanol, propanol, butanol e acetona.

Os potenciais de reconstituição do índice crioscópico pelas diferentes concentrações dos compostos alcoólicos estudados estão descritos na Tabela 2. Essa variação foi calculada conforme os valores do índice crioscópico observados no controle negativo da amostra, com o valor observado em cada uma das amostras experimentalmente adulteradas.

As variações do aprofundamento no índice crioscópico mostraram efeitos significativos na alteração da crioscopia do leite. O metanol no menor nível de inclusão (0,0005%), foi detectado no método de pesquisa do etanol e foi suficiente para aprofundar a crioscopia em -0,005 °H. Enquanto propanol, butanol e acetona foram

Tabela 1 – Sensibilidade analítica da prova do etanol na pesquisa de diferentes concentrações de etanol, metanol, propanol, butanol e acetona, adicionadas em amostras de leite cru.

Composto	Níveis de inclusão							
	0,0005%	0,005%	0,01%	0,05%	0,25%	0,5%	0,75%	1%
Etanol	-	-	+	+	+	+	+	+
Metanol	-	+	+	+	+	+	+	+
Propanol	-	+	+	+	+	+	+	+
Butanol	-	+	+	+	+	+	+	+
Acetona	-	+	+	+	+	+	+	+

detectados a partir de 0,005% de inclusão, aprofundando a crioscopia em $-0,008^{\circ}\text{H}$, $-0,002^{\circ}\text{H}$, $-0,002^{\circ}\text{H}$, respectivamente. Já o etanol, foi detectado a 0,01% de inclusão, menor percentual necessário para aprofundar em $-0,003^{\circ}\text{H}$ o índice crioscópico. Assim, foi verificado que o método para a pesquisa de etanol é ainda mais sensível e suficiente na detecção de metanol, propanol, butanol e acetona, além de suficiente para detecção desses compostos nas menores concentrações

necessárias para reconstituição do índice crioscópico.

Na Figura 1, demonstra-se que a progressão linear do índice crioscópico do metanol é superior em relação aos outros compostos químicos. Já os outros compostos tiveram ação reconstituente semelhante ao aprofundar a crioscopia.

O propanol, o butanol e a acetona apresentaram, aparentemente, um comportamento constante e reconstituem o índice

Tabela 2 – Aprofundamento do índice crioscópico médio ($^{\circ}\text{H}$) obtido com a adição de diferentes concentrações de diferentes compostos químicos

Composto	Níveis de inclusão							
	0,0005%	0,005%	0,01%	0,05%	0,25%	0,5%	0,75%	1%
Etanol	0	0	0,003	0,020	0,092	0,199	0,289	0,395
Metanol	0,005	0,008	0,011	0,032	0,139	0,296	0,421	0,692
Propanol	0	0,002	0,005	0,022	0,070	0,147	0,221	0,296
Butanol	0	0,002	0,008	0,015	0,063	0,128	0,192	0,250
Acetona	0	0,008	0,008	0,017	0,062	0,131	0,210	0,298

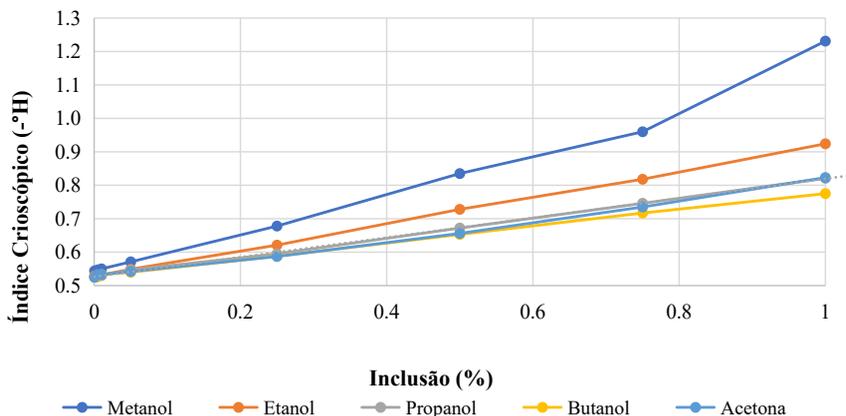


Figura 1 – Influência de diferentes concentrações de compostos químicos no índice crioscópico de leite

crioscópico de forma ligeiramente inferior ao etanol. Observou-se que o metanol, na menor concentração testada e detectada (0,0005%), tem a maior capacidade de alteração no índice crioscópico entre as substâncias testadas (-0,539 °H no controle negativo e -0,544 °H após a inclusão dessa concentração). Dessa forma, mesmo quando utilizado em baixas concentrações, tem a capacidade de recompor o índice crioscópico após a fraude inicial pela inclusão de água. Oportunamente, a prova para a pesquisa de etanol tem maior sensibilidade para esse composto em relação aos outros compostos alcoólicos, o que assegura a sua detecção se a prova por realizada pelo controle da qualidade.

O metanol, verificado como detectável com maior sensibilidade na análise e com maior capacidade de reconstituir o leite após a inclusão de água, é um composto inflamável e tóxico. A intoxicação ocorre pela biotransformação do metanol em ácido fórmico, levando à acidose metabólica, cegueira e podendo causar a morte se ingerido. É a principal causa de intoxicação por compostos tóxicos. A ingestão dos compostos químicos avaliados pelo presente estudo, mesmo que em pequenas quantidades, pode causar diversos distúrbios: digestivos, neuropsíquicos, oculares, hemodinâmicos e metabólicos (USP, 2011). Por isso, é importante que o método para sua detecção tenha alta sensibilidade.

A composição do leite, com ausência de perigos químicos e microbiológicos, é determinante para a qualidade nutricional do produto e aptidão para o processamento, produção de derivados e segurança para o consumo humano (FONSECA, 2011). A venda de produtos lácteos adulterados é uma ameaça à saúde dos consumidores, por isso a pesquisa dessas fraudes é obrigatória para leite cru e pasteurizado (BRASIL, 2018a), e se houver falhas no controle de qualidade das indústrias, ou nos órgãos de fiscalização,

o consumidor fica exposto ao risco químico do produto adulterado.

Dessa forma, o método para detecção de álcool etílico previsto pela legislação que regulamenta os métodos analíticos oficiais para o controle da qualidade e fiscalização sanitária de leite e derivados (BRASIL, 2018b), se mostra eficiente e sensível também para a pesquisa de metanol, propanol, butanol e acetona em concentrações mínimas necessárias para alteração do índice crioscópico. A legislação pode, portanto, ser complementada para a detecção dos compostos testados.

CONCLUSÃO

O método determinado pela IN-30/2018 para a pesquisa de álcool etílico tem baixa especificidade e alta sensibilidade, uma vez que também foi suficiente na detecção de metanol, propanol, butanol e acetona em baixas concentrações, demonstrando ser um método eficaz para a pesquisa desses potenciais reconstituintes do índice crioscópico. Ainda, a sensibilidade analítica do método foi superior para os diversos compostos em relação ao etanol. A capacidade de reconstituição do índice crioscópico do metanol é maior em relação aos outros compostos alcoólicos, inclusive do etanol.

A prova para a pesquisa de etanol no leite é, portanto, suficiente e sensível para a detecção de outros compostos químicos em concentrações mínimas para reconstituição do índice crioscópico e pode ser utilizada pelo controle da qualidade das indústrias e pelos órgãos de fiscalização, para a detecção dessas fraudes que, mesmo em baixas concentrações, podem expor o consumidor a riscos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeira Produtiva do Leite

(INCT- Cadeia do Leite), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 305062/2015-8) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT).

REFERÊNCIAS

BELOTI, V. *et al.* Determinação do parâmetro de crioscopia para leite UHT. **Semina Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 3181-3188, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n5p3181

BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015. p. 51-107.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 239, p. 8, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 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**: seção 1, Brasília, DF, n. 230, p. 9, 30 nov. 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018. Oficializa os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, indexado ao ISBN sob o número 978-85-7991-111-8, para realização de ensaios em amostras de produtos de origem animal, oriundas dos programas e controles oficiais

do MAPA. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 134, p. 9, 13 jul. 2018b.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 62, p. 3, 30 mar. 2017.

CORRÊA, F. T.; SOUSA, S. A.; PINTO, S. M. Presença de antibióticos, conservantes e reconstituintes em leite UHT e pasteurizado. **DEMETRA Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 10, n. 2, p. 289-298, 2015. DOI: 10.12957/demetra.2015.14843

DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF, 2004. p. 38-55.

GONZAGA, N. *et al.* Evolução da qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado. **Semina Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 47-54, 2015. DOI: 10.5433/1679-0367.2015v36n1p59-66.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, A. M. Bovine milk in human nutrition. A review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, n. 1, p. 25, 2007. DOI: 10.1186/1476-511X-6-25.

FONSECA, C. H. Padrões de identidade e qualidade para leites fluidos tipos A, B e leite pasteurizado. **Informe Agropecuário EPAMIG**, v. 32, n. 262, p. 14-23, 2011.

RAYMUNDO, N. K. L.; BERSOT, L. S.; OSAKI, S. C. Consumer profile and problems associated with uninspected raw milk consumption in western Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, 2017. DOI: 10.1590/1808-1657000872016.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 5-11, 2013. DOI: 10.5935/2238-6416.20130022.

TEIXEIRA, R. D. **Efeitos da adição do citrato de sódio sobre o índice crioscópico e a estabilidade da proteína do leite.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em

Medicina Veterinária) – Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama, Distrito Federal, 2019.

USP – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. **Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico: Metanol.** 2011. Disponível em: www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/fispq/metanol.pdf.