



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATALIA GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA  
A DETECÇÃO DE FORMALDEÍDO, LACTOSE E  
LACTULOSE NO LEITE**

---

Londrina  
2017

NATALIA GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA  
A DETECÇÃO DE FORMALDEÍDO, LACTOSE E  
LACTULOSE NO LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dra. Vanerli Beloti

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gonzaga, Natalia Gonzaga .

Desenvolvimento e validação de métodos para a detecção de formaldeído, lactose e lactulose no leite. / Natalia Gonzaga Gonzaga. - Londrina, 2017.  
71 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti Beloti.

Coorientador: Suzana Lucy Nixdorf Nixdorf.

Coorientador: Rafael Fagnani Fagnani.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Leite x Adulteração. - Tese. 2. Leite x Composição. - Tese. 3. Formaldeído x Leite. - Tese. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. - Tese. I. Beloti, Vanerli Beloti. II. Nixdorf, Suzana Lucy Nixdorf. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

NATALIA GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A  
DETECÇÃO DE FORMALDEÍDO, LACTOSE E LACTULOSE NO  
LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Vanerli Beloti  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Rafael Fagnani  
Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 23 de fevereiro de 2017.

## **DEDICO**

Aos meus pais, por todo amor e carinho e à  
minha tia querida Olair (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas oportunidades grandiosas.

Agradeço aos meus pais, Mateus e Silvana, e minha irmã Ana Julia, por todo amor, carinho, compreensão e apoio dedicados a mim. Agradeço também a minha avó Anésia, minha tia Zair e minha tia Cíntia por todo apoio ao longo da caminhada.

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. Vanerli Beloti, por todos os anos de ensinamentos, orientação, amizade e pela confiança que depositou em mim.

Às minhas parceiras de caminhada e amigas Juliana Mareze e Louise Rodrigues Mariano Marioto e à toda equipe LIPOA, pela ajuda no decorrer da pesquisa, principalmente ao Ronaldo Tamanini por todo o apoio.

Aos meninos do laboratório DIA, Lycio Shinji Watanabe, Tiago Madeira e Yuri Renan Bovolenta, por todo o auxílio durante todo o experimento, pela paciência e pelos ensinamentos.

À professora Dra. Suzana Lucy Nixdorf, pela grande parceria, por ter aberto as portas de seu laboratório e pela contribuição na correção do trabalho.

Ao professor Dr. Rafael Fagnani, por toda contribuição na correção do trabalho.

Aos meus amigos queridos por todo apoio e incentivo, Gabriela de Castro Bregadioli, Gustavo Romero Gonçalves, José Guilherme Marcondes e Efa Depe. E às amigas de longa data Ana Luiza de Oliveira, Mayara Yuki Ueda, Bruna Diniz, Mariany Coleti e Amanda Mitrovini.

Ao curso de pós-graduação em Ciência Animal da UEL e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À equipe da AINTEC, por todo apoio. À LONDRILAB, pela parceria e apoio.

GONZAGA, Natalia. **Desenvolvimento e validação de métodos para a detecção de formaldeído, lactose e lactulose no leite**. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

O leite possui uma rica composição nutricional, sendo um excelente substrato para a multiplicação de microrganismos, devendo existir o máximo cuidado e higiene em sua obtenção. A indústria tem o dever de fornecer ao consumidor um alimento inócuo, e a utilização de tratamentos térmicos tem a função de reduzir ou eliminar a contaminação ali presente. Porém, com o uso de altas temperaturas, o leite está sujeito à alterações em sua composição, como a formação da lactulose, um dissacarídeo isômero da lactose, que é formado com influência do alto aquecimento do leite. A lactulose não é absorvida no intestino, pois os mamíferos não possuem enzimas que a hidrolizem, sendo metabolizada pela microbiota intestinal e causando sintomas como desconforto abdominal, diarreia, entre outros. A lactulose pode ser usada como prebiótico na formulação de alimentos, e como medicamento, é indicada para o combate da constipação intestinal e tratamento de encefalopatia hepática. Além do beneficiamento do leite, a indústria ainda deve fornecer ao consumidor um alimento livre de qualquer adulteração. É muito comum o uso fraudulento de conservantes, como o formaldeído, buscando a eliminação de microrganismos e prevenindo as alterações causadas por eles. O formaldeído pode causar danos à saúde de quem o consumir por ser altamente tóxico e carcinogênico. O método preconizado internacionalmente para a quantificação de lactulose é por HPLC. O presente estudo propõe um método simples de extração e quantificação de lactose e lactulose no leite, com a utilização de princípios da química verde, em que não se faz o uso de reagentes poluentes, utilizando apenas água como agente extrator e fase móvel. Nessa pesquisa, para a fase de extração, utilizou-se leite, diluído em água ultrapura (1:10 v/v), ultracentrifugado, sendo o sobrenadante filtrado em filtro PVDF 0,22 µm e injetado em HPLC-RID. Para a detecção de formaldeído no leite é preconizado o teste contido na instrução normativa 68 (BRASIL, 2006), sendo este, um método que demanda longo tempo, uso de vidrarias específicas e reagentes, o que o torna de inviável execução na plataforma do laticínio. Este trabalho estudou novas técnicas que pudessem atender essa necessidade do laticínio, com métodos rápidos e simples para a detecção de formaldeído. Foram desenvolvidos dois reagentes, o reagente A, utilizado para a diluição da amostra de leite (H<sub>2</sub>O:leite, 4:1, v/v) e em seguida adicionado 1 mL da amostra diluída em tubo contendo 1 mL do reagente B, aguardando 5 minutos. Foram realizados, simultaneamente, testes comparando o novo método com outros dois métodos já conhecidos, o preconizado pela IN 68 (BRASIL, 2006) e o teste da floroglucina. Utilizou-se concentrações de 0%, 0,001%, 0,005%, 0,010%, 0,050%, 0,100% e testado o poder residual, através da realização desses testes com 0 horas, 24 horas e 48 horas após a adulteração. Ainda, foi testada a especificidade do método, utilizando outros possíveis adulterantes do leite e a aplicação do teste em 112 amostras comerciais de leite pasteurizado. Os parâmetros de validação para a detecção de quantificação de lactose e lactulose seguiram os padrões estabelecidos pela resolução RE 899 (ANVISA, 2003), em que apresentaram os resultados de acordo com os critérios preconizados pela resolução. Para a detecção de formaldeído obteve-se resultados de alta sensibilidade do novo método, especificidade e com amostras comerciais negativas nos três testes. Foi efetuado o pedido de depósito de patente do método estudado e descoberta por meio desta pesquisa, demonstrando alta sensibilidade, confiabilidade e especificidade em seus resultados, sendo totalmente adequada para a utilização, como teste de triagem, na plataforma de laticínios.

**Palavras-chave:** HPLC. Dissacarídeos. Fraude. Conservante. Química verde.

GONZAGA, Natalia. **Development and validation of methods for the detection of formaldehyde, lactose and lactulose in milk**. 2017. 73p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Milk has a rich nutritional composition, being an excellent substrate for the multiplication of microorganisms, and the greatest care and hygiene should be obtained. Industry has a duty to provide the consumer with an innocuous food, and the use of heat treatments has the function of reducing or eliminating the contamination present. However, with the use of high temperatures, milk is subject to changes in its composition, such as the formation of lactulose, a disaccharide lactose isomer, which is formed with the influence of milk heating. Lactulose is not absorbed in the intestine, because the mammals do not have enzymes that hydrolyze it, being metabolized by the intestinal microbiota and causing symptoms such as abdominal discomfort, diarrhea, among others. The lactulose can be used as a prebiotic food formulation, and as medicine, is indicated for the combat of constipation and treatment of hepatic encephalopathy. In addition to the processing of milk, the industry must still provide the consumer with a food free of any adulteration. How common is the fraudulent use of preservatives such as formaldehyde, seeking the elimination of microorganisms and preventing changes caused by them. Formaldehyde can cause damage to the health of those who consume for being highly toxic and carcinogenic. The internationally recommended method for the quantification of lactulose is by HPLC. The present study proposes a simple method of extraction and quantification of lactose and lactulose in milk, with the use of principles of green chemistry, that makes the use of pollutants, using only water as an extractor and mobile phase. For the extraction phase, milk, diluted in ultrapure water (1:10 v / v), ultracentrifuged, was used, the supernatant being filtered in a PVDF filter 0.22  $\mu\text{m}$  and injected into HPLC-RID. For the detection of formaldehyde in milk is recommended the test contained in the normative 68 (BRASIL, 2006), being this, a method that demand long time, using specific reagents and glassware, which makes it of unworkable enforcement on the platform of the dairy. This work studied new techniques that could meet this need of dairy, with fast and simple methods for the detection of formaldehyde. Were developed two reagents, reagent A, used for dilution of the milk sample ( $\text{H}_2\text{O}$ : milk, 4:1, v/v) and then added 1 mL of the diluted sample in tube containing 1 mL of reagent B, waiting for 5 minutes. At the same time, tests were performed comparing the new method with two other known methods, the one recommended by IN 68 (BRASIL, 2006) and the floroglucin test. We used concentrations of 0%, 0.001%, 0.005%, 0.010%, 0.050%, 0.100% and tested the residual power by carrying out these tests with 0 hours, 24 hours and 48 hours after adulteration. Still, the specificity of the method was tested using other possible adulterants of milk and the application of the test in 112 commercial samples of pasteurized milk. Validation parameters for quantification detection of lactose and lactulose followed the standards set by resolution RE 899 (ANVISA, 2003), in which it presented the results according to the criteria recommended by the resolution. For the detection of formaldehyde obtained high results sensitivity of the new method, specificity and with commercial samples in three negative tests. Was the application of patent deposit method studied and discovered through this research, showing high sensitivity, specificity and reliability in its results and is fully suitable for use as a screening test, on the platform of dairy products.

**Key words:** HPLC. Disaccharides. Fraud. Preservative. green chemistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO A

<b>Figura 1 -</b>	Cromatogramas sobrepostos de amostra de leite cru e amostra de leite deslactosado .....	45
<b>Figura 2 -</b>	Cromatogramas sobrepostos mostrando o diferente tempo de retenção entre os padrões de carboidratos e amostra de leite cru .....	46
<b>Figura 3 -</b>	(a) curvas analíticas concatenadas .....	47
<b>Figura 3 -</b>	(b) gráfico de resíduos para os carboidratos lactose e lactulose .....	47

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO A

<b>Tabela 1 -</b>	Dados da validação da extração de carboidratos em leite bovino (n=3).....	49
-------------------	--	----

### ARTIGO B

<b>Tabela 1 -</b>	Avaliação da sensibilidade dos métodos para a detecção de formaldeído .....	60
-------------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CG	cromatografia gasosa
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
FE	fase estacionária
FM	fase móvel
G	força gravitacional
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (do português Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IC	inclinação da curva
IN	instrução normativa
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuario
LANARA	Laboratório Nacional de Referencia Animal
PI	patente de invenção
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RID	detector de índice de refração
TR	tempo de retenção
UHT	<i>ultra high temperature</i> (do português Ultra Alta Temperatura)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1	LEITE .....	15
2.2	TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE .....	16
2.2.1	Lactose .....	17
2.2.2	Lactulose .....	18
2.2.3	Efeito Prebiótico e Bifidogênico da Lactulose.....	20
2.2.4	Lactulose em Leites Submetidos à Tratamentos Térmicos.....	20
2.2.5	Intolerância à Lactose e Efeitos da Lactulose .....	21
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	22
2.4	ADULTERAÇÕES NO LEITE.....	25
2.4.1	Fraude por Adição de Água e Reconstituintes.....	25
2.4.2	Fraude por Adição de Neutralizantes de Acidez.....	26
2.4.3	Fraude por Adição de Substâncias Conservantes.....	26
2.4.4	Dificuldades das Provas Atuais.....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
3.1	OBJETIVO GERAL .....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4</b>	<b>ARTIGO A</b> – Química verde aplicada à extração e quantificação de lactose e lactulose no leite por hplc.....	39
<b>5</b>	<b>ARTIGO B</b> – Desenvolvimento e validação de novo método para a detecção rápida de formaldeído em leite.....	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
	<b>APÊNDICES</b> .....	65

<b>APÊNDICE A</b> - Processo e kit para a detecção rápida de formaldeído em leite utilizando dois reagentes.....	66
<b>APÊNDICE B</b> - Processo e kit para a detecção rápida de formaldeído em leite utilizando um reagente .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento considerado completo por sua riqueza nutricional, o que o torna um excelente substrato para a multiplicação de diversos microrganismos. Desta maneira, deve ser mantido o máximo cuidado em higiene na sua obtenção, evitando contaminações externas e ser realizado, o quanto antes, o seu beneficiamento (OLIVEIRA, 2003; ORDÓÑEZ, 2005).

O beneficiamento do leite fluido é o aquecimento da matéria prima sob tempo e temperatura ideais, sendo preconizado pela legislação para a eliminação de microrganismos patogênicos. Porém, com a utilização de temperaturas elevadas, podem ocorrer alterações físico-químicas e organolépticas no produto que são indesejáveis (BELOTI, 2015).

Algumas dessas alterações incluem a transformação da lactose, que é o açúcar contido no leite, em um outro açúcar, a lactulose, a qual não pode ser absorvida pelo organismo de animais, pois eles não possuem enzimas que façam a quebra deste açúcar (PANESAR, KUMARI, 2011). A lactulose promove alterações intestinais em humanos, pois ao chegar ao cólon inalterada, ela é fermentada por bactérias sacarolíticas, produzindo ácido láctico e outros ácidos (SARON, 2003), podendo, em altas doses, causar sintomas de distensão abdominal, flatulências, diarreias, desconforto abdominal e outros (LACTULONA®, 2014).

De acordo com padrões internacionais, os métodos analíticos oficiais utilizados para a determinação de lactulose no leite utilizam HPLC (IDF, 2007), sendo o preparo de amostras uma das etapas de maior importância nessa análise. Uma vez que matrizes não podem ser analisadas de forma bruta, pelas interferências e incompatibilidades com os equipamentos analíticos. O preparo da amostra tem a função de isolar e concentrar os analitos em níveis adequados e obter a limpeza da amostra de forma a não comprometer sua análise química (VALENTE, AUGUSTO, 2000).

É muito comum o uso de reagentes químicos na fase de extração, principalmente se tratando de uma matriz complexa como o leite. A utilização desses reagentes requer uma série de cuidados pelo analista, além de não se encaixarem nos princípios, hoje muito importantes, de sustentabilidade da química verde, tornando-se resíduos poluentes. O desenvolvimento de uma nova técnica de extração e quantificação por HPLC para lactose e lactulose presentes no leite, utilizando apenas água ultrapura como agente extrator e na fase móvel, é de grande importância, pois possibilita a quantificação desses açúcares e verificação da sua oscilação conforme o aumento da temperatura do

tratamento térmico utilizado, além do novo método estar totalmente dentro dos princípios da química verde, não sendo utilizado nenhum reagente químico durante o procedimento.

Os principais objetivos da fraude no leite são o aumento do volume e o controle de alterações provocadas por microrganismos (VIOTTO, CUNHA, 2006). A adição de substâncias conservantes está relacionada à contaminação do leite, sendo o formaldeído um conservante amplamente utilizado, tendo como principal objetivo de seu uso, a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite (TRONCO, 2008). De acordo com a legislação vigente, devem ser realizadas pela indústria de lácteos, obrigatoriamente, algumas provas de rotina e também a pesquisa diária de substâncias adulterantes, como reconstituintes de densidade, neutralizantes de acidez e inibidores de crescimento microbiano (BRASIL, 2011). Porém, as provas preconizadas pela legislação para este fim, são dificultosas e demandam longo tempo para a obtenção dos resultados.

Com o avanço da tecnologia é essencial a descoberta de novos métodos de análise, mais rápidos e confiáveis, que garantam sua qualidade e inocuidade. Com a pesquisa por inovações na detecção de substâncias adulterantes ao leite, como o formaldeído, pôde-se obter resultados satisfatórios, desenvolvendo testes com resultados praticamente instantâneos e altamente confiáveis/sensíveis.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEITE

Pode-se definir o leite como um produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene e proveniente de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Por possuir um elevado valor biológico, é considerado um alimento completo, particularmente nos primeiros estágios de vida, quando se constitui um alimento exclusivo. Sua riqueza em elementos nutricionais o tornam um excelente substrato para o crescimento de microrganismos. Por isso, o leite deve ser obtido com a máxima higiene e mantido sob baixas temperaturas, desde a ordenha até o seu beneficiamento, garantindo as características físicas, químicas e nutricionais do produto final (OLIVEIRA, 2003).

Do ponto de vista físico-químico, o leite é considerado uma mistura homogênea contendo grande número de substâncias, como a lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas e enzimas, dentre outras, sendo a água o elemento presente em maior proporção, de aproximadamente 87% (TRONCO, 2008). Essas substâncias encontram-se algumas na forma de emulsão, como a gordura e substâncias associadas, algumas na forma de suspensão como as caseínas ligadas à sais minerais e outras na forma de solução, como a lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro e sais (ORDÓÑEZ, 2005).

Dependendo das medidas higiênicas, mesmo que procedente de animais saudáveis, o leite sempre vai conter uma diversidade de microrganismos em que as quantidades são muito variáveis (ORDÓÑEZ, 2005). Devido à alta contaminação e à possibilidade da presença de patógenos, que frequentemente ocorre no leite, a indústria tem o desafio de oferecer ao consumidor produtos inócuos e com características próximas ao alimento fresco. Procedimentos que envolvem o calor são frequentemente utilizados na indústria alimentícia, buscando eliminar microrganismos em grandes quantidades e também patógenos (LEITE et al., 2002; BELOTI, 2015).

Essa alta contaminação do leite também pode fazer com que alguns produtores ou indústrias utilizem formas ilegítimas para a eliminação de microrganismos em sua matéria-prima, com a utilização de substâncias conservantes, como o formaldeído.

### 2.2 TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE

A utilização de procedimentos que envolvem altas temperaturas para conservar alimentos está baseada na destruição de microrganismos (JAY, 2005; ORDÓÑEZ, 2005; TRONCO, 2008).

Do ponto de vista teórico, um bom método é aquele capaz de destruir os microrganismos, inativar enzimas que causam prejuízos e ainda assim manter a totalidade das propriedades e características do produto (TRONCO, 2008; BELOTI, 2015).

### *Pasteurização*

A temperatura de pasteurização do leite é designada para a eliminação de microrganismos patogênicos no leite, atualmente os valores variam entre 72°C e 75°C, por 15 a 20 segundos. Existe ainda uma enorme preocupação em não exceder a temperatura necessária na pasteurização, pois quanto maior ela é, mais alterações causará no produto (BELOTI, 2015).

Buscando a eliminação dos microrganismos ou ainda a redução do seu número no leite e derivados, são preconizadas as seguintes técnicas: pasteurização, ultrapasteurização, esterilização, microfiltração, dentre outras. A temperatura de pasteurização do leite é suficiente para destruir vários fungos e leveduras, bactérias Gram-negativas e muitas Gram-positivas (JAY, 2005; BELOTI, 2015). Altas temperaturas agem na destruição dos microrganismos, pois promovem a desnaturação de suas proteínas e a inativação de enzimas essenciais ao metabolismo (VALSECHI, 2006).

### *Tratamento UHT*

O tratamento UHT, utiliza temperaturas entre 130 e 150°C por 2 a 4 segundos, e elimina quase completamente os microrganismos do leite, além dos patogênicos, praticamente todas as células vegetativas de todos os microrganismos presentes no leite cru, podendo restar apenas 100 UFC/mL, não tendo eficiência apenas sobre esporos. Obtendo-se então, um produto com a contaminação próxima de zero e conseqüentemente com um tempo de vida de prateleira muito mais longo. Porém, após adotar esse procedimento as indústrias sofrem problemas relacionados à alterações nas propriedades físico-químicas e organolépticas, havendo alterações como a cor e o odor (BELOTI, 2015).

No Brasil há uma destacada preferência pelo consumo do leite tipo UHT, que supera o comércio do leite pasteurizado. Os consumidores optam por um produto com tempo de vida útil mais longo e que não necessite de refrigeração, facilitando seu

armazenamento. O tempo de vida útil do leite pasteurizado no Brasil é em média de 3 a 6 dias. Assim, para a indústria, questões logísticas são essenciais, e mais favoráveis à produção de leite UHT. No entanto, é sabido que existe uma relação direta entre o comprometimento das características físico-químicas e biológicas do leite e a intensidade do seu tratamento térmico (BELOTI, 2015; ORDÓÑEZ, 2005; TRONCO, 2008).

### 2.2.1 Lactose

Carboidratos não estruturais, como o amido e açúcares simples, são fermentados no rúmen, produzem ácido propiônico, que é convertido em glicose através do processo de gliconeogênese, realizado pelo fígado. A glicose é uma das precursoras da lactose do leite (MÜHLBACH, 2003). O tecido mamário então isomeriza a glicose em galactose, ligando-a a mais uma porção de glicose, formando uma molécula de lactose (ORDÓÑEZ, 2005).

A lactose está, juntamente com os sais minerais, relacionada à manutenção da osmolaridade da glândula mamária, e também à produção e secreção do leite. Por ser reguladora na entrada de água no lúmen alveolar, é considerada determinante no volume de leite produzido pelo animal (WALSTRA, JENNESS, 1984; HARDING, 1995).

O açúcar predominante no leite é a lactose, não sendo encontrado em outros alimentos é considerado um carboidrato exclusivo do leite. A lactose é composta por uma molécula de glicose e uma molécula de galactose, formando um dissacarídeo, que representa aproximadamente 4,7% do leite fluido. É encontrada no leite de duas formas, em equilíbrio, alfa e beta lactose, sendo aproximadamente 38% e 62%, respectivamente (BRITO, 2007; BELOTI, 2015).

A lactose é o único carboidrato de origem animal na cadeia alimentar do homem. No intestino é hidrolisado pela enzima lactase para então ser absorvida como glicose e galactose. Parte da população mundial é intolerante à lactose devido a reação adversa que envolve sua digestão, quando há deficiência ou ausência da lactase no organismo. Este problema surge em maior ou menor intensidade em função de fatores, como por exemplo, a idade. A lactose não hidrolisada pelo organismo está sujeita a ser fermentada por microrganismos da microbiota intestinal causando distensão e desconforto como náuseas, diarreias e dores abdominais (ZADOW, 1984; VIEIRA, 2006).

No leite produzido por todas as espécies, o único glicídio que existe em quantidades importantes é a lactose, também é o componente mais simples, constante e

abundante. A lactose é considerada como o componente mais lábil diante da ação microbiana existente no leite, sendo facilmente transformada em ácido láctico pelas bactérias, sendo excelente substrato para estas (ORDÓÑEZ, 2005).

A lactose está presente no leite em forma de solução. Se comparada a sacarose, que é o açúcar comercial, ela é dez vezes menos solúvel e adoça cinco vezes menos (BELOTI, 2015).

Além de excelente fonte de energia a lactose também possui especial valor nutritivo na alimentação de crianças. Ela também favorece a retenção de cálcio pelo organismo, estimulando a ossificação e prevenindo a osteoporose (ORDÓÑEZ, 2005).

### 2.2.2 Lactulose

No ano de 1930 a lactulose foi sintetizada como um novo açúcar por Montgomery e Hudson (TAMURA et al., 1993).

É um dissacarídeo sintetizado a partir da galactose e frutose (LUZZANA et al., 2003; ORDÓÑEZ, 2005; ZHANG et al., 2010). Ela é produzida comercialmente através da isomerização da lactose do leite, também gerada com o aquecimento do leite cru (MARCONI et al., 2004). Por ser mais doce e solúvel que a lactose é considerada como estimuladora no crescimento de microrganismos probióticos (ORDÓÑEZ, 2005).

A lactulose não é absorvida no intestino delgado, pois os mamíferos não possuem enzimas que quebram a lactulose, que então é metabolizada pela microbiota intestinal, que podem trazer benefícios para a saúde (GIBSON et al., 2004; PANESAR, KUMARI, 2011; GUERRA-ORDAZ et al., 2014). Funcionando assim como prebióticos, que promovem o crescimento de microrganismos desejáveis no cólon (KONTULA, 1999). Assim a lactulose chega ao cólon inalterada, onde é fermentada por bactérias sacarolíticas, produzindo ácido láctico e pequenas quantidades de outros ácidos, como acético e fórmico. Na presença desses ácidos no intestino, ocorre uma acidificação desse meio, desencadeando alguns mecanismos que agem na constipação e na encefalopatia hepática. Com a acidificação do conteúdo intestinal e o aumento na pressão osmótica ocorre um afluxo de líquidos para o interior do cólon, resultando no amolecimento do bolo fecal e assim acelerando o transito intestinal.

Um novo grupo de carboidratos foi introduzido na alimentação na última década, devido às suas características dietéticas, sendo a lactulose incluída nesse grupo de oligossacarídeos não digeríveis (NDO's). Juntamente com outros dois grupos, os

polissacarídeos não amidos e os amido resistentes, obedecem a uma classificação fisiológica por não serem digeridos no intestino delgado humano. Os NDO's tem demonstrado poder inibidor no desenvolvimento de patógenos no intestino, dificultando a ligação das bactérias patogênicas à superfície da mucosa (VORAGEN, 1998), além de outros benefícios como importantes atividades físico-químicas e fisiológicas benéficas para a saúde do homem. Devido a esses benefícios a utilização da lactulose como ingrediente alimentar tem aumentado muito. Algumas qualidades descritas incluem o baixo valor calórico e a capacidade de estimular o crescimento de bactérias benéficas no cólon, sendo associados também ao menor risco de infecções e diarreia e uma melhora na resposta imune. A redução do pH intestinal, decorrente de sua fermentação, reduz a população de patógenos e aumenta a de bifidobactérias, bem como a disponibilidade de minerais (CRITTENDEN, PLAYNE, 1996; RIVERO-URGELL, SANTAMARIA- ORLEANS, 2001).

Embora o grupo dos oligossacarídeos seja composto por pelo menos três unidades de monossacarídeos, a lactulose sendo um dissacarídeo está incluída neste grupo, pois possui propriedades semelhantes aos oligossacarídeos e, devido a isso, também está incluída nesta classe (CRITTENDEN, PLAYNE, 1996).

A maioria dos NDOs são classificados como prebióticos, pois estimulam seletivamente o crescimento de espécies de bactérias benéficas para a saúde, proporcionando melhorias na composição da microbiota do colón (CRITTENDEN, PLAYNE, 1996; ROBERFROID, SLAVIN, 2000).

A lactulose é fabricada comercialmente a partir da lactose, nesse caso, um processo de isomerização alcalina é utilizado para fazer a conversão da glicose em frutose. O composto resultante é o dissacarídeo lactulose (frutose + galactose). O processo para a produção da lactulose é relativamente dificultoso, devido ao baixo rendimento (20 a 30 %) e também ao custo elevado da purificação (VILLAMIEL et al., 2002).

Segundo a bula do medicamento, a lactulose comercial é indicada para o tratamento de sintomas de constipação intestinal e para a prevenção e o tratamento de encefalopatia hepática (LACTULONA®, 2014).

A lactulose também é responsável pela eliminação de amônia nas fezes, reduzindo assim sua concentração no sangue. Devido à acidez do cólon estar acima da acidez do sangue, ocorre uma migração de amônia do sangue para o cólon, formando íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), que não é absorvido e então é eliminado nas fezes. Dessa forma o medicamento melhora o quadro de encefalopatia hepática (LACTULONA®, 2014). Esta doença é caracterizada por apresentar sintomas neurológicos em pacientes que são portadores de

insuficiência hepática, possuindo graus variados de gravidade (FERRAZ, FIGUEIREDO, 2004).

### 2.2.3 Efeito Prebiótico e Bifidogênico da Lactulose

Por não poder ser absorvida pelo intestino delgado e ser capaz de alcançar o cólon, a lactulose pode ser útil como um prebiótico, estimulando o crescimento de bactérias probióticas, como dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que a metabolizam potencialmente (SARON, 2003). Essas bactérias são consideradas benéficas, pois são promotoras de efeitos desejáveis para a saúde humana, como por exemplo o equilíbrio da microbiota, a redução da amônia e do risco da carcinogênese (SCHUMANN, 2002; SCHOLZ-AHRENS et al., 2001).

Por promover a proliferação intestinal de bactérias bífidas, a lactulose vem sendo aplicada às formulas infantis comerciais e a vários produtos de leite, uma vez que a indução de um meio ácido, inibe o crescimento de bactérias indesejáveis (KUNZ, RUDLOFF, 2006).

### 2.2.4 Lactulose em Leites Submetidos à Tratamentos Térmicos

Quando o leite é submetido a tratamentos térmicos, existem algumas modificações que ocorrem, como a formação da lactulose e ácidos orgânicos, devido a isomerização da lactose, que sofre uma degradação parcial (WALSTRA, JENNES, 1984).

Ausente em leite cru, a lactulose, considerada um isômero da lactose, forma-se quando se aquece o leite, sendo a ocorrência da lactulose uma forma não natural. Nos produtos lácteos que sofreram algum tratamento térmico a lactulose pode estar presente em pequena quantidade, como nos casos dos leites condensado e evaporado, além de produtos UHT e leite em pó (MODLER et al., 1980).

Segundo BIRLOUEZ – ARAGON et al. (2002), estudando formas de detecção para diferentes tratamentos térmicos do leite, identificaram a presença de lactulose quando a temperatura de aquecimento ultrapassa 110°C, afirmando o autor que em temperaturas abaixo desse valor a mesma não se forma.

Segundo Ordóñez (2005), o aumento da concentração de lactulose se dá de forma diretamente proporcional à intensidade do tratamento térmico aplicado. Foi proposto pela Federação Internacional de Lacticínios que o leite comercial com menos de 600 mg/L de

lactulose seja considerado UHT, sendo que para maiores valores considera-se o leite como esterilizado hidrosticamente, podendo servir como elemento classificatório para a diferenciação desses tipos de leite. O medicamento LACTULONA®, a base de lactulose, possui em sua composição 667 mg/mL de lactulose, sendo 1000 vezes acima da possível quantidade presente por mL de leite UHT (LACTULONA®, 2014).

Esse dissacarídeo (galactose e frutose) que não ocorre de forma natural no leite, é sintetizado, por meio da lactose, por isomerização da glicose à frutose (AIDER, HALLEUX, 2007), havendo o rearranjo do resíduo de glicose em uma molécula de frutose, através de modificações estruturais da forma aldose em cetose (NEVES, 2015). A Frutose é um monossacarídeo de seis carbonos, isômero da glicose. Ambas possuem fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ , diferindo apenas em suas fórmulas estruturais, sendo assim, é possível ocorrer o rearranjo das suas moléculas. A isomerização pode acontecer nas formas química e enzimática, sendo a primeira com um maior rendimento, quando se trata de produção de lactulose (FABER, 2010). Durante o processamento térmico do leite, a formação da lactulose é particularmente favorecida pelo leve aumento do pH, além da presença de aminoácidos que podem contribuir com a catálise dessa reação (CHÁVEZ-SERVÍN, CASTELLOTE, LÓPEZ-SABATER, 2004).

### 2.2.5 Intolerância à Lactose e Efeitos da Lactulose

A enzima lactase é a responsável pela quebra da lactose em galactose e glicose, para então serem absorvidos pelo intestino. Quando o indivíduo apresenta deficiência na produção dessa enzima, a lactose ingerida pelo consumo de leite e derivados lácteos é fermentada por microrganismos presentes no intestino, produzindo gás e ácidos (BELOTI, 2015). A severidade dos sintomas depende da quantidade de lactose ingerida e do grau de deficiência de lactase de cada indivíduo intolerante (HEYMAN, 2006). A dor abdominal em indivíduos intolerantes que consomem produtos lácteos, se explica pela formação dos ácidos, que ao diminuir o pH do lúmen, aumenta o peristaltismo intestinal e a distensão do intestino. O gás que é formado pela fermentação da lactose causará efeitos de flatulências e inchaços. O acúmulo de ácido láctico, que possui efeito osmótico por atrair água para o interior do lúmen, explica a diarreia aquosa presente (TORREGROSA et al., 2015).

A lactulose possui efeitos de osmolaridade semelhantes ao ácido láctico, atraindo água do organismo para o lúmen intestinal. A ingestão de altas doses de lactulose pode causar distensão abdominal, flatulências, diarreias, desconforto abdominal, aumento da

sede e raros casos de vômito (LACTULONA®, 2014). Os sintomas das reações de intolerância a lactose e ações da lactulose no organismo mostram grande semelhança.

Segundo a RDC 135, publicada recentemente, informa novas regras para rotulagem de produtos com lactose. O limite proposto está baseado em referências técnicas e experiências de alguns países que já adotaram esse tipo de rotulagem há algum tempo. Para alimentos com redução na quantidade de lactose, o limite de 100 mg/100mL é entendido como um alimento seguro para pessoas com intolerância, podendo ser empregada no rótulo a expressão “zero lactose” ou “deslactosado”, os valores entre 100 mg/100mL até 1g/100mL são considerados “baixo teor de lactose”. Para qualquer alimento que contém lactose, acima de 100mg/100mL, deve conter a expressão “contém lactose” (ANVISA, 2017).

Os métodos oficiais segundo a instrução normativa IN 68, utilizados para a quantificação de lactose no leite, são os métodos de Lane-eynon e método cloramina-T (BRASIL, 2006), considerados trabalhosos, utilizam grandes quantidades de reagentes, diversas vidrarias específicas e demandam tempo, além da necessidade da realização de diversos cálculos para se chegar na porcentagem do açúcar presente. O método preconizado para a detecção e quantificação de lactulose, de acordo com padrões internacionais, é por HPLC (IDF, 2007).

### 2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Fica demonstrada a necessidade de ferramentas para estudar as substâncias presentes no leite, identificando-as e quantificando-as. O HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ou do português CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), possui grande vantagem sobre os demais métodos, tratando-se de separação e detecção de compostos individualmente, tendo uma enorme capacidade de separação de múltiplos compostos, apresentando boa exatidão e sensibilidade para mínimas quantidades de analitos (SILVA, 2007; COSTA, 2009).

Em todas as suas possíveis variantes, a cromatografia é um método para a separação de componentes de uma mistura, que depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases, sendo uma delas estacionária e a outra fase móvel. Os métodos cromatográficos são classificados em acordo com a natureza dessas duas fases, dos seus estados físicos e mecanismos de separação (GOMES, 2010).

Na cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido que escoar numa direção definida e ao longo da fase estacionária. A fase estacionária possui um sorbente que

retêm esses compostos, sendo que os fracamente retidos escoam mais rapidamente ao longo do recheio, enquanto que os que estabelecem interações mais fortes saem mais lentamente, até ocorrer a separação completa dos componentes da mistura (GOMES, 2010).

Chama-se de eluição o processo em que ocorre o escoamento dos compostos que são arrastados pela fase móvel ao longo da coluna até sua saída. O cromatograma é a resposta do detector na forma de gráfico, sendo representada a concentração do analito em função do tempo ou volume de eluição (CECCHI, 2003; GOMES, 2010).

### *Métodos cromatográficos de análise de leite*

A cromatografia compreende um grupo importante e diversificado de métodos que permitem a separação de componentes semelhantes em misturas complexas como o leite (SKOOG, HOLLER, CROUCH, 2002). É uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação devido à grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

As técnicas de separação vem se destacando na química analítica, tais como a cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido a sua capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em diversas amostras, como ambientais, farmacêuticas, biológicas e alimentícias (RIBANI et al., 2004).

### *Preparo de amostras para HPLC*

Uma das etapas de maior importância em um processo analítico é o preparo das amostras. As matrizes geralmente não são analisadas na forma bruta, buscando assim evitar interferências e incompatibilidades com os equipamentos analíticos. Desta forma, são empregados procedimentos de preparo de amostras, com os quais busca-se isolar e concentrar os analitos à níveis adequados e obter um nível de limpeza da amostra que não comprometa sua análise química (VALENTE, AUGUSTO, 2000).

Algumas amostras biológicas são consideradas complexas, como o soro, o plasma, a urina e o leite. Essas amostras contém muitos componentes que podem interferir e dificultar suas análises, por isso, a importância da realização de um pré-tratamento, podendo então ser obtidas em meio apropriado e, em adequadas concentrações para a posterior injeção no sistema cromatográfico (PEZZA et al., 2006). Analisando resíduos de antibióticos no leite, autores relatam que a extração é um dos principais problemas encontrados, pois o leite é uma

matriz com altos teores de lipídeos e proteínas, que podem vir a interferir na análise em questão (OKA, ITO, MATSUMOTO, 2000). Uma extração inadequada da amostra a ser testada, pode trazer diversos problemas, tanto para a integridade da coluna e demais equipamentos utilizados, quanto para a confiabilidade em relação aos resultados obtidos.

Uma técnica clássica para o preparo de amostras é a extração líquido-líquido. Esta requer a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos, necessita de um maior tempo de análise e é de difícil automação (SMITH, 2003; QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001), sendo comparada à extração em fase sólida, que demanda menor tempo de análise, menor quantidade de solventes, não tem a formação de emulsões, promove o enriquecimento de traços e apresenta alto potencial para automatização (SANTOS NETO, SIQUEIRA, 2005).

Segundo a EPA – USA, a química verde utiliza modelos de produtos químicos e processos que reduzem e/ou eliminam a geração de substâncias perigosas. A adoção de tais práticas influencia em benefícios ambientais significativos, inovação e melhora na economia. A química verde busca a redução da poluição na sua fonte, minimizando ou eliminando os perigos de matérias-primas químicas, reagentes, solventes e outros produtos, sendo diferente da limpeza da poluição, que envolve o tratamento de fluxo de resíduos (EPA, 2017).

Percebemos com esse estudo, a necessidade de técnicas inovadoras, e que possam atender os princípios da química verde, muito destacados atualmente. Visto que, na grande maioria das pesquisas realizadas, por diversos autores, utiliza-se uma grande variedade de substâncias químicas para limpeza das amostras, principalmente as mais complexas, como o leite, e assim como na fase móvel. Essas substâncias tóxicas, geralmente utilizadas, são importantes poluentes ambientais. Destaca-se então a grande importância de um método que utilize água ou outras substâncias atóxicas como agente de extração e fase móvel, contribuindo para a preservação de contaminações ambientais por esses reagentes, e que seja, ainda, um método confiável e apresente resultados dentro dos padrões descritos pela legislação seguida.

## 2.4 ADULTERAÇÕES NO LEITE

O leite é um dos alimentos mais comumente fraudados. As diversas fraudes ocasionadas neste alimento acarretam um grande problema para a indústria, causando prejuízos econômicos pela diminuição do rendimento industrial (MOORE, SPINK, LIPP,

2012). Além de lesar o consumidor economicamente, por fornecer um produto de qualidade inferior à declarada, a adulteração do leite pode representar risco à saúde, dependendo do tipo de substância utilizada na fraude (SHARMA, PARADAKAR, 2010).

Os principais objetivos da fraude em leite são o aumento do volume e o controle de alterações provocadas por microrganismos, além de alterar as características e componentes para o recebimento de bonificações em sistemas de pagamento por qualidade (VIOTTO, CUNHA, 2006). A adição ou subtração de quaisquer constituintes do leite, antes do seu beneficiamento, é proibida por lei (BRASIL, 2011).

Sempre que houverem falhas no controle de qualidade, que é realizado pela indústria, ou insuficiência de fiscalização, o consumidor pode estar exposto ao risco do consumo de leite adulterado ou com resíduos de inibidores microbianos. Algumas adulterações por outro lado podem ser realizadas pela própria indústria (SILVA, 2013).

Assim, as fraudes mais frequentes visam aumentar o volume, neutralizar a acidez ou eliminar microrganismos pela adição de substâncias conservantes.

#### 2.4.1 Fraude por Adição de Água e Reconstituintes

A grande maioria dos laticínios utiliza o modelo de pagamento por volume de leite aos produtores. Isso pode trazer consequências diretas para a qualidade do produto, pois desmotiva a busca por melhorias na obtenção da matéria-prima, além de incentivar o transportador a captar leites em desacordo com os padrões da legislação, visando um maior volume de captação. Outra consequência dessa forma de pagamento seria a possibilidade de fraudar o leite com água e reconstituintes da densidade, obtendo um aumento no seu volume (SILVA, 2013).

Em busca desse aumento de volume do leite, a adição de água é comumente observada (FIRMINO et al., 2010; SOUZA et al., 2011). Por ser de fácil detecção por provas rotineiras como a crioscopia e a densidade, essa fraude não é realizada de forma isolada. Para mascarar a adição de água são utilizadas substâncias que reconstituem a densidade e a crioscopia do leite, como o sal e o açúcar (TRONCO, 2008).

A adição de água causa uma redução na densidade do leite e um aumento no seu índice crioscópico, já a adição de substâncias reconstituintes atuam de forma inversa (SANTOS, FONSECA, 2007), dificultando a detecção destas fraudes apenas utilizando provas de rotina (KARTHEEK et al., 2011).

Outras substâncias como o álcool etílico e o citrato de sódio também são utilizados para reconstituir o leite fraudado, sendo que o álcool altera apenas o índice crioscópico (BELOTI et al., 2010), considerando a crioscopia como prova de eleição. Outra prática utilizada para aumentar o volume é a adição do soro do leite, oriundo da produção de queijos. Este possui em sua composição as proteínas do soro, água, lactose e sais, que fazem com seja um produto com a densidade e índice crioscópico muito próximos aos do leite. Sendo sua detecção mais complexa e laboriosa (TRONCO, 2008).

Um dos casos mais graves de adulterações em leite ocorreu na China, no ano de 2008, onde morreram 7 pessoas e milhares foram hospitalizadas, devido à adição da substância melamina para simular o aumento no teor proteico do leite (SHARMA, PARADAKAR, 2010).

#### 2.4.2 Fraude por Adição de Neutralizantes da Acidez

Condições de higiene inadequadas na obtenção do leite e também falhas na sua refrigeração podem originar um produto com elevadas contagens de microrganismos (SANTOS, FONSECA, 2007). As bactérias presentes no leite, fermentam a lactose, produzindo ácido láctico e outros componentes, sendo esse ácido láctico responsável pelo aumento na acidez do leite. Esse processo é irreversível, porém o uso de neutralizantes é uma prática empregada para neutralizar a acidez provocada por microrganismos. Os principais neutralizantes utilizados são o bicarbonato de sódio e/ou o hidróxido de sódio (TRONCO, 2008).

O hidróxido de sódio pode atuar causando a saponificação da gordura do leite, promovendo alguns defeitos no produto e nos seus derivados.

#### 2.4.3 Fraude por Adição de Substâncias Conservantes

A adição de conservantes é outra fraude relacionada à contaminação do leite. São utilizadas substâncias como o cloro, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e formaldeído, tendo como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação. A presença desses resíduos no leite pode ser prejudicial à indústria, já que podem interferir na produção de derivados que necessitam da adição de culturas lácticas, pois inibem a sua multiplicação

durante o seu processamento (TRONCO, 2008). Além de causar riscos à saúde do consumidor, dependendo da substância que é utilizada (SHARMA, PARADAKAR, 2010).

A pesquisa diária de substâncias inibidoras do crescimento microbiano é determinada pela legislação, na recepção do leite na indústria. Existem provas específicas para a pesquisa de cloro, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e formaldeído (BRASIL, 2006).

#### *Uso do formaldeído*

O formol é um composto altamente volátil a temperatura ambiente, polimeriza-se em meio aquoso e, também oxida-se em metanol (IARC, 2006; IPCS, 2002). Esta elevada reatividade, faz com que o formol seja altamente tóxico ao ser ingerido, inalado ou em contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea, pois promove mutação em células sadias transformando-as em células carcinogênicas (INCA, 2015).

Por este motivo, esta substância foi proibida em vários setores, como o de beleza, cosmético e alimentício (ANVISA, 2008).

#### 2.4.4 Dificuldades das Provas Atuais

A utilização conjunta de distintas substâncias em quantidades equilibradas tem tornado as fraudes no leite cada vez mais elaboradas, além de confundir os testes utilizados pelo controle de qualidade das indústrias. A utilização de novas substâncias também acontece, dificultando ainda mais sua detecção (BATTAGLINI, 2014).

A IN 62 determina que se examine todos os tanques de leite de todos os caminhões na recepção da indústria, para a detecção de conservantes, neutralizantes e reconstituíntes (BRASIL, 2006).

No entanto, a pesquisa diária das possíveis substâncias fraudulentas em todo o leite recebido pela indústria é inviável, principalmente quando se considera a dificuldade na execução de grande parte das provas (BRASIL, 2006). As provas oficiais para detecção de fraudes apresentam problemas para sua execução, como limitações de sensibilidade, pouca praticidade e longo tempo para resultados, o que dificulta a utilização em larga escala e torna o produto vulnerável à adulterações (SILVA, 2013).

Atualmente, a metodologia de análise de formol em leite encontra-se especificada na Instrução Normativa N° 68, no tópico Métodos Analíticos Físico-Químicos Oficiais para Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006). A prova exige a destilação do leite, é demorada e laboriosa, o que dificulta sua execução na recepção do leite. A norma classifica o

método como qualitativo, indicando se há ou não a presença do conservante no produto (SILVA, 2013).

Recentemente, nas Operações Leite Compensado, o farmacêutico Fabiano Barreto, um dos supervisores técnicos do Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS), afirmou que utilizando este método oficial em 60 amostras de leite, demorou cerca de 15 dias para avaliar a presença ou não de formol, ou seja, aproximadamente 4 amostras/dia, o que inviabiliza sua realização na velocidade que a indústria necessita, uma vez que o ideal seria obter resultados antes de descarregar o leite, o que é impossível quando a quantidade de leite recebida é grande (G1, 2013).

Dentre as principais apreensões realizadas envolvendo fraudes neste alimento, uma das mais alarmantes ocorreu em 2007, em que a Polícia Federal desvendou uma fraude em leite cometida por duas cooperativas mineiras, a operação foi denominada Ouro Branco. Em que foi criada uma fórmula por um engenheiro químico, ela reduzia o valor nutritivo do produto além de se tornar nocivo à saúde de quem o consumia. A solução química continha soda cáustica, ácido cítrico, citrato de sódio, sal e açúcar, em seguida adicionava-se água ao produto para aumentar o volume e com isso a lucratividade (PF, 2012).

Já no ano de 2013, foi deflagrada pela Polícia Federal, outro importante esquema de fraudes em leite, este denominado Operação Leite Compensado, envolvendo os estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Até o final do ano de 2015 já haviam sido registradas 10 fases dessa mesma operação, em que a matéria prima era adicionada de água e uréia (que continha formol em sua fórmula) para aumentar o seu rendimento. Sendo também desencadeada a 2ª operação Queijo Compensado, já que também foram detectadas alterações nestes produtos. (G1, 2015).

Outra operação envolvendo leite foi deflagrada, no ano de 2014, no estado de Santa Catarina, onde foi chamada de Operação Leite Adulterado, até o final do mesmo ano já haviam sido realizadas 3 fases desta mesma operação. A organização trabalhava de maneira a evitar quaisquer eventuais perdas do produto (leite cru), utilizando substâncias não permitidas e adulterando as características naturais do alimento a fim de que ele tivesse uma maior "durabilidade" por meio de adição de conservantes proibidos e impróprios para o consumo humano (MPSC, 2014).

Assim, a indústria de laticínios tem a necessidade de provas que permitam a detecção de substâncias adulterantes com maior facilidade, velocidade e menor custo, permitindo o rastreamento de todo o leite recebido pela indústria.

Podem ser encontrados alguns modelos de utilidade, referentes à pedidos de depósitos de patente registrados, de testes para a detecção de formaldeído, mostrando novamente a grande importância da descoberta de novos modelos de inovação. O modelo de utilidade CN 201892665 divulga um papel de ensaio para a detecção rápida de leite dopado com formaldeído, compreende um corpo formado por papel de teste de tecido ou não tecido ou papel de filtro qualitativo e camadas de detecção de formaldeído dispostos sobre e/ou sob um lado do corpo de papel de teste. Este tipo de teste depende da impregnação do reagente no papel.

O modelo de utilidade CN202583028 apresenta um dispositivo para a avaliação de leite fresco e inspecionar a adulteração do leite. Uma balança eletrônica é disposta sobre uma base, um copo medidor está disposto em cima da balança, um suporte de tubos de ensaio é fixado na base, uma pluralidade de tubos de ensaio está disposta no suporte de tubos de ensaio e uma pluralidade de recipientes dos reagentes está disposta na parte traseira do suporte de tubos de ensaio. O dispositivo deve ser utilizado em bancada.

WO2015132648, com prioridade em 2014, cita um kit para detectar, pelo menos, uma adulteração no leite. A adulteração inclui, pelo menos, um grupo de cana de açúcar, peróxido de hidrogênio, dextrina de malte, glicose, amônia, uréia, nitratos, sulfatos, detergentes, neutralizadores, amido e formalina. O kit é compreende fitas revestidas com uma mistura de reagentes.

CN103543123 descreve um método para detectar adulteração em leite, através de infravermelho utilizando espectrofotômetro. Amostras devem ser coletadas para detecção. Diante disso, a presente invenção descreve novo processo para detecção de formol em leite, procurando suprir uma importante demanda da indústria de laticínios no Brasil. O processo proposto é rápido e eficiente, com custo reduzido e grande facilidade na sua execução, sendo sensível, confiável, e oferecendo resultados equivalentes ao método oficial, com maior agilidade, aproximadamente 5 minutos para a obtenção do resultado final, possibilitando triar todo o leite recebido pelas indústrias em um curto tempo.

## REFERÊNCIAS

- AIDER, M.; HALLEUX, D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. **Trends in Food Science and Technology**. v.18, p.356-364, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Rotulagem de lactose em alimentos. RDC n° 135, 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 fev. 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Proíbe o uso isolado de produtos que contenham paraformaldeído ou formaldeído, para desinfecção e esterilização, regulamenta o uso de produtos que contenham tais substâncias em equipamentos de esterilização e dá outras providências. Resolução n° 91, 2008. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0091\\_28\\_11\\_2008.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0091_28_11_2008.html)>. Acesso em: 14 fev. 2017.
- BATTAGLINI, Ana Paula Pavão. **Difratometria de raios X como ferramenta na detecção de fraudes em leite**. 2014. 84f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.
- BELOTI, V.; MANTOVANI, F.D.; SILVA, M.R.; TAMANINI, R.; GARCIA, D.T.; SILVA, F.A. Alterações do ponto de congelamento do leite por adição do estabilizante citrato de sodio. In: VI Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2010, Florianópolis. Anais do VI Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2010.
- BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015.
- BIRLOUEZ – ARAGON, I.; SABAT, P.; GOUTI, N. A new method for discriminating milk heat treatment. **International Dairy Journal**, Barking, v.12, n.1, p. 59-67, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Brasília, 18 de Setembro de 2002. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução

Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro 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 República Federativa do Brasil, Brasília, 2011.

BRITO, A.B.N. **Estudo da cristalização da lactose em diferentes solventes**. 2002. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2003.

CHÁVEZ-SERVÍN, J.L.; CASTELLOTE, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography A**, v.1043, p.211–215, 2004.

COSTA, A.L.O. **Éster 2-morfolinoetil e sal sódico do ácido micofenólico: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de matéria-prima e comprimidos**. 2009. 219 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.1, p.353–361, 1996.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

EPA. Environmental Protection Agency. Estados Unidos. Disponível em: <https://www.epa.gov/greenchemistry>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

FABER, M.O. **Isomerização enzimática de glicose a frutose em biorreator de leite fixo alimentado continuamente**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

FERRAZ, L.R.; FIQUEIREDO, L.F.P. Dignóstico de encefalopatia hepática. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.50, n.2, p.116, 2004.

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

G1. Nova etapa da leite compensado no RS combate adulterações de produtos. 2015. Disponível em: <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2015/10/10-etapa-da-leite-compensado-no-rs-combate-adulteracao-de-produtos>. Acesso em: 10 mai. 2016.

G1. MP faz nova operação contra fraude no leite e prende suspeitos no RS. 2013. Disponível em: <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2013/05/ministerio-publico-faz-nova-operacao-contradulteracao-do-leite-no-rs>. Acesso em: 15 dez. 2016.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**. n.17, p. 259–275, 2004.

GOMES, S. M. C. **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Coimbra, Portugal, 2010.

GUERRA-ORDAZ, A.A.; GONZÁLEZ-ORTIZ, G.R.; LA RAGIONE, M.M.; WOODWARD, J.; COLLINS, J.W.; PÉREZ, J.F.; MARTÍN-ORÚE, S.M. Lactulose and *Lactobacillus plantarum*, a potential complementary synbiotic to control postweaning colibacillosis in piglets. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 80, p. 4879–4886, 2014.

HARDING, F. **Milk quality**. London: Chapman & Hall, 1995.

HEYMAN, M.B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. **PEDIATRICS**, v.118, n.3, set, 2006.

IARC, “Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol,” IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 88, pp. 39– 325, 2006.

IDF. Heat treated milk. Determination of lactulose content. Method using high-performance liquid chromatography. Standard 147. Brussels: International Dairy Federation. 2007.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Formol ou Formaldeído. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=795](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795). Acesso em: 15 dez. 2016.

IPCS, “Formaldehyde. Concise international chemical assessment document 40,” Tech. Rep., World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KARTHEEK, M.A.; SMITH, A.; KOTTAI MUTHU, A.; MANAVALAN, R. Determination of Adulterants in Food: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.2, p.629-636, 2011.

KONTULA, P.; SUIHKO, M.L.; VON WRIGHT, A.; SANDHOL, M. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v.82, n.2. p.249-256, fev. 1999.

KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Health promoting aspects of milk oligosaccharides. **Internatonal Dairy Journal**, Barkin, v.16, n.11, p.1341-1346, fev. 2006.

LACTULONA: lactulose. Barauri: Daiichi Sankyo Brasil Farmacêutica Ltda, 2014. Bula de remédio.

LEITE, C.C.; GUIMARÃES, A.G.; ASSIS, P.N.; SILVA, M.D.; ANDRADE, C.S. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod.** n.3, v.1, p.21-25, 2002.

LUZZANA, M.; AGNELLINI, D.; CREMONESI, P.; CARAMENTI, G.; DE VITA, S. Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique. **Le Lait**, n. 83, p.409– 416, 2003.

MARCONI, E.; MESSIA, M.C.; AMINE, A.; MOSCONE, D.; VERNAZZA, F.; STOCCHI, F.; PALLESCHI, G. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. **Food Chemistry**, n.84, p.447–450, 2004.

MODLER, H.W.; MULLER, P.G.; ELLIOT, J.T.; EMMONS, D.B. Economic and technical aspects of feeding whey to livestock. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v.63, n.5, p.838-855, mai, 1980.

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

MPSC. Presos na operação leite adulterado III são ouvidos pelo GAECO. 2014. Disponível em: <https://mpsc.mp.br/noticias/presos-na-operacao-leite-adulterado-iii-sao-ouvidos-pelo-gaeco>. Acesso em: 10 mai. 2016.

MÜHLBACH, P.R.F. Nutrição da vaca em lactação e a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO DE BOVINOCULTURA DE LEITE, I, 2003. Sociedade Catarinense de medicina veterinária/núcleo Oeste, 2003.

NEVES, L.N.O. **Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT**. 2015. 153f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.109–133, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F. Qualidade do leite no processamento de derivados. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, cap. 5, p.91–101, 2003.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005.

PANESAR, P.S.; KUMARI, S. Lactulose: production, purification and potential applications. **Biotechnol**, n. 29, p. 940–948, 2011.

PEZZA, L.; RIOS, A.; NOZAL, L.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínética micelar. **Química Nova**, v.29, n.5, p.926-931, 2006.

PF. Justiça condena acusados de adulterar leite presos na operação ouro branco. 2012. Disponível em: <http://www.pf.gov.br/agencia/noticias/2012/marco/justica-condena-acusados-de-adulterar-leite-presos-na-operacao-ouro-branco-1>. Acesso em: 10 mai. 2016.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em eluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: Application in infant food. **Early Human Development**, v.65, p.43–52, 2001.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, p.461–480, 2000.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole. 2007.

SANTOS NETO, A.J.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos c18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-Brasil). **Química nova**, v.28, n.5, p.747-750, 2005.

SARON, M.L.G. **Aproveitamento do permeado do soro de leite bovino através da transformação da lactose em lactulose e como ingrediente para meios de culturas de bactérias probióticas**. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SCHOLZ-AHRENS, K.; SHAAFDMA, G.; HEUVEL, E.V.D.; SCHREZENMEIR, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.459-464, fev 2001.

SCHUMANN, C. Medical, nutritional and technological properties of lactulose and update. **European Journal of Nutrition**, v.41, n.1, p.17-25, out 2002.

SHARMA, K.; PARADAKAR, M. The melamine adulteration scandal. **Food Security**, n.2, p.97-107, 2010.

SILVA, L.C.A. **Análise quantitativa de carboidratos em derivados de leite por diferentes métodos e desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD)**.2007. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2007.

SILVA, L.C.C. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SMITH, R. M. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p.3-27, 2003.

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.

TAMURA, Y.; MIZOTA, T.; SHIMAMURA, S.; TOMITA, M. Lactulose and its application to the food and pharmaceutical industries. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.289, p.43-53, 1993.

TORREGROSA, D.V.; TORRES, E.M.; PRIETO, L.V.; CAMACHO, J.V. Bases conceptuales del diagnóstico de intolerancia a lactosa, hipolactasia y mala digestión de lactosa. **Salud Uninorte**, v.31, n.1, p.101-118, 2015.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ed. Santa Maria: UFSM, 2008.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química nova**, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

VALSECHI, O.A. Microbiologia dos alimentos. Universidade Federal de São Carlos. Centro de ciências agrárias, Araras, 2006. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/Microbiologia%20dos%20Alimentos.pdf> Acesso em: 15 out. 2016.

VIEIRA, A.A.M.T. **Estudo da Hidrólise Enzimática do Soro de Queijo Utilizando as Lactases Lactozym® e Prozyn®**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

VILLAMIEL, M.; CORZO, N.; FODA, M.I.; MONTES, F.; OLANO, A. Lactulose formation catalysed by alkaline-substituted sepiolites in milk permeate. **Food Chemistry**, v.76 n.1, p.7-11, 2002.

VIOTTO, W.H.; CUNHA, C.R. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: ALBENONES, J.M.; DÜRR, J.W.; COELHO, K.O. (Ed.). **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**, v.1, p. 241-258, 2006.

VORAGEM, A.G.J.; Technological aspects of funtionalfood-related carbohydrates. **Trends in food Science e technology**, Cambridge, v.9, n.8, p.328-325, 1998.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1984.

ZADOW, J.G. Lactose: Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2654–2679, 1984.

ZHANG, Z.; YANG, R.; WANG, H.; YE, F.; ZHANG, S.; HUA, X. Determination of lactulose in foods: a review of recent research. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 45, p.1081-1087, 2010.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos métodos para a detecção de formaldeído, lactose e lactulose no leite.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar método de extração de carboidratos do leite.

Validar o método de extração e quantificação de carboidratos do leite.

Desenvolver novo método para a detecção rápida de formaldeído no leite.

Padronizar o método para a detecção rápida de formaldeído no leite.

Verificar a eficiência do método para a detecção rápida de formaldeído no leite comparando-o com demais métodos conhecidos.

Aplicar o método para a detecção rápida de formaldeído no leite para detecção de formaldeído no leite em amostras comerciais.

#### 4 ARTIGO A

### QUÍMICA VERDE APLICADA À EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LACTOSE E LACTULOSE NO LEITE POR HPLC

### GREEN CHEMISTRY APPLIED TO THE EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF LACTOSE AND LACTULOSE IN MILK BY HPLC

#### RESUMO

As indústrias de beneficiamento utilizam o tratamento térmico como alternativa para eliminação de microrganismos patogênicos e a redução da carga microbiana do leite, prevenindo sua deterioração. Porém, a utilização de elevadas temperaturas pode causar diversas alterações no produto, uma delas é a formação da lactulose, um dissacarídeo formado a partir da lactose, que não pode ser absorvida pelo organismo de animais, porque estes não produzem enzima para sua metabolização. Este carboidrato é fermentado pela microbiota do intestino grosso, e tem ação acidificante do intestino, o que colabora o para a fluência do transito intestinal, e se utilizado altas doses pode causar transtornos gastrointestinais. Atualmente, os métodos oficiais para a detecção e quantificação de lactulose no leite, de acordo com padrões internacionais, envolvem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou método enzimático (IDF, 2007). Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um novo método de acordo com os princípios da química verde, conforme a resolução RE nº 899 (ANVISA, 2003), para extração e quantificação de lactose e lactulose em um matriz complexa como o leite utilizando HPLC-RID. Para a fase de extração, utilizou-se leite diluído em água ultrapura (1:10 v/v), ultracentrifugado, o sobrenadante foi filtrado em filtro PVDF 0,22 µm e injetado em HPLC-RID. Os parâmetros de validação seguiram os padrões estabelecidos pela resolução RE nº 899 (ANVISA, 2003), que apresentaram resultados de acordo com os critérios preconizados pela resolução. O novo método de extração descrito neste trabalho é rápido e de fácil execução, utilizando apenas água para a extração e fase móvel, estando dentro dos princípios da química verde e demonstrando ser um método preciso, com boa seletividade, especificidade, linearidade e exatidão.

**Palavras-chave:** cromatografia, carboidratos, dissacarídeos

## ABSTRACT

The beneficitation industries use heat treatment as an alternative to eliminate pathogenic microorganisms and reduce the microbial load of the milk, preventing its deterioration. However, the use of high temperatures can cause diverse changes in the product, not the least of which is the formation of lactulose, a disaccharide formed from lactose, which cannot be absorbed by the animal body, because these do not produce enzyme for its metabolization. This carbohydrate is fermented by the microbiota of the large intestine, and has acidifying action of the intestine, which contributes to the fluency of the intestinal transit, and if used high doses can cause gastrointestinal disorders. Currently, official methods for the detection and quantification of lactulose in milk, according to international standards, involve high performance liquid chromatography (HPLC) or enzymatic method (IDF, 2007). This work aimed to develop and validate a new method according to the principles of green chemistry, according to RE Resolution 899 (ANVISA, 2003), for the extraction and quantification of lactose and lactulose in a complex matrix such as milk using HPLC- RID. For the extraction phase, dilute milk was used in ultrapure water (1:10 v/v), ultracentrifuged, the supernatant was filtered through a PVDF filter 0.22  $\mu\text{m}$  and injected into HPLC-RID. Validation parameters followed the standards established by resolution RE 899 (ANVISA, 2003), which presented results according to the criteria recommended by the resolution. The new extraction method described in this work is fast and easy to perform, using only water for extraction and mobile phase, being within the principles of green chemistry and proving to be an accurate method with good selectivity, specificity, linearity and accuracy.

**Key words:** chromatography, carbohydrate, disaccharide

## INTRODUÇÃO

O aquecimento do leite é utilizado industrialmente para tornar o produto seguro microbiologicamente e aumentar sua vida útil. No entanto, tratamentos térmicos como o utilizado no processamento UHT, que utiliza temperaturas entre 130 e 150°C, transforma parte da lactose em lactulose. A lactulose não é degradada pela lactase, sendo sua degradação feita por bactérias, também levando a produção de ácido e gás. Suspeita-se que sua atividade no organismo possa ser confundida com a intolerância à lactose, sendo inclusive utilizada em medicamentos com efeitos laxativos. Assim, é importante conhecer a quantidade de lactose transformada em lactulose durante tratamentos térmicos (BELOTI, 2015).

A lactose é o açúcar que predomina no leite e não é encontrada em outros alimentos, sendo considerada um carboidrato praticamente exclusivo deste alimento. A lactose é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma de galactose, está presente no leite em aproximadamente 4,7%. A lactose é dez vezes menos solúvel e adoça cinco vezes menos do que o açúcar que consumimos (BRITO, 2007; BELOTI, 2015). O leite de vaca apresenta apenas esse carboidrato, e pequenas quantidades de seus monossacarídeos glicose e galactose (BELOTI, 2015).

O único carboidrato de origem animal presente na cadeia alimentar do ser humano é a lactose, em seu intestino ela é hidrolisada pela enzima lactase e então pode ser absorvida como glicose e galactose. Parte da população mundial tem intolerância a este açúcar, isso se deve a reação adversa que envolve sua digestão quando há ausência total ou deficiência de lactase no próprio organismo. A lactose não hidrolisada pode ser fermentada por microrganismos presentes no intestino, causando distensão abdominal e uma série de desconfortos como náuseas e dores abdominais (ZADOW, 1984; VIEIRA, 2006).

A lactulose é um dissacarídeo formado a partir da galactose e frutose (LUZZANA et al., 2003; ORDÓÑEZ, 2005), sintetizado como um novo açúcar por Montgomery e Hudson, no ano de 1930 (TAMURA et al., 1993). Produzida comercialmente através da isomerização da lactose do leite, pode ser gerada também através do aquecimento do leite cru (MARCONI et al., 2004). Quando o leite passa por tratamentos térmicos podem ocorrer algumas modificações em sua composição, como a formação da lactulose e ácidos orgânicos, devido a isomerização da lactose, que passa por uma degradação parcial (WALSTRA, JENNES, 1984). A lactulose é considerada como estimuladora no crescimento de microrganismos probióticos por ser mais doce e solúvel que a lactose (ORDÓÑEZ, 2005).

A lactulose traz alguns benefícios como importantes atividades físico-químicas e fisiológicas benéficas para a saúde do homem, devido a esses benefícios a utilização como ingrediente alimentar tem aumentado muito. O seu baixo valor calórico e sua capacidade de estimular o crescimento de bactérias benéficas no cólon são algumas das qualidades desse carboidrato. A lactulose também está ligada ao menor risco de infecções e diarreia e melhora na imunidade, possui importante papel na redução do pH intestinal em decorrência da sua fermentação, reduzindo a população de patógenos e aumentando as bifidobactérias e a disponibilidade de minerais (CRITTENDEN, PLAYNE, 1996; RIVERO-URGELL, SANTAMARIA ORLEANS, 2001).

Segundo a instrução normativa 68, os métodos oficiais utilizados na quantificação de lactose do leite são as provas de lane-eynon e cloramina-T (BRASIL, 2006), sendo que estes testes utilizam grandes quantidades de reagentes e vidrarias específicas, são trabalhosos e demandam de longo tempo na execução. Esses métodos não fazem a diferenciação entre lactose e lactulose e não indicam a presença de outros carboidratos que podem estar presentes de forma fraudulenta.

O HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ou do português CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), é um instrumento que tem uma grande vantagem sobre os demais métodos tratando-se de separação e detecção de compostos individualmente (SILVA, 2007). Esse método possui excelente capacidade na separação de múltiplos compostos, com vantajosas técnicas que demonstram boa exatidão e sensibilidade para quantidades mínimas de analitos (COSTA, 2009).

O preparo de amostras em um processo analítico como este é uma das etapas mais importantes. As matrizes são complexas e geralmente não são analisadas em sua forma bruta, evitando interferências e incompatibilidades com equipamentos. Desta maneira, são empregados alguns procedimentos para o preparo das amostras, buscando-se isolar e concentrar os analitos a níveis adequados e obter a limpeza da amostra de forma que não comprometa sua análise química (VALENTE, AUGUSTO, 2000).

Percebendo-se, então, o uso propagado de diversas substâncias tóxicas para o preparo de amostras, este estudo teve como objetivo principal, desenvolver um método simples de extração para os carboidratos lactose e lactulose em uma matriz complexa, como o leite. Utilizando um método que atenda os princípios da química verde, com a não utilização de reagentes poluentes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## ***Material***

Os padrões de lactose, lactulose e outros carboidratos foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e a água ultrapura obtida através de um sistema Milli-Q® (Millipore, Billerica, MA, EUA). As amostras de leite cru foram fornecidas pela Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. As amostras de leite deslactosados foram obtidas do comércio, com inspeção federal.

## ***Preparo da amostra***

Para a extração dos carboidratos utilizou-se a diluição da amostra de leite a ser analisada com água ultrapura (Milli-Q®, Billerica, MA, EUA) 1:10 (v/v), seguida por homogeneizador vórtex por um minuto. Posteriormente, 5,0 mL dessa amostra diluída foi transferida para um tubo próprio, sendo vedadas e submetidos à ultracentrifugação, utilizando-se uma ultracentrífuga CP 70MX (Hitachi, Tóquio, Japão) com rotor P70AT, com rotação de 248.900 G, à temperatura de 15,0 °C, durante 12 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 µm (Millipore® – Millex, Billerica, MA, EUA) e depositado em frasco âmbar (*vials*) de 2,0 mL (Agilent, Walsdorf, Alemanha). Para a utilização da amostra em dias distintos, a mesma era acondicionada em refrigerador a aproximadamente 4°C.

## ***Equipamentos e condições cromatográficas***

A determinação e a quantificação dos carboidratos extraídos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão), composto por bomba LC-20AT, com sistema gerenciador de gradiente e desgaseificador DGU-20A com injetor automático SIL-20AC com amostrador de 70 vials. A coluna utilizada foi uma coluna de troca catiônica de Pb (II) – Aminex HPX-87P (300 mm × 7,8 mm, 9,0 µm, Biorad, EUA), mantida a 80 °C em um forno CTO-20A e a detecção foi feita pelo detector por índice de refração RID-10A, gerenciados pela controlada CBM-20A, comandados pelo software LC-Solution (Version 1.21). Utilizou-se como fase móvel água ultrapura (Milli-Q®). O volume de injeção de cada amostra foi de 10,0 µL em uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o tempo de corrida utilizado foi de 15 min por amostra.

## ***Parâmetros da validação***

O método cromatográfico (HPLC-RID) foi validado segundo a Resolução - RE nº 899 (ANVISA, 2003) avaliando-se os parâmetros de: especificidade e seletividade, linearidade e faixa dinâmica de trabalho, precisão (repetitividade – intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), exatidão (recuperação), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e estabilidade da solução. Os limites de detecção e o limite de quantificação foram calculados através da relação entre o desvio padrão do intercepto da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma, de acordo com as Equações 1 e 2.

$$LD = \frac{DP_0 \times 3}{IC} \quad Eq.1$$

$$LQ = \frac{DP_0 \times 10}{IC} \quad Eq.2$$

Em que:

$IC$  é a inclinação da curva

$DP_0$  é o desvio padrão do intercepto com eixo  $y$  das 3 curvas analíticas construídas em triplicata (BRASIL, 2012).

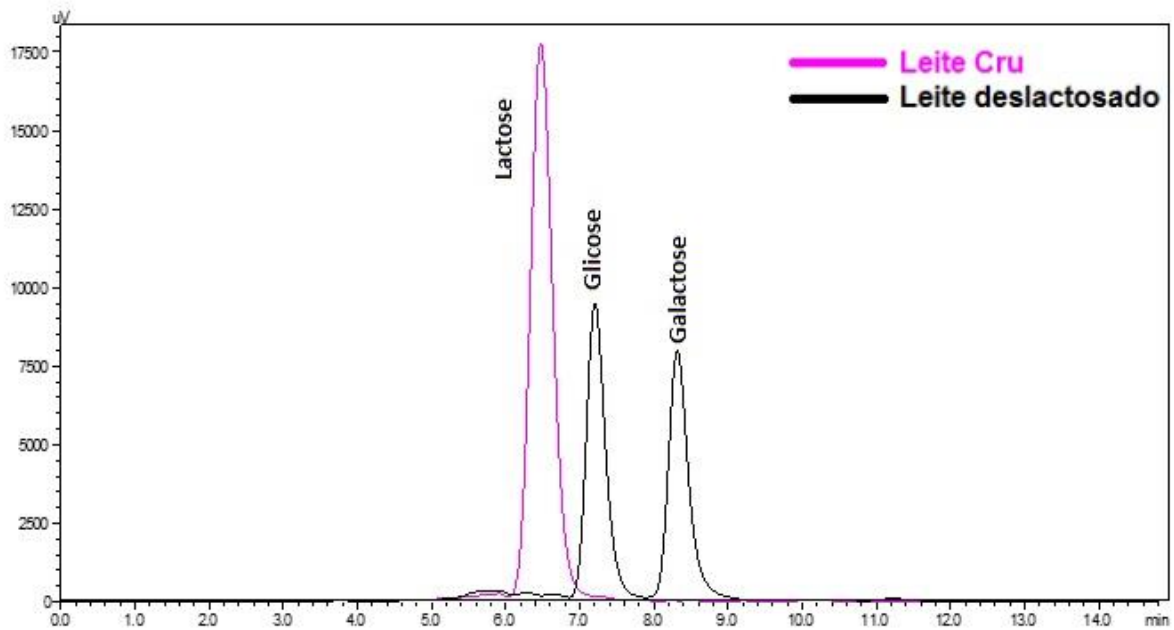
## RESULTADO E DISCUSSÃO

### Validação do método por HPLC – RID

#### *Especificidade e seletividade*

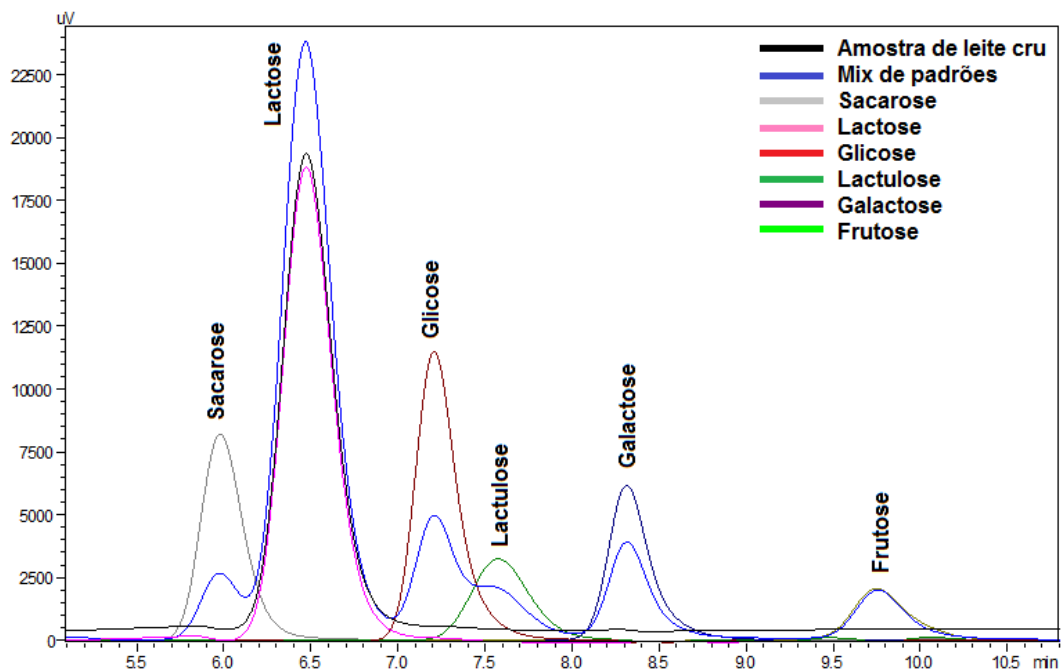
A especificidade do método foi demonstrada pela sobreposição de uma amostra de leite cru (linha rosa), contendo lactose em um tempo de retenção de (TR) de 6,47 minutos, condizendo com seu padrão e uma amostra de leite deslactosado, em que o cromatograma (linha preta) indicou a ausência dos sinais analíticos da lactose e lactulose (TR=7,53 min), entretanto, apareceram os picos de glicose e galactose, nos seus respectivos tempos de retenção (TR) de 7,20 e 8,31 min (Figura 1).

**Figura 1.** Cromatogramas sobrepostos de amostra de leite cru e amostra de leite deslactosado



A comparação dos tempos de retenção (TR) (Figura 2) indicaram a ausência de coeluição entre os possíveis interferentes e/ou adulterantes que podem ser encontrados nesta matriz, como a sacarose (possível adulterante) com TR de 5,97 min e a frutose com TR de 9,75 min., demonstrando a seletividade e especificidade deste método de análise para a determinação quantitativa de carboidratos em amostras leite.

**Figura 2.** Cromatogramas sobrepostos mostrando os diferentes tempos de retenção para os padrões de carboidratos presentes nas amostra de leite cru



### *Linearidade*

A linearidade do método foi verificada pela construção de três curvas analíticas realizadas em triplicata em 2 repetições para os carboidratos lactose e lactulose, sendo a faixa linear de trabalho definida no intervalo das concentrações entre 0,5 e 7,5 g 100 mL<sup>-1</sup> e 0,02 e 0,40 g 100 mL<sup>-1</sup> para lactose e lactulose, respectivamente. As curvas analíticas (Eq 1 e 2) obtidas para ambos os carboidratos foram construídas utilizando modelos lineares (Concentração x Área) (Figuras 3a) e expressas de forma concatenada sendo posteriormente avaliadas com relação a tendências pela análise do gráfico de resíduos (Figuras 3b).

$$[\text{lactose}](g\ 100mL^{-1}) = \frac{(Area) + 545,22}{74333,63} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$[\text{lactulose}](g\ 100mL^{-1}) = \frac{(Area) + 35,30}{79812,10} \quad \text{Eq.(2)}$$

**Figura 3.** (a) Curvas analíticas concatenadas e (b) gráfico de resíduos para os carboidratos lactose e lactulose (n=3).

(a)

(b)

Pela análise das Equações 1 e 2 e das Figura 3(a), o método analítico foi considerado linear dentro da faixa de trabalho escolhida. Pode-se observar também que os resíduos para ambos os analitos (Figura 3b) apresentaram-se de forma aleatorizada em torno da curva analítica, não apresentando tendências e pouco dispersos. Mostrando que os resultados são diretamente proporcionais à concentração dos analitos nas amostras, dentro de um intervalo especificado.

### ***Precisão***

A precisão intra-dias foi determinada pela repetibilidade de 6 (seis) injeções sucessivas de uma amostra de leite cru, contendo uma concentração média reportada pela legislação de lactose (4,0 a 5,0 %) e lactulose (0,2%) e a precisão intermediária realizada em 2 dias distintos. Os resultados da precisão e precisão intermediária estão apresentados na Tabela 1. Os valores do DPR devem ser menores que 5,0%.

Esse resultado permite concluir que o método proposto é preciso, indicando que houve concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo.

### ***Exatidão***

A exatidão calculada pela recuperação, em triplicata ( $n=3$ ), determinada pela adição dos padrões diretamente na matriz, antes e após o processo de extração, sendo que, as concentrações adicionadas após o processo de extração foram consideradas como recuperação correspondente a 100%. Foram adicionados três níveis de concentração para lactose e lactulose, sendo eles baixo ( $R1$ ), médio ( $R2$ ) e alto ( $R3$ ). A recuperação de ambos analitos variou de aproximadamente 84% a 117% (Tabela 1), demonstrando a exatidão do método, que pode variar entre 80% a 120%, tendo proximidade entre os resultados obtidos pelo método em estudo com relação aos valores verdadeiros.

### ***Limite de detecção e quantificação***

Os limites de detecção ( $LD$ ) e quantificação ( $LQ$ ) para a lactose e lactulose, calculados, respectivamente pela Eq. (1) e Eq. (2) foram de 0,06 e 0,18 g 100 mL<sup>-1</sup> para lactose e 0,002 e 0,006 g 100 mL<sup>-1</sup> para lactulose (Tabela 1).

### ***Robustez***

A robustez foi avaliada quanto a capacidade do método proposto de resistir à variações de vazão e temperatura. Para isto, variou-se a vazão da fase móvel em  $\pm 0,1\%$  e a temperatura da coluna em  $\pm 5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tabela 1). O tempo de retenção (TR) para ambos os analitos variou em torno de 10,0 % com relação as modificações na vazão, e variações inferiores à 1,0 % com relação às variações da temperatura. Os parâmetros de área e altura para ambos os analitos, variaram 9,0% ( $0,9\text{ mL}^{-1}$ ) e 1,0% ( $1,1\text{ mL}^{-1}$ ) com relação à vazão e quanto à temperatura, houve variação de 15,0%. Nenhuma das variações dos parâmetros ocasionou a inviabilização do método, devido à coeluições com possíveis monossacarídeos presentes na amostra, indicando que o método pode ser considerado robusto em situações de variações de vazão entre  $\pm 0,1\%$  e temperatura  $\pm 5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo capaz de resistir a essas pequenas variações nos parâmetros analíticos.

### ***Estabilidade da amostra***

A estabilidade da amostra foi realizada utilizando uma amostra de leite cru na concentração média de 4 a 5% (m/v) de lactose, extraída no momento e após 48 horas, mantidas a temperatura de refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ), em que observou-se que o leite cru manteve-se estável durante 48 horas refrigerado, tendo um desvio padrão relativo (DPR) de 5,0%, sendo este o limite proposto pela resolução. De acordo com os resultados de estabilidade da amostra, constata-se que as amostras de leite podem ser armazenadas por 48 horas sob refrigeração antes de serem injetadas no HPLC.

Os resultados da validação do HPLC-RID estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados da validação da extração de carboidratos em leites bovinos (n=3).

		$[Lactose]$ (g 100mL <sup>-1</sup> ) ±DP	$[Lactulose]$ (g 100mL <sup>-1</sup> ) ±DP
<b>Precisão</b>	Dia 1	4,30 ± 0,04	0,018 ± 0,002
	<i>DPR</i>	0,77%	1,27%
	Dia 2	4,20 ± 0,01	0,021 ± 0,001
	<i>DPR</i>	0,17%	0,56%
Intermediária		4,26 ± 0,08	0,039 ± 0,004
<i>DPR</i>		1,56%	1,86%
		$[Lactose]$ (g 100mL <sup>-1</sup> )	$[Lactulose]$ (g 100mL <sup>-1</sup> )
<b>Exatidão</b>	R <sub>1</sub>	100,089	84,38
	R <sub>2</sub>	98,5	116,8
	R <sub>3</sub>	104,28	105,6
Curva analítica		LD (g 100mL <sup>-1</sup> )	LQ (g 100mL <sup>-1</sup> )
$[Lactose]$ (g 100mL <sup>-1</sup> )	Área= 74333,63·[lactose]-545,22	0,06	0,18
$[Lactulose]$ (g 100mL <sup>-1</sup> )	Área= 791812,10·[lactulose]-35,30	0,002	0,006
		$[Lactose/Lactulose]$	
<b>Robustez</b>	TR	Vazão±1,0%	10,0%
		T°C±5,0°C	<1,0%
	Área/Altura	Vazão ±1,0%	9,0% (0,9 mL <sup>-1</sup> )
		T°C±5,0°C	10,0% (1,1 mL <sup>-1</sup> )
		T°C±5,0°C	15,0%

R<sub>1</sub>:0,5g; R<sub>2</sub>:4,0g; R<sub>3</sub>:6,0g para lactose e R<sub>1</sub>:0,01g; R<sub>2</sub>:0,1g; R<sub>3</sub>:0,2g para lactulose; TR: tempo de retenção; *DPR*: desvio padrão relativo

Em pesquisa realizada por FURUSAWA (2003), procurando por métodos de extração que utilizassem reagentes pouco tóxicos ou atóxicos, foi desenvolvido um método de separação de tetraciclina em leite que utiliza a diluição da amostra em água em concentração de 1:5 (v/v) e passando diretamente por uma coluna de extração de fase sólida C-18. O autor obteve como resultados amostras livres de compostos interferentes, alcançando taxas de recuperação acima de 80%, estando seu método dentro dos princípios propostos pela química verde.

Entretanto, quando trata-se de matrizes complexas, a maioria dos autores utiliza reagentes tóxicos nas etapas de extração e na fase móvel. Como o método testado por dois autores distintos em seus respectivos estudos, para a extração para carboidratos no leite, em que empregaram como fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), e como agente extrator as soluções de etanol, solução de Carrez I e II e acetonitrila, sendo logo após a precipitação da

proteína feita a filtragem em papel filtro, seguida por C18 Sep-Pak plus waters e ainda filtrado em filtro nylon de 0,45µm para então ser injetado (CHÁVEZ-SERVÍN, CASTELLOTE, LÓPEZ-SABATER, 2004; NEVES, 2015).

Acquaro Jr. et al. (2013), em sua pesquisa para validação da extração e quantificação de lactose no leite, como método de extração, também utilizaram o solvente etanol, havendo a necessidade de duas filtrações, uma com papel filtro qualitativo e outra por cartucho SepPak® Vac 3cc (500 mg) C18 (Waters®), e evaporação completa da amostra seguida por ressuspensão da mesma, contando com mais etapas e diluentes químicos.

Em outra pesquisa para a detecção de lactulose em leite por HPLC-RID, Morales, Romero e Jiménez-Pérez (2000), utilizaram como fase móvel a acetoneitrila, e para a fase de extração da amostra, adicionaram três gotas de ácido acético glacial, etanol e água destilada.

Com a utilização de solventes diferentes da água, há a necessidade de outros tratamentos como a evaporação e ressuspensão da amostra, etapas essas que demandam um tempo maior, custos com solventes e alto consumo de energia elétrica com o uso de centrífugas por horas, além de produzirem resíduos poluentes ao ambiente. Utilizando-se a água não há a necessidade dessas etapas, facilitando o processo de extração e reduzindo seus custos e a poluição ambiental.

## **CONCLUSÃO**

O método de extração para carboidratos em leite bovino, utilizando apenas água ultrapura (Milli-Q®) como agente extrator, mostrou-se preciso durante o mesmo dia e entre dias distintos, com adequada linearidade para as faixas de trabalho selecionadas para lactose e lactulose. O método cromatográfico indicou boa seletividade e especificidade para os possíveis carboidratos adulterantes e/ou produtos de degradação, indicando elevadas taxas de recuperação (exatidão), dentro do permitido pela RE 899. O método de extração de carboidratos em leites comercial desenvolvido mostrou-se simples, rápido e totalmente dentro dos princípios da química verde.

## REFERÊNCIAS

ACQUARO JR, V.R.; MADEIRA, T.B.; CASTILHO, D.C.; WATANABE, L.S.; BOVOLENTA, Y.R.; NIXDORF, S.L. Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação através de HPLC com índice de refração para lactose em leite pasteurizado. **Scientia Chromatographica**, v.5, p. 137-145, 2013.

**ANVISA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, 29 mai. 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015.

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, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Brasília, 2006.

BRITO, A.B.N.; GIULIETTI, M. Study of lactose crystallization in water-acetone solutions. **Crystal research e technology**, n.6, p.583-588, 2007.

CHÁVEZ-SERVÍN, J.L.; CASTELLOTE, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography A**, v.1043, p.211–215, 2004.

COSTA, A.L.O. **Éster 2-morfolinoetil e sal sódico do ácido micofenólico: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de matéria-prima e comprimidos**. 2009. 219 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.1, p.353–361, 1996.

FURUSAWA, N. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. **Talanta**, v. 59, p. 155-159, 2003

LUZZANA, M.; AGNELLINI, D.; CREMONESI, P.; CARAMENTI, G.; DE VITA, S. Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique. **Le Lait**, n.83, p.409-416, 2003.

MARCONI, E.; MESSIA, M.C.; AMINE, A.; MOSCONE, D.; VERNAZZA, F.; STOCCHI, F.; PALLESCI, G. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. **Food Chem**, n.84, p.447–450, 2004.

MORALES, F.J., ROMERO, C., JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. **International Journal of Food Science and Technology**, v.35, p.193–200, 2000.

NEVES, L.N.O. **Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: Application in infant food. **Early Human Development**, n.65, p.43–52, 2001.

SILVA, L. C. A. **Análise quantitativa de carboidratos em derivados de leite por diferentes métodos e desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD)**. 2007. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2007

TAMURA, Y.; MIZOTA, T.; SHIMAMURA, S.; TOMITA, M. Lactulose and its application to the food and pharmaceutical industries. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.289, p.43-53, 1993.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química nova**, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

VIEIRA, A.A.M.T. **Estudo da Hidrólise Enzimática do Soro de Queijo Utilizando as Lactases Lactozym® e Prozyn®**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1984.

ZADOW, J.G. Lactose: Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2654–2679, 1984.

## **5 ARTIGO B**

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE NOVO MÉTODO PARA A DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE**

#### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF NEW METHOD FOR THE FAST DETECTION OF FORMALDEHYDE IN MILK**

#### **RESUMO**

É obrigatória a pesquisa de conservantes no leite. O uso dessas substâncias, como o formaldeído, tem como finalidade a redução e/ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo alterações decorrentes de sua multiplicação. A presença dessas substâncias pode trazer prejuízos à indústria, interferindo na produção dos derivados, além de, principalmente, causar prejuízos à saúde de quem consome alimentos contendo esses resíduos. O formaldeído possui alta toxicidade e poder carcinogênico. As provas oficiais são dificultosas e lentas, não permitindo análises em grande escala. Esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um novo método, rápido e altamente sensível, para a detecção de formaldeído no leite. Foram realizados três testes simultaneamente, para efeitos de comparação, entre eles o teste oficial de acordo com a IN 68, o teste utilizando floroglucina e o novo método testado. Para a verificação da sensibilidade, foram utilizadas amostras de leite cru, adulteradas com as seguintes concentrações de formaldeído: 0,001%, 0,005%, 0,010%, 0,050%, 0,100%. Para a verificação da especificidade, foram realizadas adulterações com diversas substâncias conhecidas para este fim. E ainda foram testadas 112 amostras comerciais de leite pasteurizado. Os resultados revelaram alta sensibilidade, especificidade e confiabilidade do novo método testado, além de resultados rápidos (5 minutos). O método desenvolvido permite triar todo o leite recebido por laticínios e o seu pedido de patente foi solicitada por parceria entre a Universidade e empresa privada.

**Palavras-chave:** fraude, conservantes, IN 68, leite adulterado

## ABSTRACT

Research on preservatives in milk is mandatory. The use of these substances, such as formaldehyde, has the purpose of reducing and / or eliminating microorganisms present in milk, preventing changes due to their multiplication. The presence of these substances can cause damages to the industry, interfering in the production of the derivatives, besides, mainly, to cause damages to the health of those who consume foods containing these residues. Formaldehyde has high toxicity and carcinogenic power. The official tests are difficult and slow, not allowing large-scale analyzes. This study had as objective the development of a new, fast and highly sensitive method for the detection of formaldehyde in milk. Three tests were performed simultaneously, for comparison purposes, among them the official test according to IN 68, the test using floroglucine and the new method tested. For checking the sensitivity, raw milk samples adulterated with the following concentrations of formaldehyde were used: 0.001%, 0.005%, 0.010%, 0.050%, 0.100%. For the verification of specificity, adulterations with various substances known for this purpose were carried out. Also, 112 commercial samples of pasteurized milk were tested. The results revealed high sensitivity, specificity and reliability of the new method tested, in addition to fast results (5 minutes). The developed method allows to triage all the milk received by dairy products and its patent application was requested by partnership between the University and private company.

**Keywords:** fraud, preservatives, IN 68, adulterated milk

## INTRODUÇÃO

### *Controle de Qualidade do leite*

As análises do controle de qualidade do leite tem o objetivo de avaliar a qualidade e detectar possíveis fraudes e/ou quaisquer outras alterações (BRASIL, 2011).

A indústria de laticínios deve realizar um controle de qualidade da matéria prima que determina que sejam feitas pesquisas diárias de reconstituintes de densidade, neutralizantes de acidez e inibidores de crescimento microbiano (BRASIL, 2011).

### *Pesquisa de fraudes no leite*

As fraudes no leite têm como objetivos principais aumentar o volume e controlar as alterações provocadas pelos microrganismos. Além disso, visam também alterar as características e os componentes, com o intuito de receber bonificações em sistemas de pagamentos por qualidade (VIOTTO, CUNHA, 2006), criando assim, uma competição desleal e um impacto negativo na economia.

A adição substâncias conservantes no leite, como o formol, tem como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação (BELOTI, 2015). O formaldeído possui alta volatilidade em temperatura ambiente, em meio aquoso ocorre sua polimerização e em metanol sua oxidação (IARC, 2006; IPCS, 2002). Devido à sua elevada reatividade, o formaldeído é altamente tóxico ao ser ingerido, inalado ou em contato com a pele, pelas vias intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea, promovendo mutação em células sadias, transformando-as em carcinogênicas (INCA, 2015).

Esta substância foi proibida em vários setores, como o de beleza, cosmético e alimentício. E, nos setores em que é ainda utilizada, existe um limite legal de exposição do formol ao homem, o qual se não obedecido pode levar a efeitos prejudiciais à saúde, além de multas às empresas (ANVISA, 2005; 2013).

As provas oficiais para detecção de fraudes apresentam problemas para sua execução, como limitações de sensibilidade, pouca praticidade e longo tempo para resultados, o que dificulta a utilização em larga escala e torna o produto vulnerável à adulterações (SILVA, 2013).

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um novo método, rápido e altamente sensível, para a detecção de formaldeído no leite.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram realizadas análises simultâneas e comparativas entre três métodos que detectam qualitativamente formaldeído no leite, sendo dois deles testes já sabidamente utilizados para este fim, como o método oficial de acordo com a Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006) e o método utilizando floroglucina de acordo com LANARA (BRASIL, 1981) e um terceiro teste resultante de estudos envolvendo novos reagentes para a detecção rápida e com alta sensibilidade do formaldeído no leite.

Os testes de sensibilidade e efeito residual foram desenvolvidos no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), com a participação do Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (DIA) e do Laboratório de Toxicologia Animal (TOXIVET), ambos na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

Para a verificação da sensibilidade de cada teste foram utilizados amostras de leite cru refrigerado, obtidas no setor de bovinocultura leiteira da Fazenda Escola da UEL, isento de substâncias estranhas e dentro dos parâmetros estabelecidos para a Instrução Normativa 62.

Utilizou-se 6 alíquotas de 600 mL e cada uma adulterada com as seguintes concentrações de formaldeído: 0,001%, 0,005%, 0,010%, 0,050% e 0,100% (v/v) e controle negativo. Em cada diluição realizou-se análises em triplicata e para avaliar o poder residual do formaldeído também foram realizados os testes após 24 horas e 48 horas da mesma amostra acondicionada em refrigeração. Realizou-se 7 repetições do mesmo procedimento, executadas por 7 laboratoristas distintos nos laboratórios LIPOA, DIA e TOXIVET.

Para verificar a eficiência das provas em amostras comerciais, utilizou-se 112 amostras de leite pasteurizado que chegaram para análise de rotina do laboratório LIPOA, sendo realizados os três testes comparativos em todas as amostras.

Ainda foi testada a especificidade do método, adicionando diversas substâncias mais comumente utilizadas como adulterantes do leite, na concentração de 0,1%, como: sal, açúcar, amido, ureia, álcool, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, para descartar a possibilidade de interferência ou reações cruzadas.

### *Teste para formaldeído Oficial de acordo com a IN 68*

Para a realização do teste oficial de acordo com a IN 68, utilizou-se 100 mL de leite da amostra a ser testada em um balão próprio para a destilação, 100 mL de água destilada e 2 mL de ácido fosfórico P. A. Destilou-se, por aproximadamente 1 hora, até o produto destilado chegar a 50 mL. Em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL da solução de ácido cromotrópico a 0,5% em solução de ácido sulfúrico a 72% e 1 mL do destilado e aguardava-se 15 minutos no banho-maria em ebulição, a coloração roxa indicava os resultados positivos.

### *Teste para formaldeído utilizando o reagente floroglucina*

Para a realização da técnica utilizando a floroglucina a 1% foram colocados em tubos de ensaio 10 mL de amostra de leite a ser testada, 1 mL da solução de floroglucina 1% e 2 mL da solução de NaOH 10% e em seguida homogeneizava-se, obtendo-se a coloração alaranjada para resultados positivos.

### *Novo método testado para a detecção de formaldeído*

Em um béquer a amostra de leite a ser analisada foi diluída no reagente A na proporção 1:4. Foi adicionado ao tubo de ensaio 1 mL do reagente B, em seguida, despeou-se lentamente pela parede do tubo, contendo o reagente B, 1 mL da amostra diluída no reagente A. Aguardou-se aproximadamente 5 min, se necessário pode-se homogeneizar cuidadosamente. Para reações positivas obtém-se a coloração roxa e para negativas a coloração marrom/amarelo. Os reagentes não serão aqui detalhados por motivo de solicitação de patente.

## **RESULTADOS**

Os resultados da avaliação da sensibilidade dos métodos, com repetições realizadas por 7 laboratoristas e 3 laboratórios distintos, estão apresentados na tabela 1, demonstrando altíssima sensibilidade do novo método testado. Os resultados obtidos pelos 7 laboratoristas foram os mesmos.

**Tabela 1** – Avaliação da sensibilidade dos métodos para a detecção de formaldeído

%	Oficial IN 68			Floroglucina			Novo método		
	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>	T <sub>48</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>	T <sub>48</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>24</sub>	T <sub>48</sub>
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,001%	**	**	**	**	**	**	+	+	+
0,005%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*\* Resultados inconclusivos; - negativo; + positivo; T<sub>0</sub> 0 horas; T<sub>24</sub> após 24 horas; T<sub>48</sub> após 48 horas

Silva et al. (2013) realizou um vasto trabalho onde verificou a sensibilidade dos testes recomendados pela legislação vigente para a detecção de fraudes. No teste para a detecção do formaldeído em leite a autora verificou uma sensibilidade confiável de até 0,005%, sendo resultados positivos para esta concentração logo após fraudado, 24 horas e 48 horas após fraudado e condicionado em frascos fechados sob temperatura de aproximadamente 4°C. Resultado semelhante foi obtido no presente trabalho, em que a sensibilidade dos testes oficiais não ultrapassaram 0,005%, enquanto o método aqui proposto apresentou sensibilidade de 0,001%.

Em relação a especificidade, os testes também mostraram-se específicos, visto que nenhuma substância utilizada demonstrou interferência nos resultados, tanto positivos quanto negativos para três métodos.

Os resultados obtidos nas 112 amostras de leite pasteurizado, entre os três testes comparados, foram negativos para a presença do conservante formaldeído em todas as amostras, mostrando concordância entre os três testes. Análises para detecção de fraudes realizados por MAREZE et al. no ano de 2015, onde foram avaliadas 80 amostras de leite pasteurizado no estado do Paraná, nenhuma apresentou resultado positivo para a presença do conservante em questão utilizando o teste oficial pela instrução normativa 68.

O novo método testado obteve o pedido de depósito de patente aceito pelo INPI, com o número do processo: BR 10 2016 018975 6.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o método para qual solicitou-se a Patente A, mostrou alta sensibilidade e especificidade, sendo rápido e confiável e pode ser amplamente utilizado para a detecção de formaldeído na plataforma de laticínios, como teste de triagem.

## REFERÊNCIAS

**ANVISA.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA avalia risco da presença de formol e ureia no leite. Informe técnico nº 53. 2013 Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

**ANVISA.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Escova progressiva, alisantes e formol. [http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/alisantes/alisante\\_formol.htm](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/alisantes/alisante_formol.htm) Publicação: 18 jul. 2005. Acesso em: 10 dez. 2015.

**BELOTI, V. Leite: obtenção, inspeção e qualidade.** Londrina: Editora Planta, 2015.

**BRASIL.** LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília-DF, 1981.

**BRASIL.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro 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 República Federativa do Brasil, Brasília, 2011.

**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, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Brasília, 2006.

IARC, “Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol,” **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v.88, p.39–325, 2006.

**INCA.** Formol ou Formaldeído. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=795](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795). Acesso em: 10 dez. 2016.

IPCS, “Formaldehyde. Concise international chemical assessment document 40,” Tech. Rep., **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2002.

MAREZE, J.; MARIOTO, L.R.M.; GONZAGA, N.; DANIEL, G.C.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 283-290, 2015.

SILVA, L. C. C. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

VIOTTO, W. H.; CUNHA, C. R. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: ALBENONES, J. M.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. (Ed.). *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. p. 241-258.

## 6 CONCLUSÃO

A técnica padronizada para extração e quantificação de lactose, lactulose e outros carboidratos no leite, obedece os parâmetros preconizados pela resolução RE 899 (ANVISA, 2003), é um método de fácil e rápida execução e com custos reduzidos, pois utiliza apenas água como agente extrator, estando totalmente dentro dos princípios da química verde.

O desenvolvimento de técnicas rápidas para a detecção de substâncias fraudulentas no leite, resultou em dois depósitos de patente dos dois métodos descobertos nesse estudo para a detecção de formaldeído no leite.

Percebe-se a grande necessidade de técnicas atualizadas e de fácil execução para todo o controle de qualidade do leite, principalmente para a detecção de substâncias fraudulentas, de forma que se possa garantir a integridade e inocuidade do produto oferecido ao consumidor.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A****PROCESSO E KIT PARA A DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE  
UTILIZANDO DOIS REAGENTES**

17/08/2016

870160044503

11:10



00.000.2.2.16.0606026.5

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição  
de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 018975 6

**DADOS DO DEPOSITANTE (71)**

## DEPOSITANTE 1 DE 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

## DEPOSITANTE 2 DE 2

Nome ou Razão Social: LONDRILAB COMÉRCIO DE PRODUTOS MICROBIOLÓGICOS  
LTDA - EPP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 19946793000164

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei

Endereço: Av. Inglaterra, 385, Loja 22

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86046-000

País: BRASIL

Telefone: (43) 306 40471

Email: trainotti@sercomtel.com.br

## **DADOS DO PEDIDO**

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): **PROCESSO E KIT PARA A DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE UTILIZANDO 2 REAGENTES**

Resumo: Campo de aplicação: indústrias de laticínios e de alimentos. A adição substâncias conservantes, como o formol, é uma fraude que tem como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação e aumentando sua vida útil. A presente invenção descreve um processo para detecção de formol no leite, sem a necessidade de aquecimento, acompanhado de um Kit que permite triar todo o leite recebido pelas indústrias, com baixo custo e facilidade na execução.

## **DADOS DO INVENTOR (72)**

---

INVENTOR 1 DE 6

Nome: VANERLI BELOTI

CPF: 53098382953

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Quatá, 778

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 2 DE 6

Nome: JULIANA MAREZE

CPF: 04406993983

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 3 DE 6

Nome: NATALIA GONZAGA

CPF: 07299241900

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 4 DE 6

Nome: RONALDO TAMANINI

CPF: 05222032990

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

Endereço: Rua Silvio Bussador, 139

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 5 DE 6

Nome: SUZANA LUCY NIXDORF

CPF: 53564014934

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Voluntários da Pátria, 600

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 6 DE 6

Nome: YURI RENAN BOVOLENTA

CPF: 37561675852

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua Albertino Rorato, 285

Cidade: Cândido Mota Estado: SP

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

**APÊNDICE B****PROCESSO E KIT PARA A DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE  
UTILIZANDO UM REAGENTE**

16/08/2016

870160044161

14:40



00.000.2.2.16.0605881.3

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição  
de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 018864 4

**DADOS DO DEPOSITANTE (71)**

---

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO Cidade:

Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: LONDRILAB COMÉRCIO DE PRODUTOS MICROBIOLÓGICOS

LTDA - EPP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 19946793000164

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei

Endereço: Av. Inglaterra, 385, Loja 22

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 306 40471

Email: trainotti@sercomtel.com.br

## **DADOS DO PEDIDO**

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO E KIT PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE UTILIZANDO UM REAGENTE

Resumo: Campo de aplicação: indústrias de laticínios e de alimentos. A adição substâncias conservantes, como o formol, é uma fraude que tem como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação e aumentando sua vida útil. A presente invenção descreve um processo para detecção de formol no leite, acompanhado de um Kit que permite triar todo o leite recebido pelas indústrias, com baixo custo e facilidade na execução.

## **DADOS DO INVENTOR (72)**

---

INVENTOR 1 DE 6

Nome: VANERLI BELOTI

CPF: 53098382953

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Quatá, 778

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 2 DE 6

Nome: JULIANA MAREZE

CPF: 04406993983

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 3 DE 6

Nome: LYCIO SHINJI WATANABE

CPF: 36142261829

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua Pedro Marcos Prado, 320

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 4 DE 6

Nome: NATALIA GONZAGA

CPF: 07299241900

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Email: aintecpi@uel.br

## INVENTOR 5 DE 6

Nome: RONALDO TAMANINI

CPF: 05222032990

Nacionalidade: Brasileira  
Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista  
Endereço: Rua Silvio Bussador, 139  
Cidade: Londrina Estado: PR  
País: BRASIL  
Telefone: (43) 337 15812  
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 6 DE 6

Nome: SUZANA LUCY NIXDORF  
CPF: 53564014934  
Nacionalidade: Brasileira  
Qualificação Física: Professor do ensino superior  
Endereço: Av. Voluntários da Pátria, 900  
Cidade: Londrina Estado: PR  
País: BRASIL  
Telefone: (43) 337 15812  
Email: aintecpi@uel.br