

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva

**TEOR DE ÁCIDO LÁTICO COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO LEITE:
validação de métodos e monitoramento**

Belo Horizonte
2016

Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva

**TEOR DE ÁCIDO LÁTICO COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO LEITE:
validação de métodos e monitoramento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana da Motta

Belo Horizonte
2016

O48t	<p>Oliveira e Silva, Cláudia Aparecida de. Teor de ácido láctico como indicador de qualidade do leite [recurso eletrônico]: validação de métodos e monitoramento / Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva. – 2016. 1 recurso eletrônico (187 f. : il.) : pdf</p> <p>Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira. Coorientadora: Silvana da Motta.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.</p> <p>Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.</p> <p>1. Leite – Teses. 2. Ácido láctico – Teses. 3. Fenolftaleína – Teses. 4. Alcalinização – Teses. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 6. Acidez – Teses. 7. Leite – adulteração e inspeção – Teses. 8. Validação de método – Teses. I. Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Motta, Silvana da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD:664.07</p>
------	--



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

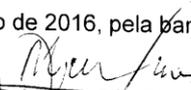
FOLHA DE APROVAÇÃO

TEOR DE ÁCIDO LÁTICO COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO LEITE: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS E MONITORAMENTO

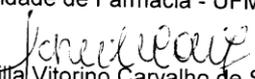
CLÁUDIA APARECIDA DE OLIVEIRA E SILVA

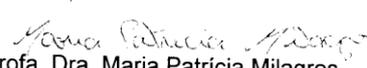
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

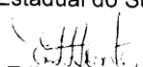
Aprovada em 22 de dezembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

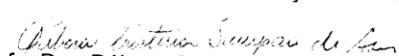

Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira (Orientador)
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Silvana da Motta (Coorientadora)
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Maria Patrícia Milagres
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB


Profa. Dra. Edimar Aparecida Filomeno Fontes
Universidade Federal de Viçosa - UFV


Profa. Dra. Débora Cristina Sampaio de Assis
Escola de Veterinária - UFMG

Belo Horizonte, 22 de dezembro de 2016.

*Aos meus pais, João e Maria, e ao meu
marido Leonardo, dedico.*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pela liberação parcial da carga horária de trabalho para cursar o doutorado e por incentivar o desenvolvimento profissional.

À Divisão de Vigilância Sanitária (DIVISA) do Instituto Octávio Magalhães (IOM), coordenador Kléber Baptista e a chefe do Serviço de Química, Tânia Mara Amâncio Peixoto Guerra, por permitirem a utilização das instalações físicas da DIVISA e apoiarem o desenvolvimento desta tese.

À equipe do Laboratório de Química Bromatológica (LQB) /DIVISA/IOM/FUNED, pela colaboração e parceria em todas as etapas deste trabalho. Em especial à pesquisadora Sara Araújo Valladão e à técnica Priscila Alves Lima.

Ao Serviço de Microscopia de Produtos do IOM-FUNED, pesquisadoras Maria Gorette Resende Duarte, Virgínia Del Carmen e Júlia Cecília Pereira Coura, pelo auxílio e empréstimo de equipamentos.

À Merck Brasil, Caio Gomes e Aline Barros pelo treinamento na utilização dos kits e disponibilização do equipamento Reflectoquant[®].

À Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB), localizada no município de Igarapé – Minas Gerais, pertencente à Escola da Veterinária da UFMG, pela disponibilização do leite *in natura*.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais (LANAGRO-MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Pesquisadores Eduardo Gonçalves Esteves e Flávia Santos Coelho, pela colaboração e fornecimento de kits para a validação do método reflectométrico.

Ao Departamento de Polícia Federal (DPF) e Superintendência da Polícia Federal em Pernambuco, peritos Jorge Jardim Zacca, Sérgio Ricardo Silva Cibreiros de Souza e Valéria Espíndola de Lima Cavalcanti de Lira, e delegada Mariana Cavalcanti de Sousa, pela colaboração na coleta de amostras de leite no estado de Pernambuco, aquisição de insumos, planejamento e realização de ensaios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e oportunidade de participar do Programa de Apoio aos Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais Brasileiras (REUNI).

À Secretaria do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG e Secretaria do PPGCA pelo apoio administrativo.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de aprender, evoluir e recomeçar a cada dia.

À minha querida família, em especial aos meus pais, João e Maria, que em sua simplicidade e demasiado esforço, proporcionaram a mim e aos meus irmãos os mais sublimes exemplos e todas as condições necessárias para que pudéssemos estudar, realizar nossos sonhos, trilhar os nossos próprios caminhos e principalmente, sermos pessoas de bem, como eles são.

Ao meu marido Leonardo, parceiro de todas as horas, em todos os projetos dessa vida. Agradeço sua compreensão, apoio, amor e dedicação.

Ao orientador, professor Dr. Roberto Gonçalves Junqueira, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e, sobretudo pelo caráter admirável. Minha imensa gratidão por toda sua dedicação e esforço, o que me faz reconhecê-lo como verdadeiro “mestre”.

À Coorientadora, professora Dra. Silvana da Motta, pela oportunidade de iniciação no curso de doutorado e pelas valiosas contribuições durante esta longa caminhada.

Aos professores de toda a minha vida estudantil, por compartilharem seus conhecimentos e seus valores, e contribuírem para o meu desenvolvimento moral e intelectual. Em especial às professoras do programa PPGCA, Dras. Raquel L. B. de Araújo, Renata Adriana Labanca e Scheilla V. C. S. Ferreira, pela agradável convivência, parceria e pelos laços de amizade construídos.

Ao professor PhD. Sebastião Cesar Cardoso Brandão, por ter dedicado uma vida inteira de trabalho em prol à qualidade do leite, pelo seu exemplo profissional inquestionável, por todas as oportunidades de aprendizado que me proporcionou ao longo da caminhada acadêmica e principalmente, por ter plantado a sementinha deste trabalho, há alguns anos atrás.

Aos membros da banca examinadora, professoras Dras. Débora Cristina Sampaio de Assis, Edimar Aparecida Filomeno Fontes e Maria Patrícia Milagres, pela simpatia, disponibilidade e colaboração para o enriquecimento deste trabalho.

Às colaboradoras: Cristiane Monteiro Pinto, Priscila Alves Lima e Sara Araújo Valladão. A dedicação e o trabalho de vocês foram fundamentais e indispensáveis para a realização desta tese. Meu eterno reconhecimento e agradecimento!

A todos que fazem ou fizeram parte dos “Bromatoletes”, em especial a Adriana Silva Vilela, Alysson Gustavo Lima do Nascimento, Cristiane Lúcia Goddard, Cristiane Monteiro Pinto, Flávio Rodrigues Pereira, Gizele Barrozo Ribeiro, Liliane Fernandes dos Santos, Luciana Rabelo Ferreira, Priscila Alves Lima e Sara Araújo Valladão, pelos adoráveis 10 anos de convivência, amizade e por contribuírem, cada um a seu modo, nessa equipe que de tão especial considero como parte da família.

As minhas amigas quase irmãs Fabiana e Veridiana, que mesmo distantes geograficamente estão sempre presentes.

Agradeço também ao Brasil e à população brasileira, que me proporcionaram o acesso à educação gratuita de qualidade, desde minha alfabetização até o doutorado. Tenho muito orgulho de sempre ter estudado em escolas públicas. A educação tem o poder de mudar as pessoas e conseqüentemente o mundo em que vive, assim como foi ferramenta de transformação na minha própria vida.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquentada e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

João Guimarães Rosa

RESUMO

Foi investigado o emprego potencial da avaliação do teor de ácido láctico nos leites *in natura* e UHT como indicador de qualidade e sua relação com a acidez titulável. O desempenho de métodos oficiais para detectar e determinar a adulteração do leite por adição de neutralizantes também foi avaliado. O desempenho dos métodos qualitativos do ácido rosólico e da fenolftaleína foi verificado pela avaliação das taxas de resultados falsos positivos, seletividade, sensibilidade, confiabilidade, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância. Os métodos quantitativos de alcalinidade das cinzas, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e arranjo de fotodiodos para determinar ácidos orgânicos, e reflectometria para análise de ácido láctico foram avaliados pela seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, veracidade, repetibilidade e precisão intermediária. Os métodos cromatográfico e reflectométrico foram aplicados em amostras de leite *in natura* e UHT, coletadas nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil. Os métodos oficiais apresentaram desempenho insatisfatório. Somente foi possível detectar a presença de neutralizantes da acidez no leite em níveis elevados (0,050 g/100 mL de hidróxido de sódio; 0,300 g/100 mL de bicarbonato de sódio e maior que 0,080 g/100 mL de carbonato de sódio), para os quais a acidez titulável já havia extrapolado os limites inferiores previstos na legislação. Falta de seletividade na presença de estabilizantes utilizados em leite UHT também foi observada no método de alcalinidade das cinzas. Os métodos cromatográfico e reflectométrico para a quantificação do ácido láctico foram considerados adequados ao propósito de uso e apresentaram correlação satisfatória, sendo o método reflectométrico mais vantajoso em relação à sensibilidade, variabilidade de resultados, praticidade e menor tempo de análise. Foram determinados os teores de ácido láctico ($71,8 \pm 43,1$ mg/L), cítrico ($2.503,8 \pm 245,5$ mg/L), orótico ($83,9 \pm 7,9$ mg/L) e acidez titulável ($0,16 \pm 0,01$ g/100 mL) em 54 amostras de leite UHT, adquiridas em estabelecimentos comerciais de Curitiba, Belo Horizonte e Recife. Foi observada maior variabilidade para o ácido láctico e falta de correlação entre os teores deste com a acidez titulável. Diferentes faixas de valores de ácido láctico foram observadas para leite *in natura* ($8,1 \pm 6,1$ mg/L) e UHT ($103,3 \pm 63,2$ mg/L) de uma mesma região, enquanto a acidez titulável foi semelhante ($0,16 \pm 0,02$ g/100 mL). O teor de ácido láctico aumentou 45 vezes durante a acidificação controlada do leite (37 ± 1 °C/9 horas), ao contrário dos teores dos ácidos orótico e cítrico que permaneceram constantes. Evidenciou-se a importância da avaliação do ácido láctico no monitoramento do leite, sua vantagem em relação a acidez titulável e a necessidade de estabelecer valores de referência para um monitoramento eficaz.

Palavras-chave: ácido rosólico; fenolftaleína; alcalinidade das cinzas; cromatografia; reflectometria; acidez titulável.

ABSTRACT

The potential use of lactic acid content *in natura* and UHT milk as a indicator of quality and its relation to titratable acidity were investigated. The performance of official methods to detect and determine milk adulteration by the addition of neutralizers was also evaluated. The performance of the rosolic acid and phenolphthalein qualitative methods was verified by evaluating the rates of false positive results, selectivity, sensitivity, reliability, loss of reliability region, limit of detection, agreement and concordance. The quantitative methods of ash alkalinity, high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and photodiode array (HPLC-UV/DAD) to determine organic acids, and reflectometry for lactic acid analysis were evaluated through the selectivity, linearity, detection and quantification limits, veracity, repeatability and intermediate precision. The chromatographic and reflectometric methods were applied to samples of fresh and UHT milk collected in the south, southeast and northeast regions of Brazil. The official methods presented poor performance. It was only possible to detect the presence of acidity neutralizers in milk at high levels (0.050 g/100 mL of sodium hydroxide; 0.300 g/100 mL of sodium bicarbonate and greater than 0.080 g/100 mL of sodium carbonate), for which the titratable acidity had already exceeded the lower limits regulated by the legislation. Lack of selectivity in the presence of UHT milk stabilizers was also observed in the ash alkalinity method. The chromatographic and the reflectometric methods for quantification of lactic acid were considered adequate for the purpose of use and presented satisfactory correlation, being the reflectometric method more advantageous in relation to the sensitivity, variability of results, practicality and less time of analysis. The content of lactic acid (71.8 ± 43.1 mg/L), citric acid ($2,503.8 \pm 245.5$ mg/L), orotic acid (83.9 ± 7.9 mg/L) and titratable acidity (0.16 ± 0.01 g/100 mL) were determined in 54 samples of UHT milk purchased from commercial establishments in Curitiba, Belo Horizonte and Recife. Greater variability was observed for lactic acid and a lack of correlation between the levels of this acid and the titratable acidity. Different ranges of lactic acid values were observed for *in natura* (8.1 ± 6.1 mg/L) and UHT (103.3 ± 63.2 mg/L) milk of the same region, whereas the titratable acidity was similar (0.16 ± 0.02 g/100 mL). Lactic acid content increased 45-fold during controlled acidification of the milk (37 ± 1 °C/9 hours), unlike the contents of the citric and orotic acids that remained constant. The importance of lactic acid evaluation in milk monitoring, its advantage in relation to titratable acidity and the need to establish reference values for effective monitoring were evidenced.

Keywords: rosolic acid; phenolphthalein; alkalinity of the ash; chromatography; reflectometry; titratable acidity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1. Produção de leite in natura no Brasil, em toneladas, entre o período de 2010 e 2014.	27
Figura 3.3. Estrutura química dos principais ácidos orgânicos presentes em leite e derivados.....	40
Figura 3.4. Esquema de reações bioquímicas envolvidas da determinação de ácido láctico por métodos enzimáticos.	48
Figura 4.1. Fluxogramas para a pesquisa de neutralizantes da acidez em leite, utilizando o método do ácido rosólico (A) e o método da fenolftaleína (B).....	66
Figura 4.2. Fluxograma para a determinação do resíduo mineral fixo e da alcalinidade das cinzas em leite.	67
Figura 4.3. Representação do delineamento experimental inteiramente casualizado para a avaliação do desempenho dos métodos qualitativos para detecção de neutralizantes em leite.	71
Figura 4.4. Resultados analíticos para a pesquisa de neutralizantes em leite acidificado, utilizando o método do ácido rosólico: controle positivo (1); amostra de leite <i>in natura</i> acidificada sem adição de neutralizantes (2); amostras de leite <i>in natura</i> acidificadas, adicionadas de bicarbonato de sódio nas concentrações de 0,005 g/100 mL (3), 0,010 g/100 mL (4), 0,020 g/100 mL (5), 0,060 g/100 mL (6), 0,150 g/100 mL (7) e 0,300 g/100 mL (8).....	75
Figura 4.5. Valores de acordância (n=10) e concordância (n=30) para o método do ácido rosólico, em função dos diferentes tipos e concentrações de neutralizantes estudados.....	81
Figura 4.6. Valores de acordância (n=10) e concordância (n=30) para o método da fenolftaleína, em função dos diferentes tipos e concentrações de neutralizantes estudados.....	82
Figura 5.1. Cromatogramas típicos obtidos para o solvente (a), pool de padrões em água (b), leite <i>in natura</i> (c) e leite <i>in natura</i> adicionado dos ácidos orgânicos de interesse (d), 1: ácido láctico, 2: ácido orótico e 3: ácido cítrico.	109
Figura 5.2. Comparação entre as curvas de calibração de ácidos orgânicos em água (A) e em extrato de leite (B).	112
Figura 5.3. Perfil de ocorrência de acidez titulável e ácidos orgânicos, láctico, cítrico e orótico no leite UHT brasileira (n = 54).....	117

Figura 5.4. Variação dos teores de ácido láctico, cítrico e orótico e acidez titulável durante a acidificação natural do leite.	122
Figura 5.5. Teores de acidez titulável, expressa em gramas de ácido láctico por 100 mL de leite e ácido láctico em leite UHT (n = 54).....	124
Figura 6.1. Avaliação da correlação entre os métodos CLAE e reflectométrico: Regressão de <i>Passing-Bablok</i> (A) e gráfico de <i>Bland-Altman</i> (B). Eixo X: valores em mg/L de ácido láctico; eixo Y: diferença em percentual entre os dois métodos (n = 50).	150
Figura 6.2. Perfil de ocorrência de ácido láctico e acidez titulável no leite in natura (a) (n = 41) e UHT (b) (n = 24).....	155
Figura 6.3. Valores médios dos teores de acidez titulável e ácido láctico para amostras de leite in natura (n=41) e UHT (n = 24). Intervalo entre 0,14 a 0,18 g/100 mL: valores de referência para acidez titulável em leite fluido no Brasil.	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Ocorrência de neutralizantes (detectados por métodos clássicos) e outros adulterantes em leite e derivados.....	34
Tabela 3.2. Comparação dos teores de ácidos orgânicos em amostras de leite em pó.	49
Tabela 3.3. Teores dos ácidos láctico, cítrico e orótico em leite, reportados na literatura.	50
Tabela 4.1. Descrição do preparo de soluções padrão para cada neutralizante estudado: níveis de concentração, alíquotas de solução e volume de leite utilizado.	70
Tabela 4.2. Equações para obtenção das taxas de falso positivo (TFP), falso negativo (TFN), sensibilidade (TSB), seletividade (TST) e confiabilidade (TCF).	72
Tabela 4.3. Taxas de falso-negativos, falso-positivos, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade obtidas na detecção de neutralizantes da acidez pelos métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína e estimativas das médias da acidez titulável, em amostras de leite <i>in natura</i> acidificadas em condições controladas.....	76
Tabela 4.4. Taxas de resultados falso positivos e confiabilidade obtidas para amostras de leite <i>in natura</i> acidificadas, adicionadas dos estabilizantes de leite UHT, para a avaliação da seletividade do método do ácido rosólico.....	84
Tabela 4.5. Taxas de resultados falso positivos e confiabilidade obtidas para amostras adicionadas dos estabilizantes de leite UHT na ausência e na presença de analito, na avaliação da seletividade do método da fenolftaleína.....	84
Tabela 4.6. Teores de alcalinidade das cinzas em leite <i>in natura</i> com e sem adição de estabilizantes, desvios padrão relativos em condições de repetibilidade, precisão intermediária, valores de HorRat.....	87
Tabela 4.7. Teores de acidez titulável, resíduo mineral fixo e alcalinidade das cinzas em leite <i>in natura</i> fresco, acidificado, e acidificado adicionado de diferentes concentrações de hidróxido de sódio.	90
Tabela 5.1. Faixa de linearidade, coeficientes da curva de calibração em leite e testes estatísticos referentes ao método de determinação de ácidos orgânicos em leite por CLAE-UV/DAD.	111

Tabela 5.2. Avaliação das interseções e das inclinações das curvas de calibração dos analitos (ácido láctico, ácido cítrico e ácido orótico) no solvente aquoso e na matriz leite para a determinação de ácidos orgânicos por CLAE-UV/DAD.	113
Tabela 5.3. Veracidade, desvios padrão relativos em condições de repetibilidade e de precisão intermediária, valores de HorRat e incerteza expandida em percentual para a determinação de ácidos orgânicos em leite por CLAE-UV/DAD.	115
Tabela 5.4. Parâmetros estimados para a distribuição dos ácidos láctico, cítrico e orótico e da acidez titulável em leite UHT (n = 54).	118
Tabela 6.1. Avaliação da seletividade do método reflectométrico na presença de ácidos orgânicos, estabilizantes e neutralizantes da acidez.	144
Tabela 6.2. Estatísticas relacionadas à regressão linear simples do método reflectométrico para a determinação de ácido láctico.	145
Tabela 6.3. Veracidade e faixa de recuperação, desvio padrão relativo em condições de repetibilidade, precisão intermediária, valores de HorRat e incerteza expandida para a determinação de ácido láctico em leite pelo método reflectométrico.	148
Tabela 6.4. Estatística descritiva para o teor de ácido láctico em leite estimado pelos métodos cromatográfico (CLAE) e reflectométrico (n = 50).	151
Tabela 6.5. Informações sobre o rebanho e produtividade das 41 propriedades selecionadas para estudo sobre a concentração intrínseca de ácido láctico em leite <i>in natura</i>	153
Tabela 6.6. Comparação das distribuições dos teores de ácido láctico e acidez titulável para o leite <i>in natura</i> (n = 41) e UHT (n = 24).	156
Tabela 1. Caracterização físico-química de todas as bateladas de coleta de leite <i>in natura</i> , na Fazenda Experimental Professor Hélio Babosa – escola de Veterinária/UFMG em Igarapé - MG, utilizadas nos experimentos.	181
Tabela 2. Resultados positivos obtidos na avaliação dos métodos qualitativos para pesquisa de neutralizantes da acidez em leite, utilizados para a determinação das taxas, do limite de detecção, da região de perda de confiabilidade, da acordância e da concordância (n = 30 para cada nível de concentração).	182
Tabela 3. Acordância e concordância estimadas na detecção de neutralizantes da acidez, pelos métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína (n = 30 para cada nível de concentração).	183
Tabela 4. Condições analíticas estudadas na etapa de otimização do método cromatográfico para análise de ácidos orgânicos em leite fluido.	184

Tabela 5. Valores médios para os ácidos láctico, orótico e cítrico em amostras comerciais de leite UHT, pelo método CLAE.	185
Tabela 6. Valores médios para os ácidos láctico, orótico e cítrico analisados por CLAE, em leite in natura submetido à fermentação controlada a 37 ± 1 °C por até 9 horas.	187

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACO	Acordância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AT	Acidez titulável
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCC	Coeficiente de correlação de concordância de Lin
CG	Cromatografia gasosa
CLAE-UV/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e arranjo de fotodiodos
CON	Concordância
CU	Customs Union
CV	Coeficiente de variação
DIVISA	Divisão de Vigilância Sanitária
DPDC/PROCON	Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor
DPF	Departamento de Polícia Federal
DPR _r	Desvio padrão relativo em condições de repetibilidade
DPR _R	Desvio padrão relativo em condições de precisão intermediária
EAC	East African Community
EC	Comission European
EU	European Union
FAFAR	Faculdade de farmácia
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FEPHB	Fazenda experimental professor Hélio Barbosa
FIL-IDF	Federação Internacional de Laticínios - International Dairy Federation
FR	Fase reversa
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
g	Gramma
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia

IOM	Instituto Octávio Magalhães
ISO-IDF	International Organization for Standardization and International Dairy Federation
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JCGM	Joint Committee for Guides in Metrology
K	Fator de abrangência
L	Litro
LA	Leite acidificado
LACEN-MG	Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LD	Limite de detecção
LDH	Lactato desidrogenase
LOD	Lactato oxidase
LQ	Limite de quantificação
LQB	Laboratório de Química Bromatológica
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MPE	Ministério Público Estadual
MPF	Ministério Público Federal
MRC	Material de referência certificado
N	Normalidade
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
nm	Nanômetro
nº	Número
P	Percentil
p	Probabilidade
PCFL	Programa Nacional de Combate à Fraude do Leite
PF	Polícia Federal
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPGCA	Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

r	Coeficiente de correlação produto-momento de Pearson
RBC	Rede brasileira de calibração
RPC	Região de perda de confiabilidade
TCF	Taxa de confiabilidade
TFN	Taxa de falso negativo
TFP	Taxa de falso positivo
TI	Troca iônica
TSB	Taxa de sensibilidade
TST	Taxa de seletividade
U	Incerteza expandida
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UHT	<i>Ultra high temperature</i>
USA	United States of America
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 Leite	26
3.2 Adulterações, fraudes e falsificações em alimentos	28
3.3.1 Adulterações e fraudes em leite	30
3.3.1.1 Fraudes por adição de neutralizantes da acidez	31
3.3.2 Ações de combate à fraude do leite no Brasil.....	37
3.3 Ácidos orgânicos em leite e derivados.....	38
3.3.1 Ácido láctico	41
3.3.2 Ácido orótico	42
3.3.3 Ácido cítrico	43
3.3.4 Determinação de ácidos orgânicos em leite e derivados.....	44
3.3.4.1 Acidez titulável (AT).....	45
3.3.4.2 Métodos químicos colorimétricos	46
3.3.4.3 Métodos cromatográficos	46
3.3.4.4 Métodos enzimáticos.....	47
3.3.5 Teores de ácidos orgânicos em leite	48
3.4 Confiabilidade de metodologias analíticas	52
3.4.1 Validação	52
3.4.2 Parâmetros de desempenho para métodos quantitativos.....	54
3.4.2.1 Sensibilidade e seletividade	54
3.4.2.2 Linearidade.....	54
3.4.2.3 Efeito de matriz	55
3.4.2.4 Limites de detecção e limite de quantificação	55
3.4.2.5 Veracidade e precisão	56
3.4.3 Parâmetros de desempenho para métodos qualitativos	57
3.4.4 Incerteza de medição.....	58
4 CAPÍTULO 1. DESEMPENHO DE MÉTODOS OFICIAIS PARA VERIFICAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DO LEITE POR ADIÇÃO DE NEUTRALIZANTES	60

RESUMO.....	60
4.1 Introdução	61
4.2 Material e métodos	62
4.2.1 Amostras.....	62
4.2.2 Equipamentos.....	63
4.2.3 Reagentes e soluções	63
4.2.4 Metodologias analíticas	64
4.2.5 Avaliação do desempenho dos métodos oficiais qualitativos para análise de neutralizantes em leite	68
4.2.5.1 Delineamento experimental para avaliação das taxas de falso positivo, falso negativo, sensibilidade, seletividade e confiabilidade, seletividade, limite de detecção, acordância e concordância	68
4.2.5.2 Avaliação complementar da seletividade	72
4.2.6 Avaliação do desempenho do método oficial quantitativo de determinação da alcalinidade das cinzas	73
4.2.6.1 Seletividade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e precisão intermediária.....	73
4.3 Resultados e Discussão	74
4.3.1 Desempenho de métodos oficiais qualitativos para análise de neutralizantes em leite.....	75
4.3.1.1 Teores de acidez titulável, taxas de falso positivo, falso negativo, sensibilidade, seletividade e confiabilidade, região de perda de confiabilidade e limites de detecção.....	75
4.3.1.2 Acordância e Concordância	79
4.3.1.3 Seletividade complementar	83
4.3.2 Desempenho do método oficial quantitativo de determinação da alcalinidade das cinzas	85
4.4 Conclusão.....	91
REFERÊNCIAS.....	91
5 CAPÍTULO 2. VALIDAÇÃO E MONITORAMENTO DOS TEORES DE ÁCIDOS LÁTICO, ORÓTICO E CÍTRICO EM LEITE FLUIDO UTILIZANDO CLAE-UV/DAD96	
RESUMO.....	96
5.1 Introdução	97
5.2 Material e Métodos	99

5.2.1 Amostras.....	99
5.2.2 Reagentes e soluções	100
5.2.3 Condições cromatográficas	101
5.2.4 Preparo de amostras para a determinação dos ácidos orgânicos por CLAE-UV/DAD.....	101
5.2.5 Validação	102
5.2.5.1 Seletividade.....	102
5.2.5.2 Linearidade e efeito de matriz	103
5.2.5.3 Limites de detecção e quantificação, veracidade, repetibilidade e precisão intermediária.....	104
5.2.6 Estimativa da incerteza de medição	105
5.2.7 Ocorrência dos ácidos láctico, cítrico e orótico e acidez titulável em leite UHT brasileiro.....	106
5.2.8 Efeito da acidificação do leite nos teores de ácidos orgânicos e acidez titulável.....	107
5.3 Resultados e discussão	107
5.3.1 Validação	107
5.3.1.1 Seletividade.....	107
5.3.1.2 Linearidade e efeito de matriz	110
5.3.1.3 Limites de detecção e quantificação, veracidade, repetibilidade e precisão intermediária.....	113
5.3.2 Estimativa da incerteza de medição	116
5.3.3 Perfil de ácidos orgânicos e acidez titulável em leite UHT.....	116
5.3.4 Efeito da fermentação do leite nos teores de ácidos orgânicos e acidez titulável	121
5.3.5 Teores de ácido láctico e acidez titulável em leite	122
5.4 Conclusão	124
REFERÊNCIAS.....	125
6 CAPÍTULO 3. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE	131
6.1 Introdução	132
6.2 Material e métodos	134
6.2.1 Amostras.....	134

6.2.2 Kits, reagentes e soluções.....	135
6.2.3 Ensaio reflectométrico	136
6.2.4 Validação e estimativa da incerteza de medição	136
6.2.4.1 Seletividade.....	137
6.2.4.2 Linearidade.....	138
6.2.4.3 Limites, veracidade, precisão e estimativa da incerteza de medição	138
6.2.5 Correlação entre os métodos reflectométrico e CLAE	140
6.2.6 Estabilidade do teor do ácido láctico em leite <i>in natura</i> em diferentes condições de armazenamento	141
6.2.7 Ácido láctico em leite <i>in natura</i> e após processamento UHT – estudo de caso sobre a avaliação do teor como ferramenta de controle de qualidade	142
6.3 Resultados e Discussão	143
6.3.1 Validação	143
6.3.1.1 Seletividade.....	143
6.3.1.2 Linearidade.....	145
6.3.1.3 Limites, veracidade, precisão e estimativa da incerteza de medição	146
6.3.2 Comparação entre os métodos reflectométrico e CLAE	149
6.3.3 Estabilidade do teor do ácido láctico em leite <i>in natura</i> em diferentes condições de armazenamento	152
6.3.4 Ácido láctico em leite <i>in natura</i> e após processamento UHT – estudo de caso sobre a avaliação do teor como ferramenta de controle de qualidade	153
6.4 Conclusão	158
REFERÊNCIAS.....	159
7 CONCLUSÕES INTEGRADAS	164
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	165
REFERÊNCIAS.....	166
APÊNDICE.....	181

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é uma atividade agropecuária das mais importantes no mundo, desempenhando fundamental papel econômico e de sustentabilidade (FIL- IDF, 2013). Em 2015, a produção mundial de leite estimada foi de 800 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016). Destas, cerca de 35 milhões foram produzidas no Brasil, que se enquadra entre os 10 maiores produtores mundiais (IBGE, 2015).

O leite é um alimento relevante na alimentação humana, considerado nutricionalmente completo, composto de carboidratos de boa qualidade, gorduras, proteínas, minerais e vitaminas (AFZAL *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2016; AWAN *et al.* 2014; PARK; HAENLEIN, 2013).

Entretanto, a composição rica e diversificada do leite, o pH próximo da neutralidade e a elevada quantidade de água livre favorecem tanto o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes como de patogênicos (MOURAD; BETTACHE; SAMIR, 2014; TANGRI; CHATLI, 2014). Dentre os microrganismos deteriorantes, as bactérias do ácido lático são as mais favorecidas. Elas são responsáveis por fermentar a lactose, produzindo ácido lático e conseqüentemente alterando a composição e o perfil de ácidos orgânicos e da acidez titulável no leite (QUIGLEY *et al.*, 2011; QUIGLEY L., *et al.*, 2013). O desenvolvimento microbiano e a produção do ácido lático impactam a qualidade do leite em suas características sensoriais, nas propriedades nutricionais, no processamento de derivados e em sua durabilidade (WOUTERS *et al.*, 2002).

A acidez titulável, expressa em concentrações de ácido lático, é um indicador físico-químico comumente utilizado e regulamentado em vários países para verificar a qualidade do leite e ocorrência de acidificação (BRASIL, 2011; CHINA, 2010; CU, 2013). Todavia, a acidez titulável pode ser afetada pela adição de neutralizantes em leite, sobretudo quando são realizadas adições discretas, suficientes apenas para corrigir valores que extrapolam os limites regulamentares previstos (KUMAR *et al.*, 2016; MILAGRES *et al.*, 2012; SOWMYA, *et al.*, 2013). Vários estudos recomendam monitorar a qualidade do leite e o desenvolvimento microbiano pela avaliação dos teores de ácido lático ou lactato. No entanto, não há valores de referência estabelecidos e estudos sobre os teores de ácido lático no leite são escassos, sobretudo para leites fluidos (BORI *et al.*, 2012; SHAPIRO; SILANIKOVE, 2010; ZAYDAN; DION; BOUJTITA, 2004).

Métodos clássicos para a pesquisa de neutralizantes, como o método do ácido rosólico, da fenolftaleína e da alcalinidade das cinzas, são utilizados e publicados como oficiais em alguns países (BRASIL, 2006; INDIA, 2012). Apesar da utilização frequente na avaliação de adulterações, poucos são os estudos sobre o desempenho destes métodos, sobretudo utilizando procedimentos recomendados para validação e verificação do desempenho de metodologias (AZIZ; KHAN, 2014; DEBNATH, *et al.*, 2015; GONDIM, 2016; SILVA *et al.*, 2015; TAMANINI, 2012; WANDERLEY *et al.*, 2012).

Tendo em vista a importância econômica e nutricional do leite e a necessidade de estabelecer indicadores que permitam a avaliação mais eficaz de sua qualidade, é necessário estudar o desempenho dos métodos oficiais para a investigação de adulterações em leite, bem como desenvolver e validar metodologias para a determinação do ácido láctico. O estudo sobre a ocorrência e as modificações dos teores de ácido láctico no leite fluido pode auxiliar no estabelecimento de valores de referência para o monitoramento da deterioração do leite por ação microbiana e na detecção, com maior sensibilidade, da adulteração por uso de neutralizantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização do teor de ácido láctico como indicador de qualidade do leite, a partir do desenvolvimento e validação de metodologias analíticas e do estudo da ocorrência e das modificações desse indicador em leite fluido.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o desempenho dos métodos oficiais qualitativos do ácido rosólico e da fenoltaleína, e do método oficial quantitativo da alcalinidade das cinzas na determinação da adulteração do leite por adição de neutralizantes.
- Otimizar, validar e estimar a incerteza de medição de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e arranjo de fotodiodos (CLAE-UV/DAD) para determinar simultaneamente os ácidos orgânicos láctico, orótico e cítrico em leite.
- Validar e estimar a incerteza de medição de um método reflectométrico rápido para a quantificação de ácido láctico em leite.
- Determinar a correlação entre o método cromatográfico e reflectométrico.
- Avaliar as modificações ocorridas nos teores de ácidos orgânicos e acidez titulável em leite *in natura* em diferentes condições de armazenamento (refrigeração e congelamento) e submetido à acidificação controlada.
- Avaliar o perfil dos ácidos láctico, orótico e cítrico e da acidez titulável em leite UHT de diferentes regiões do país.
- Determinar e relacionar a concentração intrínseca de ácido láctico e acidez titulável em leite *in natura* e em leite UHT de uma mesma região.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite

O leite é uma secreção mamária normal, oriunda da ordenha de um ou mais animais em lactação, sem adição ou subtração de qualquer substância, destinado ao consumo como leite fluido ou para posterior transformação (BRASIL, 2011; CODEX, 2011).

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma dispersão coloidal complexa de glóbulos de gordura, micelas de caseína e proteínas de soro de leite numa solução aquosa de lactose, sais, minerais e outros compostos (McCARTHY; SINGH, 2009; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Além dos nutrientes citados, muitos outros encontram-se no leite em pequenas quantidades e possuem importantes propriedades fisiológicas, tais como enzimas, hormônios, fatores de crescimento, nucleotídeos e peptídeos bioativos (HAUG; HOSTMARK; HARSTAD, 2007; PARK; HAENLEIN, 2013). A composição do leite tem uma natureza dinâmica e varia devido a fatores relacionados à genética (espécie, raça e indivíduo), estágio de lactação, estado de saúde do animal e fatores ambientais (alimentação, clima e sazonalidade) (ONTSOUKA; BRUCKMAIER; BLUM, 2003; PARK; HAENLEIN, 2013).

O leite possui elevado valor nutricional devido ao equilíbrio dos nutrientes que o constitui, sendo seu consumo recomendado para compor uma alimentação saudável e adequada. Entre os tipos de leite de diferentes espécies, o de vaca é o de maior consumo mundial, sendo este estimado em mais de 80% no ano de 2010 (FAO, 2013; MOURAD, 2014). Sua composição média em 100 mL corresponde a valores entre 85,3 e 88,7 g de água, 3,8 e 5,3 g de lactose, 2,5 e 5,5 g de gorduras, 2,3 e 4,4 g de proteínas, 0,57 e 0,83 g de sais e minerais e 0,12 e 0,21 g de ácidos orgânicos (FOX; McSWEENEY, 1998; PEREIRA, 2014; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A produção e a industrialização do leite são muito importantes na economia mundial. Em uma escala global, a produção de leite *in natura* no mundo representou quase 10% do valor de todos os produtos agropecuários produzidos em 2010 (FIL-IDF, 2013).

Estados Unidos, Índia, China, Brasil e Rússia são os cinco maiores produtores mundiais de leite e entre os anos de 2010 e 2014 produziram juntos mais

de 250 mil toneladas de leite por ano. Neste mesmo período, foi observado um aumento anual médio de aproximadamente 3,4% na produção brasileira (FAOSTAT, 2016), o que evidencia a importância deste alimento para o agronegócio brasileiro (**Figura 3.1**).

Além de ser um importante produtor, o Brasil também se destaca em relação ao consumo de leite e derivados, estando entre os dez países que mais consomem leite fluido. A população brasileira consome individualmente cerca de 4% de todo o volume de leite consumido no mundo (KARTHEEK, *et al.*, 2011; USDA, 2016).

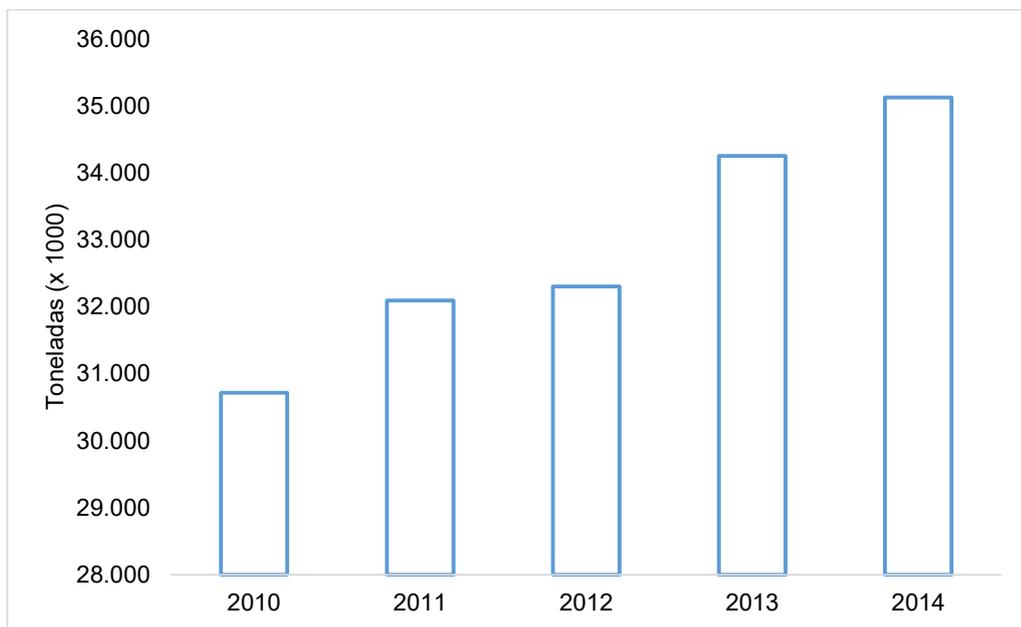


Figura 3.1. Produção de leite *in natura* no Brasil, em toneladas, entre o período de 2010 e 2014.

FONTE: FAOSTAT, 2016.

Um fator determinante para garantir a qualidade e a segurança do consumo do leite e seus derivados é a qualidade do leite *in natura*, visto que em condições normais de sanidade animal, o leite é estéril enquanto estiver no interior das glândulas mamárias. Contudo, a partir do momento em que o leite é ordenhado e entra em contato com o ambiente externo, se iniciam as numerosas possibilidades de contaminação, sejam elas microbiológicas, físicas ou químicas, e de adulterações. Portanto, procedimentos adequados de obtenção e processamento do leite devem ser garantidos desde o início da cadeia produtiva, sendo de fundamental importância para minimizar a ocorrência de deterioração ou

contaminação e garantir a qualidade do produto final (LEJEUNE; RAJALA-SCHULTZ, 2009; NADA *et al.*, 2012).

No Brasil, a produção e o beneficiamento do leite *in natura* são regulamentados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). O Decreto nº 30.691/1952 regulamenta a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal - RIISPOA, entre eles o leite. Esse documento apresenta os requisitos necessários aos estabelecimentos produtores, os procedimentos gerais de inspeção e fiscalização, os padrões de identidade e qualidade e as informações sobre registros de produtos, embalagens, rotulagem e carimbos de inspeção (BRASIL, 1952).

Já a Instrução Normativa nº 62/2011 normaliza as atividades relacionadas à produção, coleta do leite *in natura* refrigerado e seu transporte a granel, identidade e qualidade do leite *in natura* refrigerado e pasteurizado. Requisitos para controle da sanidade do rebanho, para o armazenamento e transporte do leite *in natura*, para avaliação da composição e qualidade do leite, para o monitoramento do leite nas propriedades rurais e na indústria dentre outros, estão previstos na referida legislação (BRASIL, 2011).

3.2 Adulterações, fraudes e falsificações em alimentos

Os alimentos estão sujeitos à ocorrência de adulterações, fraudes e falsificações. Segundo o artigo 879 do RIISPOA (BRASIL, 1952) considera-se que ocorreu uma adulteração quando os produtos tenham sido elaborados em condições que contrariam as especificações fixadas; quando no preparo dos produtos tenha sido empregada matéria-prima alterada ou impura; quando tenham sido empregadas substâncias de qualidade, tipo e espécie diferentes das da composição normal do produto, sem prévia autorização do órgão competente; quando os produtos tenham sido coloridos ou aromatizados sem prévia autorização e não conste declaração nos rótulos e quando houver a intenção dolosa em mascarar a data de fabricação. Já a fraude é definida como a alteração ou modificação total ou parcial de um ou mais elementos normais do produto de acordo com os padrões estabelecidos; como a realização de operações de manipulação e elaboração executadas com a intenção deliberada de estabelecer falsa impressão aos produtos fabricados; como a supressão de um ou mais elementos e substituição por outros visando aumento de

volume ou de peso, em detrimento da sua composição normal ou do valor nutritivo intrínseco; como a conservação com substâncias proibidas e como a especificação total, ou parcial na rotulagem de um determinado produto que não seja o contido na embalagem ou recipiente. Por fim, nomeia-se de falsificação quando os produtos forem elaborados, preparados e expostos no consumo com forma, caracteres e rotulagem que constituem processos especiais de privilégio ou exclusividade de outrem, sem que seus legítimos proprietários tenham dado autorização e quando forem usadas denominações diferentes das previstas no RIISPOA ou em fórmulas aprovadas (BRASIL, 1952).

A adulteração de alimentos é uma preocupação primordial para todos os envolvidos na cadeia produtiva: produtores, indústrias, consumidores e agências reguladoras. Sua ocorrência normalmente envolve a substituição ou diluição do alimento ou de matérias-primas com outros de menor valor comercial e nutricional. A adulteração não só diminui a qualidade dos alimentos e matérias primas alimentares, mas também pode resultar em uma série de efeitos nocivos à saúde (BANSAL, *et al.*, 2015; KALIVAS *et al.*, 2014).

A fraude de alimentos não configura um fenômeno contemporâneo e, provavelmente, é tão antiga quanto os sistemas de produção e processamento de alimentos. Os primeiros relatos de fraudes envolviam azeite, vinho, especiarias e chá. Esses mesmos alimentos continuam associados à fraude além de outros, como peixe, mel, leite e produtos lácteos, produtos à base de carne, sucos de frutas, bebidas alcoólicas, alimentos orgânicos, café e alimentos ultraprocessados. A maior parte das adulterações que ocorrem no mundo não é detectada, uma vez que geralmente não resultam em um risco à segurança dos alimentos e os desvios de qualidade nem sempre são percebidos pelo consumidor (BANSAL *et al.*, 2015; ELLIS, 2012; JOHNSON, 2014; MOORE, JOHN SPINK; LIPP, 2012).

Estudos sobre a ocorrência de adulterações de alimentos no período de 1980 a 2010 mostraram que azeite de oliva, leite, mel, açafraão, suco de laranja e café são os alimentos mais adulterados no mundo (MOORE; SPINK; LIPP, 2012; TAHKAPAA *et al.*, 2015).

A motivação principal para cometer a fraude é o ganho monetário ilícito. O tipo de alimento que pode ser adulterado é uma consideração secundária, pois é a oportunidade ou a viabilidade de cometer fraudes que geralmente desencadeia. Os alimentos mais comumente fraudados são aqueles de elevado valor comercial e

ou produzidos em grande escala mundial, como os já citados café, leite, mel e carne (CORDELLA *et al.*, 2002; KALIVAS *et al.*, 2014).

Apesar de existir a consciência de que adulterações em alimentos são frequentes, tanto por parte dos consumidores como por parte dos órgãos reguladores, a disponibilidade de informações sobre as fraudes detectadas e suas razões motivacionais ainda são limitadas. Neste contexto, Tähkää *et al.* (2015) enfatizaram a importância do estabelecimento de sistemas governamentais rápidos de alerta (a exemplo do Sistema de Alerta de Segurança para Gêneros Alimentícios - RASFF, da União Europeia) como uma das opções para diminuir e prevenir fraudes em alimentos. Segundo os autores, a implantação destes sistemas possibilita maior rapidez na comunicação do risco e a avaliação da existência de um padrão de adulterações, subsidiando o estabelecimento de políticas públicas mais adequadas.

Além de causar danos à qualidade e integridade dos produtos e colocar em risco a saúde do consumidor, quem adultera alimentos comete um crime contra a saúde pública. Segundo o Código Penal brasileiro, a falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de substâncias ou produtos alimentícios destinados ao consumo humano, tornando-os nocivos à saúde ou reduzindo-lhes o valor nutritivo é considerada crime hediondo, com pena de reclusão de até oito anos e multa. A pena se aplica tanto para quem adultera, como para quem expõe a venda no varejo ou no atacado o produto fraudado (BRASIL, 1998). Órgãos relacionados à defesa agropecuária (MAPA), à vigilância sanitária (ANVISA) e defesa e à proteção do consumidor (DPDC/PROCON) também consideram a adulteração de alimentos uma infração à lei e estabelecem penalidades em seus regulamentos específicos (BRASIL, 1952; BRASIL, 1969; BRASIL, 1990; MINAS GERAIS, 1999).

3.3.1 Adulterações e fraudes em leite

O Brasil se destaca no cenário mundial não somente por ser um dos maiores produtores e consumidores de leite, mas também pela frequência em que este alimento é alvo de adulterações e fraudes (HANDFORD; CAMPBELL; ELLIOTT, 2015). Segundo Kartheek, *et al.* (2011), a ocorrência de fraude no leite brasileiro podem atingir até 60% do total de leite produzido e os adulterantes mais utilizados são água, amido, neutralizantes, sal, açúcar, maltodextrina e soro de leite.

A fraude do leite também é bastante comum em outros países em desenvolvimento, como a Índia, a China e o Paquistão (HANDFORD; CAMPBELL; ELLIOTT, 2015; KARTHEEK, *et al.*, 2011; SWATHI; KAUSER, 2015).

O leite fluido pode ser fraudado com objetivos econômicos, como o aumento de volume (adição de água, soro e seus reconstituintes, como açúcares e cloretos) e também para corrigir desvios da qualidade relacionados ao desenvolvimento microbiano (adição de conservantes: formol, peróxido de hidrogênio e de neutralizantes: bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos) (AZIZ & KHAN, 2014; FINETE *et al.*, 2015; AHMAD, *et al.*, 2016; DURANTE *et al.*, 2016).

Souza *et al.* (2011) utilizaram metodologias quimiométricas e análise de componentes principais para investigar a presença dos adulterantes em leite. Amido, cloro, formol, peróxido de hidrogênio e urina foram pesquisados em 100 amostras de leite UHT produzidas nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Com exceção para o amido, foi detectada a presença de pelo menos um adulterante em todas as amostras analisadas.

3.3.1.1 Fraudes por adição de neutralizantes da acidez

A fraude do leite por adição de substâncias alcalinas é realizada para neutralizar a acidez produzida em decorrência do desenvolvimento microbiano. É sabido que o armazenamento refrigerado do leite retarda substancialmente o desenvolvimento microbiano, sobretudo dos microrganismos mesófilos, conservando sua qualidade. Logo, esse tipo de fraude estará sempre associada a falhas na aplicação das boas práticas de fabricação ao longo da cadeia produtiva do leite (AFZAL *et al.*, 2011; BRASIL, 2011; CODEX ALIMENTARIUS, 2011; CU, 2013; SINGH; GANDHI, 2015).

Hidróxido de sódio, bicarbonato e carbonato de sódio são os produtos químicos mais utilizados para este fim. Apesar de estas substâncias terem seu uso regulamentado como aditivo para vários derivados lácteos como o doce de leite e o leite condensado, seu uso em leite fluido, tanto *in natura* quanto processado, é ilícito (AFZAL *et al.*, 2011; BRASIL, 1952; BRASIL, 1997a; BRASIL, 2011; CODEX ALIMENTARIUS, 2011; SINGH; GANDHI, 2015).

A avaliação da fraude do leite por adição de substâncias alcalinas é tradicionalmente realizada com a utilização de metodologias baseadas nas

alterações provocadas no pH, na acidez e nas características do resíduo mineral fixo do leite. A pesquisa de neutralizantes pelos métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína e a determinação da alcalinidade das cinzas do leite são métodos clássicos e atualmente constam em publicações oficiais de países como Brasil e Índia (AOAC 1941; BRASIL 1981; BRASIL, 2006; INDIA, 1960; INDIA, 2015). Nos métodos que utilizam indicadores de pH, ao entrar em contato com a amostra, os indicadores reagem doando ou recebendo prótons, resultando na alteração configuração eletrônica e conseqüentemente na mudança de coloração do meio (BRASIL, 2006; INDIA, 2015).

O ácido rosólico (CID: 5100; $C_{19}H_{14}O_3$) é um indicador de concentração hidrogeniônica, com faixa de transição entre pH 6,8 e 8,2 e mudança de coloração de amarelo para vermelho carmim. O método consiste na mistura de uma amostra de leite com álcool neutralizado, adição da solução indicadora e agitação. A obtenção de coloração vermelho-carmim, semelhante a um teste controle contendo apenas solução alcoólica e de indicador, é interpretado como positivo para presença de alcalinizantes em leite (BRASIL, 2006; INDIA, 2015).

Outro método qualitativo usado para a detecção de neutralizantes em leite é o da fenolftaleína (CID: 4794; $C_{20}H_{14}O_4$; faixa de transição entre pH 8,2 e 10,0). Ele é baseado na determinação visual da alcalinidade de uma amostra de leite, após a neutralização desta com solução de hidróxido de sódio (0,1 mol/L), reacidificação com solução de ácido sulfúrico (0,0125 mol/L), aquecimento, resfriamento em banho de gelo e adição do indicador fenolftaleína. Na etapa de neutralização, os compostos de caráter ácido presentes no leite são neutralizados pela solução de hidróxido de sódio. Caso o leite tenha sido adicionado de carbonato ou bicarbonato de sódio, na etapa de reacidificação, o ácido sulfúrico reage com carbonatos e bicarbonatos de sódio, formando ácido carbônico. Na etapa de aquecimento, o ácido carbônico será eliminado na forma de gás carbônico, resultando no aumento do pH do meio, que será visualizado pela obtenção de coloração rósea, na presença do indicador fenolftaleína adicionado na última etapa (BRASIL, 1981; BRASIL, 2006).

O método quantitativo para determinação dos neutralizantes é baseado no aumento da alcalinidade das cinzas do leite provocado pela adição de substâncias alcalinas. Este consiste na obtenção das cinzas do leite, solubilização em água, adição de solução de ácido clorídrico, aquecimento, adição de solução de cloreto de cálcio e titulação com solução padronizada de hidróxido de sódio na presença do

indicador fenolftaleína. Valores de alcalinidade superiores a 0,030 g/100 g de leite, expressos em carbonato de sódio (NaCO_3), caracterizam a adição de substâncias alcalinas (BRASIL, 2006; INDIA, 2015).

Apesar dos métodos descritos não serem reconhecidos por organismos de normalização (Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, Association of Official Analytical Chemists - AOAC, International Dairy Federation - FIL-IDF, International Organization for Standardization – ISO), eles são amplamente utilizados na investigação da adulteração do leite por neutralizantes, como pode ser visualizado na **Tabela 3.1**. Todos os trabalhos citados utilizaram pelo menos um destes métodos. Os estudos são recentes e foram realizados nos países onde este tipo de fraude é comum. Parâmetros de desempenho como veracidade, precisão, limites de detecção e quantificação não foram avaliados ou citados em nenhum destes trabalhos.

Assim como para outros adulterantes do leite, o desenvolvimento de métodos instrumentais, sobretudo por técnicas de espectroscopia do infravermelho, tem sido relatado para a análise de neutralizantes em leite. Métodos para a detecção de bicarbonato, hidróxido de sódio e citrato de sódio no leite foram validados e considerados adequados. No entanto, a aplicação destes métodos em amostras reais não é relatada (BOTELHO *et al.*, 2015; CASSOLI, SARTORI, MACHADO, 2011; DURANTE *et al.*, 2016; GONDIM, 2016; SILVA *et al.*, 2015).

Tabela 3.1. Ocorrência de neutralizantes (detectados por métodos clássicos) e outros adulterantes em leite e derivados.

Tipo de leite	Amostras	Neutralizantes ^b (%)	Outros adulterantes detectados	País	Referência
<i>In natura</i>	280	27,0	Amido, peróxido de hidrogênio	Paquistão	Aziz; Khan, 2014
<i>In natura</i> ^a	100	20,0	Água, detergente, sacarose, farinha de arroz, leite em pó desnatado, peróxido de hidrogênio, amido, formol, ureia, óleos vegetais, ácido bórico, glicose, sorbitol e araruta.	Paquistão	Barham <i>et al.</i> , 2014
<i>In natura</i> ^a	100	22,0	Água, detergente, sacarose, farinha de arroz, amido, óleo vegetal hidrogenado.	Paquistão	Barham <i>et al.</i> , 2015
<i>In natura</i> ^a	50	20,0	Água, sacarose, leite em pó, amido, formol	Bangladesh	Chanda <i>et al.</i> , 2012
<i>In natura</i> e pasteurizado	48	58,3	Ácido benzoico, sacarose, detergente, formaldeído, glicose, peróxido de hidrogênio, ácido salicílico, leite em pó desnatado, amido, ureia, óleo vegetal, água	Índia	Debnath <i>et al.</i> , 2015
<i>In natura</i> ^a	60	0,0	Formol, nitrato, cloretos, sacarose e urina	Brasil	Firmino <i>et al.</i> , 2010
<i>In natura</i> ^a	100	8,0	Ureia, amido, detergente, sacarose, leite em pó desnatado, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio, glicose e dextrose e formaldeído	Índia	Indumathi; Reddy, 2015
<i>In natura</i>	60	0,0	Detergente e ureia	Índia	Kandpal; Srivastava; Negi, 2012 ^d

^acoleta de amostras em vários pontos da cadeia produtiva (produtor, coletor, intermediário, processador e comércio); ^bconsiderado como resultado positivo a presença dos neutralizantes hidróxido, carbonato e bicarbonato de sódio; ^cresultados insatisfatórios para a determinação da alcalinidade das cinzas; ^d: amostras de leite de vaca e de búfala. NI: não informado.

Continua

Tabela 3.1. Ocorrência de neutralizantes (detectados por métodos clássicos) e outros adulterantes em leite e derivados (continuação).

Tipo de leite	Amostras	Neutralizantes ^b (%)	Outros adulterantes detectados	País	Referência
<i>In natura</i>	50	28,0; 80,0 ^c	Amido, sacarose, leite em pó desnatado, alcalinidade, cloreto de sódio, ureia, formol, peróxido de hidrogênio e detergentes	Índia	Kumar <i>et al.</i> , 2015
<i>In natura</i>	260	5,8	Formol, peróxido de hidrogênio, ácido bórico e nitratos	Egito	Mansour; El-Loly; Ahmed, 2012 ^d
NI	42	0,0	Sacarose, glicose/dextrose, maltose/maltodextrina, leite em pó desnatado, cloreto de sódio, sulfato de amônio e detergente	Índia	Pala <i>et al.</i> , 2015
<i>In natura</i>	50	6,0	Cloreto de sódio, sacarose, ureia, peróxido de hidrogênio, formol, glicose e dextrose, detergente, amido, leite em pó desnatado	Índia	Ramya <i>et al.</i> , 2015
NI	50	26,0	Sacarose, leite em pó desnatado, cloreto de sódio, ureia, formol, peróxido de hidrogênio e detergentes	Índia	Singuluri; Sukumaran, 2014
<i>In natura</i>	92	8,6	Cloreto de sódio, leite em pó desnatado, detergentes, peróxido de hidrogênio, formol, glicose e ureia	Índia	Swetha; Sukumar; Sudhanthirakodi, 2014
UHT	60	1,7	Álcool etílico, cloretos e sacarose	Brasil	Tamanini, 2012

^acoleta de amostras em vários pontos da cadeia produtiva (produtor, coletor, intermediário, processador e comércio); ^bconsiderado como resultado positivo a presença dos neutralizantes hidróxido, carbonato e bicarbonato de sódio; ^cresultados insatisfatórios para a determinação da alcalinidade das cinzas; ^d: amostras de leite de vaca e de búfala. NI: não informado.

Continua

Tabela 3.1. Ocorrência de neutralizantes (detectados por métodos clássicos) e outros adulterantes em leite e derivados (continuação).

Tipo de leite	Amostras	Neutralizantes^b (%)	Outros adulterantes detectados	País	Referência
Leite <i>in natura</i> e pasteurizado	15	20,0	Amido	Índia	Tangri; Chatli, 2014
Iogurte, queijo, manteiga, sorvete e leite em pó	15	0,0	Peróxido de hidrogênio (iogurte, leite em pó e sorvete)	Paquistão	Ullah et al., 2016
UHT e pasteurizado	135	17,8	Água, substâncias reconstituintes e álcool	Brasil	Wanderley <i>et al.</i> , 2012
NI	15	0,0	Formol, amido, detergente, leite em pó desnatado, sacarose, glicose, maltose e água	Índia	Wasupalli; Sai; Kaur, 2015

^acoleta de amostras em vários pontos da cadeia produtiva (produtor, coletor, intermediário, processador e comércio); ^bconsiderado como resultado positivo a presença dos neutralizantes hidróxido, carbonato e bicarbonato de sódio; ^cresultados insatisfatórios para a determinação da alcalinidade das cinzas; ^d: amostras de leite de vaca e de búfala. NI: não informado.

3.3.2 Ações de combate à fraude do leite no Brasil

O Programa Nacional de Combate à Fraude no Leite (PCFL) do MAPA foi iniciado no Brasil em 2003. Desde então foram realizadas coletas de amostras de leite UHT, pasteurizado e em pó para análises e verificação de possíveis fraudes na indústria, sob supervisão do Serviço de Inspeção Federal (SIF). A partir de 2007, com o aumento de suspeitas sobre adulteração do leite e o início das operações policiais federais de combate à fraude, o PCFL foi aperfeiçoado e intensificado. Segundo o MAPA, cerca de 4.000 amostras de leite são coletadas anualmente para a investigação de adulterações (AGÊNCIA BRASIL, 2013).

Em 2007, o Ministério Público Federal (MPF), Ministério Público Estadual (MPE), a Polícia Federal (PF) e o MAPA realizaram a Operação Ouro Branco, nos municípios mineiros de Uberaba e Passos. As cooperativas investigadas eram suspeitas de adicionar soro, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio ao leite. Foi constatado que os produtos estavam impróprios para o consumo. A presença de substâncias alcalinas e teores baixos de acidez titulável foram constatados. Foram cumpridos vários mandados de prisão e busca e apreensão (ASCOM-MPF/MG, 2007).

Em 2008 a Operação Lactose foi realizada em cinco estados brasileiros (Santa Catarina, Bahia, Ceará, Pernambuco e Paraíba) com o objetivo de desarticular uma quadrilha que adulterava leite em pó integral, falsificava notas fiscais, sonegava impostos e corrompia funcionários públicos. Cerca de 50% do leite em pó era substituído por soro em pó (DIÁRIO CATARINENSE, 2008).

Em 2013, após a descoberta de adulteração em cerca de 600 mil litros de leite no Rio Grande do Sul, o MAPA intensificou a coleta de amostras no estado e a Operação “Leite Compensado” foi deflagrada. As empresas que realizavam o transporte do leite *in natura* até a indústria eram suspeitas de adicionar ureia e formol ao leite (AGÊNCIA BRASIL, 2013).

Em julho de 2015 uma nova edição da Operação Leite Compensado foi iniciada no Rio Grande do Sul. Resultados insatisfatórios obtidos no PNCFL nos anos anteriores levaram o MAPA a comprovar as suspeitas sobre a adição de água e bicarbonato de sódio ao leite em indústrias da região. As adulterações também eram realizadas antes do beneficiamento do leite (G1, 2015a).

Em dezembro de 2015, outra operação foi iniciada pela Polícia Federal no agreste de Pernambuco, a Operação Vida Longa. Os laticínios da região eram suspeitos de fraudar o leite com água, água oxigenada, urina, álcool etílico, sacarose e neutralizantes da acidez (G1, 2015b).

Em julho de 2016 o MPF deflagrou a 11ª fase Operação Leite Compensado e a 4ª fase Operação Queijo Compensado no Rio Grande do Sul. A investigação da adulteração dos produtos pela adição de água, amido de milho, água oxigenada e ácido sórbico foi realizada (MARTINS, 2016).

Com base nas informações apresentadas, é possível constatar que mesmo com a intensificação das ações de monitoramento e de combate à fraude, e a realização de operações policiais, a adulteração do leite ainda é uma prática recorrente no Brasil. Logo, há de se refletir e reavaliar o posicionamento dos profissionais nas indústrias de lácteos, os modelos de fiscalização e as ações de políticas públicas visto que as fraudes ocorrem predominantemente nas indústrias.

3.3 Ácidos orgânicos em leite e derivados

Assim como os minerais, as vitaminas e as enzimas, os ácidos orgânicos são considerados micronutrientes do leite, sendo normalmente encontrados na fase aquosa. Ácido cítrico, fórmico, acético e oxálico são responsáveis por mais de 90% dos ácidos orgânicos presentes no leite *in natura* fresco, sendo estimado um conteúdo final de 1,7 g/L. Deste total, o ácido cítrico é o predominante, podendo também ser encontrado na forma de citrato coloidal, associado às micelas de caseína do leite (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Além dos ácidos orgânicos provenientes do metabolismo bioquímico intrínseco (ácidos cítrico, orótico, oxálico, hipúrico, úrico e outros), podem ser encontrados em leite e seus derivados ácidos orgânicos resultantes do desenvolvimento microbiano (lático, acético, pirúvico, propiônico e fórmico) e da hidrólise da gordura do leite (ácidos graxos de cadeia curta: butírico e capróico; de cadeia média: caprílico, cáprico e láurico e de cadeia longa: mirístico, palmítico e esteárico) (NOLLET; TOLDRA, 2010). Na **Figura 3.3** estão ilustradas as estruturas químicas dos principais ácidos orgânicos presentes no leite e seus derivados.

Em geral, os ácidos orgânicos desempenham papel importante em produtos lácteos, incluindo a redução do pH e consequente inibição do desenvolvimento microbiano em produtos fermentados, a contribuição para os atributos de sabor e também como indicadores da qualidade microbiológica. Logo, a informação sobre os teores de ácidos orgânicos no leite é importante para a compreensão do metabolismo e da qualidade do leite e de seus derivados. (BEVILAQUA E CALIFANO, 1989; ZEPPA, 2001).

A composição de nutrientes, o pH próximo a neutralidade e a elevada atividade de água favorecem o desenvolvimento de microrganismos no leite e consequentemente a mudança na composição e no perfil dos ácidos orgânicos. Dentre os microrganismos que podem estar presentes no leite *in natura*, as bactérias do ácido láctico (LAB), que fermentam a lactose produzindo ácido láctico, são a população predominantemente favorecida. Os gêneros mais comuns das LABs incluem *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. As populações psicrótróficas, que se estabelecem particularmente durante o armazenamento refrigerado do leite *in natura*, também são um componente importante e incluem os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter spp* (QUIGLEY *et al.*, 2011; QUIGLEY L., *et al.*, 2013). O desenvolvimento microbiano e a produção do ácido láctico impactam a qualidade do leite em suas características sensoriais, nas propriedades nutricionais, no processamento de derivados e em sua durabilidade (WOUTERS *et al.*, 2002).

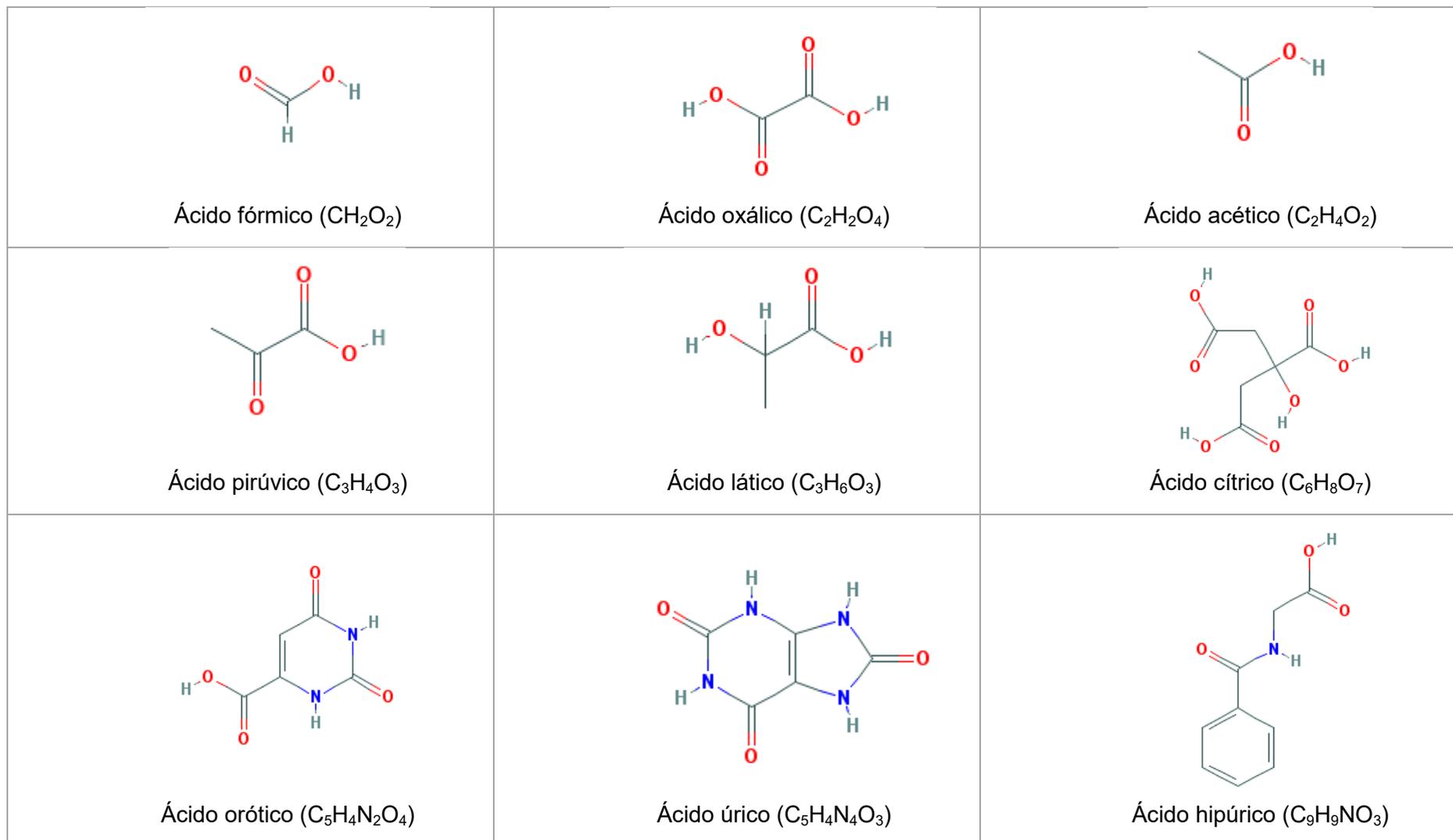


Figura 3.2. Estrutura química dos principais ácidos orgânicos presentes em leite e derivados.

FONTE: Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.3.1 Ácido láctico

A concentração intrínseca de ácido láctico no leite é oriunda do metabolismo da glândula mamária do animal, sendo reportados baixos teores em leite fresco. Níveis elevados de ácido láctico no leite ou em seus derivados resultam da degradação da lactose por ação microbiana. Logo, a determinação da concentração de ácido láctico ou de propriedades físico-químicas que se alteram com a produção deste composto (pH e acidez titulável) são extremamente úteis para monitorar a qualidade do leite e de seus derivados (GOMEZ-ALVAREZ *et al.*, 1999; JENNESS & PATTON, 1959).

Em processos fermentativos, como na produção de queijos e iogurtes, o desenvolvimento microbiano e a produção do ácido láctico são desejáveis. O processo é iniciado com a inoculação de culturas lácticas específicas no leite, que é mantido em temperaturas favoráveis ao desenvolvimento microbiano. Alterações profundas ocorrem nos atributos químicos, físicos, microbiológicos e sensoriais do leite. O ácido láctico é o principal composto produzido, conferindo aos produtos gosto ácido acentuado e aroma característico. O ácido produzido também inibe o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deterioradores, contribuindo para qualidade e durabilidade dos produtos lácteos (TORMO; IZCO, 2004; VÉNICA; PEROTTI; BERGAMINI, 2014).

O desenvolvimento microbiano e consequente acidificação do leite também podem ocorrer de forma indesejada, resultante de condições inadequadas de obtenção, armazenamento e processamento do leite. Para inibir o desenvolvimento microbiano e manter a qualidade do leite fluido, é de fundamental importância que o leite recém-ordenhado seja mantido em temperaturas inferiores a 7 °C. Bactérias lácticas têm seu tempo de geração aumentado em até 40 vezes, quando comparados o armazenamento do leite em temperaturas de 30 °C e 5 °C (BRASIL, 2011; CODEX ALIMENTARIUS, 2011; CU, 2013; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Segundo Gomez-Alvarez *et al.* (1999) a concentração de ácido láctico intrínseco em amostras de leite fresco é de aproximadamente 90,0 a 180,0 mg/L, mas pode aumentar para 900,0 a 1.800,0 mg/L, em decorrência da fermentação microbiana. Entretanto, diferentemente de outros ácidos orgânicos como o cítrico e o orótico, não há um consenso na literatura sobre valores considerados normais para

leite *in natura* fresco e também não há valores de referência regulamentados. Estes valores existem apenas para a acidez titulável (BRASIL, 2011; CHINA, 2010; CU, 2013).

3.3.2 Ácido orótico

O ácido orótico está naturalmente presente no leite e soro do leite, e foi detectado pela primeira vez em 1904. Vegetais como beterraba, nabo e cenoura também apresentam este ácido orgânico (AHMED; PORTER; McCARTHY, 1978; LÖFFLER; CARREY; ZAMEITAT, 2015). Por ser um produto intermediário na biossíntese de nucleotídeos de pirimidina, é considerado um dos ácidos orgânicos mais relevantes no leite. Por ser relativamente constante no leite, o ácido orótico pode ser utilizado como indicador para a determinação da proporção de leite em alimentos processados, assim como a creatinina total e o ácido úrico (ANASTASI *et al.*, 2000; PARK; HAENLEIN, 2013).

Durante muito tempo, o ácido orótico foi referido como vitamina B13. No entanto, não é mais reconhecido como tal, por ser também produzido pelo corpo humano e pela microbiota intestinal (SALERNO; CRIFÓ, 2002). É comercializado como suplemento vitamínico na forma de sais (orotato de cálcio, magnésio, lítio, entre outros) e pode fazer parte da composição de medicamentos usados após ataque cardíaco, tratamento de esclerose múltipla e hepatite crônica (AHMED; PORTER; McCARTHY, 1978; CATALDI *et al.*, 2006; LÖFFLER; CARREY; ZAMEITAT, 2015; PARK; HAENLEIN, 2013).

O leite bovino é a principal fonte de ácido orótico na dieta humana. Também pode ser encontrado no leite de outras espécies, mas normalmente em quantidades menores (LÖFFLER; CARREY; ZAMEITAT, 2015; INDYK; WOOLLARD, 2004; PARK; HAENLEIN, 2013). Os relatos dos primeiros estudos de determinação de ácido orótico em leites datam de 1953. Hallanger; Laakso; Schultze (1953) analisaram amostras de leite de vários mamíferos, sendo encontrados teores mais elevados para leite de ovelha (324,0 mg/L), seguido de leite de vaca (entre 78,9 e 105,0 mg/L), cabra (63,1 mg/L), mulher (7,0 mg/L) e rata (11,0 mg/L).

Os efeitos biológicos do ácido orótico têm sido foco de atenção considerável, sendo relatados em vários estudos, com diferentes propósitos. Tem sido avaliada a

sua importância como fator de crescimento para galinhas, lactobacilos e microbiota intestinal. Em seres humanos, tem sido apontado como um fator de diminuição do nível de colesterol sanguíneo, pois interfere na sua síntese endógena, inibindo a sequência enzimática responsável pela síntese de colesterol no fígado. Sua utilização está associada à melhoria da função cardíaca após hipertrofia, infarto e desenvolvimento de cardiomiopatias. No entanto, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido (ANASTASI *et al.*, 2000; CATALDI *et al.*, 2006).

3.3.3 Ácido cítrico

O ácido cítrico é sintetizado no leite a partir do ácido pirúvico, nas células da glândula mamária. Devido ao pH característico do leite (6,6 a 6,8), o ácido cítrico existe como íon citrato e está presente majoritariamente na sua forma solúvel (mais de 90%) ou em interação com a fração proteica. Assim como para os outros sais, os níveis de citrato no leite são considerados constantes, sendo relatados teores médios entre 1.323,0 e 2.079,0 mg/L. Fatores como sazonalidade, período de lactação e ocorrência de doenças são apontados como as principais fontes de variação (DUCHACÉK *et al.*, 2012; FOX; McSWEENEY, 1998; GARNSWORTHY *et al.*, 2006; GAUCHERON, 2005; RODRIGUES, 2012).

A interação do citrato com as proteínas na fração coloidal faz com que este desempenhe um papel importante na estrutura e na estabilidade das micelas de caseína. Devido as suas propriedades quelante e estabilizante, o citrato é frequentemente usado como aditivo em leite e seus derivados. Ele modifica as características físico-químicas do leite a partir da formação de complexos estáveis com os metais, o que melhora sua estabilidade ao processamento (FOX; McSWEENEY, 1998; KALIAPPAN; LUCEY, 2011).

Os citratos são muito utilizados em leites que serão submetidos ao processamento UHT. Na presença de citrato de sódio, o aquecimento do leite resulta na desagregação das micelas de fosfocaseinato de cálcio e no aumento de pH. Neste contexto, ocorrem mudanças no equilíbrio salino do leite e redução da concentração do cálcio insolúvel. Portanto, estes sais aumentam a estabilidade térmica do leite, diminuem a precipitação nos trocadores de calor e minimizam a formação de sedimentos no leite UHT ao longo da vida de prateleira (BOUMPA *et*

al., 2008; OZCAN-YILSAY *et al.*, 2007; PRAKASH *et al.*, 2007; TSILOULPAS *et al.*, 2010). A legislação brasileira permite a adição de citrato de sódio no leite UHT com a função estabilizante, desde que o somatório de todos os estabilizantes utilizados (citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio e trifosfato de sódio) não ultrapasse a quantidade de 0,1 g/100 mL, expressa em pentóxido de fósforo (BRASIL, 1997b).

O conhecimento dos níveis de ácido cítrico no leite se faz importante tanto no contexto do conteúdo intrínseco como extrínseco. O citrato é uma substância central para o metabolismo celular, sendo um indicador energético em vacas leiteiras e que também pode ser afetado pela ocorrência de doenças, como a mastite. Do ponto de vista do processamento, os citratos desempenham um papel importante no equilíbrio salino do leite. A partição dos sais do leite nas fases solúvel e coloidal afetam diretamente as propriedades de coagulação, fato importante na fabricação de queijos e leites fermentados. A informação sobre os teores de citrato em produtos processados é fundamental no monitoramento da sua utilização como aditivo, e também do uso de forma ilícita, em produtos para os quais não é prevista sua adição como estabilizante (DUCHACÉK *et al.*, 2012; FAULKNER; PEAKER, 1982; SUNDEKILDE *et al.*, 2014).

3.3.4 Determinação de ácidos orgânicos em leite e derivados

Ao longo dos anos, várias metodologias analíticas têm sido desenvolvidas e utilizadas na determinação de ácidos orgânicos em alimentos, sobretudo para os produtos fermentados. Diferentes técnicas analíticas são utilizadas, a exemplo de titulações colorimétricas simples, como a determinação da acidez titulável, a métodos instrumentais mais complexos, como a cromatografia e a eletroforese capilar (KHOSRAVI, *et al.*, 2015; LIGOR *et al.*, 2008; NOLLET; TOLDRÁ, 2010; TAYLOR, 1996).

A seguir, são apresentadas as metodologias mais utilizadas em leite e derivados e de interesse neste estudo.

3.3.4.1 Acidez titulável (AT)

A determinação da AT em leite e derivados é realizada por dois motivos principais: a verificação do frescor e qualidade do leite e o monitoramento de produtos fermentados (McCARTHY; SINGH, 2009). Embora a AT seja uma medida da acidez total do produto, ela é expressa como a quantidade do ácido predominante, que neste caso, é o ácido láctico (NOLLET; TOLDRÁ, 2010).

O procedimento básico consiste na titulação da amostra de leite ou seus derivados com uma solução padronizada de hidróxido de sódio (0,1 mol/L) na presença do indicador fenolftaleína, até a obtenção de coloração rósea (pH ~ 8,3) (AOAC, 2012; BRASIL, 2006).

A determinação da AT é simples e barata, sendo regulamentada em vários países do mundo para monitorar o desenvolvimento microbiano e a produção do ácido láctico. Para leite fluido, valores entre 0,12 e 0,21 gramas de ácido láctico por 100 mL de leite são estabelecidos em diferentes países (CHINA, 2010; CU, 2013; GOMEZ-ALVAREZ *et al.*, 1999). No Brasil a faixa aceitável para a AT é de 0,14 a 0,18 g/ 100 mL, expressa em gramas de ácido láctico (BRASIL, 1997b; BRASIL, 2011).

No entanto, a AT apresenta limitações e nem sempre irá refletir o conteúdo real de ácido láctico no leite. Uma acidez titulável elevada em leite fresco (na ausência de desenvolvimento de ácido láctico) sugere um leite com teores superiores de proteínas (caseína e albumina), de constituintes tamponantes (fosfatos e citratos) e de gás carbônico dissolvido (McCARTHY; SINGH, 2009; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A liberação de ácidos graxos devido à lipólise da gordura do leite também pode interferir na estimativa da acidez titulável em produtos ricos em gordura, aumentando o seu teor. Durante a titulação, dependendo da velocidade em que esta ocorre, pode haver precipitação de fosfato de cálcio (com uma diminuição concomitante do pH) e esmaecimento da coloração obtida faixa de viragem da fenolftaleína. A velocidade de agitação da amostra durante a titulação também pode favorecer a incorporação de gás carbônico atmosférico, impactando nos resultados obtidos (FOX; McSWEENEY, 1998; BOUTEILLE, *et al.*, 2013).

Kumar *et al.* (2016), Milagres *et al.* (2012) e Sowmya *et al.* (2013) também apontaram como um fator limitante para a utilização da acidez titulável no monitoramento do leite, a adulteração com substâncias neutralizantes, como hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos. Esses compostos irão neutralizar parcialmente a acidez livre do leite, formando lactato de sódio e interferindo na determinação da acidez titulável.

3.3.4.2 Métodos químicos colorimétricos

Os métodos colorimétricos mais frequentemente relatados para a determinação de ácidos orgânicos referem-se a análise dos ácidos láctico e cítrico. Embora estejam bem estabelecidos, raramente são utilizados por serem laboriosos, demorados, gerarem grande quantidade de resíduos e por apresentarem menor sensibilidade em relação às demais metodologias. Além destas desvantagens, alguns métodos também envolvem a utilização de reagentes nocivos à saúde, como na determinação espectrofotométrica clássica do citrato, com utilização de pirimidina e anidrido acético (MARIER; BOULET, 1958; NOLLET; TOLDRÁ, 2010).

Em 1937 a AOAC (2012) publicou um método (nº 937.05) para determinar o ácido láctico em leite e derivados, baseado na complexação deste ácido com o reagente cloreto férrico. O composto amarelo formado é analisado espectrofotometricamente e determinado a partir de curvas de calibração. A análise é laboriosa e envolve o preparo da amostra com água e solução de ácido sulfúrico a 0,5 mol/L, extração com éter por aproximadamente 3 horas, neutralização com hidróxido de bário e evaporação.

3.3.4.3 Métodos cromatográficos

Dentre os métodos cromatográficos para a análise de ácidos orgânicos em leite e derivados, os mais utilizados são aqueles por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com o emprego de colunas de troca iônica (TI), exclusão de íons (EI) ou de fase reversa (FR), e com detecção por ultravioleta (UV).

Na determinação por CLAE-TI, a maioria dos estudos relata a utilização de coluna Aminex HPX 87H em temperaturas entre 45 °C e 65 °C, o uso de soluções

diluídas de ácido sulfúrico como fase móvel, o preparo da amostra envolvendo etapas de agitação, centrifugação e filtração, a detecção entre 210 nm e 220 nm e tempo total de análise de 30 minutos. Maioria dos trabalhos tinha como objetivo principal a aplicação do para a determinação de ácidos orgânicos em derivados lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (ANDIÇ; TUNÇTÜRK; GENÇCELEP, 2011; CALIFANO; BEVILACQUA, 2001; GARDE *et al.*, 2012; KAMINARIDES; STAMOU; MASSOURAS, 2007; MADUREIRA *et al.*, 2012; VÉNICA; PEROTTI; BERGAMINI, 2014) e com menor frequência na análise de leite fluido (MARSILI *et al.*, 1981; MILAGRES *et al.*, 2012).

Na determinação de ácidos orgânicos por CLAE-FR são utilizadas condições similares aos da CLAE-TI, principalmente no que se refere ao preparo da amostra, tipo de detector, comprimento de onda e tempo de análise. A utilização de coluna C18 e de fase móvel composta por tampão fosfato (pH ~2,2) adicionado de pequena quantidade de acetonitrila ou metanol, são as principais diferenças encontradas. A maior parte dos trabalhos também teve como foco principal a análise de lácteos fermentados (ANDRÉS TENORIO; VILLANUEVA, 2015; BENSMIRA; JIANG, 2011; MURTAZA *et al.*, 2011; TORMO; IZCO, 2004).

Tormo; Izco (2004) apontam como principais vantagens da utilização de metodologias por CLAE-FR o uso de colunas mais baratas, maior facilidade na otimização do método, realização da análise em temperatura ambiente e maior vida útil da coluna.

3.3.4.4 Métodos enzimáticos

A determinação enzimática do ácido láctico é baseada em uma série de reações bioquímicas, catalisadas por enzimas específicas. De forma geral, o lactato é oxidado a piruvato na presença de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD) e da enzima lactato-desidrogenase (LDH), havendo a formação de NADH (NAD reduzido). Nos métodos enzimáticos clássicos, o NADH produzido é detectado diretamente por absorvância, ou indiretamente, pela formação de compostos cromogênicos ou fluorescentes, cuja intensidade é diretamente proporcional ao conteúdo inicial de lactato (KAN *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2016; NOLLET; TOLDRÁ, 2010; SHAPIRO; SILANIKOVE, 2010) (**Figura 3.4**).

Nos biossensores, a reação enzimática entre lactato e NAD também pode ser catalisada por outras enzimas como a lactato oxidase (LOD), havendo a formação de peróxido de hidrogênio, que por sua vez é detectado eletroquimicamente (CHEN *et al.*, 2015; NGUYEN-BOISSE *et al.*, 2013).

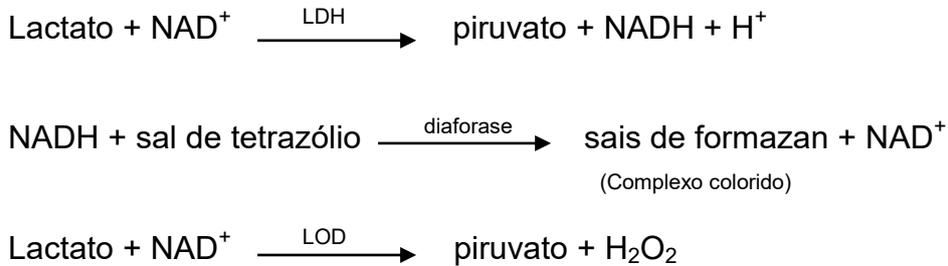


Figura 3.3. Esquema de reações bioquímicas envolvidas da determinação de ácido láctico por métodos enzimáticos.

Os biossensores e os métodos enzimáticos clássicos apresentam como vantagens em relação aos métodos anteriormente descritos a especificidade, rapidez, simplicidade, possibilidade de realização em tempo real e menor geração de resíduos. Como desvantagens, cita-se o custo e a impossibilidade de análise múltipla de ácidos orgânicos (BALLESTA-CLAVER; VALENCIA-MIRÓN; CAPITÁN-VALLVEY, 2008; CHEN *et al.*, 2015; PALMISANO *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2016; KAN *et al.*, 2015 RATHEE *et al.*, 2016).

3.3.5 Teores de ácidos orgânicos em leite

Segundo Marsili *et al.* (1981), a determinação de ácidos orgânicos em leites e derivados é uma ferramenta potencialmente útil para o monitoramento da qualidade. Os autores propuseram uma metodologia por CLAE-EI para quantificar simultaneamente nove ácidos orgânicos em diferentes produtos lácteos, incluindo o leite em pó e o leite fluido integral. Na análise de amostras de leite em pó de boa qualidade e de qualidade questionável, diferenças consideráveis nos teores dos ácidos orgânicos, sobretudo cítrico, láctico, acético e propiônico foram encontradas (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2. Comparação dos teores de ácidos orgânicos em amostras de leite em pó.

Ácido	µg/g	
	Amostra controle	Amostra de qualidade duvidosa
Orótico	479,0	457,0
Cítrico	1.630,0	1.220,0
Pirúvico	25,0	44,8
Lático	<150,0	4.320,00
Úrico	103,0	75,3
Fórmico	<100,0	<100,0
Acético	<200,0	305,0
Propiônico	497	2.010,0
Butírico	<300,0	<300,0
Hipúrico	85,2	42,7

FONTE: Marsili *et al.*, 1981.

Estudos sobre a determinação dos ácidos láctico, cítrico e orótico em leites fluidos *in natura* e processado são apresentados na **Tabela 3.3**. A utilização de métodos cromatográficos, enzimáticos clássicos e por biossensores foi predominante. Apenas em cinco dos 22 estudos houve a determinação simultânea dos três ácidos orgânicos. Em três estudos foram empregadas metodologias por CLAE-FR (BEVILACQUA, 1989; PÉREZ-RUIZ *et al.*, 2004; TORMO; IZCO, 2004) e nos outros dois por CLAE-TI ou EI (MARSILI *et al.*, 1981; VÉNICA; PEROTTI; BERGAMINI, 2014).

Foram observados valores menores que o limite de detecção e de até 1.497,0 mg/L para o ácido láctico, entre 936,0 e 2.169,6 mg/L para o ácido cítrico e entre 22,7 a 125,7 mg/L para o ácido orótico. Com exceção de dois estudos de ocorrência para o ácido orótico, todos os outros foram realizados com um número de amostras restrito (≤ 12).

Tabela 3.3. Teores dos ácidos láctico, cítrico e orótico em leite, reportados na literatura.

Tipo de leite	Nº	Teores* (mg/L)	Método analítico	Referência
Ácido láctico				
Processado	01	< 60,0	CLAE - EI	Marsili <i>et al.</i> , 1981
<i>In natura</i>	12	< 50,0	CLAE - FR	Bevilacqua; Califano, 1989
<i>In natura</i>	01	28,8 a 33,3	Biossensor	Skladal <i>et al.</i> , 1993
Leite processado	06	8,6 a 52,2	Enzimático	Marraza; Cagnini; Mascini, 1994
<i>In natura</i>	02	Não detectado	CLAE - TI	Mullin; Emons, 1997
Pasteurizado e UHT	03	22,5 a 54,0	Enzimático e biossensor	Palmisano <i>et al.</i> , 2001
<i>In natura</i> e pasteurizado	03	14,4 a 67,5	Enzimático e biossensor	Torriero <i>et al.</i> , 2003
UHT	03	1.047,0 a 1.497,0	CLAE - FR	Pérez-Ruiz <i>et al.</i> , 2004
<i>In natura</i>	01	174,0	CLAE - FR	Tormo; Izco, 2004
<i>In natura</i>	08	15,4 a 20,1	Biossensor	Zaydan; Dion; Boujtita, 2004
<i>In natura</i>	01	23,4	Enzimático	Shapiro; Silanikove, 2010
<i>In natura</i>	02	6,0	Biossensor	Bori <i>et al.</i> , 2012
<i>In natura</i>	01	394,2	CLAE - EI	Milagres <i>et al.</i> , 2012
<i>In natura</i>	01	200,0	CLAE - TI	Vénica, Perotti, Bergamini, 2014
<i>In natura</i>	01	25,7	Enzimático	Kumar <i>et al.</i> , 2016
Ácido cítrico				
Processado	01	940,0	CLAE - EI	Marsili <i>et al.</i> , 1981
<i>In natura</i>	12	1.610,0	CLAE - FR	Bevilacqua; Califano, 1989
<i>In natura</i>	02	1.550 a 1.580,0	CLAE - TI	Mullin; Emons, 1997

*teores médios ou faixa de concentração; Nº: número de amostras; CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência; FR: fase reversa; TI: troca iônica.

Continua.

Tabela 3.3. Teores dos ácidos láctico, cítrico e orótico em leite, reportados na literatura (Continuação).

Tipo de leite	N	Teores* (mg/L)	Método analítico	Referência
UHT	03	936,0 a 1.624,0	CLAE - FR	Pérez-Ruiz <i>et al.</i> , 2004
<i>In natura</i>	01	1.480,0	CLAE - FR	Tormo; Izco, 2004
<i>In natura</i>	24	1.862,4 a 2.169,6	CLAE - FR	Garnsworthy <i>et al.</i> , 2006
<i>In natura</i>	04	1.747,2 a 1.827,8	Enzimático e CLAE	Shapiro; Silanikove, 2011
<i>In natura</i>	02	1.680,0 a 1.769,0	CLAE - TI	Vénica, Perotti, Bergamini, 2014
Ácido orótico				
<i>In natura</i>	80	63,9 a 121,0	Microbiológico	Hallanger; Laakso; Schultze, 1953
Processado	01	83,6	CLAE - EI	Marsili <i>et al.</i> , 1981
<i>In natura (vacas individuais)</i>	2.250	53,8	CLAE - FR	Counotte, 1983
<i>In natura</i>	12	35,0	CLAE - FR	Bevilacqua; Califano, 1989
Pasteurizado, UHT e em pó	10	22,7 a 39,3	Biosensor e enzimático	Anastasi <i>et al.</i> , 2000
<i>In natura</i>	08	23,9 a 46,0	CLAE - FR	Indyk; Woollard, 2004
<i>In natura</i>	01	104,0	CLAE - FR	Tormo; Izco, 2004
<i>In natura</i> , pasteurizado e UHT	16	56,0 a 125,7	CLAE - TI	Cataldi <i>et al.</i> , 2006
<i>In natura</i>	02	82,4 a 86,5	CLAE - TI	Vénica, Perotti, Bergamini, 2014

*teores médios ou faixa de concentração; N^o: número de amostras; CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência; FR: fase reversa; TI: troca iônica.

3.4 Confiabilidade de metodologias analíticas

Segundo o guia Eurachem (2014), boas práticas de medição analítica envolvem seis princípios básicos:

- as medidas analíticas devem satisfazer um objetivo definido;
- métodos e equipamentos utilizados nas determinações devem ser avaliados, garantindo sua adequação à finalidade proposta;
- os analistas devem possuir qualificação e capacidade técnica para realizar tal atividade;
- deve haver avaliações regulares e independentes do desempenho de um laboratório;
- as medições realizadas devem ser consistentes em comparação com aquelas realizadas em outro laboratório;
- as organizações que fazem medições analíticas devem definir procedimentos de controle e garantia de qualidade.

A disponibilidade de métodos analíticos confiáveis, adequados ao uso e rastreáveis é de suma importância para a análise de alimentos, tanto no que diz respeito à determinação da qualidade e composição do alimento, quanto em relação à investigação de adulterações e contaminações. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos legais e comerciais irreparáveis. Laboratórios de análise de alimentos que atuam nas mais diferentes atividades (regulação, prestação de serviços ou controle de qualidade interno) devem dispor de meios e critérios para estabelecer e executar suas metodologias analíticas. Os ensaios realizados devem conduzir a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2016; BANSAL *et al.*, 2015; KALIVAS *et al.*, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

3.4.1 Validação

Validar um método é confirmar, por meio de exames e fornecimento de evidência objetiva, que os requisitos específicos de um determinado uso pretendido estão atendidos (ABNT, 2005; INMETRO, 2016; VIM, 2012).

Para realizar esta confirmação, a avaliação de diferentes parâmetros de desempenho é indicada, sendo estes descritos em vários documentos orientativos. Os parâmetros mais comumente avaliados para métodos são: sensibilidade, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, veracidade, precisão (ABNT, 2005; EC, 2002; EURACHEM, 2014; FDA, 2015; INMETRO, 2016; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; VIM, 2012). Na abordagem qualitativa, são aplicáveis parâmetros de desempenho como taxa de falsos resultados, taxa de confiabilidade, taxa de seletividade, taxa de sensibilidade, limite de detecção, região de perda de confiabilidade, acordância, concordância e robustez (GONDIM; JUNQUEIRA, SOUZA, 2011; GONDIM *et al.*, 2014).

A validação de métodos se faz necessária sempre que não forem utilizados métodos normalizados, isto é, quando forem desenvolvidos novos métodos, na expansão do escopo ou de matrizes e nas alterações ou adaptações de metodologias. Quando utilizados métodos normalizados, a confirmação da capacidade de operação adequada do método também se faz necessária (ABNT, 2005; FDA, 2015).

A validação também é considerada uma ferramenta extremamente importante por ser requisito obrigatório para a acreditação laboratorial à norma ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2005, que trata dos “Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração” e muitas vezes é exigida em questões legais, comerciais e de certificação (ABNT, 2005; KUMAR *et al.*, 2012; SOUZA, 2007)

As validações podem ser classificadas como intralaboratoriais, quando todo o procedimento realizado envolve um único laboratório ou como interlaboratoriais ou validação completa, quando é realizado um estudo colaborativo entre laboratórios para comprovar a adequação do método ao uso. A validação intralaboratorial será sempre uma etapa precedente à validação completa, e esta última irá confirmar o desempenho do método em condições de maior variabilidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

3.4.2 Parâmetros de desempenho para métodos quantitativos

3.4.2.1 Sensibilidade e seletividade

A sensibilidade corresponde a uma alteração na resposta obtida em função da alteração na concentração do analito de interesse. Quanto maior a capacidade do método em determinar a diferença entre dois níveis de concentração muito próximos, maior será a sua sensibilidade. Para os métodos que envolvem a construção de curvas de calibração, este parâmetro normalmente é avaliado pelo valor de inclinação da mesma. Já a seletividade está relacionada com a capacidade do método em determinar um analito individualmente, sem a interferência de outros componentes que podem estar presentes na amostra e que tenham um comportamento semelhante (FDA, 2015; VIM, 2012).

Segundo González & Herrador (2007), como é impraticável considerar todas as interferências potenciais, é aconselhável estudar apenas os casos mais prováveis e críticos. Tais interferentes devem ser determinados considerando o fundamento do método, a constituição da matriz e o analito de interesse.

3.4.2.2 Linearidade

A linearidade de um método refere-se à sua capacidade em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016).

Não é recomendado que a linearidade de um método seja observada apenas por meio de gráficos de resultados de respostas em função da concentração do analito. Valores dispersos, homogeneidade das variâncias e independência dos resíduos dos dados são parâmetros que devem ser avaliados, utilizando ferramentas estatísticas específicas, anteriormente à análise de regressão e verificação do ajuste ao modelo linear (INMETRO, 2016; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

3.4.2.3 Efeito de matriz

Em alguns documentos orientativos a avaliação do efeito de matriz é descrita juntamente com a avaliação da seletividade e se considera que se o método é seletivo, não há efeito de matriz (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016). Já o documento orientativo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) e Souza (2007) recomendaram verificar a ocorrência do efeito de matriz em concomitância com o estudo da linearidade do método, a partir da elaboração de curvas de calibração simples em solvente e em matriz, e comparação estatística entre as interseções e inclinações das duas curvas.

A avaliação do efeito de matriz tal qual recomendado por Souza (2007), foi realizada em três diferentes estudos de validação de métodos cromatográficos para a determinação de semicarbazida em alimentos infantis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em café, e pesticidas em morangos. Embora efeito de matriz não tenha sido observado nos dois primeiros, o contrário ocorreu para alguns pesticidas analisados no morango (PISSINATTI *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2013; SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005).

Belo *et al.* (2017) sistematizaram um procedimento para avaliar efeitos de matriz na análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em grãos de café e cacau torrados, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com diluição isotópica. Os autores enfatizam a importância da avaliação dos efeitos da matriz, mesmo para esse tipo de método, onde se utiliza uma abordagem de diluição de isótopos.

3.4.2.4 Limites de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) do método é definido como a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser distinguida do zero, enquanto o de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade que pode ser determinada com um nível de precisão aceitável (FDA, 2015; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Existem várias formas de se calcular o limite de detecção de um método, entre elas estão a percepção visual, a estimativa da relação sinal/ruído em métodos instrumentais e a avaliação da inclinação da curva de calibração (INMETRO, 2016).

Um procedimento muito usual e relatado em documentos orientativos para determinar o LD e LQ teóricos é a realização de análises com replicatas de branco de amostras ou de amostras com baixo teor do analito, determinação do desvio padrão amostral e estimativa dos parâmetros a partir dos teores médios encontrados acrescidos de três (LD) e dez (LQ) vezes o desvio padrão obtido (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016). Este processo foi utilizado por Rakita *et al.* (2014) e Petrarca; Rossi; Sylos (2016) para a determinação do LD e LQ na validação de métodos para análise de glúten em trigo e micotoxina em arroz, respectivamente.

3.4.2.5 Veracidade e precisão

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012), a veracidade está relacionada com o grau de concordância entre a média obtida a partir de infinitas medidas de um determinado material e um valor de referência. Na impossibilidade de realizar medidas infinitas, a veracidade é normalmente avaliada em termos de tendência. Os processos comumente utilizados para avaliar a tendência de um método envolvem o uso de materiais de referência certificados (MRC), a participação em comparações interlaboratoriais, a comparação com métodos de referência e a realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2016; VIM, 2012).

Já a precisão indica o grau de concordância entre os valores obtidos com medições repetidas em condições de repetibilidade (local, analista, tempo e outras condições analíticas, as mais similares possíveis), de precisão intermediária (condições similares de local e procedimento e diferentes de tempo, analistas e outros) e de reprodutibilidade (diferentes locais, analistas e outros) (INMETRO, 2016; VIM, 2012).

A avaliação da adequação dos resultados obtidos para a tendência é realizada a partir da comparação dos resultados obtidos com o valor designado para o MRC, quando disponível, ou também a partir dos valores obtidos para recuperação. Alguns documentos orientativos apresentam valores de referência para este parâmetro, em diferentes faixas de concentração (AOAC, 2012b; EC, 2002).

Os resultados para a precisão são expressos em termos de desvio padrão relativo, tanto em condições de repetibilidade como em condições de precisão

intermediária (DPR_r e DPR_R , respectivamente) e normalmente avaliados em comparação com os valores de referência, que podem ser obtidos por exemplo, a partir da utilização da equação de Horwitz ou da fração HorRat. A determinação desses valores de referência é realizada a partir de modelos matemáticos que se baseiam na variabilidade dos resultados em função da concentração do analito (AOAC, 2012; INMETRO, 2016; HORWITZ; ALBERT, 2006).

3.4.3 Parâmetros de desempenho para métodos qualitativos

Uma análise qualitativa envolve a identificação ou classificação de uma substância a partir de uma resposta binária “sim” ou “não” para um dado nível de concentração do analito (EURACHEM, 2014).

Diferentemente dos métodos quantitativos, poucas são as informações nos documentos orientativos sobre os parâmetros de desempenho para avaliação de métodos qualitativos. O INMETRO (2016) cita que seletividade, limite de detecção e robustez (opcional) devem ser determinados, entretanto, não faz nenhum tipo de recomendação diferenciada para a execução dos ensaios ou para a avaliação dos resultados.

Os parâmetros de limite ou capacidade de detecção, seletividade e sensibilidade são apresentados no guia Eurachem (2014). Segundo este guia, o LD é determinado a partir da análise aleatória de amostras em diferentes níveis de concentração, em no mínimo 10 replicatas para cada nível. Gráficos de percentual de respostas positivas em função da concentração devem ser construídos, e o LD é estabelecido como o valor de concentração para o qual se obteve percentual de falso negativo inferior a 5%. A seletividade é dada em função da razão entre resultados negativos obtidos e o total de resultados negativos esperados e a sensibilidade em função da razão entre resultados positivos obtidos e o total de resultados positivos esperados.

Já no documento orientativo para validação de métodos da *Food and Drug Administration* (FDA, 2015) é recomendada uma avaliação mínima dos parâmetros de sensibilidade, seletividade, taxa de falso positivo, taxa de falso negativo, concentração mínima detectável (equivalente ao limite de detecção), robustez e confirmação de identidade (métodos de *screening*). O critério de avaliação do LD é

igual ao do guia anterior (< 5% de taxa de falso negativo) e também é estabelecido um critério para obtenção de taxas de falso positivo entre 10% e 15%, desde que sejam realizados métodos confirmatórios adicionais para as amostras positivas. A diferença entre o número de replicatas recomendadas para a análise utilizando métodos qualitativos e quantitativos é pequena, tanto nas determinações intra como interlaboratoriais. Por exemplo, para uma validação intralaboratorial classificada como nível de complexidade analítica “2”, são necessárias análises de 6 ou 9 replicatas por nível de concentração, para o método quantitativo e qualitativo, respectivamente (FDA, 2015).

Justamente devido à falta de referências bem estabelecidas, Gondim *et al.* (2014) propuseram um procedimento detalhado e sistematizado para a validação de métodos qualitativos. Foram propostas as etapas de testes preliminares para a definição do intervalo de concentração (1); estudo das taxas de falsos resultados, região de perda de confiabilidade, limite de detecção e valores de acordância (repetibilidade) e concordância (precisão intermediária) (2); estudo de seletividade (3) e estudo de robustez (4). Os autores enfatizaram a importância de se incluir um número significativo de amostras e níveis de concentração, visto que os métodos qualitativos resultam em uma resposta binária. Por exemplo, para a realização da segunda etapa, é sugerido o preparo de amostras em entre 5 e 10 diferentes níveis de concentração, mais amostras negativas, em 30 replicatas por nível. O uso de material de referência certificado, a aleatorização da análise e o desconhecimento da concentração das amostras para o analista também foi recomendado.

3.4.4 Incerteza de medição

A incerteza é definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam razoavelmente ser atribuídos ao mensurando. É sabido que, mesmo quando todos os componentes de erro conhecidos ou presumidos tenham sido avaliados e a correção adequada realizada, ainda permanecerá uma incerteza sobre a veracidade do valor declarado (EURACHEM, 2012; JCGM, 2008).

A estimativa da incerteza de medição é recomendada como uma determinação complementar à validação analítica e é considerada uma

característica dos dados obtidos (EURACHEM, 2014). Segundo a norma ABNT ISO/IEC 17.025:2005, o laboratório deve utilizar de procedimentos apropriados para estimar a incerteza de seus ensaios analíticos (ABNT, 2005).

Em linhas gerais, a incerteza de medição é obtida a partir da definição das fontes de variação e aplicação de equações e modelos matemáticos para obtenção das incertezas combinada e expandida (EURACHEM, 2012; JCGM, 2008).

A estimativa deste parâmetro em complementação à validação de metodologias para a análise de alimentos tem sido cada vez mais explorada, como pode ser observado nos estudos de Kiliç; Yenisoy-Karakas; Kiliç (2015), Rakita *et al.* (2014); Rezende, Carmo, Esteves (2015) e Petrarca; Rossi; Sylos (2016).

4 CAPÍTULO 1. DESEMPENHO DE MÉTODOS OFICIAIS PARA VERIFICAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DO LEITE POR ADIÇÃO DE NEUTRALIZANTES

RESUMO

A aplicabilidade dos métodos oficiais qualitativos do ácido rosólico e da fenolftaleína, e quantitativo da alcalinidade das cinzas para avaliar a adulteração por adição de neutralizantes no leite foi estudada. Para os métodos qualitativos, taxas de falso-positivos nulas e taxas de seletividade de 100,0% foram estimadas para as amostras de leite *in natura* acidificadas, sem adição de neutralizantes. Para o método do ácido rosólico, taxas de confiabilidade entre 93,3% e 100,0% foram alcançadas apenas para os níveis mais concentrados de hidróxido, bicarbonato e carbonato de sódio (0,050 g/100 mL, 0,300 g/100 mL e 0,080 g/100 mL, respectivamente). O método da fenolftaleína não foi capaz de detectar o hidróxido de sódio, em nenhum dos níveis de concentração estudados. Taxas de confiabilidade de 86,7% (carbonato de sódio) e 100,0% (bicarbonato de sódio) foram obtidas apenas para o último nível de concentração avaliado. Os valores de acordância e concordância indicaram padronização adequada da metodologia para as amostras de leite sem adição de neutralizantes e para aquelas com taxa de confiabilidade de 100,0%. Sensibilidade inadequada (limite de quantificação experimental de 0,058 g/100 mL), falta de seletividade na presença de estabilizantes de leite UHT e elevada variabilidade (DPR_r entre 6,3% e 271,1% e DPR_R entre 12,0% e 271,1%) foram observados para o método de alcalinidade das cinzas. Os teores de alcalinidade das cinzas no leite *in natura* acidificado somente sofreram alterações significativas ($p < 0,05$) e foram quantificados com confiabilidade quando foi adicionada quantidade elevada de hidróxido de sódio (0,050 g/100 mL). Tendo em vista a relevância da investigação da adulteração do leite por adição de neutralizantes, a avaliação do desempenho das três metodologias mostrou as limitações individuais e evidenciou a necessidade de otimização destas para adequação ao propósito de uso ou do estudo de alternativas metodológicas de maior eficácia.

Palavras-chave: ácido rosólico, fenolftaleína, alcalinidade das cinzas, sensibilidade, seletividade, fraude.

4.1 Introdução

A ocorrência da adulteração do leite é uma prática comum, sobretudo nos países em desenvolvimento, localizados na África, Ásia e América do Sul. Adulterantes como formol, ureia, amido, neutralizantes da acidez, detergentes, cloreto de sódio, açúcares, peróxido de hidrogênio e água são comumente pesquisados e detectados em leites de diferentes espécies, processamentos distintos e em várias etapas da cadeia produtiva (AZIZ; KHAN, 2014; CHANDA *et al.*, 2012; FIRMINO *et al.*, 2010; MANSOUR; EL-LOLY; AHMED, 2012; TAMANINI, 2012; WASUPALLI; SAI; KAUR, 2015).

A adição de neutralizantes ao leite é realizada no intuito de corrigir a acidez excessiva, decorrente da fermentação da lactose por ação microbiana. A neutralização do leite com hidróxido, carbonatos e bicarbonatos de sódio invariavelmente aumentará o pH, o teor de cinzas e a alcalinidade das cinzas do leite (KUMAR *et al.*, 2016; SINGH; GANDHI, 2015).

Neutralizantes da acidez podem ser detectados no leite pelos métodos da fenolftaleína, do ácido rosólico ou da alcalinidade das cinzas. A determinação do pH e da acidez titulável também são indicativos da ocorrência de adulteração. Tais metodologias são fundamentadas nas alterações de pH e de minerais no leite, em função da adição dos neutralizantes (SINGH; GANDHI, 2015).

Os métodos clássicos para a determinação de neutralizantes em leite foram publicados há várias décadas e ainda constam como métodos oficiais em países como Brasil e Índia (AOAC, 1941; AOAC, 2012; BRASIL, 1981; BRASIL, 2006; INDIA, 1960; INDIA, 2015). A pesquisa de neutralizantes da acidez, sobretudo com a utilização do método do ácido rosólico, é comumente utilizada na investigação de fraudes (KANDPAL; SRIVASTAVA; NEGI, 2012; INDUMATHI; REDDY, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; RAMYA *et al.*, 2015; SINGULURI; SUKUMARAN, 2014). No entanto, apesar da utilização rotineira, são poucas as informações sobre o desempenho e a confiabilidade destes métodos, sendo questionável sua sensibilidade na ocorrência de adulterações com baixos teores de neutralizantes (BRASIL, 2006; GONDIM, 2016; INDIA, 2012; INDIA, 2015; KUMAR *et al.*, 2016; SOWMYA *et al.*, 2013).

Os métodos qualitativos são baseados numa resposta binária simples (“detectado ou “não detectado”), o que torna possível a detecção de analito com maior rapidez e simplicidade operacional e com menor custo e geração de resíduos (SOUZA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2013). Todavia, assim como para os métodos quantitativos, é importante garantir a confiabilidade de seus resultados e confirmar sua adequação ao uso proposto (GONDIM *et al.*, 2014; GONDIM *et al.*, 2015).

Trabalhos sobre a avaliação de desempenho e validação de métodos qualitativos para a detecção de adulterações em leite são restritos, além de não ser observada uma uniformização quanto aos parâmetros avaliados (BOTELHO *et al.*, 2015; GONDIM *et al.*, 2014; GONDIM *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

Neste estudo, os métodos oficiais para identificação (método do ácido rosólico e da fenolftaleína) e determinação (método da alcalinidade das cinzas) da fraude do leite por adição de neutralizantes foram estudados, utilizando tanto a abordagem qualitativa como a quantitativa. A aplicabilidade dos métodos, principalmente em relação à seletividade na presença de estabilizantes de leite UHT e em baixos níveis de adição de neutralizantes também foi avaliada.

4.2 Material e métodos

Os ensaios analíticos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química Bromatológica (LQB) do Serviço de Química e do laboratório do Serviço de Microscopia de Produtos, do Instituto Octávio Magalhães (Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais/ LACEN-MG) da Fundação Ezequiel Dias.

As vidrarias, instrumentos e equipamentos de medição utilizados neste trabalho possuíam calibração vigente, realizada por empresas acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

4.2.1 Amostras

Foi utilizado leite *in natura* proveniente da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em Igarapé (Minas Gerais, Brasil).

Para os procedimentos de validação, oito amostras de leite com aproximadamente cinco litros cada, obtidas entre julho de 2013 e janeiro de 2014, e em setembro de 2016 foram utilizadas. A coleta foi realizada diretamente do tanque de expansão entre 2 a 3 horas após a ordenha matutina. O leite foi imediatamente transportado para o laboratório em condições de refrigeração (4 °C por até 1 hora), caracterizado quanto ao atendimento aos requisitos físico-químicos previstos no Padrão de Identidade e Qualidade do produto (aspecto, cor, odor, densidade a 15 °C em g/mL, gorduras em g/100 g, sólidos totais em g/100 g, sólidos não gordurosos em g/100 g, acidez titulável em g de ácido láctico/100 mL e índice crioscópico em °H) e mantido em temperaturas inferiores a 7 °C até o momento da análise (BRASIL, 2006; BRASIL, 2011).

4.2.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a realização das análises foram: balança analítica eletrônica (Mettler Toledo, modelo AG 285, 0,0001 g de resolução), banho termostático com ajuste eletrônico de temperatura (Cientec, modelo Dubnoff CT-232, 0,1 °C de resolução), chapa aquecedora com agitação magnética (Corning, modelo PC4200) e mufla (Lavoisier, modelo 402D).

4.2.3 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e padrões utilizados foram de grau de pureza apropriado, cujos valores encontravam-se descritos em seus respectivos certificados de análise. No preparo de soluções, foi observada a pureza dos reagentes e corrigido quando necessário.

Os reagentes utilizados e suas respectivas purezas foram: ácido clorídrico (37%), ácido sulfúrico (96%), fosfato de sódio monobásico (98%) e fosfato de sódio dibásico (99,8%) da Merck (Darmstadt, Alemanha); carbonato de sódio (99,5%) da Fluka (Buchs, Suíça); álcool etílico (99,8%), citrato de sódio tribásico (100%), ácido rosólico, cloreto de cálcio (103,7%), fenolftaleína, fucsina básica (C.I. 42510) e fosfato de sódio tribásico (99%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); bicarbonato de sódio (100,3%) e hidróxido de sódio (98,9%) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA),

ácido rosólico da F. Maia (Belo Horizonte, Brasil) e mix comercial de fosfatos – Mix Viva L 80: mistura de tripolifosfato, fosfato monossódico e dissódico (56,9 a 58,9% em P_2O_5), grau alimentício, para uso como estabilizante em leite e derivados, da Vivare (Matias Barbosa, Brasil).

Para a detecção de neutralizantes em leite, foram utilizadas soluções de álcool etílico (99,8% v/v) neutralizado, ácido rosólico (2,0 g/100 mL) em álcool etílico neutralizado (método do ácido rosólico); hidróxido de sódio 0,1 mol/L, ácido sulfúrico 0,0125 mol/L, fenolftaleína (1,0 g/100 mL) em álcool etílico neutralizado, solução estoque de fucsina básica em álcool etílico (0,12 g/100 mL) e solução de trabalho de fucsina básica em álcool etílico 50% (0,00024 g/100 mL) (método da fenolftaleína).

Para a determinação da alcalinidade das cinzas e acidez titulável, foram utilizadas soluções padronizadas de hidróxido de sódio 0,1 mol/L e ácido clorídrico 0,1 mol/L, cloreto de cálcio (40,0 g/100 mL) e fenolftaleína (1,0 g/100 mL) em álcool etílico neutralizado e as soluções para referência de cor (ponto final da titulação), citadas anteriormente para o método da fenolftaleína.

Todas as soluções citadas foram preparadas conforme descrito na Instrução Normativa nº 68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2006).

Para a avaliação o desempenho dos métodos na presença de neutralizantes e para o estudo da seletividade, foram utilizadas soluções aquosas recém-preparadas dos estabilizantes nas concentrações de 10,0 g/100 mL (citrato de sódio, mix de fosfatos, fosfatos monossódico, dissódico e trissódico) e dos neutralizantes (hidróxido de sódio a 5,0 g/100 mL e 10,0 g/100 mL, carbonato de sódio a 5,0 g/100 mL e bicarbonato de sódio a 10,0 g/100 mL).

4.2.4 Metodologias analíticas

A detecção de neutralizantes em leite (métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína), a determinação do resíduo mineral fixo, da alcalinidade das cinzas e da acidez titulável foram realizadas conforme descrito nas metodologias oficiais brasileiras (BRASIL, 2006) (**Figuras 4.1 e 4.2**).

Para a detecção de neutralizantes pelo método da fenolftaleína, utilizou-se como referência de coloração rósea para interpretação do resultado final, uma

amostra de leite (10 mL) adicionada de 1 mL da solução de trabalho de fucsina básica, preparada no momento da análise. Como a metodologia não estabelece um padrão de referência da coloração rósea e o fundamento analítico do método é semelhante ao da acidez titulável (para qual é descrita a utilização do padrão de referência: coloração ligeiramente rósea), optou-se por utilizar a mesma referência de coloração em ambos os métodos.

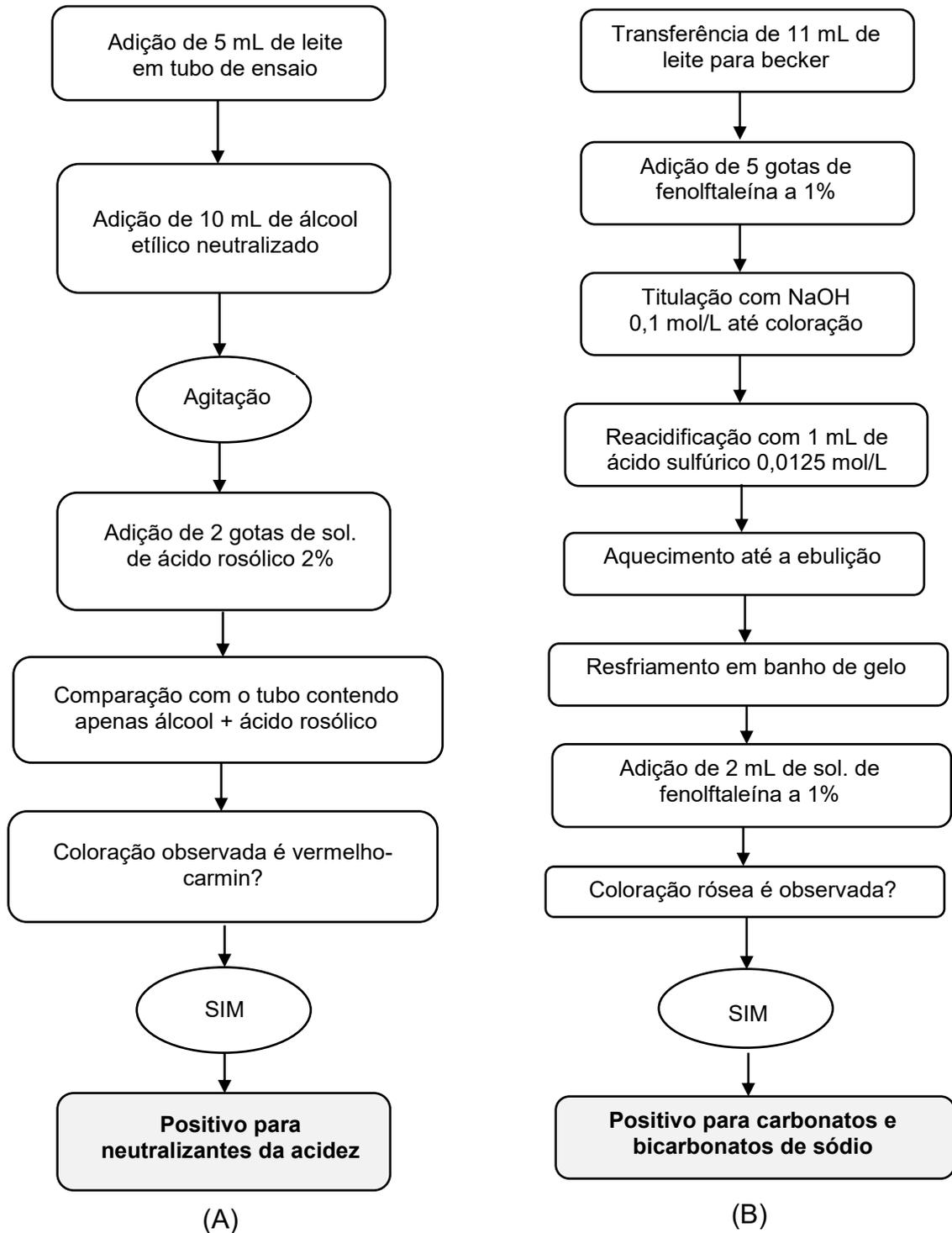


Figura 4.1. Fluxogramas para a pesquisa de neutralizantes da acidez em leite, utilizando o método do ácido rosólico (A) e o método da fenolftaleína (B).

Fonte: Instrução Normativa n° 68 - MAPA (BRASIL, 2006), adaptado.

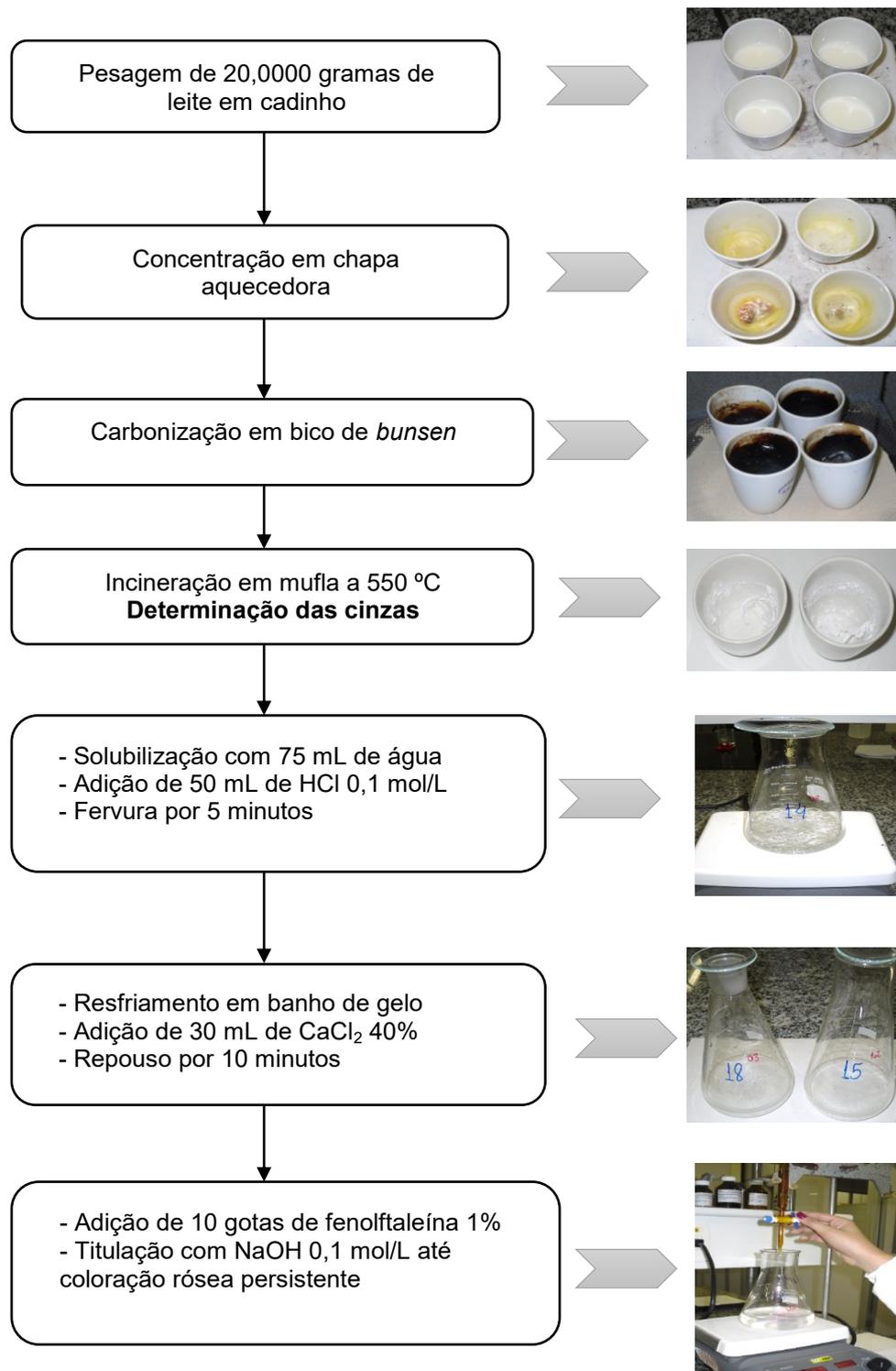


Figura 4.2. Fluxograma para a determinação do resíduo mineral fixo e da alcalinidade das cinzas em leite.

Fonte: Instrução Normativa n° 68 - MAPA (BRASIL, 2006), adaptado.

4.2.5 Avaliação do desempenho dos métodos oficiais qualitativos para análise de neutralizantes em leite

Para avaliar o desempenho dos métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína na detecção de neutralizantes da acidez, o leite *in natura* foi induzido à acidificação microbiana em condições laboratoriais controladas (incubação do leite em banho de água, em temperatura de 37 ± 1 °C, até que a acidez titulável extrapolasse os limites da legislação vigente), no intuito de simular o que ocorre indevidamente na cadeia produtiva: armazenamento inadequado, desenvolvimento microbiano e consequente aumento da acidez titulável, seguida da adição ilícita de substâncias neutralizantes.

Foram analisadas amostras de leite acidificadas e amostras acidificadas adicionadas de neutralizantes da acidez (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio) em diferentes níveis de concentração. Os níveis de adição de cada neutralizante foram previamente determinados, de forma que se fossem obtidas amostras finais de leite com diferentes teores de acidez titulável, que se enquadrassem ou extrapolassem o intervalo preconizado pela legislação vigente (0,14 g/100 mL a 0,18 g/100 mL) (BRASIL, 2011). Dessa forma, pretendia-se avaliar a sensibilidade dos métodos e averiguar se a adição de neutralizantes ao leite em quantidades suficientes apenas para neutralizar a acidez excessiva era detectada.

Para cada neutralizante estudado, cerca de 4 litros de leite foram mantidos em banho de água (37 ± 1 °C) entre 8 e 9 horas, até que a acidez titulável atingisse $0,19 \pm 0,01$ grama de ácido láctico/100 mL de leite.

Após a acidificação, o leite era imediatamente resfriado em banho de gelo até atingir temperaturas menores ou iguais a 7 °C, para então ser utilizado no preparo das amostras adicionadas de neutralizantes, para a avaliação do desempenho dos métodos.

4.2.5.1 Delineamento experimental para avaliação das taxas de falso positivo, falso negativo, sensibilidade, seletividade e confiabilidade, seletividade, limite de detecção, acordância e concordância

Os neutralizantes da acidez (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio) foram adicionados ao leite em no mínimo seis níveis de

concentração além do branco, e em replicatas independentes para cada nível (**Tabela 4.1**).

Para cada método qualitativo e neutralizante estudado, conforme proposto por Gondim et al. (2014), foram realizadas três baterias analíticas distintas, variando-se dias, analistas e soluções. Em cada bateria eram analisadas dez replicatas para cada nível de concentração e também para o leite acidificado sem adição de neutralizantes, totalizando entre 210 e 240 replicatas por analito (**Figura 4.3**). Para garantir independência, as amostras foram preparadas e analisadas em ordem aleatória e desconhecida para os analistas. Em cada bateria analítica três replicatas de cada nível, sorteadas aleatoriamente, também foram utilizadas para a determinação da acidez titulável, de acordo com a metodologia nº 947.05 (AOAC, 2012b).

Tabela 4.1. Descrição do preparo de soluções padrão para cada neutralizante estudado: níveis de concentração, alíquotas de solução e volume de leite utilizado.

Neutralizante* (g/100 mL)	Alíquota de neutralizante utilizada (mL)	Volume de leite (mL)
<i>Hidróxido de sódio (solução de uso de 5,0 g/100 mL)</i>		
0,000	0,000	50,00
0,002	0,020	49,98
0,005	0,050	49,95
0,010	0,100	49,90
0,015	0,150	49,85
0,030	0,300	49,70
0,050	0,500	49,50
<i>Bicarbonato de sódio (solução de uso de 10,0 g/100 mL)</i>		
0,000	0,000	50,00
0,005	0,025	49,98
0,010	0,050	49,95
0,020	0,100	49,90
0,060	0,300	49,70
0,150	0,750	49,25
0,300	1,500	48,50
<i>Carbonato de sódio (solução de uso de 5,0 g/100 mL)</i>		
0,000	0,000	50,00
0,005	0,050	49,95
0,015	0,150	49,85
0,025	0,250	49,75
0,040	0,400	49,60
0,050	0,500	49,50
0,060	0,600	49,40
0,080	0,800	49,20

*concentração final de neutralizante no leite.

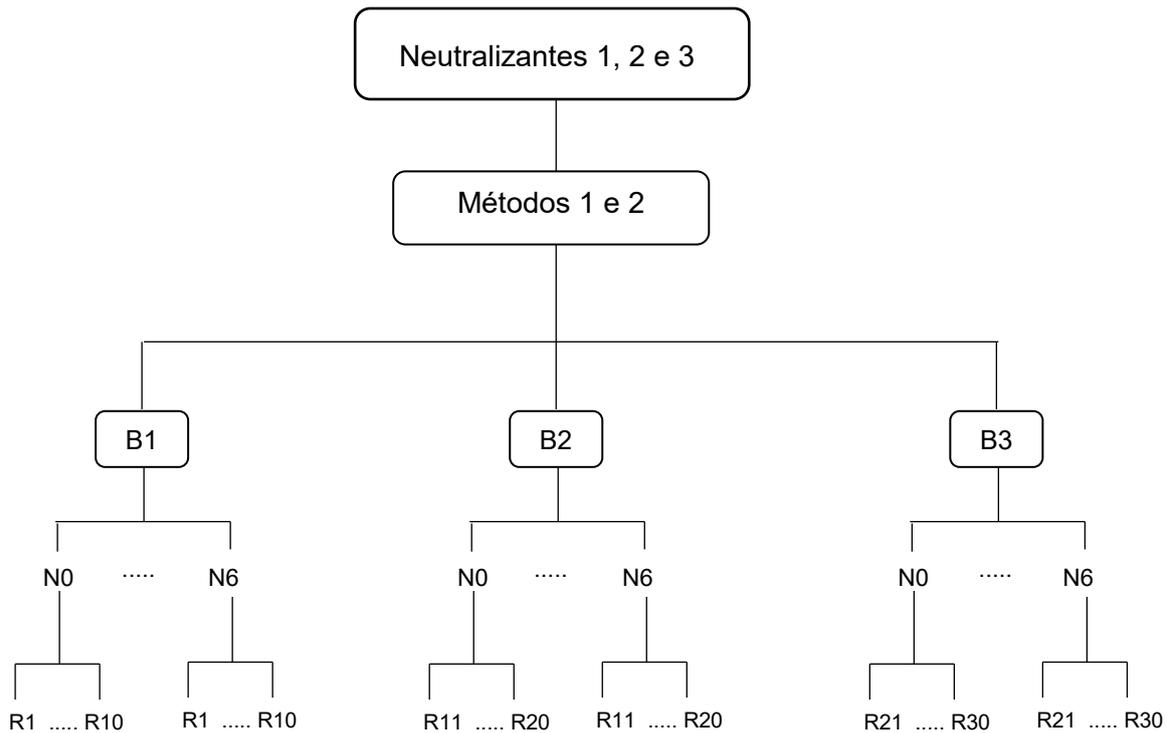


Figura 4.3. Representação do delineamento experimental inteiramente casualizado para a avaliação do desempenho dos métodos qualitativos para detecção de neutralizantes em leite.

Neutralizantes: hidróxido de sódio (1), bicarbonato de sódio (2) e carbonato de sódio (3); Métodos: pesquisa de neutralizantes – método do ácido rosólico (1); pesquisa de neutralizantes – método da fenolftaleína (2); N: nível de concentração de neutralizante da acidez; B: bateria analítica (1, 2 e 3); R: replicata.

Após a realização dos ensaios, foram estimadas, para cada nível de concentração as taxas de falso positivo (TFP), falso negativo (TFN), sensibilidade (TSB), seletividade (TST) e confiabilidade (TCF), limite de detecção (LD), região de perda de confiabilidade (RPC), acordância (ACO) e concordância (CON), conforme descrito por Gondim *et al.* (2014) (**Tabela 4.2**).

O método foi considerado seletivo quando foi obtida TST igual a 100% para as amostras de leite acidificado sem adição de neutralizantes. Estimou-se ACO e CON por análise combinatória, sendo considerados aceitáveis os resultados iguais ou superiores a 0,8 (obtenção de um resultado negativo) desde que fora da RPC. A RPC foi representada pela região entre 5% e 95% de resultados positivos, sendo considerado como LD do método o limite superior da RPC (GONDIM *et al.*, 2014).

Tabela 4.2. Equações para obtenção das taxas de falso positivo (TFP), falso negativo (TFN), sensibilidade (TSB), seletividade (TST) e confiabilidade (TCF).

Taxa	Expressão
Falso positivo (TFP)	$TFP_i = \frac{FP_i}{FP_i + TN_i} \times 100$ (Eq. 1)
Falso negativo (TFN)	$TFN_i = \frac{FN_i}{FN_i + TP_i} \times 100$ (Eq. 2)
Sensibilidade (TSB)	$TSB_i = \frac{TP_i}{TP_i + FN_i} \times 100$ (Eq. 3)
Seletividade (TST)	$TST_i = \frac{TN_i}{TN_i + FP_i} \times 100$ (Eq. 4)
Confiabilidade (TCF)	$TCF_i = \frac{TP_i + TN_i}{TP_i + TN_i + FP_i + FN_i} \times 100$ (Eq. 5)

FP: número de resultados falso positivos; TN: total dos resultados negativos corretos; FN: número de resultados falso negativos; TP: total de resultados positivos corretos; i: cada nível de concentração.

Fonte: Gondim *et al.*, 2014.

4.2.5.2 Avaliação complementar da seletividade

Para avaliar a seletividade dos métodos na presença de interferentes, foram adicionadas ao leite *in natura* acidificado, de forma individual, soluções de estabilizantes utilizados no processamento de leite UHT: citrato de sódio, mix comercial de fosfatos, fosfatos monossódico, dissódico e trissódico, nas concentrações de adição de 0,05 e 0,10 g/100 mL. Foram preparadas dez replicatas independentes de cada nível, que foram analisadas também de forma aleatória e desconhecida para o analista, em condições de repetibilidade. O método foi considerado seletivo quando o interferente em questão não alterou a TCF (GONDIM *et al.*, 2014).

Para o método da fenolftaleína, também foi avaliado o efeito supressor dos estabilizantes (0,05 g/100 mL) na detecção do bicarbonato de sódio no menor nível de concentração para o qual tenha sido obtida TCF de 100%, sendo tolerada uma

taxa de no mínimo 95% na presença do potencial interferente (GONDIM *et al.*, 2014).

4.2.6 Avaliação do desempenho do método oficial quantitativo de determinação da alcalinidade das cinzas

Para avaliar o desempenho da determinação da alcalinidade das cinzas na investigação da adulteração do leite por adição de neutralizantes, foram estudados os seguintes parâmetros de desempenho do método: limites de detecção e quantificação (LD e LQ) teóricos e experimentais, seletividade, precisão em condições de repetibilidade e precisão intermediária (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi de 5%.

4.2.6.1 Seletividade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e precisão intermediária

Amostras de leite *in natura* e amostras de leite adicionadas individualmente dos estabilizantes: fosfato monossódico, dissódico e trissódico, citrato de sódio e mix de fosfatos na concentração de 0,10 g/100 mL (quantidade máxima permitida pela legislação vigente) foram utilizadas para a avaliação da seletividade, estimativa do LD e LQ teórico e experimental, e avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método. As amostras para cada nível foram analisadas em 12 replicatas independentes, em quatro baterias analíticas, variando-se dias, analistas e soluções.

Valores dispersos foram identificados pelo teste de *Grubbs*. A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de *Ryan-Joiner* e *Levene* modificado, respectivamente (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

Para avaliação da seletividade, as médias obtidas em cada tratamento foram comparadas utilizando o teste F para delineamento inteiramente casualizado e a discriminação das médias foi realizada pelo teste de *Tukey*, ambos os testes ao nível de 5% de significância.

Os valores de LD e LQ teóricos foram obtidos a partir dos resultados obtidos para as amostras de leite *in natura* (baixa concentração do analito). Foram estimados como 3 e 10 vezes, respectivamente, o desvio padrão amostral obtido (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016).

Foi considerado como LD experimental o menor teor médio de alcalinidade das cinzas quantificado, independente do atendimento aos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária. O LQ do método foi confirmado experimentalmente, pela obtenção de resultados aceitáveis para os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária (EC, 2002; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

Precisão, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária foram estimadas por análise de variância e expressas em termos de desvio padrão relativo de repetibilidade (DPR_r) e de precisão intermediária (DPR_R). Para a avaliação da precisão, as razões HorRat foram determinadas e consideradas satisfatórias quando o produto da divisão fosse igual ou inferior a 2,0 (HORWITZ; ALBERT, 2006).

A veracidade não foi avaliada, devido à indisponibilidade de material de referência ou padrão analítico para determinação da alcalinidade das cinzas em leite.

Ensaio complementares foram realizados utilizando amostras de leite *in natura* frescas, acidificadas ($0,19 \pm 0,01$ g/ 100 mL), acidificadas e adicionadas de hidróxido de sódio nas concentrações de 0,005 g/100 mL, 0,010 g/100 mL, 0,015 g/100 mL, 0,030 g/100 mL e 0,050 g/100 mL. Estas amostras foram analisadas em três replicatas independentes para a determinação dos teores de alcalinidade das cinzas e também de acidez titulável. As médias de cada tratamento também foram comparadas utilizando o mesmo procedimento do estudo de seletividade.

4.3 Resultados e Discussão

O leite *in natura* utilizado nos experimentos atendeu a todos os requisitos físico-químicos avaliados e previstos no Padrão de Identidade e Qualidade do produto (BRASIL, 2011). Apresentou aspecto, cor e odor adequados, densidade relativa a 15 °C de $1,031 \pm 0,001$ g/mL, teor de gorduras de $3,8 \pm 0,3$ g/100 g, teor

de sólidos totais de $12,6 \pm 0,4$ g/100 g, teor de sólidos não gordurosos de $8,8 \pm 0,2$ g/100 g, acidez titulável de $0,16 \pm 0,005$ g de ácido láctico/100 mL e índice crioscópico de $-0,545 \pm 0,005$ °H.

4.3.1 Desempenho de métodos oficiais qualitativos para análise de neutralizantes em leite

4.3.1.1 Teores de acidez titulável, taxas de falso positivo, falso negativo, sensibilidade, seletividade e confiabilidade, região de perda de confiabilidade e limites de detecção

O perfil de coloração obtido na realização do método do ácido rosólico, para o controle positivo e para as amostras de leite acidificadas e adicionadas de neutralizantes em diferentes concentrações está ilustrado para o neutralizante bicarbonato de sódio na **Figura 4.4**.

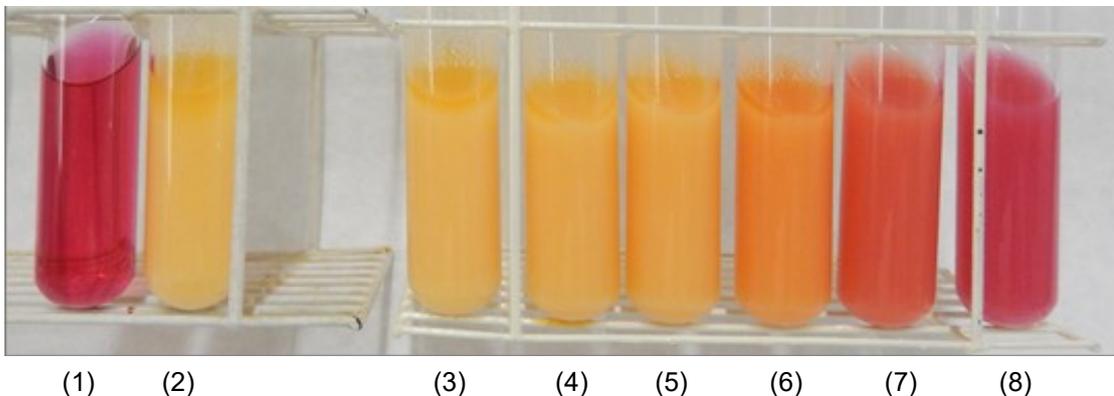


Figura 4.4. Resultados analíticos para a pesquisa de neutralizantes em leite acidificado, utilizando o método do ácido rosólico: controle positivo (1); amostra de leite *in natura* acidificada sem adição de neutralizantes (2); amostras de leite *in natura* acidificadas, adicionadas de bicarbonato de sódio nas concentrações de 0,005 g/100 mL (3), 0,010 g/100 mL (4), 0,020 g/100 mL (5), 0,060 g/100 mL (6), 0,150 g/100 mL (7) e 0,300 g/100 mL (8).

Ambos os métodos qualitativos estudados apresentaram TFP de 0%, TST e TCF de 100% para as amostras de leite *in natura* acidificadas, sem adição de neutralizantes da acidez, demonstrando a seletividade do método na presença apenas dos constituintes do leite (**Tabela 3**).

Tabela 4.3. Taxas de falso-negativos, falso-positivos, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade obtidas na detecção de neutralizantes da acidez pelos métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína e estimativas das médias da acidez titulável, em amostras de leite *in natura* acidificadas em condições controladas.

Analito (g/100 mL)	Acidez titulável* (g/100 mL)	Desempenho dos métodos qualitativos					
		Ácido rosólico			Fenolftaleína		
		TFN/TFP	TSB/TST	TCF	TFN/TFP	TSB/TST	TCF
<i>Hidróxido de sódio</i>							
0,0	0,195 ± 0,010	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
0,002	0,192 ± 0,015	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
0,005	0,182 ± 0,014	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
0,010	0,174 ± 0,017	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
0,015	0,155 ± 0,013	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
0,030	0,122 ± 0,015	66,7	33,3	33,3	100,0	0,0	0,0
0,050	0,072 ± 0,017	0,0	100,0	100,0	96,7	3,3	3,3
<i>Bicarbonato de sódio</i>							
0,0	0,191 ± 0,005	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
0,005	0,188 ± 0,006	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
0,010	0,185 ± 0,004	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
0,020	0,180 ± 0,006	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
0,060	0,169 ± 0,007	100,0	0,0	0,0	76,7	23,3	23,3
0,150	0,147 ± 0,008	23,3	76,7	76,7	20,0	80,0	80,0
0,300	0,129 ± 0,008	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
<i>Carbonato de sódio</i>							
0,0	0,195 ± 0,009	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
0,005	0,191 ± 0,008	100,0	0,0	0,0	96,7	3,3	3,3
0,015	0,177 ± 0,007	100,0	0,0	0,0	96,7	3,3	3,3
0,025	0,168 ± 0,005	100,0	0,0	0,0	96,7	3,3	3,3
0,040	0,151 ± 0,014	100,0	0,0	0,0	90,0	10,0	10,0
0,050	0,138 ± 0,011	100,0	0,0	0,0	76,7	23,3	23,3
0,060	0,135 ± 0,007	73,3	26,7	26,7	83,3	16,7	16,7
0,080	0,120 ± 0,015	6,7	93,3	93,3	13,3	86,7	86,7

* médias ± desvio padrão (n = 9); TFN: taxa de falso-negativos, para amostras positivas; TFP: taxa de falso-positivos, para amostras negativas; TSB: taxa de sensibilidade, para amostras positivas; TST: taxa de seletividade, para amostras negativas; TCF: taxa de confiabilidade (n = 30). Destacados em cinza os valores que se encontraram fora da região de perda de confiabilidade.

A adição do neutralizante hidróxido de sódio ao leite *in natura* acidificado em quantidades entre 0,002 g/100 mL e 0,050 g/100 mL proporcionou uma diminuição da acidez titulável do leite acidificado de 0,195 g/100 mL para até 0,072 g/100 mL. No método do ácido rosólico, os resultados para TFN, TSB e TCF variaram entre 0,0% e 100,0%, obtendo-se TCF de 100,0% apenas para o último nível estudado. Foi demonstrada a falta de sensibilidade do método da fenolftaleína para a detecção do hidróxido de sódio em leite, pois foram obtidas TFN entre 96,7% e 100,0% e TCF entre 0,0% e 3,3%. Tal resultado era esperado, visto que o método da fenolftaleína é recomendado apenas para detecção dos neutralizantes carbonato e bicarbonato de sódio em leite (BRASIL, 2006).

Para o neutralizante bicarbonato de sódio, quantidades entre 0,005 g/100 mL e 0,300 g/100 mL adicionadas ao leite *in natura* acidificado proporcionaram uma diminuição da acidez titulável de 0,191 g/100 mL para até 0,129 g/100 mL. Os parâmetros TFN, TSB e TCF variaram entre 0,0% e 100,0%, para ambos os métodos. As taxas obtidas foram similares entre os métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína. Para os níveis de maior concentração do analito, obteve-se TFN de cerca de 20,0% e TCF de cerca de 80,0% (adição de 0,150 g/100 mL de bicarbonato de sódio) e TFN de 0,0% e TCF de 100,0% (adição de 0,300 g/100 mL de bicarbonato de sódio).

A adição de carbonato de sódio ao leite *in natura* acidificado, em quantidades entre 0,005 g/100 mL e 0,080 g/100 mL, resultou em uma diminuição da acidez titulável de 0,195 g/100 mL para até 0,120 g/100 mL. Assim como para o bicarbonato de sódio, as taxas obtidas, sobretudo para os dois níveis de carbonato de sódio de maior concentração, foram similares para os dois métodos. Valores de TFN entre 6,7% e 100,0%, de TSB e TCF entre 0,0% e 93,3% foram obtidas para o método do ácido rosólico. Para o método da fenolftaleína obteve-se valores entre 13,3% e 96,7% (TFN) e entre 3,3% e 86,7% (TSB e TCF).

Considerando como LD o nível de concentração para cada neutralizante e método, em que a TCF foi de no mínimo 95%, foram obtidos os limites de 0,050 g/100 mL (hidróxido de sódio), 0,300 g/100 mL (bicarbonato de sódio) e superior a 0,080 g/100 mL (carbonato de sódio) para ambos os métodos. Teve-se uma exceção para a detecção do hidróxido de sódio pelo método da fenolftaleína,

para o qual não foi possível estabelecer o LD, visto a falta de sensibilidade do método na detecção deste neutralizante.

Os resultados obtidos demonstraram que o desempenho dos dois métodos na detecção de neutralizantes em leite *in natura* acidificado somente mostrou-se adequado quando o nível de adição do analito foi elevado e, sobretudo, em quantidades que resultaram em alterações expressivas na acidez titulável. Quando a adição foi realizada apenas no intuito de neutralização parcial da acidez desenvolvida e reenquadramento da mesma no intervalo previsto pela legislação brasileira (0,14 a 0,18 g/100 mL), os métodos avaliados não apresentaram bom desempenho.

Em estudo com o neutralizante bicarbonato de sódio, Wanderley *et al.* (2012) observaram que a adição de 0,06 g/100 mL modificava discretamente a acidez do leite, que permanecia dentre os níveis normais da legislação, mas alterava significativamente o ponto de congelamento (2012).

O manual indiano de métodos para análise de leite e derivados relata como limites de detecção para o método do ácido rosólico valores de 0,10 g/100 mL para hidróxido e carbonato de sódio, e 0,20 g/100 mL para bicarbonato de sódio (INDIA, 2015). Neste estudo foram observados limites de detecção inferiores para hidróxido e carbonato de sódio. Para o bicarbonato de sódio, apesar de ter sido constatado um LD superior, foi possível observar que o LD referenciado se encontra entre os dois últimos níveis de concentração avaliados, para os quais obteve-se TCF entre 76,7% e 100,0%.

Silva *et al.* (2015) também observou que a adição de hidróxido de sódio ao leite *in natura* nas quantidades de 0,010 g/100 mL, 0,025 g/100 mL e 0,050 g/100 mL reduzia a acidez titulável de 0,17 g/100 mL para até 0,10 g/100 mL e determinou como limite de detecção o valor de 0,10 g/100 mL de hidróxido de sódio. Os autores ainda afirmaram que o hidróxido de sódio não foi detectado, quando a acidez do leite foi neutralizada com pequena quantidade de hidróxido de sódio, suficiente apenas para o enquadramento da acidez titulável aos limites da legislação vigente.

Gondim (2016) validou o método oficial do ácido rosólico para os neutralizantes: bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio e citrato de sódio. Foi realizada a validação intralaboratorial com amostras de leite *in natura*

sem acidificação, tanto para a versão oficial do método (comparação do resultado com o padrão de cor vermelho carmin) como para uma versão modificada (comparação do resultado com a coloração da amostra controle não cega). O método modificado foi validado interlaboratorialmente, utilizando amostras previamente acidificadas a 0,19 g/100 mL. Na validação intralaboratorial, foram obtidos LDs 0,0133 e 0,09% para o método tradicional e entre 0,0094 e 0,07% para o método modificado. Ou seja, foram obtidos valores de LD cerca de 3 a 4 vezes inferiores aos obtidos nesse estudo, para o método tradicional. No entanto, a autora esclareceu que na avaliação da adequação ao propósito de uso (ensaios com amostras previamente acidificadas), o método apresentou-se adequado apenas para a detecção de hidróxido de sódio, sendo observadas limitações na detecção dos demais neutralizantes em amostras de leite *in natura* com níveis de acidez acima dos limites permitidos. No estudo colaborativo realizado pela autora, foi confirmado o desempenho do método modificado em relação aos parâmetros de seletividade e acordância. No entanto, em relação à sensibilidade e à precisão intermediária, o desempenho do método foi inferior ao obtido na etapa de validação intralaboratorial, o que é explicado pelo fato de na validação intralaboratorial terem sido usadas amostras de leite *in natura* frescas e na validação interlaboratorial foram usadas amostras previamente acidificadas.

É importante ressaltar que como os métodos qualitativos do ácido rosólico e da fenolftaleína são dependentes do pH, os limites de detecção obtidos irão variar em função do pH inicial do leite utilizado nos estudos. Neste trabalho, foi utilizado leite *in natura* acidificado. É esperado que se obtivesse limites de detecção menores utilizando leite *in natura* fresco, como relatado por Gondim (2016).

4.3.1.2 Acordância e Concordância

Para o método do ácido rosólico, para os três neutralizantes estudados, foram obtidos resultados de ACO e CON satisfatórios ($\geq 0,8$) para todos os níveis de concentração, exceto para o penúltimo nível, caracterizado pela região de perda de confiabilidade (0,030 g/100 mL de hidróxido de sódio, 0,150 g/100 mL de bicarbonato de sódio e 0,060 g/100 mL de carbonato de sódio) (**Figura 4.5**).

A concordância variou entre 0,5 e 1,0 para o hidróxido de sódio, sendo diferente de 1,0 apenas para o penúltimo nível de concentração. Para bicarbonato e carbonato de sódio, variou entre 0,6 e 1,0, sendo também inferior a 1,0 apenas para o penúltimo nível de concentração de bicarbonato e de 0,6 e 0,9 para os dois últimos níveis de concentração de carbonato de sódio.

Já para o método da fenolftaleína, apenas para o neutralizante hidróxido de sódio se obteve resultados satisfatórios tanto para a ACO (0,8 a 1,0) como para a CON (0,9 a 1,0). Valores inferiores a 1,0 foram observados somente na concentração de 0,050 g/100 mL de adição em leite *in natura* acidificado. Para o bicarbonato de sódio, a ACO variou entre 0,5 e 1,0 e a CON entre 0,6 e 1,0. Valores menores que 1,0 foram observados para os níveis de concentração de 0,060 g/100 mL e 0,150 g/100 mL. Para o carbonato de sódio maior variabilidade entre os resultados tanto de ACO como de CON foram observados. Valores iguais a 1,0 foram obtidos somente para o leite *in natura* acidificado sem adição do neutralizante. Para os demais níveis de concentração, ACO média entre 0,6 e 0,9 foram observadas. A CON variou de forma similar à ACO (**Figura 4.6**).

Na avaliação da ACO e CON, foi observada para ambos os métodos que o comportamento destes parâmetros foi influenciado pela concentração e que valores inferiores a 1,0 somente foram visualizados na RPC.

A ACO e a CON são os parâmetros relacionados à precisão do método, em condições de repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. Esses parâmetros representam a probabilidade de duas amostras idênticas, analisadas pelo mesmo laboratório, fornecerem o mesmo resultado e indicam se o método está suficientemente uniformizado (GONDIM *et al.*, 2014; LANGTONN *et al.*, 2002).

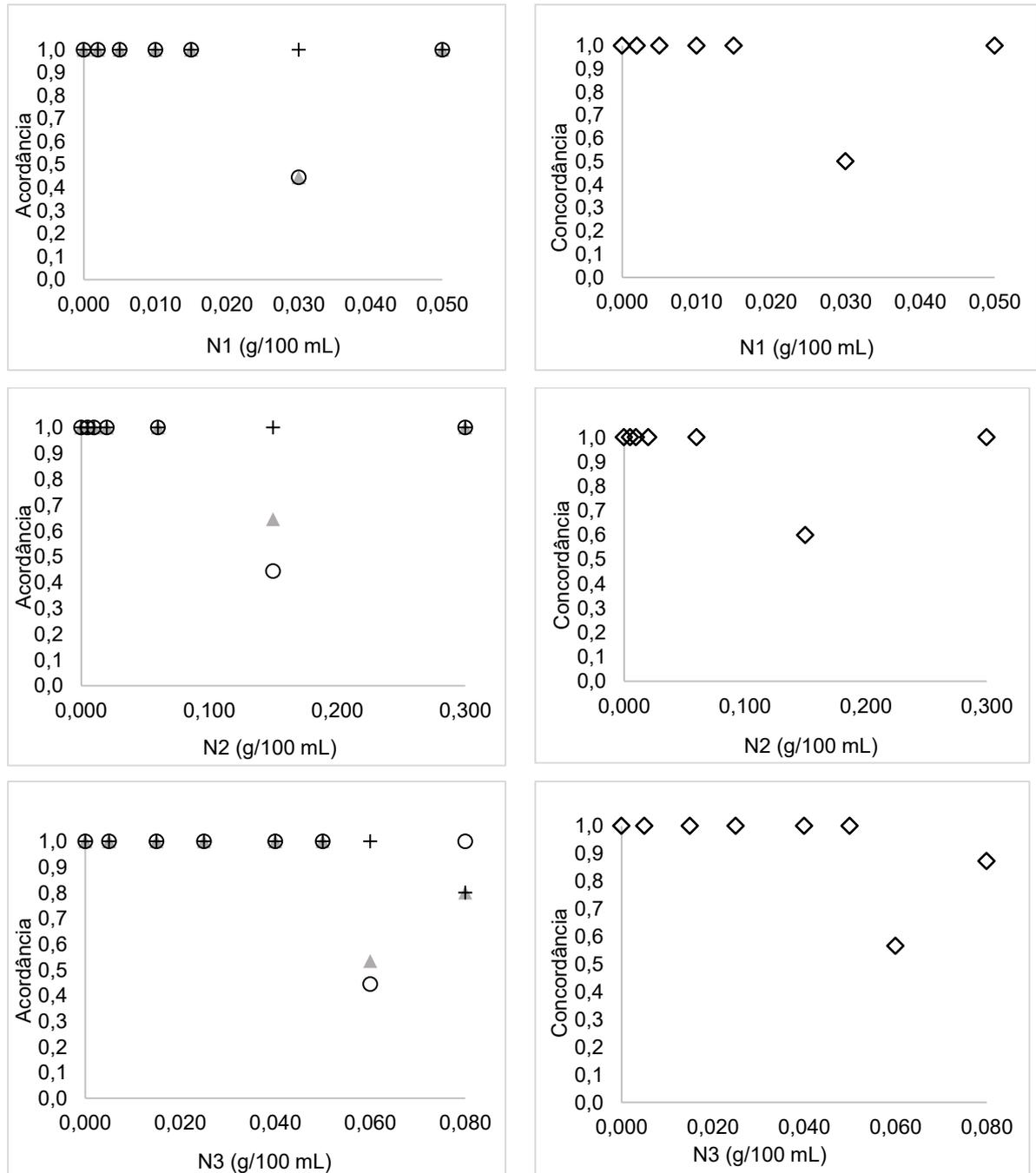


Figura 4.5. Valores de acordância (n=10) e concordância (n=30) para o método do ácido rosólico, em função dos diferentes tipos e concentrações de neutralizantes estudados.

N1: hidróxido de sódio; N2: bicarbonato de sódio; N3: carbonato de sódio.

▲ Bateria analítica 1; + bateria analítica 2; ○ bateria analítica 3.

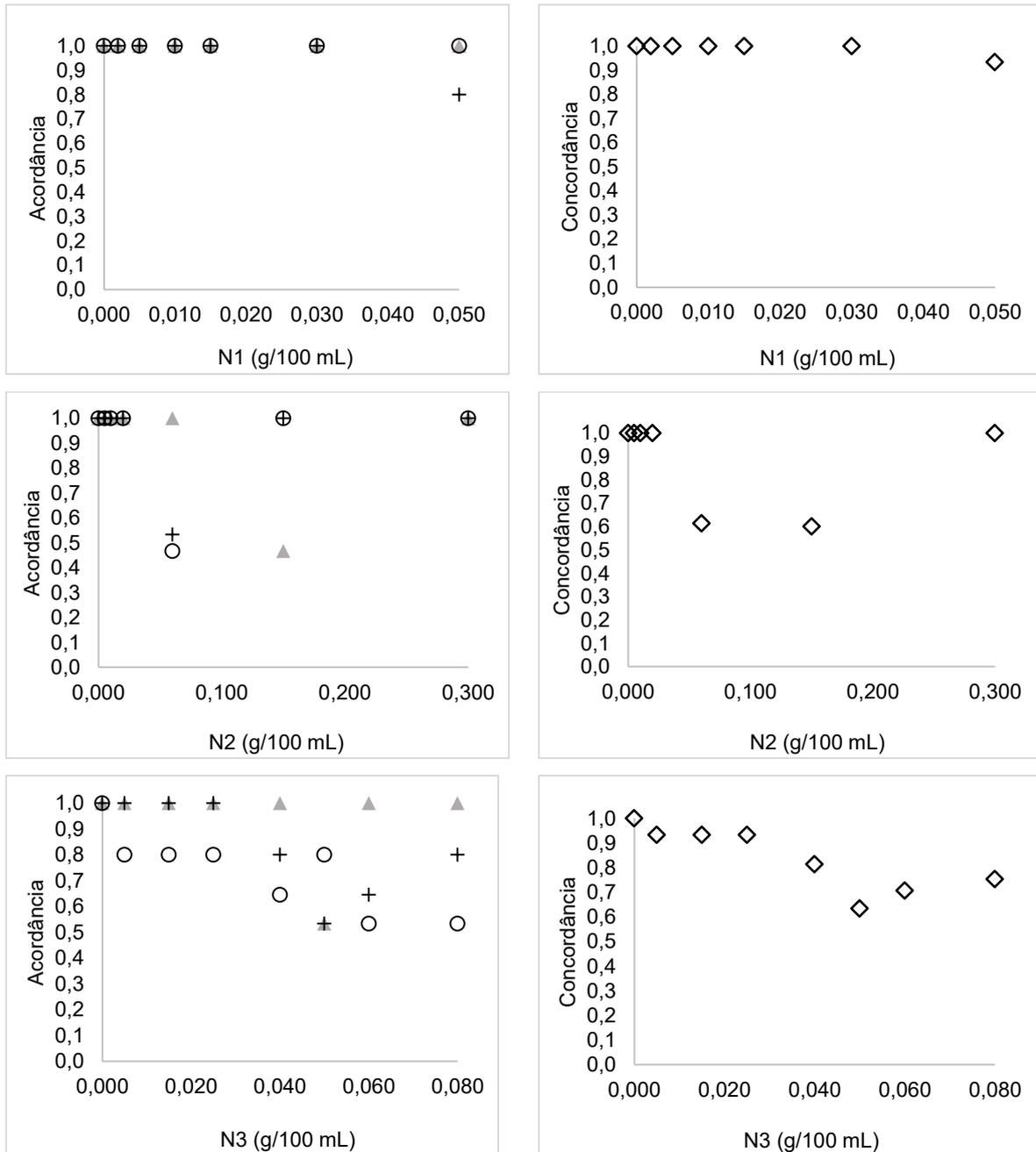


Figura 4.6. Valores de acordância (n=10) e concordância (n=30) para o método da fenolftaleína, em função dos diferentes tipos e concentrações de neutralizantes estudados.

N1: hidróxido de sódio; N2: bicarbonato de sódio; N3: carbonato de sódio.

▲ Bateria analítica 1; + bateria analítica 2; ○ bateria analítica 3.

4.3.1.3 Seletividade complementar

Na avaliação da seletividade do método do ácido rosólico, obteve-se TCF igual a 100,0% para todas as amostras adicionadas apenas de estabilizantes, nos dois níveis de concentração avaliados de 0,05 e 0,10 g/100 mL (**Tabela 4.4**).

Observou-se também que a adição dos estabilizantes (na concentração de 0,10 g/100 mL) afetou a acidez titulável do leite. No leite acidificado sem adição de estabilizantes o valor médio de acidez titulável encontrado foi de $0,196 \pm 0,001$ g/100 mL, já nas amostras adicionadas de citrato de sódio, mix de fosfatos, fosfato monossódico, fosfato dissódico e fosfato trissódico as concentrações médias obtidas foram de $0,180 \pm 0,006$ g/100 mL, $0,177 \pm 0,006$ g/100 mL, $0,270 \pm 0,008$ g/100 mL, $0,183 \pm 0,003$ g/100 mL e $0,188 \pm 0,005$ g/100 mL, respectivamente.

Foi observado um discreto efeito potencializador (intensificação da coloração obtida), quando foram comparadas as amostras adicionadas dos interferentes em estudo com as amostras de leite *in natura* acidificada, sem adição. No entanto, essa alteração da coloração não era suficientemente intensa ao ponto de se obter resultado falso positivo, quando a comparação era feita somente conforme a recomendação do método oficial (coloração vermelho-carmin). Estes resultados podem ser explicados devido à alteração da acidez e do pH em função dos estabilizantes. O método do ácido rosólico é baseado justamente na mudança de coloração em função do pH, provocando sua alteração, mesmo na ausência de neutralizantes.

Em estudos sobre o efeito de estabilizantes nas propriedades físico-químicas, sedimentação e estabilidade do leite, a alteração do pH também foi observada, tanto para o uso de citrato de sódio como para fosfatos (hexametáfosfato, fosfato dissódico e monossódico). Citrato de sódio em diferentes concentrações ocasionou aumento do pH em leite de vaca *in natura* (TSIOULPAS *et al.*, 2010), leite de vaca UHT em diferentes tempos de armazenamento (RODRIGUES, 2012) e em leite de cabra UHT (BOUMPA *et al.*, 2008).

Para a seletividade do método da fenolftaleína, também foram obtidas TCF igual a 100,0% para os dois estudos: amostras de leite *in natura* acidificado adicionado apenas de estabilizantes e adicionado de estabilizantes e do

neutralizante bicarbonato de sódio, no nível de concentração em que a TFC era de 100%. Portanto, para este método não foram observados os efeitos potencializador e supressor dos estabilizantes utilizados (**Tabela 4.5**).

Tabela 4.4. Taxas de resultados falso positivos e confiabilidade obtidas para amostras de leite *in natura* acidificadas, adicionadas dos estabilizantes de leite UHT, para a avaliação da seletividade do método do ácido rosólico.

Interferente	Concentração (g/100 mL)			
	0,05		0,10	
	TFP	TCF	TFP	TCF
<i>Comparação com a coloração vermelho carmin - "controle positivo"</i>				
Citrato de sódio	0,0	100,0	0,0	100,0
Mix fosfatos	0,0	100,0	0,0	100,0
Fosfato monossódico	0,0	100,0	0,0	100,0
Fosfato dissódico	0,0	100,0	0,0	100,0
Fosfato trissódico	0,0	100,0	0,0	100,0

TFP: taxa de falso-positivos; TCF: taxa de confiabilidade; (n = 10).

Tabela 4.5. Taxas de resultados falso positivos e confiabilidade obtidas para amostras adicionadas dos estabilizantes de leite UHT na ausência e na presença de analito, na avaliação da seletividade do método da fenolftaleína.

Interferente	Concentração adicionada (g/100 mL)					
	0,05		0,10		0,05 + 0,30 de bicarbonato	
	TFP	TCF	TFP	TCF	TFP	TCF
Citrato de sódio	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Mix fosfatos	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Fosfato monossódico	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Fosfato dissódico	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Fosfato trissódico	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0

TFP: taxa de falso-positivos; TCF: taxa de confiabilidade; (n = 10).

4.3.2 Desempenho do método oficial quantitativo de determinação da alcalinidade das cinzas

O método oficial de determinação da alcalinidade das cinzas não apresentou desempenho adequado para a verificação da adição de neutralizantes no leite UHT, pela avaliação dos parâmetros de limite de detecção e quantificação, seletividade e precisão.

Os limites LD e LQ teóricos foram estimados em 0,017 g/100 g e 0,058 g/100 g de alcalinidade das cinzas, expressos em carbonato de sódio. O LD experimental foi estabelecido como a menor quantidade detectada (0,003 g/100 g), independente da variabilidade dos resultados obtidos. O valor encontrado para o LQ teórico foi confirmado para o LQ experimental. Somente foi possível quantificar a alcalinidade das cinzas em condições aceitáveis de repetibilidade e precisão intermediária para o nível de concentração de 0,058 g/100 g (**Tabela 4.6**).

Apesar de não haver um intervalo regulamentado para os teores de alcalinidade das cinzas em leite, segundo a metodologia oficial brasileira, valores entre 0,015 g/100 g e 0,030 g/100 g são considerados normais para leite fluido e que valores superiores, sobretudo acima de 0,040 g/100 g, caracterizam adição de substâncias alcalinas (BRASIL, 2006). O resultado obtido para o LQ experimental de 0,058 g/100 g comprova a incapacidade do método em quantificar com confiabilidade teores de alcalinidade na faixa citada e também superiores a ela e inferiores ao LQ (entre 0,030 e 0,058 g/100 g), intervalo que supostamente, já indicaria a ocorrência de adulterações por adição de neutralizantes. O manual de métodos do Ministério da Saúde indiano (INDIA, 2015), considera que há presença de neutralizantes no leite quando forem necessários volumes superiores a 1,2 mL de hidróxido de sódio na titulação. Este volume corresponde a um conteúdo de 0,032 g /100g de alcalinidade das cinzas em leite, que também não se enquadra no limite de quantificação experimental do método estudado.

A seletividade do método foi afetada pela adição de estabilizantes no leite, na concentração máxima permitida pela legislação vigente (0,10 g/100 mL). O uso individual de mix comercial de fosfatos, fosfato monossódico e fosfato dissódico diminuiu significativamente os teores da alcalinidade das cinzas, enquanto a utilização de citrato de sódio provocou aumento significativo ($p < 0,05$). O fosfato

trissódico foi o único estabilizante que não provocou alterações significativas no teor de alcalinidade das cinzas no leite *in natura* fresco. Os resultados evidenciam a limitação da aplicação do método para amostras de leite UHT na investigação de adulteração por adição de neutralizantes, sobretudo quando se utiliza citrato de sódio. Como este estabilizante aumenta os teores da alcalinidade, teores elevados encontrados em amostras de leite UHT em que ele foi utilizado, não necessariamente indicariam a ocorrência de adulterações.

Na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método, foram obtidos valores entre 6,3% e 271,1% e 12,0% e 271,1% para DPR_r e DPR_R , respectivamente. A diminuição da variabilidade do método em função do aumento da concentração de alcalinidade das cinzas foi observada. No entanto, valores satisfatórios para $HorRat_r$ e $HorRat_R$ ($< 2,0$) somente foram obtidos para a concentração média estimada de 0,058 g/100 g de alcalinidade das cinzas.

Tabela 4.6. Teores de alcalinidade das cinzas em leite *in natura* com e sem adição de estabilizantes, desvios padrão relativos em condições de repetibilidade, precisão intermediária, valores de HorRat.

Amostras*	Alcalinidade das Cinzas (g/100 g)**	n	DPR _{r cal}	DPR _{r tab}	DPR _{R cal}	DPR _{R tab}	HorRat _r	HorRat _R
Leite <i>in natura</i>	0,027 ± 0,005 ^a	12	20,8	4,6	20,8	6,9	4,5	3,0
Leite + citrato de sódio	0,058 ± 0,006 ^b	12	6,3	4,1	12,0	6,1	1,5	2,0
Leite + mix de fosfatos	0,003 ± 0,009 ^c	12	271,1	6,3	271,1	9,4	43,4	28,9
Leite + fosfato monossódico	0,005 ± 0,008 ^c	11	103,4	5,9	155,5	8,8	17,6	17,6
Leite + fosfato dissódico	0,008 ± 0,007 ^c	12	77,9	5,5	87,7	8,2	14,2	10,7
Leite + fosfato trissódico	0,026 ± 0,006 ^a	12	24,6	4,6	24,6	6,9	5,3	3,6

* leite *in natura*, com e sem adição de estabilizantes de leite UHT, na concentração de 0,10 g/100 mL de adição; ** médias ± desvio padrão, seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$); n: número de observações, após tratamento de outliers (*Grubbs*); DPR_r: desvio padrão relativo, em condições de repetibilidade; DPR_R: desvio padrão relativo, em condições de precisão intermediária; HorRat_r: valor observado de DPR_r dividido pelo valor de DPR_r de referência, definido como 2/3 de DPR_R estimada pela equação modificada de Horwitz ou Thompson; HorRat_R: valor observado de DPR_R dividido pelo valor de DPR_R, estimado pela equação modificada de Horwitz ou Thompson. **Valores destacados em negrito:** abaixo do limite de quantificação experimental do método.

No estudo complementar, em que hidróxido de sódio foi adicionado ao leite *in natura* acidificado em cinco diferentes níveis de concentração (0,005 g/100 mL; 0,010 g/100 mL; 0,015 g/100 mL; 0,030 g/100 mL e 0,050 g/100 mL), foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) na acidez titulável entre as sete amostras analisadas. Obteve-se teores médios de 0,152 g/100 mL para o leite *in natura* fresco, 0,186 g/100 mL para o leite *in natura* acidificado, e teores entre 0,183 g/100 mL e 0,100 g/100 mL, para as amostras adicionadas de diferentes concentrações de hidróxido de sódio (**Tabela 4.7**).

O teor de resíduo mineral fixo também variou entre as amostras, mas diferenças significativas ($p < 0,05$) somente foram observadas entre o leite *in natura* acidificado (0,746 g/100 g) e os leites *in natura* acidificados e adicionados de 0,030 g/100 mL e 0,050 g/100 mL de hidróxido de sódio (0,784 g/100 g e 0,791 g/100 g de resíduo mineral fixo, respectivamente) e entre os leites *in natura* acidificados e adicionados de 0,0050 e 0,050 g/100 mL de hidróxido de sódio (0,750 e 0,791 g/100 g de resíduo mineral fixo, respectivamente). Teor similar de resíduo mineral fixo em leite fresco foi observado por Ahirwar *et al.* (2015), que também somente observou aumentos consideráveis para este parâmetro a partir da adição de 1,0 g/100 mL de neutralizantes da acidez.

A acidificação do leite *in natura* provocou mudanças significativas no teor de alcalinidade das cinzas ($p < 0,05$). Porém, dentre as amostras acidificadas e adicionadas de neutralizante, alterações significativas apenas foram observadas para os níveis de concentração a partir de 0,030 g/100 mL de hidróxido de sódio.

Os resultados do estudo complementar evidenciaram que somente foi possível comprovar a adulteração do leite por adição do neutralizante hidróxido de sódio em amostras de leite acidificadas, pela avaliação do teor de alcalinidade das cinzas, em níveis a partir de 0,050 g/100 mL, comprovando a baixa sensibilidade do método. Teores de adição a partir do valor citado, já alteram demasiadamente a acidez titulável do leite, o que já é o indicativo da adulteração.

É importante ressaltar que além das limitações referentes à seletividade e sensibilidade do método de determinação da alcalinidade das cinzas, o mesmo é laborioso e demorado, o que torna sua aplicação rotineira ainda menos atrativa.

Em 2007, Silva *et al.* (2009) determinaram o teor de alcalinidade das cinzas em 25 amostras de leite UHT decorrentes de uma operação policial de combate à

fraude, sendo encontrados valores entre 0,017 g/100 g e 0,087 g/100 g. Embora não tenham sido apresentadas informações sobre o desempenho do método, os autores sugerem que o indicador avaliado pode não ser efetivo na investigação da fraude do leite, devido à utilização permitida de estabilizantes.

Tabela 4.7. Teores de acidez titulável, resíduo mineral fixo e alcalinidade das cinzas em leite *in natura* fresco, acidificado, e acidificado adicionado de diferentes concentrações de hidróxido de sódio.

Amostra	Adição de NaOH (g/100 mL)	Acidez titulável (g/100 mL)	Resíduo mineral fixo (g/100g)	Alcalinidade das Cinzas (g/100 g)
Leite <i>in natura</i> fresco	0,0	0,152 ± 0,001 ^a	0,755 ± 0,004 ^{abc}	0,034 ± 0,005^a
LA	0,0	0,186 ± 0,001 ^b	0,746 ± 0,018 ^a	0,012 ± 0,012^b
LA + N1	0,005	0,183 ± 0,003 ^b	0,750 ± 0,029 ^{ab}	0,024 ± 0,007^{ab}
LA + N2	0,010	0,172 ± 0,001 ^c	0,772 ± 0,002 ^{abc}	0,029 ± 0,004^{ab}
LA + N3	0,015	0,160 ± 0,001 ^d	0,771 ± 0,004 ^{abc}	0,021 ± 0,010^{ab}
LA + N4	0,030	0,142 ± 0,003 ^e	0,784 ± 0,007 ^{bc}	0,054 ± 0,003^c
LA + N5	0,050	0,100 ± 0,001 ^f	0,791 ± 0,003 ^c	0,068 ± 0,003 ^c

LA: leite *in natura* acidificado; N: níveis de adição entre 1 e 5 de hidróxido de sódio (NaOH) no leite; médias ± desvio padrão (n = 12), seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$). **Valores destacados em negrito:** abaixo do limite de quantificação experimental do método.

4.4 Conclusão

Os métodos oficiais brasileiros qualitativos (ácido rosólico e fenolftaleína) e quantitativo (alcalinidade das cinzas), para a investigação da adulteração do leite por adição de neutralizantes não apresentaram desempenho adequado, sendo incapazes de identificar a adulteração quando se utiliza baixos níveis de concentração do adulterante. A realização de estudos mais aprofundados em relação às possibilidades de otimização e adequação ao uso destes métodos, ou ainda de alternativas metodológicas para a determinação de neutralizantes em leite se faz necessária.

REFERÊNCIAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 941.07. Alkalinity of Ash of Dry Skim Milk. Titrimetric Method. **AOAC Official Methods of Analysis**. 1941.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 941.07. Alkalinity of Ash of Dry Skim Milk. Titrimetric Method, **AOAC Official Methods of Analysis**. 19th ed., Washington. 2012a.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 947.05 - Acidity of Milk Titrimetric Method. **AOAC Official Methods of Analysis**. 19th ed. Washington, Chapter 33, p. 7. 2012b.

AZIZ, T., KHAN, H. A survey on milk adulteration at retail outlets of Islamabad, Pakistan. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 44-52, 2014.

AHIRWAR, R., *et al.* Quality changes in milk adulterated with detergent, urea, ammonium sulphate and neutralizers. **Asian Journal Dairy & Food Research**, v. 34, n. 4, p. 285-289, 2015.

BOTELHO, B.G. *et al.* Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31–37. 2015.

BOUMPA, T., *et al.* Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goats' milk. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 160-166, 2008. Disponível em: < doi:10.1017/S0022029908003166 >. Acesso em: 06/12/2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório de Defesa Animal. PORTARIA Nº 1, DE 07 DE OUTUBRO DE 1981. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. **Diário Oficial da União** de 13/10/1981, Seção 1, Página 19381, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos, para o Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 14/12/2006, Seção 1, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite cru refrigerado, leite pasteurizado e de coleta de leite cru e transporte a granel. **Diário Oficial da União**, 30/12/2011, Seção 1, 2011.

CHANDA, T., *et al.* Adulteration of raw milk in the rural areas of Barisal district of Bangladesh. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 112-115. 2012.

EC COMMISSION EUROPEAN. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L221, p. 8-36, 2002.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. 2nd ed. Teddington: LGC, 2014.

FIRMINO, F. C., *et al.* Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. Set/Out, n. 376, p. 5-11, 2010.

GONDIM, C. S., *et al.* An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 830, p. 11-22, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856507> >. Acesso em: 15/08/2015.

GONDIM, C. S., *et al.* Performance improvement and single laboratory validation of classical qualitative methods for the detection of adulterants in milk: starch, chlorides and sucrose. **Analytical Methods**, v. 7, p. 9692–9701, 2015. Disponível em: < DOI: 10.1039/c5ay01822f >. Acesso em: 15/09/2016.

GONDIM, Carina de Souza. **Métodos qualitativos para detecção de adulterantes em leite cru: validação intra e interlaboratorial**. 2016. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2016.

HORWITZ W., ALBERT R. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p.1095-1109, 2006.

INDIA. **Bureau of Indian Standards (BIS)**. Methods of Tests for Dairy Industry, Part 1, Rapid Examination of Milk, IS: 1479 (Part 1) – 1960 (Reaffirmed – 2003), 1.4 edn. New Delhi, India. 1960.

INDIA. Food Safety and Standards Authority of India. Ministry of Health and Family Welfare of India. **Manual of Methods of Analysis of Foods - Milk and milk products**. New Delphi, 2012. 204 p.

INDIA. Food Safety and Standards Authority of India. Ministry of Health and Family Welfare of India. **Manual of Methods of Analysis of Foods - Milk and milk products**. New Delphi, 2015. 191 p.

INDUMATHI, J., REDDY O. B. Quality evaluation of milk samples collected from different intermediaries at the vicinity of Chittoor district, Andhrapradesh, Índia. **International Journal of Current Advanced Research**, v. 4, n. 10, p. 436-440, 2015.

INMETRO **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**. DOQ-CGCRE-008. Revisão 05. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, 2016.

KANDPAL, S. D., SRIVASTAVA, A. K., NEGI, K. S. Estimation of quality of raw milk (open & branded) by milk adulteration testing kit. **Indian Journal of Community Health**, v. 24, n. 24, p. 188-192, 2012.

KUMAR, A., *et al.* A Study on status of milk adulterants using in milk of district Varanasi. **South Asian Journal of Food Technology and Environment**, v. 1, n. 2, p. 140-143, 2015.

KUMAR, B., *et al.* Rapid lactate oxidase-based assay for lactate content in milk to ascertain its hygienic quality. **International Journal of Dairy Thecnology**. v. 69, n. 3, p. 460–467, 2016.

LANGTONN, S. D., *et al.* Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 175-181, 2002.

MANSOUR, A. I. A., EL-LOLY, M. M., AHMED, R. O. A Preliminary Detection of Physical and Chemical Properties, Inhibitory Substances and Preservatives in raw milk. **Internet Journal of Food Safety**, v. 14, p. 93-103, 2012.

RAMYA, P., *et al.* Detection of adulterants in retail milk samples procured in proddatur town, ysr Kadapa (dt), Andhra Pradesh. **International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, v. 3, n. 1, p. 104-109. 2015.

RODRIGUES, Emanuela Karla Ferreira Ribeiro. **Alterações nas propriedades físico-químicas do leite esterilizado adicionado de estabilizantes durante a**

estocagem. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2012.

SILVA, C. A. O., *et al.* Leite UHT: Qualidade físico-química e ocorrência de adulterações em amostras coletadas no estado de Minas Gerais. **Gestão, Ciência & Saúde – Revista da Fundação Ezequiel Dias**, v. 5, n. 2, p. 99-103, 2009.

SILVA, L.C.C., *et al.* Preservatives and neutralizing substances in milk: analytical sensitivity of official specific and nonspecific tests, microbial inhibition effect, and residue persistence in milk. **Ciência Rural**. v. 45, n. 9, p. 1613-1618, 2015.

SINGH, P., GANDHI, N. Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. **Food Reviews International**, v. 31, n. 3, p. 236-261, 2015. Disponível em: <DOI: 10.1080/87559129.2014.994818>. Acesso em: 15/08/2016.

SINGULURI, H., SUKUMARAN, M. K. Milk Adulteration in Hyderabad, India – A Comparative Study on the Levels of Different Adulterants Present in Milk. **Journal Chromatography Separation Techniques**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2014. Disponível em: <doi:10.4172/2157-7064.1000212>. Acesso em: 23/11/2015.

SOUZA, S. V. C, JUNQUEIRA, R. G, GINN R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) in-house method validation. **Journal of Chromatography A**, v.1077, p. 151-158, 2005.

SOUZA, S. V. C, PINTO, C. T, JUNQUEIRA, R. G. In-house method validation: Application in arsenic analysis. **Journal Food Composition Analysis**, v. 20, p. 241-247, 2007.

SOUZA, G. C. S., *et al.* A multicommuted flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples. **Food Control**, n. 46, p. 127-135, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.021>. Acesso em: 07/12/2016.

SOWMYA, R., *et al.* Detection of calcium based neutralizers in milk and milk products by AAS. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 2, p.1188-1193, 2013.

TAMANINI, Ronaldo. **Controle de qualidade de leite UHT**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

TSIOULPAS, A., *et al.* Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1027-1034, 2010.

VIEIRA, G. P., *et al.* An environmentally friendly photometric procedure for ammonium determination in rainwater employing a multicommutation approach. **Analytical Methods**, v. 5, p. 489–495, 2013. Disponível em: < DOI: 10.1039/c2ay26011e>. Acesso em: 07/12/2016.

WANDERLEY, C.H., *et al.* Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido. **Revista Ciências da Vida**. v. 32, n. 2, p. 34-42, 2012.

WASUPALLI, G. K., SAI, K. C., KAUR, S. Detection of Adulterants and Mastitis in Milk Samples and major milk fatty acid composition estimation using gas chromatography. **International Journal of Pharma Sciences and Scientific Research**, v. 1, n. 1, p. 7-12. 2015.

5 CAPÍTULO 2. VALIDAÇÃO E MONITORAMENTO DOS TEORES DE ÁCIDOS LÁTICO, ORÓTICO E CÍTRICO EM LEITE FLUIDO UTILIZANDO CLAE-UV/DAD

RESUMO

Com objetivo de avaliar a utilização dos teores dos ácidos láctico, orótico e cítrico como indicadores de qualidade de leite fluido (*in natura* e UHT), foi validado e aplicado um método para quantificação simultânea desses ácidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e arranjo de fotodiodos (CLAE-UV/DAD). Linearidade (lático: 25,0 mg/L a 1.825,0 mg/L; orótico: 5,0 mg/L a 125,0 mg/L e cítrico: 600,0 mg/L a 2.500,0 mg/L), efeito de matriz ($p < 0,05$), veracidade (recuperação entre 87,0% e 109,0%), repetibilidade (DPR_r entre 2,0% e 13,5%), precisão intermediária (DPR_R entre 3,1% e 13,8%) e estimativa da incerteza de medição (2,4% a 25,4%) foram determinados. A avaliação do perfil desses ácidos em amostras comerciais de leite UHT brasileiro ($n=54$) demonstrou maior variabilidade para o teor do ácido láctico (25,0 mg/L a 214,0 mg/L; CV = 60,0%), seguido do ácido cítrico (1.857,2 mg/L a 3.152,7 mg/L; CV = 9,8%) e orótico (66,4 mg/L a 102,8 mg/L; CV = 9,4%). A comparação entre os perfis do ácido láctico e da acidez titulável (0,13 g/100 mL a 0,19 g/100 mL, CV = 7,4%) mostrou que a acidez titulável não representa adequadamente o conteúdo de ácido láctico no leite, não sendo este um parâmetro confiável para o monitoramento da qualidade do leite. O efeito da fermentação (37 °C por 9 horas) do leite *in natura* sobre o teor dos ácidos orgânicos e da acidez titulável também foi investigado. A fermentação não afetou significativamente ($p > 0,05$) os teores de ácido orótico ($80,6 \pm 3,1$ mg/L) e cítrico ($2.119,8 \pm 62,6$ mg/L), ao contrário do lático, que variou entre 12,5 e 574,0 mg/L e da acidez titulável (0,15 a 0,24 g/100 mL). Os resultados evidenciam o potencial de utilização dos ácidos orgânicos como indicadores de qualidade do leite fluido, sobretudo o ácido láctico, e comprovam a adequação ao uso proposto do método CLAE-UV/DAD validado.

Palavras-chave: validação intralaboratorial, ácidos orgânicos, acidez titulável, ocorrência, acidificação.

5.1 Introdução

Muitos são os ácidos orgânicos presentes em leite de vaca, como o láctico, cítrico, orótico, hipúrico, butírico, acético, pirúvico e úrico, sendo os três primeiros os que mais se destacam em termos de quantidade, relevância biológica e tecnológica (TORMO; IZCO, 2004; VÉNICA; PEROTTI; BERGAMINI, 2014). A ocorrência dessas substâncias é resultante da hidrólise da gordura (acético e butírico), do metabolismo bioquímico normal (cítrico, orótico e úrico) e do desenvolvimento microbiano (láctico, acético, pirúvico e propiônico) (GARDE *et al.*, 2012).

O leite recém-ordenhado possui baixos teores de ácido láctico, sendo seu aumento devido à fermentação da lactose por bactérias lácticas (KUMAR *et al.*, 2016; ZAYDAN; DION; BOUJITITA, 2004). A ocorrência da fermentação pode ser desejável, como na fabricação de produtos lácteos fermentados, ou indesejável, como no armazenamento do leite em condições higiênicas ou ambientais insatisfatórias, resultando em sua deterioração.

A acidez titulável (AT), expressa em concentrações de ácido láctico, é utilizada por muitos países para monitorar a qualidade do leite (BRASIL, 2011; CHINA, 2010; CU, 2013; EAC, 2006). Entretanto, apesar de ser um método simples, rápido e de baixo custo, a AT é determinada a partir da neutralização tanto dos ácidos orgânicos como de outras substâncias de caráter ácido naturalmente presentes no leite, como citratos, fosfatos, gás carbônico e proteínas (CALAMARI; GOBBI; BANI, 2016).

O ácido cítrico é o ácido orgânico predominante no leite, sendo encontrado na forma de citrato solúvel ou complexado a minerais, como cálcio e magnésio. Os teores de citrato estão relacionados ao conteúdo mineral total, à capacidade tamponante e à estabilidade de proteínas, afetando diretamente as características de processamento do leite (CHEN; LEWIS; GRANDISON, 2014; GARNSWORTHY *et al.*, 2006). Além da concentração intrínseca, o ácido cítrico e seus sais têm o uso regulamentado como estabilizante em leite UHT e outros derivados lácteos em muitos países. Já para os leites *in natura* e pasteurizado esse aditivo não é previsto (CODEX ALIMENTARIUS, 2011; MERCOSUL, 1996; UE, 2011). Casos de adição ilícita e fraudulenta de citrato em leite fluido (*in natura* e pasteurizado), em concomitância com a adição de água e reconstituintes da densidade e do ponto de

congelamento, foram relatados no Brasil (BOTELHO *et al.*, 2015; CASSOLI *et al.*, 2011).

O ácido orótico é um produto intermediário na biossíntese de nucleotídeos de pirimidina, especificamente no leite. Assim como a creatinina total e o ácido úrico, o ácido orótico representa um indicador adequado para a determinação da proporção de leite em produtos processados e também da predição do teor de proteínas do leite em outros alimentos (SUNDEKILDE *et al.*, 2014). O ácido orótico é nutricionalmente relevante, e sua importância como fator de crescimento para a microbiota intestinal, na diminuição do nível de colesterol e na regulação na transcrição de genes tem sido estudada (ANASTASI *et al.*, 2000; LÖFFLER; CARREY; ZAMEITAT, 2015).

Os teores dos ácidos láctico, cítrico, orótico e suas bases conjugadas, lactato, citrato e orotato interferem diretamente na estabilidade das proteínas e nas propriedades de coagulação do leite, indicando a aptidão da matéria prima para o processamento de produtos esterilizados e fermentados (SUNDEKILDE *et al.*, 2014). A quantificação de ácidos orgânicos em leite também tem relevância sensorial, por contribuírem com o sabor característico de derivados lácteos (GARDE *et al.*, 2012; MARSILI, *et al.*, 1981).

Diferentes métodos são utilizados para a determinação de ácidos orgânicos em alimentos, destacando-se os cromatográficos por troca iônica (COSTA *et al.*, 2016; TOFALO *et al.*, 2015), cromatográficos por fase reversa (FR) (ANDRÉS; TENORIO; VILLANUEVA, 2015; MURTAZA *et al.*, 2012), eletroforese capilar (GATEA *et al.*, 2015; LIGOR *et al.*, 2008), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (BOUTEILLE *et al.*, 2013; SUNDEKILDE *et al.*, 2013), enzimáticos clássicos e por biosensores (JENIE; PRIETO-SIMON; VOELCKER, 2015; KUMAR *et al.*, 2016; RATHEE *et al.*, 2016). Todavia, grande parte destes estudos ou foram realizados com derivados lácteos fermentados, como queijos e iogurtes, ou não abrangem a quantificação simultânea de mais de um ácido orgânico em leite fluido.

Neste trabalho, a validação e a estimativa da incerteza de medição de um método por CLAE com detecção por ultravioleta (UV) e arranjo de fotodiodos (DAD) para a determinação simultânea dos ácidos láctico, cítrico e orótico em leite fluido é apresentada. O método foi aplicado em amostras de leite UHT fabricadas nos principais estados produtores de leite do Brasil, com o intuito de avaliar o perfil

destes ácidos no leite brasileiro, relacionar e comparar os teores de ácido láctico e acidez titulável. As modificações nos teores destes ácidos orgânicos e da acidez titulável no leite *in natura* ao longo do processo de acidificação natural controlada, simulando condições de deterioração da matéria-prima por ação microbiana, também foram investigadas.

5.2 Material e Métodos

Os ensaios analíticos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química Bromatológica (LQB) do Serviço de Química e do laboratório do Serviço de Microscopia de Produtos, do Instituto Octávio Magalhães (Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais/ LACEN-MG) da Fundação Ezequiel Dias.

As vidrarias, instrumentos e equipamentos de medição utilizados neste trabalho possuíam calibração vigente, realizada por empresas acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

5.2.1 Amostras

Para os experimentos de validação e estudo de acidificação natural controlada, duas amostras de cerca de cinco litros de leite *in natura* foram obtidas da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em Igarapé (Minas Gerais, Brasil) entre maio e junho de 2015. A coleta foi realizada diretamente do tanque de expansão entre 2 a 3 horas após a ordenha matutina. O leite foi imediatamente transportado para o laboratório em condições de refrigeração (4 °C por até 1 hora) e mantido refrigerado (≤ 7 °C) até o momento da análise.

A cada coleta, foi confirmado o atendimento aos requisitos físico-químicos previstos no Padrão de Identidade e Qualidade do produto (aspecto, cor, odor, densidade a 15 °C em g/mL, gorduras em g/100 g, sólidos totais em g/100 g, sólidos não gordurosos em g/100 g, acidez titulável em g de ácido láctico/100 mL e índice crioscópico em °H) (BRASIL, 2006; BRASIL, 2011).

5.2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e padrões utilizados foram de grau de pureza apropriado, cujos valores encontravam-se descritos em seus respectivos certificados de análise. No preparo de soluções, foi observada a pureza dos reagentes e corrigido quando necessário.

Foram utilizados os padrões de ácidos orgânicos com suas respectivas purezas: L (+) ácido láctico (99,9%) da Supelco (Bellefonte, USA); ácidos orótico (99,0%) e fórmico (99,1%) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA); ácido cítrico (100,5%) e oxálico (102,1%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e ácido acético (99,9%) da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para a fase móvel utilizou-se fosfato de sódio monobásico (100,2%) e metanol grau CLAE (99,9%) da Merck (Darmstadt, Alemanha) e ácido fosfórico grau CLAE (85,7%) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

Para o estudo de seletividade utilizou-se os neutralizantes de acidez com suas respectivas purezas: hidróxido de sódio (99%) da Merck (Darmstadt, Alemanha); carbonato de sódio (99,5%) da Fluka (Buchs, Suíça) e bicarbonato de sódio (100,3%) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) e os estabilizantes: fosfato de sódio monobásico (98%) e fosfato de sódio dibásico (99,8%), da Merck (Darmstadt, Alemanha); citrato de sódio tribásico (100%) e fosfato de sódio tribásico (99%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e mix comercial de fosfatos – Mix Viva L 80, mistura de tripolifosfato, fosfato monossódico e dissódico (56,9 a 58,9% em P_2O_5), grau alimentício, para uso como estabilizante em leite e derivados, da Vivare (Matias Barbosa, Brasil).

Para o preparo das amostras e extração dos ácidos orgânicos foram utilizados ferrocianeto de potássio trihidratado (100,1%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e sulfato de zinco heptahidratado (99%) da Synth (Diadema, Brasil).

Água ultrapura (resistividade de 18,2 $m\Omega/cm$) foi obtida com sistema de gradiente de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Na determinação da acidez titulável utilizou-se soluções elaboradas a partir de hidróxido de sódio (99%) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) e fenolftaleína (98%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Para a validação foram preparadas em água ultrapura soluções padrão de ácido láctico (0,1 g/L, 1,0 g/L, 10,0 g/L, 5,0 g/L e 20,0 g/L), ácido cítrico (5,0 g/L e 50,0 g/L) e ácido orótico (0,1 g/L e 1,0 g/L). Estas soluções foram utilizadas na forma de *pool* para preparo das curvas de calibração e estudos de repetibilidade e precisão intermediária.

Para o preparo das amostras de leite nas análises cromatográficas, foram utilizadas soluções de ferrocianeto de potássio a 35,9 g/L e sulfato de zinco 71,8 g/L em água (soluções de *Carrez*) (ISO-IDF, 2005).

5.2.3 Condições cromatográficas

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Class-VP (Kyoto, Japão), previamente qualificado, com detecção por varredura de espectro ultravioleta por arranjo de fotodiodo (DAD) (SPD-M 10A VP), UV-visível (SPD 10A VP) e software CLASS VP 6.14 SP1.

Para a separação dos compostos utilizou-se coluna analítica C18 (modelo 100A, Kromasil[®] – Eka Chemicals, número de série E98499, Bohus, Suécia), com 150 mm de comprimento, 4,0 mm de diâmetro e partícula de 5 µm, mantida a temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

A definição das condições cromatográficas foi baseada nos estudos de Lues; Both; Samita (1998), Tormo; Izco (2004), Dinkci *et al.* (2007) e Milagres, *et al.* (2012). Após otimização, foram estabelecidas as seguintes condições analíticas: corrida isocrática, com fase móvel composta por 99,8% de tampão fosfato 20 mmol/L (com pH de 2,2 ± 0,05) e 0,2% de metanol; fluxo de 0,7 mL/minuto; injeção de 30 µL de amostra, detecção em 210 nm e tempo de corrida de 12 minutos.

5.2.4 Preparo de amostras para a determinação dos ácidos orgânicos por CLAE-UV/DAD

As amostras de leite foram homogeneizadas por agitação e inversão da embalagem original por cinco vezes e transferidas para frascos de vidro. Foi transferido um mililitro de leite para balão volumétrico de 25 mL, adicionados 500

microlitros de cada solução de *Carrez* e o volume foi completado com água ultrapura. A mistura foi totalmente filtrada em papel de filtro qualitativo e uma alíquota de 2,0 mL foi novamente filtrada em membrana de fluoreto de polivinidileno PVDF (Millipore[®]) de 0,45 µm de porosidade e armazenadas em frascos de vidro até a realização da análise cromatográfica de ácidos orgânicos.

5.2.5 Validação

A metodologia otimizada foi submetida à validação intralaboratorial utilizando soluções padrão e amostras de leite *in natura* sem e com adição de padrão. Seletividade, linearidade e faixa linear, efeito de matriz, veracidade, precisão em condições de repetibilidade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação foram investigados conforme descrito por Souza; Junqueira; Ginn (2005) e Souza; Pinto; Junqueira (2007). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi de 5% de probabilidade.

5.2.5.1 Seletividade

Seletividade foi estudada a partir da avaliação do perfil cromatográfico de branco de reagentes, amostras de leite *in natura* (com concentração intrínseca dos ácidos orgânicos), soluções aquosas e amostras adicionadas dos analitos de interesse: ácidos láctico, cítrico e orótico. O estudo foi realizado em sete baterias analíticas e em três replicatas independentes para cada caso.

A identificação dos picos foi baseada no tempo de retenção dos padrões, avaliados no detector UV e sua autenticidade pelas características espectrais fornecidas no DAD. A ausência de resultados falsos positivos para o branco de reagentes e a comparação entre as respostas obtidas para as amostras sem e com adição de padrões, associados à capacidade do método em separar (resolução), detectar e quantificar os três ácidos orgânicos de interesse sem interferência mútua e externa, foram os parâmetros avaliados para se estabelecer a seletividade do método.

Foi avaliado o potencial interferente dos ácidos orgânicos: oxálico (0,6 mg/L), fórmico (1,6 mg/L) e acético (4,0 mg/L), cuja presença no leite já tinha sido relatada

em outros estudos (MARSILI *et al.*, 1981; TORMO; IZCO, 2004). Soluções aquosas e em leite destes ácidos orgânicos foram analisadas.

A interferência dos neutralizantes da acidez (hidróxido de sódio 0,3 g/L; carbonato de sódio 0,5 g/L e bicarbonato de sódio 3,0 g/L) e dos estabilizantes (fosfato monossódico, dissódico e trissódico, citrato de sódio e mix de fosfatos na concentração de 1,0 g/L) na quantificação do ácido láctico também foi estudada. As concentrações utilizadas de cada neutralizante basearam-se em quantidades suficientes para reduzir a acidez titulável do leite a valores inferiores a 0,14 g de ácido láctico/100 mL de leite. Os estabilizantes foram utilizados na concentração máxima de adição permitida pela legislação vigente, que é de 1,0 g/L, expresso em P₂O₅ (BRASIL, 1997).

As amostras de leite adicionadas de neutralizantes e estabilizantes foram analisadas em três replicatas, em concomitância com o leite *in natura* sem adição. Valores dispersos foram identificados pelo teste de *Grubbs*. As premissas de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de *Ryan-Joiner* e *Levene* modificado, respectivamente (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Após a verificação do atendimento das premissas, as médias obtidas em cada tratamento foram comparadas por análise de variância - teste F para delineamento inteiramente casualizado, ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software *Excel* 2013.

5.2.5.2 Linearidade e efeito de matriz

Curvas de calibração foram preparadas em pelo menos sete níveis de concentração e três replicatas independentes para cada nível, a partir de soluções padrão em água (curva usual) e em leite (curva matrizada), adicionadas na forma de *pool*. As concentrações de adição utilizadas foram: 1,0 mg/L, 13,0 mg/L, 25,0 mg/L, 37,0 mg/L, 49,0 mg/L, 61,0 mg/L e 73,0 mg/L (ou 25,0 mg/L, 325,0 mg/L, 625,0 mg/L, 925,0 mg/L, 1.225,0 mg/L, 1.525,0 mg/L e 1.825,0 mg/L em leite) para ácido láctico; 24,0 mg/L, 40,0 mg/L, 52,0 mg/L, 64,0 mg/L, 76,0 mg/L, 88,0 mg/L e 100,0 mg/L (ou 600,0 mg/L, 1.000,0 mg/L, 1.300,0 mg/L, 1.600,0 mg/L, 1.900,0 mg/L, 2.200,0 mg/L e 2.500,0 mg/L em leite) para ácido cítrico e 0,2 mg/L; 0,9 mg/L; 1,6 mg/L; 2,3 mg/L; 3,0 mg/L; 3,7 mg/L; 4,4 mg/L e 5,0 mg/L (ou 5,0 mg/L; 22,5

mg/L; 40,0 mg/L; 57,5 mg/L; 75,0 mg/L; 92,5 mg/L; 110,0 mg/L e 125,0 mg/L em leite) para ácido orótico.

A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados ordinários, os valores discrepantes foram tratados pelo teste dos resíduos padronizados *Jackknife* e o atendimento às premissas relacionadas à análise de regressão: normalidade (teste de *Ryan-Joiner*), homogeneidade de variâncias (teste de *Brown-Forsythe* ou *Levene* modificado) e independência dos resíduos da regressão (teste de *Durbin-Watson*) foi investigado, de acordo com o procedimento descrito por Souza; Junqueira (2005).

Os efeitos de matriz foram avaliados a partir da comparação das inclinações e interseções das curvas pelo teste *t* de Student após verificação da homogeneidade das variâncias (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

5.2.5.3 Limites de detecção e quantificação, veracidade, repetibilidade e precisão intermediária

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos foram estimados a partir de 25 replicatas independentes de amostras de leite *in natura* e adicionadas dos ácidos láctico, orótico e cítrico, levando em consideração as respostas obtidas ao longo da corrida cromatográfica, nas regiões caracterizadas apenas pelo sinal do ruído. Os valores de LD e LQ foram estimados a partir da média acrescida de 3 e 10 vezes o desvio padrão amostral obtido, respectivamente (EURACHEM, 2014).

O LQ do método foi confirmado experimentalmente, pela obtenção de resultados aceitáveis para os parâmetros de precisão e veracidade (EC, 2002; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

Veracidade, precisão em condições de repetibilidade e precisão intermediária foram estudadas em amostras adicionadas dos analitos de interesse, preparadas em três níveis de concentração e doze replicatas independentes de cada nível na faixa linear. Tais parâmetros foram investigados em amostras de leite adicionadas de 25,0 mg/L, 325,0 mg/L, e 1.825,0 mg/L de ácido láctico; 600,0 mg/L, 1.600,0 mg/L e 2.500,0 mg/L de ácido cítrico e 5,0 mg/L, 22,5 mg/L e 125,0 mg/L de ácido orótico. As análises foram realizadas em quatro baterias distintas, variando-se dias,

analistas, soluções e reagentes (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

A veracidade foi avaliada por estudos de recuperação. As recuperações foram estimadas e valores extremos foram investigados para cada nível de concentração utilizando teste de *Grubbs* (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Valores médios entre 80% e 110% foram considerados aceitáveis (AOAC 2012b; EC, 2002; INMETRO, 2016).

Precisão, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária foram estimadas por análise de variância e expressas em termos de desvio padrão relativo de repetibilidade (DPR_r) e de precisão intermediária (DPR_R). As premissas relacionadas ao teste F foram previamente testadas (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Para a avaliação da precisão, as razões *HorRat* foram determinadas ($HorRat_r$: valor observado de DPR_r dividido pelo valor de DPR_r de referência, definido como 2/3 de DPR_R estimada pela equação modificada de Horwitz ou Thompson e $HorRat_R$: valor observado de DPR_R dividido pelo valor de DPR_R de referência, estimado pela equação modificada de Horwitz ou Thompson) e consideradas satisfatórias quando o produto da divisão fosse igual ou inferior a 2,0 (HORWITZ; ALBERT, 2006).

5.2.6 Estimativa da incerteza de medição

A estimativa de incerteza foi determinada a partir da incerteza padrão combinada, incerteza padrão expandida e a incerteza padrão expandida percentual (EURACHEM/CITAC, 2012; JCGM, 2008).

A incerteza de medição combinada foi estimada considerando as seguintes fontes independentes: precisão intermediária, curva de calibração, incerteza atribuída ao padrão analítico, incerteza atribuída aos balões volumétricos e pipetadores automáticos utilizados na análise cromatográfica (Equação 5.1).

$$U = k \sqrt{u_s^2 + u_c^2 + u_{pa}^2 + u_b^2 + u_{pi}^2}$$

(Eq. 5.1)

Sendo U a incerteza de medição expandida do analito na fração de massa (mg/L), k o fator de abrangência, u_s a incerteza de precisão da medida em termos de precisão intermediária, u_c a incerteza correspondente à curva de calibração, u_{pa} a incerteza para o padrão, u_b a incerteza atribuída aos balões volumétricos e u_{pi} a incerteza correspondente aos pipetadores automáticos utilizados.

5.2.7 Ocorrência dos ácidos láctico, cítrico e orótico e acidez titulável em leite UHT brasileiro

Para o estudo de aplicação do método validado e avaliação do perfil de ácidos orgânicos em leite, utilizou-se amostras de leite UHT obtidas em estabelecimentos comerciais das regiões sudeste, sul e nordeste do Brasil. Entre abril e novembro de 2015 foram coletadas aleatoriamente 54 amostras de leite UHT de lotes distintos, disponíveis em estabelecimentos comerciais de três capitais brasileiras (Belo Horizonte, Curitiba e Recife). Os leites analisados eram produzidos por 33 diferentes indústrias de relevância nacional, localizadas em: Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Goiás, Rio de Janeiro e Pernambuco. Estes oito estados brasileiros são responsáveis pela produção de cerca de 90% do leite *in natura* produzido em todo território nacional (IBGE, 2014). Uma embalagem de 1L de cada amostra foi coletada, identificada e transportada ao laboratório à temperatura ambiente e armazenada em local fresco e arejado até o momento da análise.

Os teores de ácidos orgânicos foram determinados, em três replicatas independentes, de acordo com o método validado e a acidez titulável foi determinada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists, metodologia nº 947.05 (AOAC, 2012a).

A distribuição do teor dos ácidos orgânicos e da acidez titulável no leite UHT foi caracterizada pelas medidas de tendência central (média e mediana), dispersão (variância e coeficiente de variação) e coeficientes de assimetria e curtose. Foram estimados os percentis da distribuição dos dados, sendo a aderência à distribuição normal avaliada pelo teste de Jarque-Bera (JARQUE; BERA, 1987).

5.2.8 Efeito da acidificação do leite nos teores de ácidos orgânicos e acidez titulável

No intuito de avaliar a variação nos teores de ácidos orgânicos e acidez titulável, leite *in natura* foi mantido em banho de água a 37 ± 1 °C durante 0, 2, 4, 6, 8 e 9 horas para favorecer o desenvolvimento microbiano e consequente acidificação natural do leite. Em cada período de tempo, uma amostra do leite foi retirada, imediatamente resfriada em banho de gelo até atingir temperaturas ≤ 7 °C e submetida ao processo de extração e quantificação dos ácidos orgânicos e da acidez titulável.

5.3 Resultados e discussão

O leite *in natura* utilizado nos experimentos atendeu a todos os requisitos físico-químicos avaliados e previstos no Padrão de Identidade e Qualidade do produto (BRASIL, 2011). Apresentou aspecto, cor e odor adequados, densidade relativa a 15 °C de $1,031 \pm 0,001$ g/mL, teor de gorduras de $3,8 \pm 0,3$ g/100 g, teor de sólidos totais de $12,6 \pm 0,4$ g/100 g, teor de sólidos não gordurosos de $8,8 \pm 0,2$ g/100 g, acidez titulável de $0,16 \pm 0,005$ g de ácido láctico/100 mL e índice crioscópico de $-0,545 \pm 0,005$ °H.

5.3.1 Validação

5.3.1.1 Seletividade

Os tempos de retenção médios para os ácidos láctico, orótico e cítrico em leite, obtidos a partir de 48 corridas independentes de soluções padrão e de amostras de leite adicionadas dos analitos foram de $3,19 \pm 0,02$; $3,80 \pm 0,07$ e $6,23 \pm 0,13$ minutos, respectivamente. Ácido láctico, orótico e cítrico não foram detectados em nenhuma das baterias analíticas para os brancos de reagentes (água ultrapura e solução de extração – Carrez). Cromatogramas típicos do solvente, do *pool* de soluções padrão em água (1,0 mg/L de ácido láctico; 0,2 mg/L de ácido orótico; 24,0 mg/L de ácido cítrico), das amostras de leite *in natura* e adicionadas dos analitos de

interesse (25,0 mg/L de ácido láctico; 5,0 mg/L de ácido orótico; 600,0 mg/L de ácido cítrico) são apresentados na **Figura 5.1**.

Os ácidos oxálico e fórmico não foram detectados nem em soluções aquosas e nem em amostras de leite adicionadas. O ácido acético, apesar de ter sido identificado em soluções padrão aquosas no tempo de retenção médio de $3,52 \pm 0,04$ minutos, não foi detectado nas amostras de leite *in natura* e não interferiu na resolução dos ácidos orgânicos de interesse.

Os resultados para os tempos de retenção são semelhantes aos apresentados por Lues; Both; Samita (1998) e Tormo; Izco (2004), que relataram tempos de retenção entre 3,3 e 4,4 (ácido láctico); 3,7 e 5,0 (ácido acético); 3,8 e 4,9 (ácido orótico) e 4,7 e 7,0 minutos (ácido cítrico), utilizando condições cromatográficas similares às deste estudo.

Nenhum dos neutralizantes e estabilizantes avaliados (hidróxido de sódio, carbonato e bicarbonato de sódio; fosfatos mono, di e trissódico, citrato de sódio e mix comercial de fosfatos) interferiram na quantificação do ácido láctico em leite *in natura*. Resultados inferiores ao limite de quantificação do método foram obtidos tanto para o leite sem adição como para o leite adicionado destes interferentes. Tais resultados indicam a capacidade do método por CLAE-UV/DAD em quantificar o ácido láctico em amostras de leite, mesmo na ocorrência de adulterações por adição de neutralizantes ou na presença de estabilizantes legalmente permitidos no processamento de leite UHT.

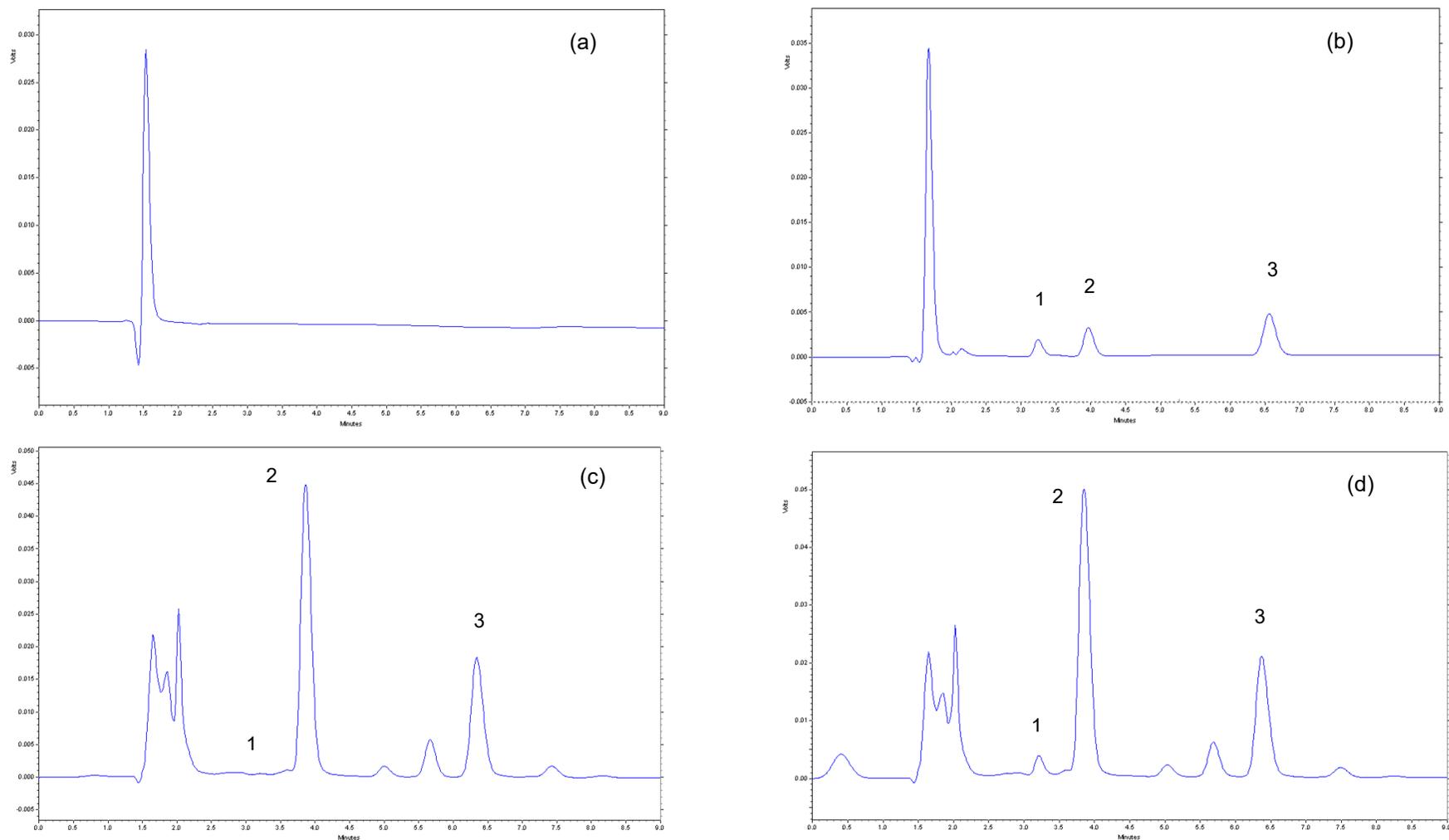


Figura 5.1. Cromatogramas típicos obtidos para o solvente (a), pool de padrões em água (b), leite *in natura* (c) e leite *in natura* adicionado dos ácidos orgânicos de interesse (d), 1: ácido láctico, 2: ácido orótico e 3: ácido cítrico.

5.3.1.2 Linearidade e efeito de matriz

Após o tratamento de valores dispersos (*outliers*), as premissas relacionadas à análise de regressão linear simples foram confirmadas para as curvas de calibração em água e em matriz leite, para os três ácidos orgânicos nas faixas de concentração estudadas. Os resultados obtidos na matriz estão detalhados na **Tabela 5.1**.

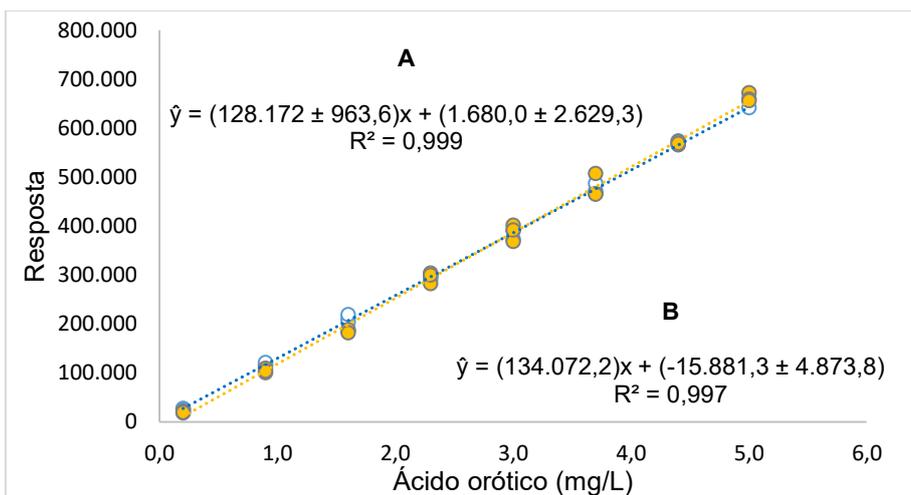
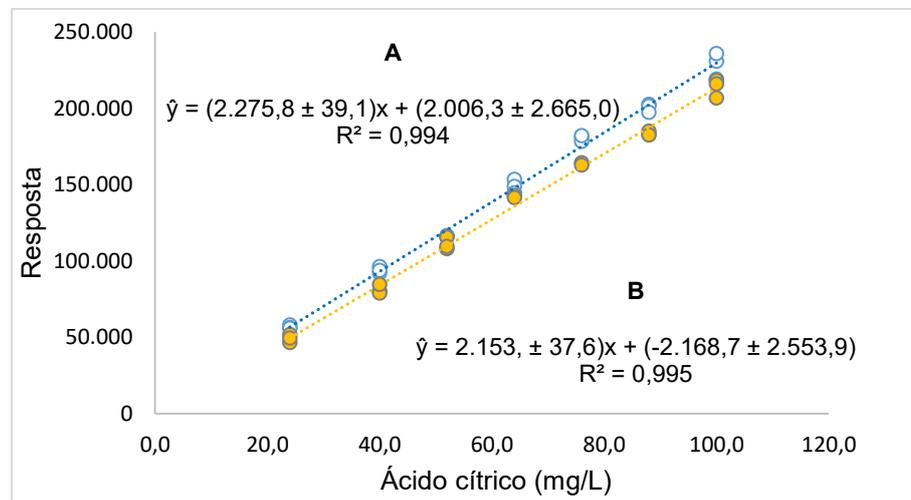
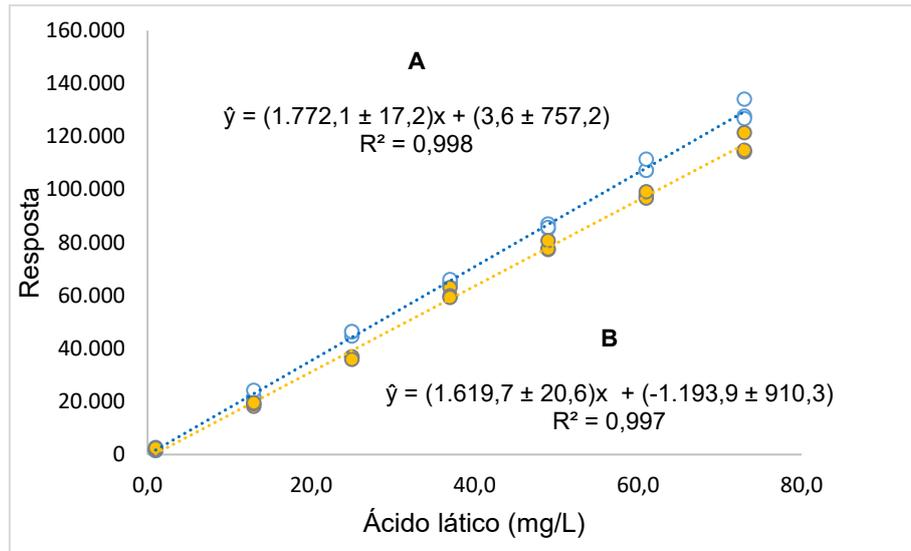
Efeito de matriz foi comprovado para os três ácidos orgânicos (**Figura 5.2**). Diferença significativa ($p < 0,05$) entre as inclinações das curvas em solvente e em extrato de leite foi observada nos três casos (**Tabela 5.2**). Heteroscedasticidade das variâncias e diferença significativa também entre as interseções foram observadas para o ácido orótico. Ficou comprovado que a resposta cromatográfica na análise de ácidos orgânicos em leite é afetada pela matriz. Logo, para o método em questão a utilização de curvas de calibração elaboradas a partir da simples diluição dos padrões dos ácidos láctico, cítrico e orótico em solvente não é apropriada.

A avaliação do efeito de matriz ainda é pouco explorada em estudos de validação para análise de ácidos orgânicos em leite e derivados. A utilização de curvas de calibração dos analitos em solvente sem a investigação do efeito de matriz foi relatada em leite (PÉREZ-RUIZ *et al.*, 2004), em fórmulas infantis (GILL; INDYK, 2007) e em leite fermentado (GATEA *et al.*, 2015). Em estudos de validação de metodologia para a determinação de ácido láctico em leite por cromatografia de troca iônica, foram usadas apenas de curvas de calibração em extrato de leite, também sem a avaliação do efeito de matriz (MILAGRES *et al.*, 2012). Em outro relato, o efeito de matriz foi avaliado e não detectado a partir da observação do paralelismo das curvas preparadas em solução aquosa e em iogurte, mas sem a utilização de ferramentas estatísticas (COSTA *et al.*, 2016).

Tabela 5.1. Faixa de linearidade, coeficientes da curva de calibração em leite e testes estatísticos referentes ao método de determinação de ácidos orgânicos em leite por CLAE-UV/DAD.

Estatística*	Ácido orgânico (mg/L)		
	Lático (n=21)	Cítrico (n=19)	Orótico (n=24)
Faixa linear (mg/L)	25,0 a 1.825,0	600,0 a 2.500,0	5,0 a 125,0
a	- 1.193,9 ± 910,3	- 2.168,7 ± 2.553,9	- 15.881,3 ± 4.873,8
b	1.619,7 ± 20,6	2.153,0 ± 37,6	134.072,2 ± 1.583,9
R	0,985	0,987	0,987
d	1,816	1,364	1,971
t _L	0,187	-0,538	-0,876
F _{regressão}	6,16 x 10 ^{3***}	3,28 x 10 ^{3***}	7,17 x 10 ^{3***}
F _{Falta de ajuste}	2,449 ^{ns}	2,743 ^{ns}	1,301 ^{ns}

*n: número de observações após tratamento de *outliers* ($p < 0,05$); a: coeficiente linear ± erro padrão; b: coeficiente angular ± erro padrão; R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ($p > 0,10$); d: Estatística de Durbin-Watson ($p > 0,10$); t_L: t de Levene ($p < 0,05$); F_{regressão}: razão da variância do teste de significância da regressão ($***p < 0,001$); F_{Falta de ajuste}: razão da variância do teste de desvio da linearidade ($p > 0,05$); ns: não significativo.



Legenda: ○ Curva em água ● Curva em leite.

Figura 5.2. Comparação entre as curvas de calibração de ácidos orgânicos em água (A) e em extrato de leite (B).

Tabela 5.2. Avaliação das interseções e das inclinações das curvas de calibração dos analitos (ácido láctico, ácido cítrico e ácido orótico) no solvente aquoso e na matriz leite para a determinação de ácidos orgânicos por CLAE-UV/DAD.

Ácido (mg/L)	Estatística				
	GL	Interserção		Inclinação	
		t_a	p	t_b	p
Lático	38	1,011 ^{ns}	$3,2 \times 10^{-1}$	5,677*	$2,0 \times 10^{-6}$
Cítrico	36	1,130 ^{ns}	$2,7 \times 10^{-1}$	2,260*	$3,0 \times 10^{-2}$
Orótico	40	3,233*	$2,8 \times 10^{-3}$	3,258*	$2,7 \times 10^{-3}$

GL: grau de liberdade ($n_s + n_m - 4$), sendo n_s número de pontos da curva para solvente e n_m número de pontos da curva para matriz leite; t_a : estatística t para contrastes entre interseções; t_b : estatística t para contrastes entre inclinações; p : significância ao nível de 5% de probabilidade; ns: não significativo; *significativo.

5.3.1.3 Limites de detecção e quantificação, veracidade, repetibilidade e precisão intermediária

Limites teóricos de detecção e quantificação de 3,0 mg/L e 3,1 mg/L; 25,0 mg/L e 31,5 mg/L; 30,5 mg/L e 35,0 mg/L foram observados para ácido orótico, láctico e cítrico, respectivamente.

Para a determinação do LQ experimental, foram considerados os limites teóricos citados, os resultados preliminares da concentração intrínseca destes ácidos orgânicos em amostras de leite *in natura* e o atendimento aos parâmetros de precisão e veracidade, que correspondiam ao primeiro nível da faixa linear estabelecida. Foram obtidos valores de 5,0 mg/L; 25,0 mg/L e 600,0 mg/L para os ácidos orótico, láctico e cítrico, respectivamente. Limites similares foram reportados para os ácidos láctico e cítrico, utilizando eletroforese capilar (LIGOR *et al.*, 2008). Para determinação de ácido láctico por cromatografia líquida de troca iônica, foram encontrados valores mais elevados para LD e LQ (MILAGRES *et al.*, 2012).

As recuperações médias para os três ácidos orgânicos variaram entre 87% e 109%, atendendo ao critério de aceitação estabelecido de 80% a 110% (AOAC 2012b; EC, 2002; INMETRO, 2016). Resultados satisfatórios para DPR_r , DPR_R , $HorRat_r$ e $HorRat_R$ confirmaram a precisão do método em condições de repetibilidade e precisão intermediária. O ácido cítrico foi o analito que apresentou

melhores resultados para DPR_r e DPR_R , fato que se justifica por ser o ácido orgânico predominante no leite *in natura* e UHT e avaliado neste estudo em concentrações mais elevadas que os demais (**Tabela 5.3**).

Na quantificação de ácidos orgânicos em queijo Ossolano por CLAE foram relatados valores semelhantes de veracidade (80,8% a 92,5%) e de precisão em condições de repetibilidade (6,7% a 11,0%) (ZEPPA; CONTERNO; GERBI, 2001). Na validação de metodologia por eletroforese capilar para análise de ácidos orgânicos em probióticos, Gatea *et al.* (2015) relataram valores de veracidade para cítrico e láctico entre 94% a 110%, na faixa de concentração de 20 mg/L a 120 mg/L.

Tabela 5.3. Veracidade, desvios padrão relativos em condições de repetibilidade e de precisão intermediária, valores de HorRat e incerteza expandida em percentual para a determinação de ácidos orgânicos em leite por CLAE-UV/DAD.

Ácido	Concentração* (mg/L)	n	Veracidade R _m (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)	HorRat _r	HorRat _R	U (%)
Lático	25,0	12	108,9	11,5	13,8	1,8	1,4	25,4
	325,0	11	87,1	3,0	12,3	0,7	1,8	7,8
	1.825,0	12	97,0	3,8	9,9	1,1	1,9	6,0
Cítrico	600,0	12	104,9	4,9	9,0	1,2	1,5	5,9
	1.600,0	12	101,7	2,9	4,4	0,8	0,8	3,2
	2.500,0	10	88,2	2,0	3,1	0,6	0,6	2,4
Orótico	5,0	12	94,2	13,5	13,5	1,6	1,1	9,6
	22,5	12	87,7	5,1	13,5	0,8	1,3	8,2
	125,0	12	89,3	3,1	13,7	0,6	1,8	8,2

* nível de adição no leite *in natura* com desconto da concentração intrínseca; n: número de observações, após tratamento de outliers (*Grubbs*); R_m: Recuperação média, DPR_r: desvio padrão relativo, em condições de repetibilidade; DPR_R: desvio padrão relativo, em condições de precisão intermediária; HorRat_r: valor observado de DPR_r dividido pelo valor de DPR_r de referência, definido como 2/3 de DPR_R estimada pela equação modificada de Horwitz ou Thompson; HorRat_R: valor observado de DPR_R dividido pelo valor de DPR_R, estimado pela equação modificada de Horwitz ou Thompson; U: incerteza expandida em percentual, a um nível de confiança de 95% e fator de abrangência entre 2,0 e 2,3.

5.3.2 Estimativa da incerteza de medição

A incerteza expandida percentual variou entre 6,0% e 25,4% para ácido láctico, entre 2,4% e 5,9% para o cítrico e entre 8,2% e 9,6% para o ácido orótico. Nos três casos, a curva de calibração e a precisão intermediária foram as fontes de variação que mais contribuíram na estimativa da incerteza combinada.

Apesar da estimativa da incerteza de medição se tratar de uma determinação recomendada e complementar à validação analítica, caracterizando uma propriedade do conjunto de dados estudado (EURACHEM/CITAC, 2012; EURACHEM, 2014; JCGM, 2008), sua realização ainda é pouco frequente. Em estudos recentes sobre a validação de métodos cromatográficos para a determinação de ácidos orgânicos em alimentos (COSTA *et al.*, 2016; KHOSRAVI, *et al.*, 2015; MILAGRES *et al.*, 2012), a estimativa da incerteza da medição não foi apresentada.

5.3.3 Perfil de ácidos orgânicos e acidez titulável em leite UHT

O método cromatográfico validado foi aplicado em amostras comerciais (n=54) de leite UHT de três diferentes regiões do Brasil, para obtenção dos perfis de ocorrência dos ácidos orgânicos orótico, cítrico e láctico. Foi obtido também o perfil do teor de acidez titulável para essas amostras (**Figura 5.3**).

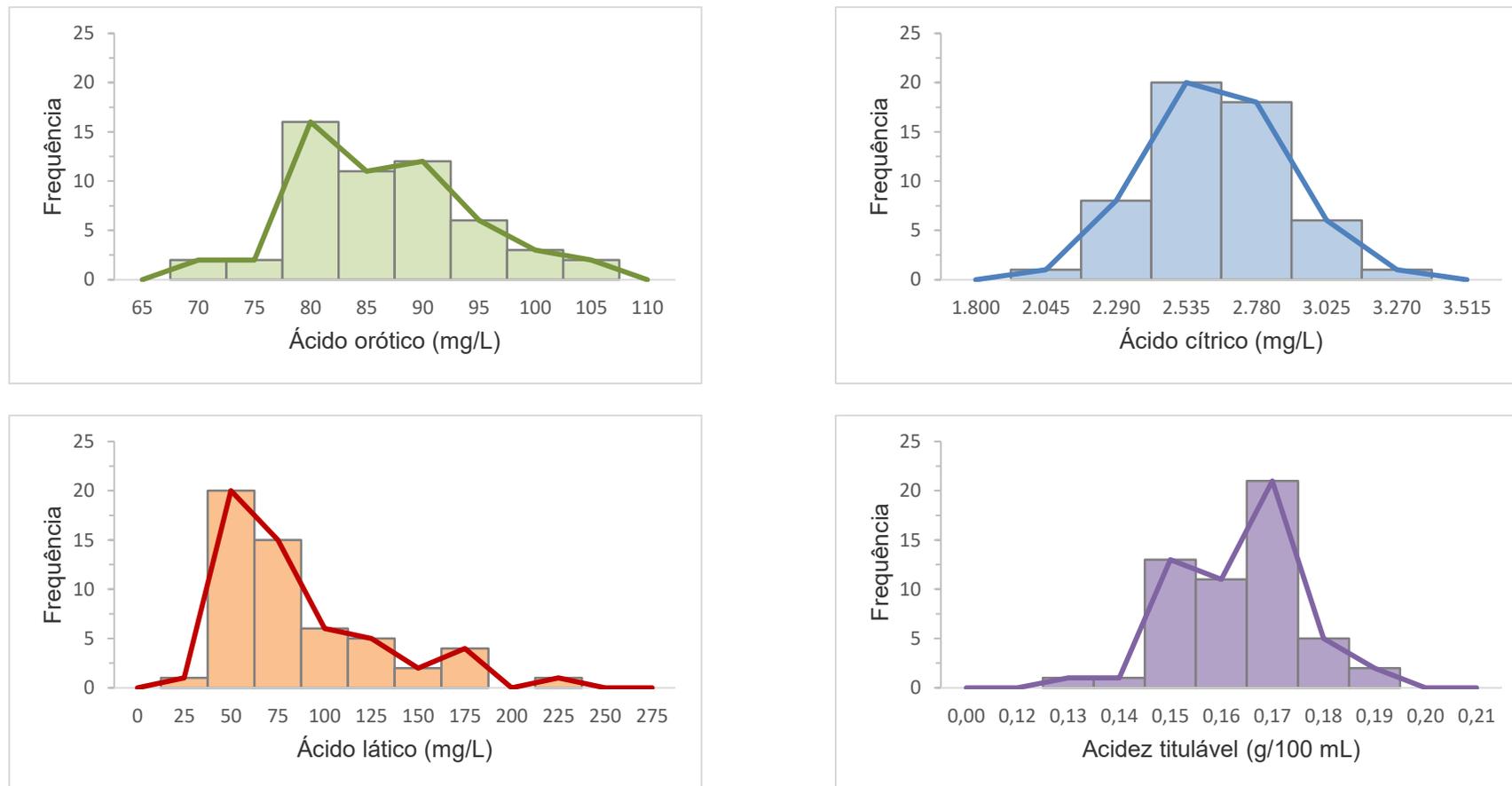


Figura 5.3. Perfil de ocorrência de acidez titulável e ácidos orgânicos, láctico, cítrico e orótico no leite UHT brasileira (n = 54).

Distribuições simétricas e não achatadas (curtose não significativa) foram observadas para os ácidos cítrico e orótico, com médias estimadas semelhantes às medianas. A distribuição do teor desses ácidos no leite UHT segue a distribuição normal, segundo o teste de Jarque-Bera (JARQUE; BERA, 1987). Valores médios entre 66,4 mg/L e 102,8 mg/L e 1.857,2 mg/L e 3.152,7 mg/L foram encontrados para ácido orótico e cítrico, respectivamente (**Tabela 5.4**).

Tabela 5.4. Parâmetros estimados para a distribuição dos ácidos láctico, cítrico e orótico e da acidez titulável em leite UHT (n = 54).

Parâmetro	Ácido láctico	Ácido cítrico	Ácido orótico	Acidez titulável
Mínimo	25,0	1.857,2	66,4	0,13
Máximo	214,0	3.152,7	102,8	0,19
\bar{X}	71,8	2.503,8	83,9	0,16
s^2	1.858,4	60.291,5	62,0	0,0001
α_3	1,415***	0,016 ^{n.s.}	0,49 ^{n.s.}	-0,197 ^{n.s.}
$\alpha_4 - 3$	1,472*	0,31	0,031 ^{n.s.}	0,107 ^{n.s.}
CV	60,04	9,81	9,38	7,43
JB	22,884***	0,219 ^{n.s.}	2,221 ^{n.s.}	0,373 ^{n.s.}
P ₅	30,9	2.115,5	72,9	0,15
P ₂₅	38,9	2.330,8	78,0	0,15
P ₅₀	58,1	2.503,6	81,6	0,17
P ₇₅	89,2	2.649,3	89,2	0,17
P ₉₅	165,2	2.909,5	99,5	0,18
P ₉₉	188,5	3.028,5	102,7	0,19

\bar{X} : média, mg/L; s^2 : variância, mg²/L² (ácidos orgânicos); \bar{X} : média, g/100 mL; s^2 : variância, g²/100 mL² (acidez titulável); α_3 : coeficiente de assimetria; $\alpha_4 - 3$: coeficiente de curtose; CV: coeficiente de variação; JB: χ^2 para o teste de normalidade de Jarque-Bera; ^{n.s.}: $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; P₅: percentil 5; P₂₅: percentil 25; P₅₀: percentil 50 (mediana); P₇₅: percentil 75; P₉₅: percentil 95 e P₉₉: percentil 99.

Teores de ácido cítrico entre 936,0 e 1.827,8 mg/L foram reportados em leites *in natura* e UHT (PÉREZ-RUIZ *et al.*, 2004; SHAPIRO; SILANIKOVE, 2011; TORMO; IZCO, 2004; VÉNICA; PEROTTI; BERGAMINI, 2014), valores mais baixos do que os observados no presente estudo, o que era esperado, uma vez que todos

os fabricantes declararam a utilização do estabilizante citrato de sódio nos leites UHT avaliados, o que faz aumentar o conteúdo de ácido cítrico neste produto.

Os teores de ácido orótico determinados se enquadraram nas faixas observadas por Indyk; Woollard (2004), Tormo; Izco (2004) e Vénica; Perotti; Bergamini (2014), que encontraram teores entre 23,9 e 104,0 mg/L em leite *in natura* e por Anastasi *et al.* (2000) e Cataldi *et al.* (2006) que observaram valores entre 22,7 e 125,7 mg/L em leites pasteurizado, UHT e em pó.

A baixa variabilidade dos resultados observada para os ácidos cítrico e orótico ($CV < 10\%$) sugerem que o teor desses ácidos no leite é relativamente constante, independente do processamento, região, marca e outras fontes de variação. Os resultados apresentados demonstram que a avaliação dos teores destes ácidos orgânicos pode ser utilizada como indicadores de qualidade, principalmente para verificar a proporcionalidade do leite em alimentos processados e também investigar adulterações por diluição. A estabilidade do ácido orótico submetido aos tratamentos térmicos de pasteurização e esterilização, e a estabilidade sazonal do ácido cítrico em leite *in natura* foram apresentadas em outros estudos (CHEN; LEWIS; GRANDISON, 2014; SAIDI; WARTHESEN, 1989).

Para a distribuição do ácido láctico foi observada assimetria positiva e significativa ($p < 0,001$). A distribuição tem desvio significativo da curtose ($p < 0,05$) e da normal, segundo o teste de Jarque-Bera ($p < 0,001$). Valores médios entre 25,0 mg/L e 214,0 mg/L foram encontrados para este ácido.

Dos três ácidos orgânicos avaliados, o láctico foi o que apresentou maior variabilidade ($CV = 60\%$). Tais resultados sugerem a ocorrência indesejada da acidificação do leite em alguma etapa do processamento e reforça a indicação da avaliação do teor deste ácido em leite como uma ferramenta de monitoramento do controle de qualidade. Neste trabalho, observou-se que 95% da distribuição continha teores de ácido láctico menores que 165 mg/L (0,0165%), indicando que valores superiores a estes podem estar associados à ocorrência de falhas no processo produtivo. A variabilidade dos resultados remete à heterogeneidade da produção de leite no Brasil, tanto das condições higiênico-sanitárias de produção, como das condições tecnológicas durante o processamento, o transporte e o armazenamento do produto acabado.

Valores muito diferentes deste estudo são reportados para teores de ácido láctico em leite *in natura* e UHT. Torriero *et al.* (2003) e Zaydan; Dion; Boujtitita (2004) relataram valores entre 14,4 mg/L e 67,5 mg/L, em leite argentino e francês, respectivamente. Já Tormo; Izco (2004) e Vénica; Perotti; Bergamini (2014), observaram quantidades entre 174 mg/L e 200 mg/L para leite *in natura* produzido na Espanha e na França, respectivamente. Teores ainda mais elevados foram citados por Milagres *et al.* (2012) em leite *in natura* brasileiro submetido à acidificação natural (394,2 a 964,7 mg/L) e por Pérez-Ruiz *et al.* (2004), em leite UHT (1.047,0 mg/L a 1.497,0 mg/L) comercializado na Espanha. Como a concentração intrínseca do ácido láctico no leite recém-ordenhado é relatada como pouco expressiva (ZAYDAN; DION; BOUJITITA, 2004), a variabilidade dos teores observados pode ser explicada pela ocorrência da fermentação do leite. Isso demonstra a importância da quantificação do ácido láctico na avaliação da qualidade do leite.

Diferentemente do ácido láctico, distribuição normal, simétrica e não achatada foi observada para a AT no leite UHT brasileiro. Valores médios entre 0,13 e 0,19 g de ácido láctico/100 mL de leite, e baixa variabilidade (CV = 7,4%) foram obtidos. Apesar da determinação da AT ser um indicador analítico utilizado para avaliar a acidez do leite expressa em ácido láctico, a variabilidade para o perfil encontrado para a AT é muito inferior a encontrada para o AL, o que indica a fragilidade deste indicador de qualidade do leite. Ou seja, o conteúdo da acidez titulável do leite não representa, de fato, o conteúdo do ácido láctico. Além disso, é sabido que o uso de estabilizantes e a adição ilícita de neutralizantes como hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos ao leite também afetam diretamente a AT, pois neutralizam parte do ácido láctico produzido pela ação microbiana (KUMAR *et al.*, 2016; MILAGRES *et al.*, 2012).

Teores de AT entre 0,16 e 0,17 g/100 mL foram relatados em amostras de leite UHT fabricadas em três países do Mercosul (DOMARESKI *et al.*, 2010), e entre 0,15 g/100 mL e 0,22 g/100 mL, em estudos de *shelf life* de leite UHT integral (LONGHI *et al.*, 2012).

5.3.4 Efeito da fermentação do leite nos teores de ácidos orgânicos e acidez titulável

A alteração dos teores de ácido láctico, cítrico e orótico durante a manutenção do leite *in natura* a 37 ± 1 °C está representada na **Figura 5.4**. Os teores de ácido cítrico ($2.119,8 \text{ mg/L} \pm 62,6 \text{ mg/L}$) e orótico ($80,6 \text{ mg/L} \pm 3,1 \text{ mg/L}$) não foram influenciados pela acidificação natural ($p > 0,05$). Por outro lado, observou-se baixo teor de ácido láctico no leite *in natura* recém-coletado e discreto aumento nas primeiras 6 horas de fermentação, atingindo o máximo de $36,2 \text{ mg/L}$ ($0,0036\%$). Após este período, o teor de ácido láctico aumentou rapidamente, atingindo valores próximos a 600 mg/L ($0,06\%$) após 9 horas, sendo seu aumento atribuído ao desenvolvimento microbiano. Esse comportamento também foi observado por Milagres *et al.* (2012), que reportaram um aumento de $394,2 \text{ mg/L}$ para $964,7 \text{ mg/L}$, após 8 horas de manutenção do leite *in natura* em banho de água a 36 °C. Em condições de incubação a 45 °C durante 4 horas, Bouteille *et al.* (2013) observaram um aumento de aproximadamente 4 vezes do teor de ácido láctico, também em leite *in natura*.

A alteração dos teores de AT ao longo do processo fermentativo foi semelhante ao observado para o ácido láctico. A concentração inicial de AT ($0,15 \text{ g ácido láctico/100 mL}$) também permaneceu constante até 6 horas de fermentação, registrando um rápido aumento após esse período, até atingir um teor máximo de $0,24 \text{ g de ácido láctico/100 mL}$. Na representação gráfica a acidez titulável foi expressa em mg/L , para padronizar e facilitar a comparação com os teores de ácido láctico.

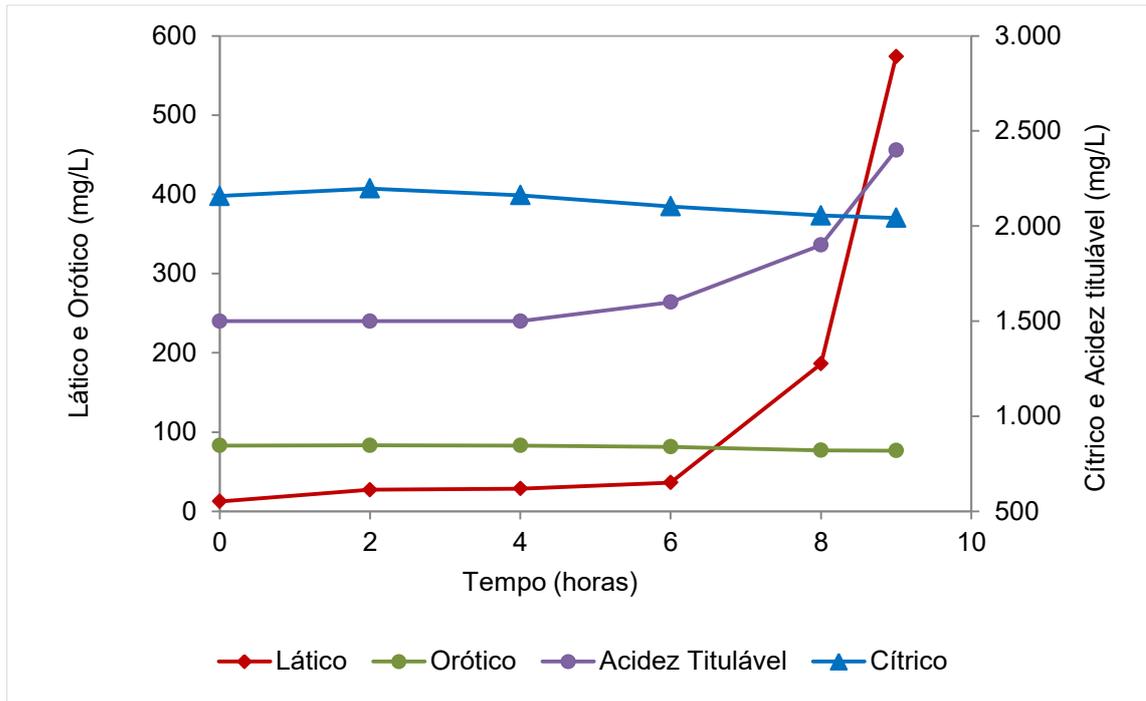


Figura 5.4. Variação dos teores de ácido láctico, cítrico e orótico e acidez titulável durante a acidificação natural do leite.

5.3.5 Teores de ácido láctico e acidez titulável em leite

A determinação da AT é comumente utilizada para avaliar a qualidade do leite e a ocorrência de deterioração por processos fermentativos. Valores entre 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL são regulamentados no Brasil (BRASIL, 2011), enquanto na China e na Rússia um intervalo mais abrangente, de 0,12 a 0,21 g/100 mL é aceitável (CHINA, 2010; CU, 2013).

No entanto, a acidez titulável não é um bom indicador do conteúdo real de ácido láctico. Além da AT não representar apenas a concentração de ácido láctico, mas também de outras substâncias no leite que possuem caráter ácido, o uso de estabilizantes e a adição ilícita de neutralizantes como hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos ao leite também afetam diretamente a AT, pois neutralizam parte do ácido láctico produzido pela ação microbiana (KUMAR *et al.*, 2016; MILAGRES *et al.*, 2012). A acidez titulável também pode ser afetada por outros fatores, como a hidrólise da gordura do leite e liberação de ácidos graxos, tratamento térmico e remoção de gases solúveis, e até mesmo pela velocidade da titulação, devido à

precipitação de fosfato de cálcio, provocando a liberação de íons H^+ (CHANDAN; KILARA; SHAH, 2008; MCCARTHY; SINGH, 2009).

A avaliação dos teores reais de ácido láctico no leite representa uma ferramenta de controle mais fidedigna para avaliar a qualidade do leite que a determinação da AT (KUMAR *et al.*, 2016; SUNDEKILDE *et al.*, 2013), pois seria possível quantificar tanto o ácido láctico livre como o lactato produzido após a adição de neutralizantes.

No presente estudo foi possível constatar que apesar de serem observados teores considerados aceitáveis para a AT em leite UHT comercializado no Brasil e baixa variabilidade entre as amostras (CV = 7,4%), os valores encontrados para o teor real de ácido láctico apresentaram considerável variabilidade (CV = 60%), dificultando estabelecer uma relação direta e proporcional entre o teor de ácido láctico e a AT em leite UHT (**Figura 5.5**). Essa variabilidade elevada pode ser explicada pelo desenvolvimento microbiano e produção de ácido láctico nas diferentes amostras de leite UHT, não refletida no conteúdo da acidez titulável.

Durante a indução da acidificação natural do leite *in natura* em condições controladas (37 ± 1 °C) observou-se que apesar de haver uma relação direta entre ácido láctico e AT, o teor do ácido láctico aumentou 15 vezes após 8 horas de fermentação, enquanto a AT ainda se enquadraria nos valores máximos tolerados em vários países do mundo.

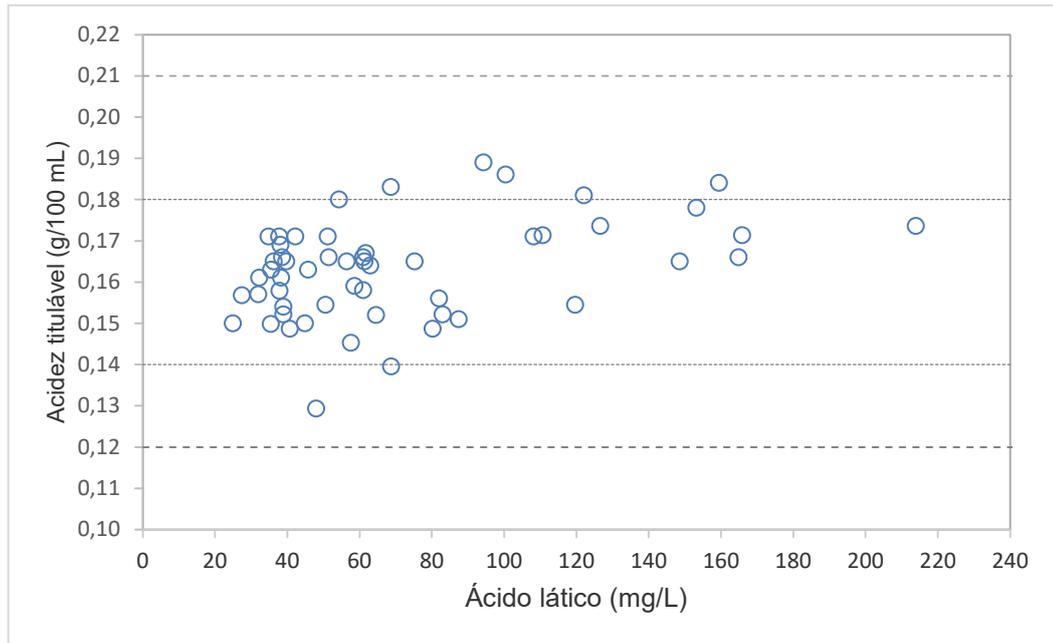


Figura 5.5. Teores de acidez titulável, expressa em gramas de ácido láctico por 100 mL de leite e ácido láctico em leite UHT (n = 54).

Nota: Intervalo entre 0,14 a 0,18 g/100 mL: valores de referência para AT em leite fluido no Brasil; intervalo entre 0,12 a 0,21 g/100 mL: valores de referência para AT em outros países.

5.4 Conclusão

O método validado é simples, rápido, e mostrou-se adequado para a determinação simultânea dos ácidos láctico, cítrico e orótico em leite *in natura* e UHT, desde que utilizada curva de calibração dos padrões na matriz leite (curva matrizada).

Os teores reportados para estes ácidos podem fornecer subsídio para o estabelecimento de valores de referência que caracterizem desvios de qualidade ou ocorrência de adulterações.

Comprovou-se que a AT não representa adequadamente o teor de ácido láctico no leite. A variabilidade dos teores de AL é superior, tanto em amostras de leite UHT quanto em condições simuladas de deterioração do leite devido à fermentação, sendo o AL um indicador de qualidade mais sensível.

REFERÊNCIAS

ANASTASI, G. *et al.* Orotic acid: a milk constituent enzymatic determination by means of a new microcalorimetric method. **Talanta**, v. 52, p. 947–952. 2000.

ANDRÉS, V.; TENORIO, M.D.; VILLANUEVA, M.J. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1100–1106. 2015.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 947.05 - Acidity of Milk Titrimetric Method. **AOAC Official Methods of Analysis**. 19th ed. Washington, Chapter 33, p. 7. 2012a.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**. Published by AOAC Internacional. 2012b.

BOTELHO, B.G. *et al.* Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31–37. 2015.

BOUTEILLE, R. *et al.* Monitoring lactic acid production during milk fermentation by in situ quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2071–2080. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite UHT (UAT). **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 08/09/1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite cru refrigerado, leite pasteurizado e de coleta de leite cru e transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 30/12/2011. Seção 1.

CALAMARI, L.; GOBBI, L.; BANI, P. Improving the prediction ability of FT-MIR spectroscopy to assess titratable acidity in cow's milk. **Food Chemistry**, v. 192, p. 477–484. 2016.

CASSOLI, L. *et al.* An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 4, p. 480–485. 2011.

CATALDI, T.R.I. *et al.* A Pulsed electrochemical detection of orotic acid by an activated potential waveform at a gold working electrode following anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1107, p. 130–138. 2006.

CHANDAN, R. C., KILARA, A., SHAH, N. P. (Editors). **Dairy Processing & Quality Assurance**. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-813-82756-8. First edition. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA. 2008.

CHEN, B.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. **Food Chemistry**, v. 158, p. 216–223. 2014.

CHINA. The National Standard of People's Republic of China, GB 25190-2010. National food safety standard: Sterilized Milk. **Ministry of Health of the People's Republic of China**. 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. Milk and Milk Products. **World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Second edition. Rome. 2011.

COSTA, M.P. *et al.* Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC/DAD- RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. **Talanta**, v. 152, p. 162–170. 2016.

CUSTOMS UNION - CU. Technical Regulation of the Russia-Kazakhstan-Belarus Customs Union "On Safety of Milk and Dairy Products" (TR-TS 033/2013). **Council of the Eurasian Economic Commission n° 67**, October 9. 2013.

DINKCI, N. *et al.* Isocratic Reverse-Phase HPLC for Determination of Organic Acids in Kargı Tulum Cheese. **Chromatographia**, v. 66, p. 45–49. 2007.

DOMARESKI, J. L. *et al.* Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Organó Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. **Arquivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 60, n. 3, p. 261–269. 2010.

EAC - EAST AFRICAN COMMUNITY. East African Standard. EAS 27 UHT milk – Specification. **Edict of Government**. First edition. 2006.

EC COMMISSION EUROPEAN. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L221, p. 8 - 36. 2002.

EU EUROPEAN UNION. Commission Regulation n° 1129/2011 of 11 November 2011. Amending Annex II to Regulation (EC) n° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. **Official Journal of the European Union**, L 295/1, 1–177. 2011.

EURACHEM/CITAC. Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Third Edition. Teddington: LGC. 2012.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd Ed. Teddington: LGC. 2014.

GARDE, S. *et al.* Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. **International Dairy Journal**, v. 25, p. 87-91. 2012.

GARNSWORTHY, P. C. *et al.* Variation of Milk Citrate with Stage of Lactation and De Novo Fatty Acid Synthesis in Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 1604–1612. 2006.

GATEA, F. *et al.* Capillary Electrophoresis Method Validation for Organic Acids Assessment in Probiotics. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 1335–1340. 2015.

GILL, B.D.; INDYK, H.E. Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleosides in milk and infant formulas. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 596–605. 2007.

HORWITZ W.; ALBERT R. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095–1109. 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística de produção agropecuária, dezembro de 2014. 50 p.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. Revisão 05. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro; 2016.

INDYK, H. E.; WOOLLARD, D.C. Determination of Orotic Acid, Uric Acid, and Creatinine in Milk by Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 1, p. 116–122. 2004.

ISO-IDF. International Organization for Standardization and International Dairy Federation. **ISO 8069 – IDF 69:2005: Dried milk** — Determination of content of lactic acid and lactates. Second edition. 2005.

JARQUE, C. M., BERA, A. K. A Test for Normality of observations and regression residuals. **International Statistical Review**, v. 55, n. 2, p. 163-172. 1987.

JENIE, S.N.A.; PRIETO-SIMON, B.; VOELCKER, N.H. Development of L-lactate dehydrogenase biosensor based on porous silicone resonant microcavities as fluorescence enhancers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 637–643. 2015.

JCGM. Joint Committee for Guides in Metrology. **JCGM 100:2008**. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. First edition. 2008.

KHOSRAVI, F. *et al.* Determination of Organic Acids in Fruit juices by UPLC. **International Journal of Life Sciences**, v. 9, n. 5, p. 41–44. 2015.

KUMAR, B. *et al.* Rapid lactate oxidase-based assay for lactate content in milk to ascertain its hygienic quality. **International Journal of Dairy Thecnology**, v. 69, n. 3, p. 460–467. 2016.

LIGOR, M. *et al.* Determination of volatile and non-volatile products of milk fermentation processes using capillary zone electrophoresis and solid phase microextraction coupled to gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2707–2713. 2008.

LÖFFLER, M.; CARREY, E. A.; ZAMEITAT, E. Orotic Acid, more than just an intermediate of Pyrimidine synthesis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 42, p. 207-219. 2015.

LONGHI, R. *et al.* A survey of the physicochemical and microbiological quality of ultra-heat-treated whole milk in Brazil during their shelf life. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 45-50. 2012.

LUES, J. F. R.; BOTH, W. C.; SAMITA, E.J. Ion-exchange HPLC of Cheese-related Organic Acids in Comparison with Reverse-phase HPLC. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 959–965. 1998.

MARSILI, R.T. *et al.* High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 52–57. 1981.

MCCARTHY, O.J.; SINGH, H. Lactose. Water, Salts and Minor Constituents. Physico-chemical Properties of Milk, Chapter 15. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 3, p. 691-758. 2009.

MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. Grupo Mercado Comum (GMC) - Resolução nº 135 de 1996. Inclusão do citrato de sódio no regulamento técnico Mercosul de identidade e qualidade do leite U.A.T. (U.H.T). **XXIV GMC** - Fortaleza, 13/12/96. 1996.

MILAGRES, M.P. *et al.* Development and validation of the high performance liquid chromatography–ion exclusion method for detection of lactic acid in milk. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1078–1082. 2012.

MURTAZA, M.A. *et al.* Organic acid contents of buffalo milk cheddar cheese as influenced by accelarated ripening and sodium salt. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, p. 99–106. 2012.

PÉREZ-RUIZ, T. *et al.* High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 57–64. 2004.

RATHEE, K. *et al.* Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, p. 35–54. 2016.

SAIDI, B.; WARTHESEN, J. J. Analysis and Stability of Orotic Acid in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 2900–2905. 1989.

SHAPIRO, F.; SILANIKOVE, N. Rapid and accurate determination of malate, citrate, pyruvate and oxaloacetate by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Application in colorful juices and fermentable food (yogurt, wine) analysis. **Food Chemistry**, v. 129, p. 608–613. 2011.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G.; GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) In-house method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 151–158. 2005.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25–35. 2005.

SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. In-house method validation: Application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 241–247. 2007.

SUNDEKILDE, U.K. *et al.* Nuclear magnetic resonance metabonomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 290–299. 2013.

SUNDEKILDE, U.K. *et al.* Association between the bovine milk metabolome and rennet-induced coagulation properties of milk. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 6076–6084. 2014.

TOFALO, R. *et al.* Influence of pig rennet on proteolysis, organic acids content and microbiota of Pecorino di Farindola, a traditional Italian ewe's raw milk cheese. **Food Chemistry**, v. 175, p. 121–127. 2015.

TORMO, M.; IZCO, J.M. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, p. 305–310. 2004.

TORRIERO, A. A. J. *et al.* Milk lactate determination with a rotating bioreactor based on an electron transfer mediated by osmium complexes incorporating a continuous-flow/stopped-flow system. **Analytica Chimica Acta**, v. 498, p. 155–163. 2003.

VÉNICA, C. I.; PEROTTI, M. C.; BERGAMINI, C. V. Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p. 561–580. 2014.

ZAYDAN, R.; DION, M.; BOUJTITA, M. Development of a new method, based on a bioreactor coupled with an L-lactate biosensor, toward the determination of a nonspecific inhibition of L-lactic acid production during milk fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8–14. 2004.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2722–2726. 2001.

6 CAPÍTULO 3. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE

RESUMO

Um método reflectométrico rápido, simples e prático para a determinação de ácido láctico em leite fluido foi validado e comparado com o método de referência por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e arranjo de fotodiodos (CLAE-UV/DAD). Seletividade, linearidade (3,0 a 48,0 mg/L), veracidade (recuperação entre 85% e 120%), repetibilidade (DPR_r entre 3,1% e 9,5%), precisão intermediária (DPRR entre 6,5% e 10,5%), razão HorRat_r (entre 0,4 e 1,2), razão HorRat_R (entre 0,5 e 1,0) e incerteza expandida (entre 3,4% e 6,1%) foram determinados. A correlação entre os métodos reflectométrico e CLAE foi comprovada (Coeficiente de correlação produto-momento de Pearson de 0,978; Coeficiente de Concordância de Correlação de *Lin* de 0,965 e desvio da linearidade não significativo, $p > 0,10$, para a regressão de *Passing-Bablok*). Os teores de ácido láctico em amostras armazenadas refrigeradas (6 ± 1 °C) por até dois dias e congeladas (-15 a -30 °C) por até 1 mês não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$). Amostras de 41 produtores de 8 diferentes cidades de uma mesma região, que produziam em média 19.610 litros de leite/dia, foram utilizadas para se estudar a concentração intrínseca de ácido láctico (3,0 mg/L e 28,0 mg/L) e a acidez titulável ($0,16 \pm 0,02$ g/100 mL) em leite *in natura*. Para o leite UHT processado a partir deste leite *in natura*, foram encontrados valores entre 22,0 mg/L e 245,0 mg/L (ácido láctico) e $0,16 \pm 0,01$ g/100 mL (acidez titulável). Os resultados obtidos demonstraram a adequação ao uso do método reflectométrico e uma boa correlação com o método cromatográfico. Foi evidenciada a importância da avaliação do teor de ácido láctico no controle de qualidade do leite, sua vantagem em relação à determinação da acidez titulável e a também a necessidade de se estabelecer valores de referência para um monitoramento mais efetivo.

Palavras-chave: validação intralaboratorial, métodos enzimáticos, cromatografia, correlação, acidez titulável, leite UHT.

6.1 Introdução

O leite obtido e armazenado em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias à sua conservação está sujeito ao crescimento microbiano indesejado e consequente acidificação (SOWMYA *et al.*, 2013). O ácido láctico é produzido a partir da fermentação da lactose e sua determinação pode ser uma ferramenta útil tanto para a detecção precoce da contaminação microbiana no leite fresco, como para o monitoramento durante o processamento e armazenamento de produtos processados, como o leite UHT (CHEN *et al.*, 2011; MARRAZZA; CAGNINI; MASCINI, 1994; PALMISANO *et al.*, 2001; SKLADAL *et al.*, 1993).

Apesar da avaliação dos teores de ácido láctico ser amplamente recomendada para o monitoramento da qualidade do leite (NGUYEN-BOISSE *et al.*, 2013; RATHEE *et al.*, 2016), não há valores de referência estabelecidos e os teores citados na literatura para leite fluido são muito discrepantes (PÉREZ-RUIZ *et al.*, 2004; VÉNICA; PEROTTI; BERGAMINI, 2014; ZAYDAN; DION; BOUJTITA, 2004). São escassos os estudos que avaliam os teores de ácido láctico no leite *in natura* e no leite após o processamento.

A disponibilidade de um método analítico rápido e simples para determinação do lactato é de grande relevância para fins de controle de qualidade do leite (KUMAR *et al.*, 2016; PALMISANO *et al.*, 2001). A utilização de diferentes metodologias analíticas é relatada, como a cromatografia líquida alta eficiência (CLAE) e a gasosa (CG), a espectrofotometria e os métodos enzimáticos, com diferentes tipos de detecção (quimioluminescência, eletroquímica e fluorescência). Embora CLAE e CG apresentem boa sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, a maioria dos métodos cromatográficos é laboriosa, demorada e requer equipamentos de alto custo e profissionais qualificados, restringindo sua aplicabilidade (BALLESTA-CLAVER; VALENCIA-MIRÓN; CAPITÁN-VALLVEY, 2008; BORI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015; KAN *et al.*, 2015). Por outro lado, os métodos enzimáticos clássicos e os biosensores para a determinação de lactato são altamente específicos, sensíveis, simples, rápidos, normalmente não necessitam de pré-tratamento da amostra além da diluição, geram menos resíduos e podem ser utilizados em campo e em tempo real, além de envolverem equipamentos de baixo

custo, quando comparado aos equipamentos cromatográficos (KUMAR *et al.*, 2016; RATHEE *et al.*, 2016).

Os métodos enzimáticos para a determinação do lactato são baseados na oxidação do lactato a piruvato, na presença de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD) e da enzima lactato-desidrogenase (LDH), gerando piruvato e NADH (NAD reduzido). O NADH produzido pode ser detectado diretamente por absorvância ou fluorescência, ou indiretamente a partir de reações e formação de compostos cromogênicos ou sinais elétricos (CHEN *et al.*, 2015; KAN *et al.*, 2015). Especificamente para o kit utilizado neste estudo (Reflectoquant[®], referência 1.16127.0001), o NADH formado, na presença de diaforase, reduz um sal de tetrazólio formando um composto azul. Tal composto é determinado reflectometricamente e sua concentração é proporcional ao conteúdo de ácido láctico ou lactato da amostra.

Muitos trabalhos têm focado no desenvolvimento e aplicação de biosensores para a determinação de lactato (BORI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2015; MONOSIK *et al.*, 2012b). Todavia, a determinação de lactato pelo método enzimático combinado com a utilização de sais de tetrazólio impregnado em tiras reativas ainda é pouco relatada, sobretudo para a matriz leite.

Neste trabalho é apresentada a validação e a determinação da estimativa da incerteza de medição de um método enzimático rápido e simples com detecção por reflectância para a quantificação de ácido láctico em leite fluido *in natura* e UHT. A correlação entre o método validado e a metodologia por CLAE-UV/DAD, foi avaliada a partir do Coeficiente de Correlação produto-momento de Pearson (r), Coeficiente de Correlação de Concordância de Lin (CCC), método de *Bland-Altman* e regressão de *Passing-Bablok*. O método foi aplicado em amostras de leite fluido, no intuito de se comparar os teores obtidos em amostras de leite *in natura* recém-ordenhado com aqueles encontrados em amostras de leite UHT, evidenciando a importância do monitoramento do teor do ácido láctico na avaliação da qualidade do leite. A estabilidade dos teores de ácido láctico no leite submetido a diferentes condições de armazenamento também foi avaliada.

6.2 Material e métodos

Os ensaios analíticos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química Bromatológica (LQB) do Serviço de Química e do laboratório do Serviço de Microscopia de Produtos, do Instituto Octávio Magalhães (Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais/ LACEN-MG) da Fundação Ezequiel Dias.

As vidrarias, instrumentos e equipamentos de medição utilizados neste trabalho possuíam calibração vigente, realizada por empresas acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

6.2.1 Amostras

Leite *in natura* obtido na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em Igarapé (Minas Gerais, Brasil) foi utilizado para a validação do método e estudo de estabilidade da amostra ao armazenamento em diferentes condições de armazenamento. Entre maio e agosto de 2015 foram coletadas quatro amostras de aproximadamente cinco litros de leite, diretamente do tanque de expansão, entre 2 a 3 horas após a ordenha matutina. O leite foi imediatamente transportado para o laboratório em condições de refrigeração (4 °C por até 1 hora), caracterizado e mantido em temperaturas inferiores a 7 °C até o momento da análise ou armazenado em condições pré-determinadas para o estudo de estabilidade.

Para avaliação da correlação entre os métodos reflectométrico e cromatográfico foram utilizadas 50 amostras de leite UHT de marcas de relevância nacional. Uma embalagem de 1L de cada amostra foi coletada, identificada e transportada ao laboratório a temperatura ambiente, ficando armazenada em local fresco e arejado até o momento da análise.

A aplicação do método foi realizada em amostras de leite *in natura* obtidas em propriedades rurais do nordeste brasileiro (agreste pernambucano) e em amostras de leite UHT, processadas em laticínios da mesma região, fornecidas pelo Departamento de Polícia Federal (DPF), durante a realização de uma operação para investigação de fraude em leite. As amostras de leite *in natura* foram coletadas

imediatamente após a ordenha em frascos de polipropileno, e armazenadas sob congelamento de -15 a -30 °C. Para transporte até o laboratório, as amostras congeladas foram armazenadas em caixas de isopor lacradas, contendo gelo seco. As amostras de leite UHT foram enviadas à temperatura ambiente. As temperaturas de armazenamento para cada caso foram mantidas até o momento da análise.

6.2.2 Kits, reagentes e soluções

Todos os reagentes e padrões utilizados foram de grau de pureza apropriado, cujos valores encontravam-se descritos em seus respectivos certificados de análise. Os kits para análise possuíam certificado de desempenho.

Foi utilizado kit Reflectoquant® para determinação de ácido láctico, referência 1.16127.0001, faixa de trabalho: 3,0 mg/L a 60,0 mg/L da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os reagentes utilizados e suas respectivas purezas foram: ácido acético (99,9%), fosfato de sódio monobásico (98%), fosfato de sódio dibásico (99,8%), hidróxido de sódio (99%) e lactato de lítio (99,5%), da Merck (Darmstadt, Alemanha); carbonato de sódio (99,5%) e material de referência certificado (MRC) de lactato de magnésio em solução aquosa ($1.001,0 \pm 6,0$ mg/L) da Fluka (Buchs, Suíça); ácido cítrico (100,5%), ácido oxálico (102,1%), citrato de sódio tribásico (100%) e fosfato de sódio tribásico (99%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); ácido fórmico (99,1%), ácido orótico (99%) e bicarbonato de sódio (100,3%) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) e mix comercial de fosfatos – Mix Viva L 80, mistura de tripolifosfato, fosfato monossódico e dissódico (56,9 a 58,9% em P_2O_5), grau alimentício, para uso como estabilizante em leite e derivados, da Vivare (Matias Barbosa, Brasil). Água ultrapura (resistividade de 18,2 mΩ/cm) foi obtida com sistema de gradiente de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Para os estudos de validação, foram utilizadas soluções recém-preparadas em água ultrapura do padrão recomendado pelo fabricante do kit: lactato de lítio (0,2 g/100 mL), dos estabilizantes nas concentrações de 10 g/100 mL (citrato de sódio, mix de fosfatos, fosfatos monossódico, dissódico e trissódico), dos neutralizantes (hidróxido de sódio a 1,5 g/100 mL, carbonato de sódio a 2,5 g/100 mL e bicarbonato de sódio a 10,0 g/100 mL) e dos ácidos orgânicos (ácido acético a 2,0 g/100 mL,

ácido cítrico a 15,0 g/100 mL, ácido fórmico a 1,0 g/100 mL, ácido orótico a 0,1 g/100 mL e ácido oxálico a 0,25 g/100 mL). As concentrações de cada solução foram definidas de forma a se obter concentrações finais no leite que atendessem os níveis de estudo pré-estabelecidos.

6.2.3 Ensaio reflectométrico

Foi utilizado o equipamento RQFlex[®] - Reflectoquant, modelo Plus 10 da Merck (Darmstadt, Alemanha). Antes da medição, o equipamento foi calibrado com a utilização de tira com código de barras específica, disponibilizada como acessório do mesmo. Após a calibração, foram inseridas as informações referentes ao ensaio de ácido láctico, contidas também em tira com código de barras, referente ao lote de kit em uso.

As amostras refrigeradas de leite *in natura* eram colocadas à temperatura ambiente até que atingissem entre 15 °C a 25 °C, homogeneizadas por agitação e inversão da embalagem original por cinco vezes e transferidas para frascos de vidro. Quando necessário, as amostras foram previamente diluídas 2, 5 ou 10 vezes com água ultrapura, de forma a obter valores de leitura entre 3,0 mg/L e 60,0 mg/L de ácido láctico, conforme recomendação do fabricante.

No ensaio reflectométrico, a tira de reação foi inserida em becker de vidro contendo cerca de 5 mL da amostra de leite, simultaneamente ao acionamento do tempo de reação de 5 minutos no próprio equipamento. A tira era mantida em contato com o leite por dois segundos, o excesso de amostra era retirado em papel absorvente e a tira inserida no compartimento indicado no reflectômetro. Ao final do tempo de reação, a concentração de ácido láctico, em mg/L, foi lida diretamente no visor do equipamento.

6.2.4 Validação e estimativa da incerteza de medição

O método reflectométrico foi validado intralaboratorialmente, utilizando amostras de leite *in natura*, previamente confirmadas quanto ao atendimento aos requisitos físico-químicos previstos no Padrão de Identidade e Qualidade do produto

(BRASIL, 2011), amostras de leite adicionadas de padrão de lactato de lítio e MRC de lactato de magnésio e amostras de leite *in natura* acidificadas naturalmente.

Seletividade, linearidade e faixa linear, veracidade, precisão em condições de repetibilidade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação foram investigados conforme descrito por Souza; Junqueira; Ginn (2005) e Souza; Pinto; Junqueira (2007). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi de 5% de probabilidade. A estimativa de incerteza foi determinada a partir da incerteza padrão combinada, incerteza padrão expandida e a incerteza padrão expandida percentual (EURACHEM/CITAC, 2012).

6.2.4.1 Seletividade

Para verificar a seletividade do método ao ácido láctico, foram considerados os seguintes interferentes em potencial: ácidos orgânicos cuja presença já tinha sido relatada no leite (MARSILI *et al.*, 1981; TORMO; IZCO, 2004), estabilizantes legalmente permitidos no processamento de leite UHT e neutralizantes supostamente utilizados na adulteração do leite, para mascarar o desenvolvimento da acidez por fermentação microbiana. As concentrações utilizadas de cada interferente basearam-se nos teores citados em leite (ácidos orgânicos), quantidade máxima permitida como aditivo (estabilizantes) e quantidades suficientes para reduzir a acidez titulável do leite a valores inferiores a 0,14 g de ácido láctico/100 mL (neutralizantes).

Utilizou-se amostras de leite *in natura* e amostras de leite adicionadas individualmente dos ácidos orgânicos: acético (0,01 g/100 mL), cítrico (0,15 g/100 mL), fórmico (0,004 g/100 mL), orótico (0,01 g/100 mL) e oxálico (0,002 g/100 mL); dos estabilizantes: fosfato monossódico, dissódico e trissódico, citrato de sódio e mix de fosfatos (0,10 g/100 mL) e dos neutralizantes: hidróxido de sódio (0,03 g/100 mL), carbonato de sódio (0,05 g/100 mL) e bicarbonato de sódio (0,30 g/100 mL).

As amostras de leite *in natura* sem adição e adicionadas de interferentes foram analisadas em três replicatas independentes. Valores dispersos foram identificados pelo teste de *Grubbs*. As premissas de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de *Ryan-Joiner* e *Levene* modificado, respectivamente (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA;

PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Após a verificação do atendimento das premissas, as médias obtidas em cada tratamento foram comparadas por análise de variância - teste F para delineamento inteiramente casualizado, ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software *Excel* 2013.

6.2.4.2 Linearidade

A linearidade foi verificada a partir de curva de calibração externa preparada em sete níveis de concentração e três replicatas independentes para cada nível. As concentrações de adição no leite *in natura* foram: 3,0, 10,0, 17,0, 24,0, 31,0, 38,0 e 48,0 mg/L de lactato de lítio.

A linearidade da curva foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados ordinários, os valores discrepantes foram tratados pelo teste dos resíduos padronizados *Jackknife* e o atendimento às premissas relacionadas à análise de regressão: normalidade (teste de *Ryan-Joiner*), homogeneidade de variâncias (teste de *Brown-Forsythe* ou *Levene* modificado) e independência dos resíduos da regressão (teste de *Durbin-Watson*) foi investigado, conforme proposto por Souza & Junqueira (2005).

6.2.4.3 Limites, veracidade, precisão e estimativa da incerteza de medição

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos foram avaliados a partir de doze replicatas independentes de amostras de leite *in natura*, com teor de ácido láctico próximo ao limite inferior da faixa de medição do kit (3,0 mg/L). Os valores de LD e LQ foram estimados como 3 e 10 vezes, respectivamente, o desvio padrão amostral obtido (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016).

O LQ do método foi confirmado experimentalmente, pela obtenção de resultados aceitáveis para os parâmetros de precisão e veracidade (EC, 2002; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

Recuperação, precisão em condições de repetibilidade e precisão intermediária foram estudadas em amostras de leite preparadas em quatro níveis de concentração e doze replicatas independentes, no intervalo de leitura do kit. Tais parâmetros foram investigados em amostras de leite adicionadas de 1,0, 3,0, 24,0 e

48,0 mg/L de lactato de lítio. As análises foram realizadas em quatro baterias distintas, variando-se dias, analistas, soluções e reagentes (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

Repetibilidade e precisão intermediária também foram avaliadas nas seguintes amostras de leite: *in natura* sem diluição, *in natura* diluída duas vezes, e após fermentação e diluída dez vezes.

Ensaio complementares da veracidade e da precisão em condições de repetibilidade foram realizados utilizando MRC de lactato de magnésio ($1.000,0 \pm 6,0$ mg/L) adicionado às amostras de leite nas concentrações de 3,0, 24,0, 48,0, 75,0 e 250,0 mg/L. Após a adição das concentrações de 75,0 e 250,0 mg/L de MRC, as amostras foram diluídas 5 e 10 vezes, respectivamente. As demais amostras foram analisadas sem diluição.

As recuperações foram estimadas e valores extremos foram investigados para cada nível de concentração utilizando teste de *Grubbs* (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Valores médios entre 80 e 110% foram considerados aceitáveis (AOAC 2012b; EC, 2002; INMETRO, 2016).

A precisão foi estimada por análise de variância e expressas em termos de desvio padrão relativo de repetibilidade (DPR_r) e de precisão intermediária (DPR_R). As premissas relacionadas ao teste F foram previamente testadas (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Para a avaliação da precisão, as razões HorRat foram determinadas e consideradas satisfatórias quando o produto da divisão fosse igual ou inferior a 2,0 (HORWITZ; ALBERT, 2006).

A incerteza de medição combinada foi estimada considerando quatro fontes independentes: a repetibilidade ou precisão intermediária, a incerteza atribuída ao MRC, a incerteza atribuída ao balão volumétrico utilizado para diluição de amostras, quando aplicável, e a resolução do equipamento digital RQFlex[®] - Reflectoquant (Equação 6.1).

$$U = k \sqrt{u_S^2 + u_{MRC}^2 + u_b^2 + u_e^2}$$

(Eq. 6.1)

Sendo U a incerteza de medição expandida do analito na fração de massa (mg/L), k o fator de abrangência, u_s a incerteza de precisão da medida em termos de repetibilidade, u_{MRC} a estimativa de incerteza para o material de referência ou padrão, u_b a incerteza atribuída ao balão volumétrico utilizado para diluição de amostras, e u_e a incerteza correspondente à resolução do equipamento.

6.2.5 Correlação entre os métodos reflectométrico e CLAE

A comparação entre os métodos reflectométrico e CLAE-UV/DAD validado (limite de quantificação: 25 mg/L, veracidade: 88 a 109%; DPR_r entre 2,0 e 13,5% e DPR_R entre 3,1 e 13,8%), utilizado como referência no laboratório para determinação de ácido láctico, foi realizada utilizando 50 amostras de leite UHT.

Foram utilizados testes estatísticos comumente empregados para avaliar a concordância entre metodologias: coeficiente de concordância de correlação de *Lin* (CCC) (FARREL, *et al.*, 2012; LIN, 1992), coeficiente de correlação produto-momento de Pearson (r) (GASPARINI; BARBIERI; MAZZER, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2014), regressão de *Passing-Bablok* (FARREL, *et al.*, 2012; JOURDIL *et al.*, 2013) e método de *Bland-Altman* (BLAND; ALTMAN, 2012; GIAVARINA, 2015; JOURDIL *et al.*, 2013; RODRIGUEZ *et al.*, 2014;). Os dados foram analisados utilizando o software *Excel* 2013 e *XLSTAT* 2016.

A concordância entre métodos utilizando o CCC foi classificada como “excelente concordância” (CCC > 0,99), “concordância substancial” (CCC entre 0,95 e 0,99), “concordância moderada” (CCC entre 0,90 e 0,94) e “concordância fraca” (CCC < 0,90) (FARREL, *et al.*, 2012; LIN, 1992).

O coeficiente de correlação produto-momento de Pearson representa o grau em que duas variáveis (x e y) estão relacionadas, desde que a relação seja linear. Este coeficiente não tem unidade de medida e varia entre -1 e 1. Se $r = 0$, não há relação linear entre x e y e as variáveis não estão correlacionadas (GASPARINI; BARBIERI; MAZZER, 2007).

A regressão de *Passing-Bablok* permite avaliar a linearidade entre dois métodos, a partir do teste de linearidade acumulativa (Cusum). O teste é utilizado para avaliar se os resíduos estão dispersos aleatoriamente acima e abaixo da linha

de regressão e não exibem qualquer distinção de tendência. Valores de $p < 0,01$ indicam desvio significativo da linearidade. (FARREL, *et al.*, 2012; JOURDIL *et al.*, 2013).

O gráfico de *Bland-Altman* foi plotado a partir das médias das duas medidas (eixo X) e da diferença entre as medidas (eixo Y). É recomendado que 95% dos dados esteja dentro do intervalo: média ± 2 desvios padrão (GIAVARINA, 2015).

Os métodos também foram comparados utilizando estatística descritiva. A distribuição do teor do ácido láctico no leite UHT foi caracterizada pelas medidas de tendência central (média e mediana), dispersão (variância e coeficiente de variação) e coeficientes de assimetria e curtose. Foram estimados os percentis da distribuição dos dados, sendo a aderência à distribuição normal avaliada pelo teste de Jarque-Bera (JARQUE; BERA, 1987).

6.2.6 Estabilidade do teor do ácido láctico em leite *in natura* em diferentes condições de armazenamento

A estabilidade do ácido láctico foi avaliada em duas condições de armazenamento: refrigeração e congelamento.

Leite *in natura* recém-ordenhado e imediatamente refrigerado foi homogeneizado e fracionado em frascos de polietileno. Três deles foram mantidos refrigerados (6 ± 1 °C) e os teores de ácido láctico foram quantificados nos tempos 0, 24 e 48 horas. Quatro frascos foram congelados entre -15 e -30 °C por até 31 dias. Os teores de ácido láctico foram determinados nos tempos 0, 5, 20 e 31 dias. Cada frasco de leite foi submetido ao descongelamento lento em condições de refrigeração, uma única vez. Nos dois estudos, as determinações de ácido láctico em cada frasco foram realizadas em três replicatas independentes, para cada tempo de armazenamento.

Valores dispersos foram identificados pelo teste de *Grubbs*. As premissas de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de *Ryan-Joiner* e *Levene* modificado, respectivamente (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Após a verificação do atendimento das premissas, as médias obtidas em cada tempo foram comparadas

por análise de variância - teste F para delineamento inteiramente casualizado, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software *Excel* 2013.

6.2.7 Ácido láctico em leite *in natura* e após processamento UHT – estudo de caso sobre a avaliação do teor como ferramenta de controle de qualidade

Para avaliação do perfil da concentração intrínseca de ácido láctico no leite *in natura* foram utilizadas amostras pré-selecionadas pela DPF, de 47 produtores de 8 cidades que compõe a mesorregião do agreste meridional de Pernambuco. Os municípios foram escolhidos considerando a produção leiteira, o número de produtores e a destinação do leite para beneficiamento em laticínios produtores de leite UHT. Informações sobre raça, tamanho do rebanho, produção leiteira diária, tipo de ordenha e alimentação animal foram levantadas.

O atendimento aos requisitos físico-químicos previstos no Padrão de Identidade e Qualidade do produto (BRASIL, 2011) foi verificado de acordo com as metodologias da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012b). Foram desconsideradas as amostras com resultados insatisfatórios para pelo menos dois dos três parâmetros: acidez titulável, índice crioscópico e densidade.

Os teores de ácido láctico e acidez titulável também foram avaliados em 24 amostras de leite UHT, fabricado em quatro laticínios que processavam o leite *in natura* oriundo das propriedades rurais selecionadas. As amostras foram fornecidas pelo DPF, tendo sido coletadas no mercado local, na mesma época da coleta das amostras de leite *in natura*.

Os teores de ácido láctico e acidez titulável nos leites *in natura* e UHT foram caracterizados pelas medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão e coeficiente de variação). Os percentis da distribuição dos dados também foram estimados.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Validação

6.3.1.1 Seletividade

A seletividade analítica foi confirmada neste estudo, pois nenhum dos interferentes avaliados sejam eles ácidos orgânicos, estabilizantes ou neutralizantes da acidez, interferiram significativamente ($p > 0,05$) na quantificação do teor de ácido láctico no leite (**Tabela 6.1**).

Este parâmetro refere-se à capacidade do método em determinar analitos específicos em misturas ou matrizes sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Logo, a elevada especificidade atribuída aos métodos enzimáticos (BALLESTA-CLAVER; VALENCIA-MIRÓN; CAPITÁN-VALLVEY, 2008; MINAMI *et al.*, 2015; MONOSIK *et al.*, 2012a) foi confirmada nesse estudo.

Os analitos avaliados no estudo de seletividade interferem em outras metodologias utilizadas para verificação da qualidade e a ocorrência de adulterações em leite, tais como a determinação da acidez titulável, o pH e da alcalinidade das cinzas (KUMAR *et al.*, 2016; MILAGRES *et al.*, 2012; SOWMYA *et al.*, 2013). Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de neutralizantes em leite, baseados em princípios de colorimetria, potenciometria e titulação. Contudo, a adição de neutralizantes em pequenas quantidades, suficiente apenas para neutralizar a acidez excessiva, pode dificultar a sua detecção (SOWMYA *et al.*, 2013). Diferentemente destes métodos, os enzimáticos determinam tanto o ácido láctico como sua base conjugada, o lactato. Portanto, o método em estudo seria aplicável para amostras de leite, independente do uso de estabilizantes e ocorrência de adulterações com neutralizantes.

Tabela 6.1. Avaliação da seletividade do método reflectométrico na presença de ácidos orgânicos, estabilizantes e neutralizantes da acidez.

Matriz/Interferente	Adição no leite (g/100 mL)	Ácido láctico (mg/L)
<i>Estabilizantes (p = 0,97)</i>		
Leite controle	-	8,0 ± 1,8 ^a
Citrato de sódio	0,10	8,0 ± 1,3 ^a
Mix de fosfatos	0,10	8,2 ± 1,4 ^a
Fosfato monossódico	0,10	7,2 ± 1,7 ^a
Fosfato dissódico	0,10	7,9 ± 1,0 ^a
Fosfato trissódico	0,10	7,9 ± 1,3 ^a
<i>Neutralizantes da acidez (p = 0,41)</i>		
Leite Controle	-	10,7 ± 1,5 ^a
Hidróxido de sódio	0,03	9,5 ± 0,7 ^a
Carbonato de sódio	0,05	9,1 ± 1,7 ^a
Bicarbonato de sódio	0,30	8,9 ± 1,0 ^a
<i>Ácidos orgânicos (p = 0,51)</i>		
Leite Controle	-	9,2 ± 0,9 ^a
Ácido acético	0,010	9,9 ± 0,6 ^a
Ácido cítrico	0,150	10,1 ± 1,4 ^a
Ácido fórmico	0,004	9,9 ± 0,4 ^a
Ácido orótico	0,010	9,2 ± 0,5 ^a
Ácido oxálico	0,002	10,1 ± 0,1 ^a

^a médias ± desvio padrão (n = 3), seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo ao nível de 5% de significância (p > 0,05).

Método enzimático-colorimétrico para determinar lactato em leite fresco e acidificado também se mostrou seletivo na presença de hidróxido de sódio e formol (KUMAR *et al.*, 2016). Igualmente, açúcares (D-glicose, D-frutose, L-arabinose, D-galactose e maltose), ácidos orgânicos (acético, ascórbico, cítrico, málico, láctico e succínico), etanol e glutamina não interferiram na quantificação de ácido láctico em cervejas pelo método enzimático-amperométrico (VARGAS *et al.*, 2016).

6.3.1.2 Linearidade

Após tratamento de valores dispersos e confirmação das premissas relacionadas a análise de regressão linear simples, linearidade foi demonstrada para a determinação do ácido láctico pelo método reflectométrico, na faixa de concentração estudada (**Tabela 6.2**).

Tabela 6.2. Estatísticas relacionadas à regressão linear simples do método reflectométrico para a determinação de ácido láctico.

Estatística	Valor
<i>Equação da reta (\hat{y})</i>	
Faixa linear (mg/L) *	3,0 a 48,0
a	0,657 ± 0,013
b	4,226 ± 0,484
<i>Regressão linear</i>	
n	19
R	0,967
d	1,944
t_L	-1,000
$F_{\text{Regressão}}$	2,45 x 10 ³
$F_{\text{Falta de ajuste}}$	2,485

*níveis de adição de lactato de lítio no leite: 3,0, 10,0, 17,0, 24,0, 31,0, 38,0 e 48,0 mg/L; a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; n: número de observações após tratamento de *outliers* ($p < 0,05$); R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ($p > 0,10$); d: Estatística de Durbin-Watson ($p > 0,10$); t_L : Estatística de Levene ($p < 0,05$); $F_{\text{Regressão}}$: razão da variância ($p < 0,001$); $F_{\text{Falta de ajuste}}$: razão da variância ($p > 0,05$).

Para utilização do Reflectoquant[®], o kit específico para cada analito é calibrado pelo fabricante, e para cada lote de kit é fornecido um código de barras contendo as informações de calibração (MERCK, 2013). Apesar de o método reflectométrico proporcionar a obtenção de resultados diretos em mg/L de ácido láctico a partir da utilização deste código de barras, a verificação da linearidade do método na matriz de interesse se faz necessária, visto que o kit tem ampla recomendação de uso, como alimentos em geral, cervejas, sucos e leite fermentado

(MERCK, 2012). Neste estudo a linearidade foi comprovada, não havendo restrições para a utilização dos resultados a partir pela leitura direta no equipamento.

Todavia, essa verificação da linearidade não é rotineiramente realizada. Em estudo comparativo de métodos para determinação de amônia em carnes, linearidade não foi avaliada para o kit reflectométrico. Os autores consideraram que, como o equipamento exibe a concentração de amônia em mg/L automaticamente, tal avaliação não se fazia necessária (HIJAZ; SMITH; KASTNER, 2007).

Hostálková; Klingelhöfer; Morlock (2013) avaliaram o desempenho de kit reflectométrico para determinação de hidroximetilfurfural em méis e comparou com metodologia por CLAE. Curvas de calibração externa foram elaboradas e os resultados comparados com a leitura direta. No entanto, apesar da avaliação da linearidade ter sido considerada satisfatória, ela se restringiu a observação do coeficiente de determinação. É sabido que a avaliação restrita a tal parâmetro é insuficiente para se concluir sobre a adequação do modelo de regressão linear simples (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

6.3.1.3 Limites, veracidade, precisão e estimativa da incerteza de medição

Os limites LD e LQ teóricos foram estimados em 1,1 mg/L e 3,7 mg/L de ácido láctico, respectivamente. O LD experimental foi estabelecido como o limite inferior da faixa de medição do kit (3,0 mg/L), enquanto o LQ foi estimado em 4,0 mg/L, com resultados satisfatórios para repetibilidade e precisão intermediária.

Valores similares de LD e LQ teóricos foram reportados na determinação de lactato em produtos lácteos utilizando eletroforese capilar (GATEA *et al.*, 2015), método enzimático-amperométrico (BORI *et al.*, 2012) e biosensor de quimioluminescência (BALLESTA-CLAVER; VALENCIA-MIRÓN; CAPITÁN-VALLVEY, 2008). Por outro lado, valores de LD e LQ teóricos cerca de 40 e 30 vezes superiores aos observados neste estudo, respectivamente, foram encontrados para metodologias por cromatografia líquida por troca iônica (MILAGRES *et al.*, 2012) e enzimática-colorimétrica com observação visual (KUMAR *et al.*, 2016). Em nenhum dos estudos citados a determinação experimental dos limites foi realizada.

Os resultados para veracidade, repetibilidade, precisão intermediária e estimativa de incerteza de medição são apresentados na **Tabela 6.3**.

Na avaliação dos dados obtidos para veracidade, não foram identificados *outliers* (teste de *Grubbs*) em nenhum dos níveis de concentração estudados. Para as amostras adicionadas de padrão de lactato de lítio e não diluídas, recuperações médias entre 97% e 101% foram obtidas nos níveis estudados entre 5,0 mg/L e 15,3 mg/L, enquanto que para a faixa entre 33,4 mg/L e 60,3 mg/L, observou-se valores entre 85% e 89%. A diminuição da recuperação em função do aumento da concentração também foi observada para o método reflectométrico de determinação de amônia na matriz carne (HIJAZ; SMITH; KASTNER, 2007). Provavelmente, tal fato se deve à proporção dos reagentes impregnados na tira reativa e saturação dos sítios ativos para a reação enzimática.

Para as amostras adicionadas de padrão de lactato de lítio e diluídas 2, 5 e 10 vezes, foram obtidas recuperações médias de 101%, 113% e 120%, respectivamente. Considerando a faixa de recuperação recomendada de 80% a 110%, para amostras diluídas 5 e 10 vezes os resultados médios obtidos ultrapassaram o limite superior máximo. Tal ocorrência era prevista pelo fabricante do kit (MERCK, 2014), que recomenda utilizar como faixa de aceitação valores entre 80% e 120%. Neste caso, sugere-se realizar a correção da leitura para amostras diluídas 5 ou 10 vezes.

Na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária, as premissas relacionadas ao teste F (normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias) foram atendidas. Resultados satisfatórios para DPR_r , DPR_R , $HorRat_r$ e $HorRat_R$ confirmaram a precisão do método em condições de repetibilidade e precisão intermediária.

A incerteza expandida percentual variou entre 3,1% e 6,1%, ao longo de toda faixa de concentração estudada. Apesar da estimativa da incerteza de medição se tratar de uma determinação recomendada e complementar a validação analítica (EURACHEM/CITAC, 2012; EURACHEM 2014; INMETRO, 2016), sua realização ainda é incomum. Em estudos recentes sobre a validação de métodos para a determinação de ácido láctico ou lactato por cromatografia (COSTA *et al.*, 2016; MILAGRES *et al.* 2012), por métodos enzimáticos e biosensores (HOSTÁLKOVÁ; KLINGELHÖFER; MORLOCK, 2013; VARGAS *et al.*, 2016) e por eletroforese capilar (GATEA *et al.*, 2015) a estimativa da incerteza da medição não é apresentada.

Tabela 6.3. Veracidade e faixa de recuperação, desvio padrão relativo em condições de repetibilidade, precisão intermediária, valores de HorRat e incerteza expandida para a determinação de ácido láctico em leite pelo método reflectométrico.

Ácido láctico (mg/L)	n	Veracidade Rm (%)	Faixa de recuperação (%)	DPR _r	DPR _R	HorRat _r	HorRat _R	U (%)
4,0 ^a	12	-	-	9,5	9,5	1,1	0,7	6,2
5,0 ^b	12	101	92 - 114	5,2	6,5	0,6	0,5	4,3
12,4 ^c	12	-	-	4,5	9,3	0,6	0,9	5,6
12,4 ^d	6	97	98 - 102	3,1	-	0,4	-	3,4
15,3 ^e	12	101	91 - 116	3,4	10,3	0,5	1,0	6,1
33,4 ^d	6	87	82 - 96	5,4	-	0,8	-	5,9
36,3 ^e	12	89	76 - 101	3,2	10,5	0,5	1,1	6,2
57,4 ^d	6	86	82 - 93	5,2	-	0,9	-	5,7
60,3 ^e	12	85	76 - 94	3,8	8,6	0,6	1,0	5,2
84,1 ^f	6	113	105 - 121	5,3	-	1,0	-	5,8
194,0 ^g	12	-	-	5,6	7,4	1,2	1,0	6,4
259,1 ^h	6	120	112 - 131	5,1	-	1,1	-	5,6

^a leite diluído duas vezes; ^b leite adicionado de 1 mg/L de MRC e diluído 2 vezes; ^c leite sem diluição; ^d leite adicionado de 3,0 24,0 e 48,0 mg/L de MRC, respectivamente; ^e leite adicionado de 3,0; 24,0 e 48,0 mg/L de lactato de lítio, respectivamente; ^f leite adicionado 75,0 mg/L de MRC e diluído 5 vezes; ^g leite fermentado e diluído 10 vezes; ^h leite adicionado 250 mg/L de MRC e diluído 10 vezes; n: número de observações, após tratamento de outliers (*Grubbs*); R_m: recuperação média; DPR_r: desvio padrão relativo, em condições de repetibilidade; DPR_R: desvio padrão relativo, em condições de precisão intermediária; HorRat_r: valor observado de DPR_r dividido pelo valor de DPR_r de referência, definido como 2/3 da DPR_R estimada pela equação modificada de Horwitz ou Thompson; U: incerteza expandida em percentual, a um nível de confiança de 95% e fator de abrangência entre 2,3 e 2,7.

6.3.2 Comparação entre os métodos reflectométrico e CLAE

A correlação entre os métodos reflectométrico e CLAE-UV/DAD para a quantificação do ácido láctico em leite foi confirmada em todos os testes estatísticos empregados.

Foi observada correlação positiva e significativa ($p < 0,01$) entre as duas metodologias, com um coeficiente de Pearson igual a 0,978, assumindo uma relação linear.

Concordância classificada como “substancial” entre os métodos foi observada pela avaliação do coeficiente de concordância de correlação de *Lin*, cujo valor estimado foi de 0,965, com intervalo de confiança (95%) entre 0,946 e 0,978.

A regressão de *Passing-Bablok* não revelou desvio significativo da linearidade ($p > 0,10$) a partir da soma acumulativa. Foi obtida a equação de regressão linear: $y = -13,145 + 1,206 x$, sendo o intervalo de confiança (95%) para a interseção entre -9,526 e -16,877 e para a inclinação entre 1,140 e 1,267. O gráfico de *Bland-Altman* mostrou que a diferença percentual entre os métodos reflectométrico e CLAE variou entre -41 e 25%, com intervalo de confiança (95%) entre -39 e 28%. Logo, apenas um dado extrapolou o intervalo de dispersão recomendado (média $\pm 2s$) (**Figura 6.1**).

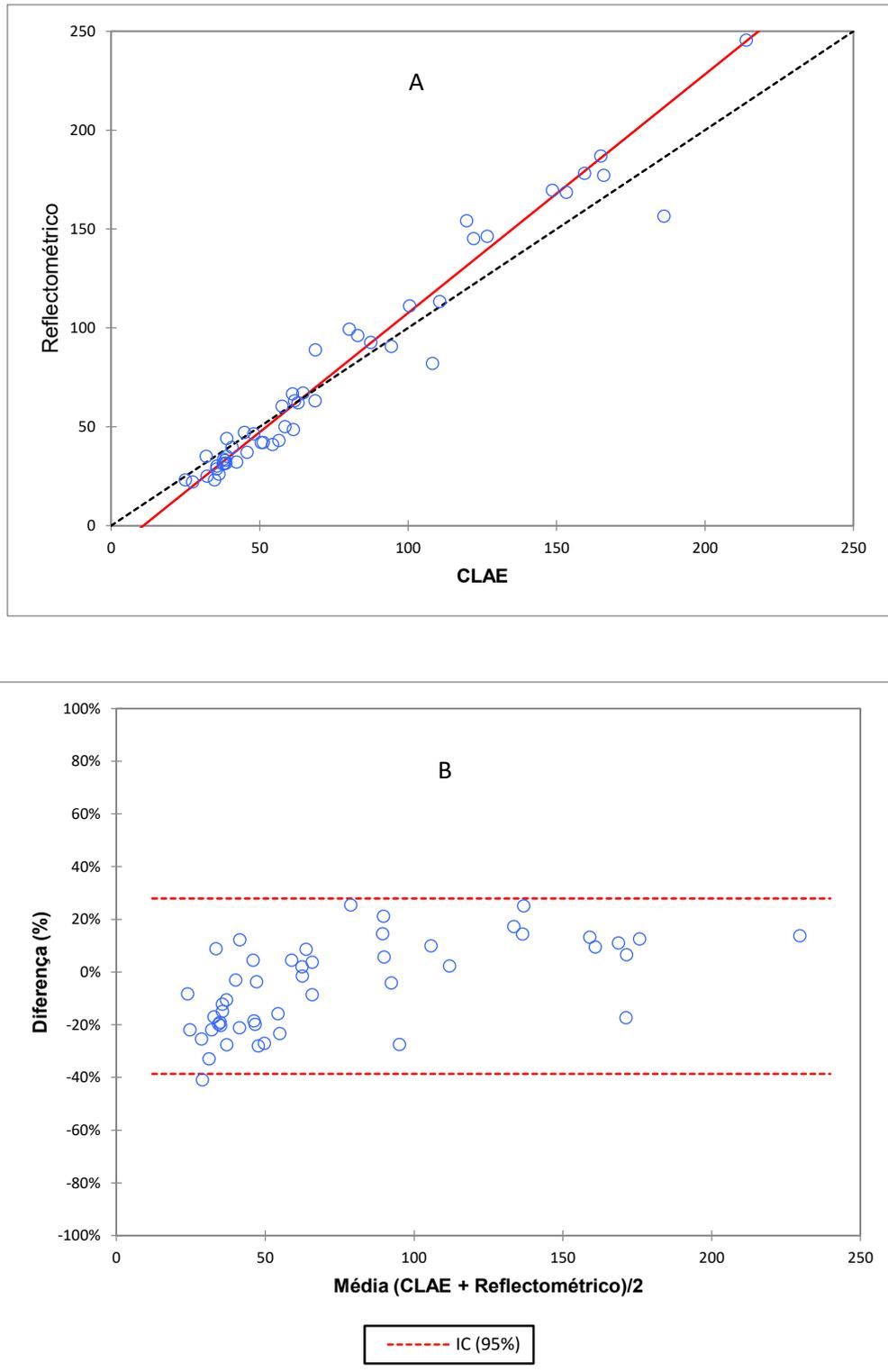


Figura 6.1. Avaliação da correlação entre os métodos CLAE e reflectométrico: Regressão de *Passing-Bablok* (A) e gráfico de *Bland-Altman* (B). Eixo X: valores em mg/L de ácido láctico; eixo Y: diferença em percentual entre os dois métodos (n = 50). Legenda: IC - intervalo de confiança (95%).

Pela avaliação da estatística descritiva para comparação dos métodos (Tabela 6.4), é possível observar que valores superiores para o teor de ácido láctico são encontrados com maior frequência para o método CLAE na faixa de concentração entre 20 mg/L e 60 mg/L. Para valores superiores a esta, o contrário ocorre.

Para ambos os métodos, o mesmo perfil de distribuição do ácido láctico em leite foi observado: assimetria positiva e significativa ($p < 0,001$), desvio da curtose não significativo ($p > 0,05$) e desvio da normal, segundo o teste de Jarque-Bera ($p < 0,001$). Valores médios entre 25,0 mg/L e 214,0 mg/L e entre 22,0 mg/L e 245,4 mg/L foram encontrados no método CLAE e reflectométrico, respectivamente.

Tabela 6.4. Estatística descritiva para o teor de ácido láctico em leite estimado pelos métodos cromatográfico (CLAE) e reflectométrico (n = 50).

Estatística	CLAE	Reflectométrico
Mínimo	25,0	22,0
Máximo	214,0	245,4
\bar{X}	75,1	76,0
s^2	2.232,2	3.079,7
α_3	1,259***	1,211***
$\alpha_4 - 3$	0,701 ^{n.s}	0,841 ^{n.s}
CV	62,93	72,98
JB	14,237***	12,920**
P ₅	30,0	23,0
P ₂₅	38,6	33,4
P ₅₀	58,1	49,3
P ₇₅	102,5	102,2
P ₉₀	158,9	169,4
P ₉₅	175,0	182,0
P ₉₉	200,4	216,7

\bar{X} : média, mg/L; s^2 : variância, mg²/L²; α_3 : Coeficiente de assimetria; $\alpha_4 - 3$: coeficiente de curtose; CV: coeficiente de variação; JB: χ^2 para o teste de normalidade de Jarque-Bera; ^{n.s.} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; P₅: percentil 5; P₂₅: percentil 25; P₅₀: percentil 50 (mediana); P₇₅: percentil 75; P₉₀: percentil 90; P₉₅: percentil 95 e P₉₉: percentil 99.

6.3.3 Estabilidade do teor do ácido láctico em leite *in natura* em diferentes condições de armazenamento

O armazenamento do leite *in natura* sob refrigeração (6 ± 1 °C) por até 48 horas e o congelamento (-15 a -30 °C) por até um mês não interferiram significativamente nos teores de ácido láctico ($p > 0,05$). Quantidades de $12,4 \pm 0,5$; $13,1 \pm 0,8$ e $13,2 \pm 0,3$ mg/L de ácido láctico foram obtidos nos tempos de 0, 24 e 48 horas de refrigeração, respectivamente. Durante o congelamento, foram quantificados teores de $9,5 \pm 0,5$ mg/L (tempo 0), $9,5 \pm 0,2$ mg/L (5 dias), $9,1 \pm 0,8$ mg/L (20 dias) e $9,9 \pm 0,8$ mg/L (31 dias). Obteve-se acidez titulável média de $0,15 \pm 0,002$ g/100 mL durante a refrigeração e de $0,16 \pm 0,003$ mg/L durante o congelamento.

O estudo de estabilidade do leite armazenado em condições de refrigeração por até 48 horas foi realizado no intuito de se avaliar duas situações: a possibilidade de ocorrência de alterações no teor de ácido láctico até o beneficiamento do leite na indústria, e estabilidade da amostra durante o tempo decorrido entre a coleta e a realização do ensaio laboratorial.

Regulamentos sobre obtenção, armazenamento e transporte de leite *in natura* especificam que o leite deve ser refrigerado logo após a ordenha a temperaturas entre 4 °C e 7 °C, que o tempo decorrido entre a ordenha inicial e seu beneficiamento não deve ultrapassar 48 horas e que a acidez titulável deve ser de no máximo 0,19 g de ácido láctico/100 mL (BRASIL, 2011; CODEX ALIMENTARIUS, 2011; CU, 2013). Logo, para um leite *in natura* produzido em condições higiênico-sanitárias satisfatórias e mantido nas condições de temperatura e tempo de armazenamento estabelecidos, não é esperado que ocorra alterações significativas nos teores de ácido láctico no interstício entre a ordenha e o beneficiamento do leite, e nem durante o transporte e armazenamento refrigerado de amostras.

A comprovação da estabilidade da amostra ao congelamento, também permite inferir que as amostras podem ser congeladas logo após coleta por até um mês para a realização do ensaio.

6.3.4 Ácido láctico em leite *in natura* e após processamento UHT – estudo de caso sobre a avaliação do teor como ferramenta de controle de qualidade

Das 47 amostras de leite *in natura* coletadas nas propriedades rurais, 41 foram utilizadas para o estudo sobre a concentração intrínseca do ácido láctico, de acordo com atendimento aos requisitos físico-químicos avaliados (reprovação em pelo menos dois requisitos). Além destas, 24 amostras de leite UHT provenientes de quatro indústrias que beneficiavam leite dessas propriedades foram analisadas quanto aos teores de ácido láctico e acidez titulável.

Juntas, essas propriedades rurais possuíam um rebanho de 1.972 vacas em lactação, predominantemente da raça Girolando (95%), que produziam em média 19.610 litros de leite por dia (**Tabela 6.5**). A maior parte das propriedades utilizava ordenha manual (59%), por duas vezes ao dia (95%). A alimentação do rebanho era majoritariamente composta por palma, silo, farelos de soja, milho e mandioca, capim e bagaço de cana.

Tabela 6.5. Informações sobre o rebanho e produtividade das 41 propriedades selecionadas para estudo sobre a concentração intrínseca de ácido láctico em leite *in natura*.

Município	Número de produtores	Vacas em lactação		Produção (litros/dia)	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
1	10	16	100	90	750
2	11	30	92	120	1500
3	4	16	45	320	400
4	1	-	45	-	450
5	7	21	60	120	800
6	3	12	25	140	280
7	3	24	42	380	480
8	2	80	100	1300	1800

As estimativas obtidas para a composição físico-química do leite *in natura* foram: $0,16 \pm 0,02$ g/100 mL (acidez titulável); $-0,537 \pm 0,007$ °H (índice crioscópico);

1,030 ± 0,001 g/mL (densidade); 3,0 ± 0,80 g/100 mL (gorduras totais) e 8,3 ± 0,34 g/100 mL (extrato seco desengordurado).

Os perfis de ocorrência do ácido láctico e da acidez titulável nas amostras de leite *in natura* (n=41) e leite UHT (n=24) produzidas e processadas na mesorregião do agreste meridional de Pernambuco podem ser visualizados na **Figura 6.2**.

Na determinação da acidez titulável, resultados semelhantes foram encontrados no leite *in natura* e UHT para os parâmetros descritivos de tendência central, dispersão e distribuição dos percentis (**Tabela 6.6**). Quatro (10%) amostras de leite *in natura* e duas (8%) de UHT apresentaram teores de acidez titulável fora dos limites previstos na legislação nacional (BRASIL, 2011).

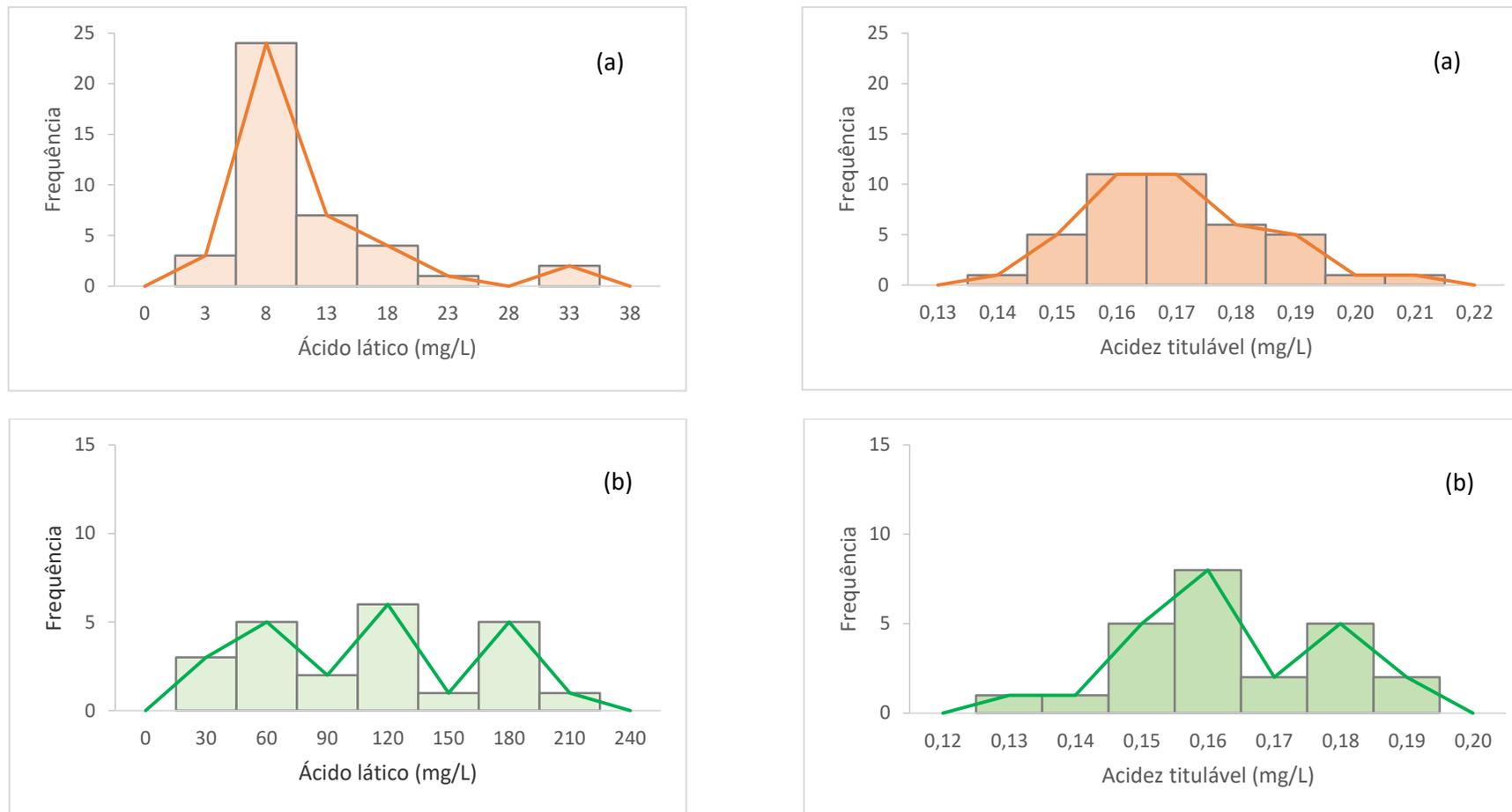


Figura 6.2. Perfil de ocorrência de ácido láctico e acidez titulável no leite in natura (a) (n = 41) e UHT (b) (n = 24).

Tabela 6.6. Comparação das distribuições dos teores de ácido láctico e acidez titulável para o leite *in natura* (n = 41) e UHT (n = 24).

Estatística	Acidez titulável		Ácido láctico	
	<i>In natura</i>	UHT	<i>In natura</i>	UHT
Mínimo	0,13	0,13	3,0	22,0
Máximo	0,21	0,19	28,5	245,4
\bar{X}	0,16	0,16	8,1	103,3
s	0,02	0,01	6,1	63,2
CV	9,4	8,9	74,8	61,2
P ₅	0,14	0,13	3,0	22,3
P ₂₅	0,15	0,15	4,1	42,5
P ₅₀	0,16	0,16	5,5	97,6
P ₇₅	0,18	0,17	10,7	164,9
P ₉₀	0,18	0,18	14,6	182,4
P ₉₅	0,19	0,19	27,4	230,8
P ₉₉	0,20	0,19	28,4	231,9

\bar{X} : média, mg/L (ácido láctico) ou g/100 mL (acidez titulável); s: desvio padrão, mg/L (ácido láctico) ou g/100 mL L; CV: coeficiente de variação; P₅: percentil 5; P₂₅: percentil 25; P₅₀: percentil 50 (mediana); P₇₅: percentil 75; P₉₀: percentil 90; P₉₅: percentil 95 e P₉₉: percentil 99.

Os teores de ácido láctico no leite *in natura* variaram entre 3,0 e 28,0 mg/L, enquanto que para o leite UHT foram observados valores entre 22,0 e 245,4 mg/L. Embora a variabilidade no teor de ácido láctico para de cada tipo de leite tenha sido elevada (CV > 60%), o perfil de distribuição observado é muito distinto. Valores médios para leite UHT foram cerca de 12 vezes o encontrado para o leite *in natura* (**Figura 6.3**).

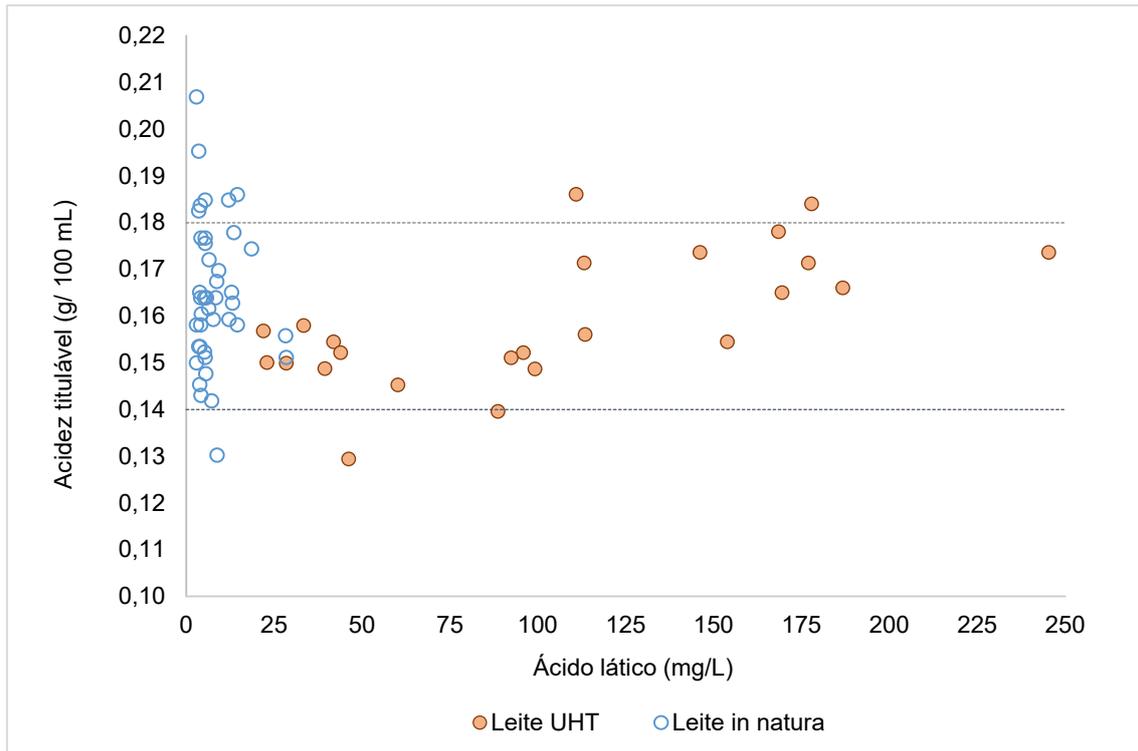


Figura 6.3. Valores médios dos teores de acidez titulável e ácido láctico para amostras de leite in natura (n=41) e UHT (n = 24). Intervalo entre 0,14 a 0,18 g/100 mL: valores de referência para acidez titulável em leite fluido no Brasil.

Valores semelhantes ao deste trabalho, entre 6,0 mg/L e 25,7 mg/L, foram relatados em leite *in natura* (BORI *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2016; TORRIERO *et al.*, 2003; SHAPIRO; SILANIKOVE, 2010; ZAYDAN; DION; BOUJTITA, 2004). Para leite processado, teores entre 8,6 mg/L e 68,0 mg/L (MARRAZZA; CAGNINI; MASCINI, 1994; PALMISANO *et al.*, 2001; TORRIERO *et al.*, 2003) e 1.047,0 a 1.497,0 mg/L (PÉREZ-RUIZ *et al.* 2004) foram encontrados. Entretanto, esses estudos foram realizados utilizando um número restrito de amostras (máximo de 8), poucos são os dados disponíveis para leite processado e quando existem, não relacionam os teores do ácido láctico entre matéria-prima e produto final, dificultando a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

Considerando a concentração intrínseca do ácido láctico no leite *in natura* utilizado no processamento do leite UHT, e a estabilidade de seus teores em condições adequadas de armazenamento, valores tão distintos entre os dois tipos de leite não eram esperados. Assim, teores de ácido láctico muito superiores a 30 mg/L só podem ser explicados pela ocorrência de condições inadequadas de

armazenamento da matéria-prima na indústria antes do processamento e consequente desenvolvimento microbiano. Tal constatação enfatiza a importância não só da determinação do lactato como ferramenta para o monitoramento da qualidade do leite, como também da necessidade de se estabelecer valores de referência que auxiliem na tomada de decisão, tanto para controle de qualidade do processo, como em atividades de fiscalização.

Em investigação sobre a deterioração do leite por bactérias comumente encontradas e isoladas em leite UHT, ficou comprovado que os teores de lactato aumentam significativamente ao longo do tempo, mesmo sem variação perceptiva do pH do leite (SKALADAL *et al.*, 1993).

6.4 Conclusão

A adequação ao uso do método reflectométrico para a determinação do teor de ácido láctico em leite foi comprovada, tanto em relação ao atendimento aos parâmetros de desempenho da validação, como em correlação com o método de referência por CLAE-UV/DAD. Quando comparado ao método cromatográfico, o reflectométrico se mostrou mais simples, rápido, prático, sensível e preciso, além de gerar menos resíduos e sua utilização não se restringir ao ambiente laboratorial. A veracidade do método foi comprovada, mas ressalva-se a necessidade de se avaliar criticamente a realização da correção dos resultados para amostras diluídas a partir de 5 vezes.

O armazenamento do leite em condições de refrigeração e congelamento não afetaram significativamente os teores de ácido láctico, nas condições estudadas.

No estudo de caso sobre a concentração intrínseca do ácido láctico em leite *in natura* foi possível comprovar a ocorrência de baixos teores de ácido láctico em leite fresco e constatar elevada variabilidade entre estes e os encontrados para o leite UHT. A determinação de valores de referência para os teores de ácido láctico em leite permitirá monitorar mais efetivamente a qualidade do leite, facilitando a identificação da ocorrência de contaminações e de adulterações.

REFERÊNCIAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. George W, Latimer, J. (Ed.). Official Methods of Analysis, 19rd ed. Published by AOAC Internacional. 2012a.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**. Published by AOAC Internacional. 2012b.

BALLESTA-CLAVER, J.; VALENCIA-MIRÓN, M.C.; CAPITÁN-VALLVEY, L.F. One-shot lactate chemiluminescent biosensor. **Analytica. Chimica. Acta**, v.629, p.136-144. 2008.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. Measurement Method Comparison. **Anesthesiology**, v. 116, p. 182-185. 2012.

BORI, Z. ET AL. Determination of L-Lactic Acid Content in Foods by Enzyme- Based Amperometric Bioreactor. **Electroanalysis**, v. 24, n. 1, p. 158-164. 2012. Disponível em <doi:10.1002/elan.201100409>. Acesso em:

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite cru, leite pasteurizado e de coleta e transporte a granel de leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30/12/2011, Seção 1; 2011.

CHEN, Y. *et al.* Dual-signal analysis eliminates requirement for milk sample pretreatment. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 29, p. 115-118. 2011.

CHEN, C.M. *et al.* Development of an enzymatic assay system of d-lactate using d-lactate dehydrogenase and a UV-LED fluorescent spectrometer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 116, p. 150-155. 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. Milk and Milk Products. **World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations**. Rome, 2nd edition, 2011.

COSTA, M.P. *et al.* Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC DAD- RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. **Talanta**, v. 152, p. 162-170. 2016.

CUSTOMS UNION - CU. Technical Regulation of the Russia-Kazakhstan-Belarus Customs Union “On Safety of Milk and Dairy Products” (TR-TS 033/2013). **Council of the Eurasian Economic Commission nº 67**, October 9. 2013.

EC COMMISSION EUROPEAN. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical

methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L221, p. 8-36, 2002.

EURACHEM/CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3rd ed. Teddington: LGC; 2012.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Teddington: LGC; 2014.

FARREL, C.J.L. *et al.* State-of-the-Art Vitamin D Assays: A Comparison of Automated Immunoassays with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Methods. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 531-542. 2012.

GASPARINI, A.L.P.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, N. Correlação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.15, p. 285-289. 2007.

GATEA, F. *et al.* Capillary Electrophoresis Method Validation for Organic Acids Assessment in Probiotics. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 1335-1340. 2015.

GIAVARINA, D. Understanding Bland Altman analysis. **Biochemical Medicine**, v. 25, n. 2, p. 141-51. 2015.

HIJAZ, F.; SMITH, J.S.; KASTNER, L. Evaluation of Various Ammonia Assays for Testing of Contaminated Muscle Food Products. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. 253-257. 2007.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095-1109. 2006.

HOSTÁLKOVÁ, A.; KLINGELHÖFER, I.; MORLOCK, G.E. Comparison of an HPTLC method with the Reflectoquant assay for rapid determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 9207-9218. 2013.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. Revisão 05. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro; 2016.

JARQUE, C. M., BERA, A. K. A Test for Normality of observations and regression residuals. **International Statistical Review**, v. 55, n. 2, p. 163-172. 1987.

JOURDIL, J.F. *et al.* Ultra-fast cyclosporin a quantitation in whole blood by Laser Diode Thermal Desorption – Tandem Mass Spectrometry; comparison with High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 805, p. 80-86. 2013.

KAN, S.C. *et al.* Development of an enzymatic chromatography strip with nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium coupling reactions for quantitative L-lactate analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 471, p. 61-66. 2015.

KUMAR, B. *et al.* Rapid lactate oxidase-based assay for lactate content in milk to ascertain its hygienic quality. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 3, p. 460-467. 2016.

LIN, I-KUEI. Assay Validation Using the Concordance Correlation Coefficient. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 599-604. 1992.

MARRAZZA, G.; CAGNINI, A.; MASCINI, M. L-and D-lactate assay in real milk samples with immobilized enzyme reactors and grafite electrode. **Talanta**, v. 41, n. 6, p. 1007-1014. 1994.

MARSILI, R.T. *et al.* High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 52-57. 1981.

MERCK. Reflectoquant®. Lactic Acid Test, 1.16127.0001. Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany; 2012. Disponível em: <www.analytical-test-kits.com>. Acesso em: 12/11/2016.

MERCK. RQflex® plus 10. Operating manual. Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany; 2013. Disponível em: <www.analytical-test-kits.com>. Acesso em: 12/11/2016.

MERCK. Application. Identification of matrix effects by means of dilution. Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany; 2014.

MILAGRES, M.P. *et al.* Development and validation of the high performance liquid chromatography-ion exclusion method for detection of lactic acid in milk. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1078-1082. 2012.

MINAMI, T. *et al.* A novel OFET-based biosensor for the selective and sensitive detection of lactate levels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 45-48. 2015.

MONOSIK, R. *et al.* Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 40-53. 2012a.

MONOSIK, R. *et al.* A rapid method for determination of L-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite. **Food Control**, v. 23, p. 238-244. 2012b.

NGUYEN-BOISSE, T.T. *et al.* Highly sensitive conductometric biosensors for total lactate, d- and l-lactate determination in dairy products. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 179, p. 232- 239, 2013.

PALMISANO, F. *et al.* Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. **Analyst**, v. 126, p. 866-870, 2001.

PÉREZ-RUIZ, T. *et al.* High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 57-64. 2004.

RATHEE, K. *et al.* Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **Biochemical and Biophysical**, v. 5, p. 35-54. 2016.

RODRIGUEZ, M.A.P. *et al.* Concordance analysis between estimation methods of milk fatty acid content. **Food Chemistry**, v.156, p. 170-175. 2014.

SHAPIRO, F.; SILANIKOVE, N. Rapid and accurate determination of D- and L-lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Applications in food quality control. **Food Chemistry**, v. 119, p. 829-833. 2010.

SKLADAL, P. *et al.* Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 508-512. 1993.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G.; GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) in-house method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 151-158. 2005.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytical Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35. 2005.

SOUZA, S.V.C.; PINTO, C.T.; JUNQUEIRA, R.G. In-house method validation: Application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 241-247. 2007.

SOWMYA, R. *et al.* Detection of calcium based neutralizers in milk and milk products by AAS. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 2, p. 1188-1193. 2013.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TORMO, M.; IZCO, J.M. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, p. 305-310. 2004.

TORRIERO, A.A.J. *et al.* Milk lactate determination with a rotating bioreactor based on an electron transfer mediated by osmium complexes incorporating a continuous flow/stopped-flow system. **Analytical Chimica Acta**, v. 498, p. 155-163. 2003.

VARGAS, E. *et al.* Implementation of a new integrated D-lactic acid biosensor in a semiautomatic FIA system for the simultaneous determination of lactic acid enantiomers. Application to the analysis of beer samples. **Talanta**, v. 152, p. 147-154. 2016.

VÉNICA, C.I.; PEROTTI, M.C.; BERGAMINI, C.V. Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p. 561-580. 2014.

ZAYDAN, R.; DION, M.; BOUJTITA, M. Development of a new method, based on a bioreactor coupled with an L-lactate biosensor, toward the determination of a nonspecific inhibition of L-lactic acid production during milk fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8-14. 2004.

7 CONCLUSÕES INTEGRADAS

Os métodos oficiais para determinação da adulteração do leite por adição de substâncias alcalinas não apresentaram desempenho satisfatório para o leite fluido, sobretudo em relação aos parâmetros de sensibilidade e seletividade.

Os métodos cromatográfico e reflectométrico se mostraram adequados na determinação do ácido láctico em leite, sendo possível quantificar também os ácidos cítrico e orótico pelo método cromatográfico.

Na determinação do ácido láctico, os dois métodos estudados apresentaram boa correlação. No entanto, o método reflectométrico se destacou em relação à sensibilidade, praticidade e rapidez.

A avaliação das alterações nos teores dos ácidos láctico, cítrico e orótico no leite durante a acidificação controlada permitiu entender o comportamento destes ácidos na ocorrência do processo fermentativo e evidenciar a possibilidade de utilização dos mesmos como indicadores da qualidade do leite, visto à estabilidade observada para os ácidos cítrico e orótico e o aumento dos teores de ácido láctico em função do desenvolvimento microbiano. Foi possível também conhecer a ocorrência dos ácidos láctico, orótico e cítrico e da acidez titulável em leite UHT brasileiro, sendo verificada maior variabilidade para ácido láctico.

O armazenamento do leite em condições de refrigeração e congelamento não afetou significativamente os teores de ácido láctico no leite, comprovando que alterações significativas nos teores de ácido láctico durante o transporte adequado do leite entre a propriedade rural até o processamento não são esperadas.

Foi comprovado que tanto no leite UHT como no leite *in natura*, a acidez titulável não é um parâmetro adequado para avaliar a qualidade do leite e que esta não apresenta relação direta com os teores de ácido láctico, sobretudo na ocorrência de adulterações.

Foi evidenciado o potencial de aplicação dos teores de ácido láctico para o monitoramento da qualidade do leite e a necessidade de se estabelecer valores de referência.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final deste trabalho, foram visualizadas as seguintes perspectivas para estudos futuros, visando principalmente o aprofundamento sobre o uso dos teores de ácidos orgânicos como indicadores de qualidade do leite:

- Ampliar o estudo sobre a concentração intrínseca de ácido láctico no leite para outras regiões do Brasil para estabelecer a faixa aceitável. Correlacionar a concentração do ácido láctico com outros parâmetros de qualidade vigentes, como os microbiológicos.
- Estudar as alterações do teor de ácido láctico durante o processamento e vida de prateleira de leite pasteurizado e UHT.
- Estudar o desenvolvimento de biossensores práticos e baratos para a determinação de lactato em leite para serem utilizados em campo;
- Aprofundar o estudo de aplicação do ácido cítrico e orótico como indicadores de qualidade do leite. O conteúdo de ácido cítrico poderia ser monitorado para avaliação da adulteração do leite e de produtos lácteos por adição de citratos em produtos não permitidos. Já o ácido orótico pode ser auxiliar na detecção da fraude por alteração do teor de proteínas.
- Estudar a interferência da adição de conservantes amostras de leite na quantificação do teor de ácido láctico e estabilidade, visando transporte de amostras para análise.
- Aprofundar os estudos sobre metodologias para a comparação de métodos analíticos quantitativos e o uso dessas ferramentas para validação simplificada.

REFERÊNCIAS

Introdução e Revisão de literatura

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025: **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005, 31p.

AFZAL, A., *et al.* Adulteration and microbiological quality of milk. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.10, p. 1195-1202, 2011.

AGÊNCIA BRASIL. **Ações de combate à irregularidade no leite serão intensificadas em todo País**. 09/05/2013. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/05/acoes-de-combate-a-irregularidade-no-leite-serao-intensificadas-em-todo-pais>. Acesso em: 10/12/2016.

AHIRWAR, R., *et al.* Quality changes in milk adulterated with detergent, urea, ammonium sulphate and neutralizers. **Asian Journal Dairy & Food Research**, v. 34, n. 4, p. 285-289, 2015.

AHMAD, S. A., *et al.* Quantitation and Risk Assessment of Chemical Adulterants in Milk Using UHPLC Coupled to Photodiode Array and Differential Refractive Index Detectors. **Food Analytical Methods**. v.9, n. 12, p. 3367–3376, 2016.

AHMED, A. A., PORTER, G. A., McCARTHY, R. D. Isolation, Quantification, and Biosynthetic Origin of Orotic Acid in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 39-43. 1978.

AHMED, M., *et al.* Optimization and Validation Procedure for Elemental Composition of Fresh and Pasteurized Milk in Pakistan Employing Microwave Digestion Followed by ICP-OES: a Contribution to Risk Assessment. **Food Analytical Methods**. v.9, p. 2933-2942, 2016.

ANASTASI, G. *et al.* Orotic acid: a milk constituent enzymatic determination by means of a new microcalorimetric method. **Talanta**, v. 52, p. 947–952. 2000.

ANDIÇ, S., TUNÇTÜRK, Y., GENÇCELEP, H. The effect of different packaging methods on the formation of biogenic amines and organic acids in Kashar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1668-1678. 2011.

ANDRÉS, V.; TENORIO, M.D.; VILLANUEVA, M.J. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1100–1106. 2015.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 941.07. Alkalinity of Ash of Dry Skim Milk. Titrimetric Method. **AOAC Official Methods of Analysis**. 1941.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. George W, Latimer, J. (Ed.). **Official Methods of Analysis**, 19rd ed. Published by AOAC Internacional. 2012a.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**. Published by AOAC Internacional. 2012b.

AWAN, A., *et al.* A study on chemical composition and detection of chemical adulteration in tetra pack milk samples commercially available in Multan. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 27, p. 183-186, 2014.

AZIZ, T., KHAN, H. A. Survey on milk adulteration at retail outlets of islamabad, pakistan. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**. v. 6, n. 2, p. 44-52, 2014.

BALLESTA-CLAVER, J.; VALENCIA-MIRÓN, M.C.; CAPITÁN-VALLVEY, L.F. One-shot lactate chemiluminescent biosensor. **Analytica. Chimica. Acta**, v.629, p.136-144. 2008.

BANSAL, S., *et al.* Food Adulteration: Sources, Health Risks and Detection Methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Disponível em: <Doi: 10.1080/10408398.2014.967834>. Jun 9:0. [Epub ahead of print]. 2015. Acesso em: 03/12/2016.

BARHAM, G. S., *et al.* Extent of extraneous water and detection of various adulterants in market milk at Mirpurkhas, Pakistan. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 83 - 89. 2014.

BARHAM, G. S., *et al.* Adulterated Milk Used for Consumption in Thatta District of Sindh, Pakistan. **American Journal of Agricultural Science**, v. 2, n 3. p. 91-96. 2015.

BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4th revised and extended edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009.

BELO, R. F. C., *et al.* Evaluating Matrix Effects in the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Food: Can These Interferences Be Neglected for Isotope Dilution?. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 1488–1499, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-016-0706-0>>. Acesso em: 16/12/2016.

BENSMIRA, M., JIANG, B. Organic Acids Formation During the Production of a Novel Peanut-Milk Kefir Beverage. **British Journal of Dairy Sciences**, v. 2, n. 1, p. 18-22, 2011.

BEVILACQUA, A. E., CALIFANO, A. N. Determination of Organic Acids in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 1076-1079. 1989.

BORI, Z., *et al.* Determination of L-Lactic Acid Content in Foods by Enzyme- Based Amperometric Bioreactor. **Electroanalysis**, v. 24, n. 1, p.158-164. 2012.

BOTELHO, B.G. *et al.* Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31–37. 2015.

BOUTEILLE, R. *et al.* Monitoring lactic acid production during milk fermentation by in situ quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2071–2080. 2013.

BOUMPA, T., *et al.* Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goats' milk. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 160-166, 2008. Disponível em: < doi:10.1017/S0022029908003166 >. Acesso em: 06/12/2015.

BRASIL. Decreto-Lei n. 30691, de 29 de março de 1952. Aprova novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, de 07 de julho de 1952.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União**. 21/10/1969.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório de Defesa Animal. PORTARIA Nº 1, DE 07 DE OUTUBRO DE 1981. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. **Diário Oficial da União** de 13/10/1981, Seção 1, Página 19381, 1981.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 12/09/1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Doce de leite. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 08/09/1997a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite UHT (UAT). **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 08/09/1997b.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 9677, de 2 de julho de 1998. Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 03/07/1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14/12/2006, Seção 1, Página 8, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite cru, leite pasteurizado e de coleta e transporte a granel de leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30/12/2011, Seção 1; 2011.

CALIFANO, A. N., BEVILACQUA, A. E. Multivariate Analysis of the Organic Acids Content of Gouda type Cheese during Ripening. **Journal of food composition and analysis**, v. 13, p. 949-960, 2000.

CASSOLI, L. D., SARTORI, B., MACHADO, P. F. The use of the Fourier Transform Infrared spectroscopy to determine adulterants in raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.11, p. 2591-2596. 2011.

CATALDI, T.R.I. *et al.* A. Pulsed electrochemical detection of orotic acid by an activated potential waveform at a gold working electrode following anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1107, p. 130–138. 2006.

CHANDA, T., *et al.* Adulteration of raw milk in the rural areas of Barisal district of Bangladesh. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 112-115. 2012.

CHEN, C.M. *et al.* Development of an enzymatic assay system of d-lactate using d-lactate dehydrogenase and a UV-LED fluorescent spectrometer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 116, p. 150-155. 2015.

CHINA. The National Standard of People's Republic of China, GB 25190-2010. National food safety standard: Sterilized Milk. **Ministry of Health of the People's Republic of China**. 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. Milk and Milk Products. **World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations**. Rome, 2nd edition, 2011.

CORDELLA, C. *et al.* Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1751-1764, 2002.

CUSTOMS UNION - CU. Technical Regulation of the Russia-Kazakhstan-Belarus Customs Union "On Safety of Milk and Dairy Products" (TR-TS 033/2013). **Council of the Eurasian Economic Commission nº 67**, October 9. 2013.

COUNOTTE, G. H. M. Determination of orotate in ruminant milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 276, p. 423-426. 1983.

DAS, S. *et al.* Performance study of a 'constant phase angle based' impedance sensor to detect milk adulteration. **Sensors and Actuators A**, v. 167, 273-278. 2011.

DEBNATH, A., *et al.* Qualitative detection of adulterants in milk samples from Kolkata and its suburban areas. **IMPACT: International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences**, v. 3, n 8, p. 81-88. 2015.

DIÁRIO CATARINENSE. **Três empresas de SC são investigadas na Operação Lactose**. 15/05/2008. Disponível em: <<http://dc.clicrbs.com.br/sc/noticias/noticia/2008/05/tres-empresas-de-sc-sao-investigadas-na-operacao-lactose-1863327.html>>. Acesso em: 01/12/2016.

DUCHÁCEK, J. *et al.* The relationship between fatty acid and citric acid concentrations in milk from Holstein cows during the period of negative energy balance. **Journal of Central European Agriculture**, v. 13, n. 4, p. 615-630. 2012.

DURANTE, G., *et al.* Electrical Impedance Sensor for Real-Time Detection of Bovine Milk Adulteration. **IEEE Sensors Journal**, v. 16, n. 4, p. 861-865. 2016.

EC COMMISSION EUROPEAN. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, L221, p. 8-36, 2002.

ELLIS, D. I. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 5706–5727, 2012.

EURACHEM/CITAC Guide CG 4. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3rd ed. Teddington: LGC; 2012.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. 2nd ed. Teddington: LGC, 2014.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. MUEHLHOFF, E., BENNETT, A., McMAHON, D. (Editors). **Milk and dairy products in a human nutrition**. 404p. Rome, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>>. Acesso em: 22/02/2016.

FAOSTAT. **FAOSTAT. 2016**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>>. Acesso em: 16 set. 2016.

FAULKNER, A., PEAKER, M. Reviews of the progress of Dairy Science: Secretion of citrate into milk. **Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 159-169. 1982.

FDA – Food and Drug Administration. **Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program**. 2nd Edition, US Food & Drug Administration Office of Foods and Veterinary Medicine. 2015.

FIL-IDF **International Dairy Federation**. The Economic Importance of Dairying. IDF Factsheet – February 2013. 5p.

FINETE, V.L.M., *et al.* Validation of a method of high performance liquid chromatography with fluorescence detection for melamine determination in UHT whole bovine milk. **Food Control**. v. 51, p. 402-407, 2015.

FIRMINO, F. C., *et al.* Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. Set/Out, n. 376, p. 5-11, 2010.

FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Published by Blackie Academic & Professional an imprint of Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London SE1 SHN, UK. First edition, 1998.

G1. **MP deflagra nova fase da Operação Leite Compensado na Serra do RS**. 17/09/2015. 2015a. Disponível em: < <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2015/09/mp-deflagra-nova-fase-da-operacao-leite-compensado-na-serra-do-rs.html>>. Acesso em: 12/12/2016.

G1. **PF investiga empresas por urina, soda cáustica e água oxigenada em leite**. 04/12/2015. 2015b. Disponível em: <<http://g1.globo.com/pe/caruaru/regiao/noticia/2015/12/pf-faz-buscas-em-empresas-suspeitas-de-adulterar-leite-no-agreste-de-pe.html>>. Acesso em: 11/09/2016.

GARDE, S. *et al.* Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. **International Dairy Journal**, v. 25, p. 87-91. 2012.

GARNSWORTHY, P. C. *et al.* Variation of Milk Citrate with Stage of Lactation and De Novo Fatty Acid Synthesis in Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 1604–1612. 2006.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 473-483. 2005.

GOMEZ-ALVAREZ, E. *et al.* Flow injection spectrophotometric determination of lactic acid in skimmed milk based on a photochemical reaction. **Talanta**, v. 50, p. 121-131, 1999.

GONDIM, C. S., JUNQUEIRA, R.G., SOUZA, S.V.C. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p.433-47, 2011. Disponível em: < <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32498/31329>>. Acesso em: 16/11/2016.

GONDIM, C. S., *et al.* An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 830, p. 11-22, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856507> >. Acesso em: 15/08/2015.

GONDIM, Carina de Souza. **Métodos qualitativos para detecção de adulterantes em leite cru: validação intra e interlaboratorial**. 2016. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2016.

GONZÁLEZ, A. G., HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3. 2007.

HALLANGER, L. E., LAAKSO, J. W., SCHULTZE, M. O. Orotic acid in milk. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 202, p. 83-89, 1953.

HANDFORD, C. E., CAMPBELL, K., ELLIOTT, C. T. Impacts of Milk Fraud on Food Safety and Nutrition with Special Emphasis on Developing Countries. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.15, p. 130-142. 2016.

HAUG, A., HOSTMARK, A. T., HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition: a review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, n. 25, p. 1-16. 2007.

HARDING, F. Adulteration of milk, **Milk Quality: Food Science Book**, in: F. Harding (Ed.), Chapman and Hall, New York, 1999.

HORWITZ W., ALBERT R. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p.1095-1109, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2015**, v. 43, p.1-49, Rio de Janeiro, 2015.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. Revisão 05. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro; 2016.

INDIA. **Bureau of Indian Standards (BIS)**. Methods of Tests for Dairy Industry, Part 1, Rapid Examination of Milk, IS: 1479 (Part 1) – 1960 (Reaffirmed – 2003), 1.4 edn. New Delhi, India. 1960.

INDIA. Manual of methods of analysis of foods. **Milk and milk products**. Food safety and standards authority of India Ministry of health and family welfare Government of India. New Delhi, 2012.

INDIA. Food Safety and Standards Authority of India. Ministry of Health and Family Welfare of India. **Manual of Methods of Analysis of Foods - Milk and milk products**. New Delphi, 2015. 191 p.

INDYK, H. E.; WOOLLARD, D.C. Determination of Orotic Acid, Uric Acid, and Creatinine in Milk by Liquid Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 1, p. 116–122. 2004.

INDUMATHI, J., OBULA, R. B. Quality evaluation of milk samples collected from different intermediaries at the vicinity of Chittoor district, Andhrapradesh, India. **International Journal of Current Advanced Research**, v. 4, n. 10, p. 436-440, 2015.

JCGM. Joint Committee for Guides in Metrology. **JCGM 100:2008**. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. First edition. 2008.

JENNESS, R., PATTON, S. **Principles of Dairy Chemistry**, Chapman & Hall Limited, by John Wiley & Sons, Inc. 1959.

JOHNSON, R. Specialist in Agricultural Policy. “Food Fraud and Economically Motivated Adulteration” of Food and Food Ingredients. **Congressional Research Service**. January, 2014.

KANDPAL, S. D., SRIVASTAVA, A. K., NEGI, K. S. Estimation of quality of raw milk (open & branded) by milk adulteration testing kit. **Indian Journal of Community Health**, v. 24, n. 24, p. 188-192, 2012.

KALIAPPAN, S.; LUCEY, J. A. Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v.94, n. 9, p. 4255–4263, 2011.

KALIVAS, J. H., *et al.* Food adulteration analysis without laboratory prepared or determined reference food adulterant values. **Food Chemistry**, v. 148, p. 289-293, 2014.

KAMINARIDES, S., STAMOU, P., MASSOURAS, T. Comparison of the characteristics of set type yoghurt made from ovine milk of different fat content. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1019-1028. 2007.

KAN, S.C. *et al.* Development of an enzymatic chromatography strip with nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium coupling reactions for quantitative L-lactate analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 471, p. 61-66. 2015.

KARTHEEK, *et al.* Determination of Adulterants in Food: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n. 2, p.629-636. 2011.

KHOSRAVI, F., *et al.* Determination of Organic Acids in Fruit juices by UPLC. **International Journal of Life Sciences**, v. 9, n. 5, p. 41-44, 2015.

KILIÇ, S., YENISOY-KARAKAS, S., KILIÇ, M. Metal Contamination in Fruit Juices in Turkey: Method Validation and Uncertainty Budget. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 2487–2495. 2015.

KUMAR, A. *et al.* Method development and validation: Skills and tricks. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, n. 1, p. 3-11. 2012.

KUMAR, A., *et al.* A Study on status of milk adulterants using in milk of district Varanasi. **South Asian Journal of Food Technology and Environment**, v.1, n. 2, p. 140-143, 2015.

KUMAR, B., *et al.* Rapid lactate oxidase-based assay for lactate content in milk to ascertain its hygienic quality. **International Journal of Dairy Thecnology**. v. 69, n. 3, p. 460–467. 2016.

LEJEUNE, J. T., RAJALA-SCHULTZ, P. J. Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. **Food Safety**, v. 48, n. 1, p. 93-100.

LIGOR, M. *et al.* Determination of volatile and non-volatile products of milk fermentation processes using capillary zone electrophoresis and solid phase microextraction coupled to gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2707–2713. 2008.

LÖFFLER, M.; CARREY, E. A.; ZAMEITAT, E. Orotic Acid, more than just an intermediate of Pyrimidine synthesis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 42, p. 207-219. 2015.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1458-1465. 2013.

MANSOUR, A. I. A., EL-LOLY, M. M., AHMED, R. O. A Preliminary Detection of Physical and Chemical Properties, Inhibitory Substances and Preservatives in raw milk. **Internet Journal of Food Safety**, v. 14, p. 93-103, 2012.

MARIER, J. R., BOULET, M. Direct Determination of Citric Acid in Milk with an Improved Pyridine-Acetic Anhydride Method. **Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 12, p. 1683-1692, 1958.

McCARTHY, O.J.; SINGH, H. Lactose. Water, Salts and Minor Constituents. Physico-chemical Properties of Milk, Chapter 15. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 3, p. 691-758. 2009.

MARRAZZA, G.; CAGNINI, A.; MASCINI, M. L-and D-lactate assay in real milk samples with immobilized enzyme reactors and grafite electrode. **Talanta**, v. 41, n. 6, p. 1007-1014. 1994.

MARSILI, R.T. *et al.* High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 52–57. 1981.

MARTINS, Cid. **MP deflagra a 11ª Operação Leite Compensado e a 4ª Operação Queijo Compensado no RS.** 05/07/2016. Disponível em:< <http://wp.clicrbs.com.br/casodepolicia/2016/07/05/mp-deflagra-a-11a-operacao-leite-compensado-e-a-4a-operacao-queijo-compensado-no-rs/?topo=52,1,1,,171,e171>>. Acesso em: 13/12/2016.

MILAGRES, M. P., *et al.* Development and validation of the high performance liquid chromatography-ion exclusion method for detection of lactic acid in milk. **Food Chemistry**. v. 135, p. 1078-1082. 2012.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. **Código de Saúde do Estado de Minas Gerais.** Lei 13.317 de 24 de setembro de 1.999.

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.

MOURAD, G., BETTACHE, G., SAMIR, M. Composition and nutritional value of raw milk. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 10, p. 115-122. 2014.

MULLIN, W. J., EMMONS, D. B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 30, n. 2, pp. 147-151. 1997.

MURTAZA, M.A. *et al.* Organic acid contents of buffalo milk cheddar cheese as influenced by accelerated ripening and sodium salt. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, p. 99–106. 2012.

NADA, S. *et al.* Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, n. 25, p. 728-731. 2012.

NAVALE, D., GUPTA, S. Detection of an Adulteration Present in Milk and Milk Products. **International Journal of Latest Technology in Engineering, Management & Applied Science (IJLTEMAS)**, v. 5, n. 6, p. 71-74. 2016.

NOLLET, L. M. L., TOLDRÁ, F. (editors). **Handbook of Dairy Foods Analysis.** Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742. Flórida, USA. 2010.

ONTSOUKA, C. E., BRUCKMAIER, R. M., BLUM, J. W. Fractionized Milk Composition During Removal of Colostrum and Mature Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2005-2011. 2003.

OZCAN-YILSAY, T. *et al.* Effect of trisodium citrate on rheological and physical properties and microstructure of yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.4, p.1644–1652, 2007.

PALA, K. H. M. *et al.* Detection of adulteration, physico – chemical properties, chemical composition and hygienic status of milk in Shillong, India. **Keanean Journal of Science**, v. 4, p. 9-14. 2015.

PALMISANO, F. *et al.* Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. **Analyst**, v. 126, p. 866-870. 2001.

PARK, Y.W., HAENLEIN, J.F.W (Editors). **Milk and Dairy Products in Human Nutrition - Production, Composition and Health**. A John Wiley & Sons, Ltda Publication. Pondicherry, India. 2013.

PEREIRA, P.C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**. v. 30, p. 619-627, 2014.

PÉREZ-RUIZ, T. *et al.* High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 57-64. 2004.

PETRARCA, M. H., ROSSI, E. A., SYLOS, C. M. In-house method validation, estimating measurement uncertainty and the occurrence of fumonisin B1 in samples of Brazilian commercial rice. **Food Control**, v. 59, p. 439-446. 2016.

PISSINATTI, R., *et al.* Simultaneous analysis of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: Optimization, in-house method validation and application to an exploratory study. **Food Control**, n. 51, p. 140-148, 2015.

PRAKASH, S. *et al.* Reducing fouling during UHT treatment of goat's milk. **Milchwissenschaft**, v. 62, n.1, p. 16-19, 2007.

QUIGLEY L., *et al.* Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 81-94, 2011.

QUIGLEY L., *et al.* The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 664-698, 2013.

RAKITA, S., *et al.* Determination of free sulphhydryl groups in wheat gluten under the influence of different time and temperature of incubation: Method validation. **Food Chemistry**, v.150, p. 166–173. 2014.

RAMYA, P., *et al.* Detection of adulterants in retail milk samples procured in proddatur town, ysr Kadapa (dt), Andhra Pradesh. **International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, v. 3, n. 1, p. 104-109. 2015.

RATHEE, K. *et al.* Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **Biochemical and Biophysical**, v. 5, p. 35-54. 2016.

REZENDE, P. S., CARMO, G. P., ESTEVES, E. G. Optimization and validation of a method for the determination of the refractive index of milk serum based on the reaction between milk and copper(II) sulfate to detect milk dilutions. **Talanta**, v. 138, p. 196-202. 2015.

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, nº 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, Emanuela Karla Ferreira Ribeiro. Alterações nas propriedades físico-químicas do leite esterilizado adicionado de estabilizantes durante a estocagem. 2012. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)** - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2012.

SALERNO, C., CRIFÓ, C. Diagnostic value of urinary orotic acid levels: applicable separation methods. **Journal of Chromatography B**, v. 781, p. 57–71. 2002.

SHAPIRO, F., SILANIKOVE, N. Rapid and accurate determination of D- and L-lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Applications in food quality control. **Food Chemistry**, v. 119, p. 829-833. 2010.

SHAPIRO, F., SILANIKOVE, N. Rapid and accurate determination of malate, citrate, pyruvate and oxaloacetate by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Application in colorful juices and fermentable food (yogurt, wine) analysis. **Food Chemistry**, v. 129, p. 608-613. 2011.

SINGH, P., GANDHI, N. Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. **Food Reviews International**, v. 31, n. 3, p. 236-261, 2015. Disponível em: <DOI: 10.1080/87559129.2014.994818>. Acesso em: 15/08/2016.

SINGULURI, H., SUKUMARAN, M. K. Milk Adulteration in Hyderabad, India – A Comparative Study on the Levels of Different Adulterants Present in Milk. **Journal Chromatography Separation Techniques**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2014. Disponível em: <doi:10.4172/2157-7064.1000212>. Acesso em: 23/11/2015.

SILVA, L.C.C., *et al.* Preservatives and neutralizing substances in milk: analytical sensitivity of official specific and nonspecific tests, microbial inhibition effect, and residue persistence in milk. **Ciência Rural**, v.45, n.9, p.1613-1618, 2015.

SKLADAL, P. *et al.* Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 508-512. 1993.

SOARES, A. A., *et al.* In-house method validation and occurrence of alpha-, beta-endosulfan, endosulfan sulphate, lambda-cyhalothrin, procymidone and trifluralin residues in strawberry. **Food Science and Technology**, v. 33, n.4, p. 765-775. 2013.

SOUZA, *et al.* Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 124, p. 692-695. 2011.

SOUZA, Scheilla Vittorino Carvalho. **Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análise de Alimentos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35. 2005.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G.; GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) In-house method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 151–158. 2005.

SOWMYA, R., *et al.* Detection of calcium based neutralizers in milk and milk products by AAS. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 1188-93, 2013.

SRIVASTAVA, S. Food adulteration affecting the nutrition and health of human beings. **Journal of Biological Sciences and Medicine**, v.1, n.1, p. 65-70, 2015.

SUNDEKILDE, U.K. *et al.* Association between the bovine milk metabolome and rennet-induced coagulation properties of milk. **Journal Dairy Science**, v. 97, p. 6076-6084. 2014.

SWATHI, J. K., KAUSER, N. A study on adulteration of milk and milk products from local vendors. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 6, n.09, p. 678-681, 2015.

SWETHA, C. S., SUKUMAR, B., SUDHANTHIRAKODI, S. The Study on Detection of Adulteration in Milk Samples Supplied by Local Vendors in Tirupathi Region, India. **Shanlax International Journal Of Veterinary Science**. V 2, n 2. 2014. p. 4 - 11.

TÄHKÄPÄÄ, S. *et al.* Patterns of food frauds and adulterations reported in the EU rapid alert system for food and feed and in Finland. **Food Control**, n. 47, p.175-184. 2015.

TAMANINI, Ronaldo. **Controle de qualidade de leite UHT**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

TANGRI, R., CHATLI, A. S. Microbial quality and chemical adulterants evaluation in the raw and pasteurized milk. **Asian Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 11, p. 716-721, 2014.

TAYLOR, K. A. C. C. A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, p. 49-58. 1996.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TORMO, M; IZCO, J.M. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, p. 305-310. 2004.

TORRIERO, A.A.J. *et al.* Milk lactate determination with a rotating bioreactor based on an electron transfer mediated by osmium complexes incorporating a continuous-flow/stopped-flow system. **Analytica Chimica Acta**, v. 498, p. 155-163. 2003.

TSIOULPAS, A. *et al.* Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1027-1034, 2010.

USDA – United States Department of Agriculture. **Dairy, Milk, Fluid Domestic Consumption by Country in 1000 MT**. Disponível em: < <http://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=milk&graph=domestic-consumption>>. Acesso em: 14/12/2016.

ULLAH, S., *et al.* Physico-chemical, Microbiological Parameters and Adulteration in Processed Dairy Products in Pakistan. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, v. 25, n. 1, p. 100-112. 2016.

VÉNICA, C. I., PEROTTI, M. C., BERGAMINI, C. V. Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p.561-580. 2014.

VIM - **Vocabulário Internacional de Metrologia**. Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Título original em inglês: International Vocabulary of Metrology Basic and general concepts and associated terms - JCGM 200:2012 Inmetro, Rio de Janeiro, Edição Luso-Brasileira. 2012.

WALSTRA, P., WOUTERS, J. T. M., GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Second Edition, by Taylor & Francis Group, LLC. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300. 2006. DOI 10.1007/978-3-540-69934-7.

WANDERLEY, C.H., *et al.* Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido. **Revista Ciências da Vida**, v. 32, n. 2, p.34-42, 2012.

WASUPALLI, G. K., SAI, K. C., KAUR, S. Detection of Adulterants and Mastitis in Milk Samples and major milk fatty acid composition estimation using gas chromatography. **International Journal of Pharma Sciences and Scientific Research**, v. 1, n. 1, p. 7-12. 2015.

WOUTERS J.T.M *et al.* Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91-109, 2002.

ZAYDAN, R.; DION, M.; BOUJTITA, M. Development of a new method, based on a bioreactor coupled with an L-lactate biosensor, toward the determination of a nonspecific inhibition of L-lactic acid production during milk fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8-14. 2004.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of Organic Acids, Sugars, Diacetyl, and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2722–2726. 2001.

APÊNDICE

Tabela 1. Caracterização físico-química de todas as bateladas de coleta de leite *in natura*, na Fazenda Experimental Professor Hélio Babosa – escola de Veterinária/UFMG em Igarapé - MG, utilizadas nos experimentos.

Leite <i>in natura</i> (mês/ano)	Parâmetros Físico-Químicos								
	Aspecto	Cor	Odor	Densidade (g/mL)	Lipídeos (%)	EST (%)	ESD (%)	Acidez (%)	Crioscopia (°H)
07/2013	Líquido	Branca	Característico	1,030	4,0	12,6	8,6	0,16	-0,552
07/2013	Líquido	Branca	Característico	1,031	3,8	12,6	8,8	0,16	-0,546
08/2013	Líquido	Branca	Característico	1,031	4,0	12,7	8,8	0,16	-0,544
09/2013	Líquido	Branca	Característico	1,031	3,8	12,5	8,7	0,16	-0,547
09/2013	Líquido	Branca	Característico	1,031	4,2	13,0	8,8	0,16	-0,541
10/2013	Líquido	Branca	Característico	1,032	3,6	12,7	9,1	0,17	-0,548
01/2014	Líquido	Branca	Característico	1,031	4,0	12,8	8,8	0,16	-0,542
12/2014	Líquido	Branca	Característico	1,031	3,0	11,5	8,5	0,15	-0,535
05/2015	Líquido	Branca	Característico	1,032	3,6	12,5	8,9	0,15	-0,541
06/2015	Líquido	Branca	Característico	1,033	3,8	13,0	9,3	0,16	-0,550
08/2015	Líquido	Branca	Característico	1,031	3,9	12,6	8,7	0,16	-0,547
09/2016	Líquido	Branca	Característico	1,033	3,4	12,6	9,2	0,17	-0,547
Média	-	-	-	1,031	3,8	12,6	8,8	0,16	-0,545
Desvio padrão	-	-	-	0,001	0,315	0,419	0,219	0,005	0,005
CV (%)	-	-	-	0,07	8,4	3,3	2,5	3,2	0,9
Referência (BRASIL, 2011)	Líquido	Branca	Característico	1,028 a 1,034	≥ 3,0	ND	≥ 8,4	0,14 a 0,18	- 0,530 a - 0,550

EST: extrato seco total; ESD: extrato seco desengordurado; CV: coeficiente de variação; ND: não determinado.

Capítulo 1

Tabela 2. Resultados positivos obtidos na avaliação dos métodos qualitativos para pesquisa de neutralizantes da acidez em leite, utilizados para a determinação das taxas, do limite de detecção, da região de perda de confiabilidade, da acordância e da concordância (n = 30 para cada nível de concentração).

Analito (g/100 mL)	Método qualitativo									
	Ácido rosólico					Fenolftaleína				
	BA 1	BA 2	BA 3	TP	% Positivos	BA 1	BA 2	BA 3	TP	% Positivos
<i>Hidróxido de sódio</i>										
0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,002	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,005	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,010	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,015	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,030	5	0	5	10	33,3	0	0	0	0	0,0
0,050	10	10	10	30	100,0	0	1	0	1	3,3
<i>Bicarbonato de sódio</i>										
0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,005	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,010	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,020	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,060	0	0	0	0	0,0	0	3	4	7	23,3
0,150	8	10	5	23	76,7	4	10	10	24	80,0
0,300	10	10	10	30	100,0	10	10	10	30	100,0
<i>Carbonato de sódio</i>										
0,0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0,0
0,005	0	0	0	0	0,0	0	0	1	1	3,3
0,015	0	0	0	0	0,0	0	0	1	1	3,3
0,025	0	0	0	0	0,0	0	0	1	1	3,3
0,040	0	0	0	0	0,0	0	1	2	3	10,0
0,050	0	0	0	0	0,0	3	3	1	7	23,3
0,060	3	0	5	8	26,7	0	2	3	5	16,7
0,080	9	9	10	28	93,3	10	9	7	26	86,7

BA: bateria analítica (1, 2 ou 3); TP: total de resultados positivos.

Tabela 3. Acordância e concordância estimadas na detecção de neutralizantes da acidez, pelos métodos do ácido rosólico e da fenolftaleína (n = 30 para cada nível de concentração).

Analito (g/100 mL)	Ácido rosólico				Fenolftaleína			
	ACO			CON	ACO			CON
	BA 1	BA 2	BA 3		BA 1	BA 2	BA 3	
<i>Hidróxido de sódio</i>								
0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,002	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,005	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,010	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,015	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,030	0,4	1,0	0,4	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
0,050	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	1,0	0,9
<i>Bicarbonato de sódio</i>								
0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,005	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,010	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,020	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,060	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,6
0,150	0,6	1,0	0,4	0,6	0,5	1,0	1,0	0,6
0,300	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Carbonato de sódio</i>								
0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,005	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	0,9
0,015	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	0,9
0,025	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	0,9
0,040	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	0,6	0,8
0,050	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,8	0,6
0,060	0,5	1,0	0,4	0,6	1,0	0,6	0,5	0,7
0,080	0,8	0,8	1,0	0,9	1,0	0,8	0,5	0,8

BA: bateria analítica; ACO: acordância; CON: concordância.

Capítulo 2

Tabela 4. Condições analíticas estudadas na etapa de otimização do método cromatográfico para análise de ácidos orgânicos em leite fluido.

Condições avaliadas	Variáveis estudadas	Condição analítica definida
Composição da fase móvel	100% tampão fosfato	99,8% tampão fosfato + 0,2% metanol
	99,95% tampão fosfato 20 mmol/L + 0,05% metanol	
	99,9% tampão fosfato 20 mmol/L + 0,1% metanol	
	99,8% tampão fosfato 20 mmol/L + 0,2% metanol	
	99,7% tampão fosfato 20 mmol/L + 0,3% metanol	
	99,5% tampão fosfato 20 mmol/L + 0,5% metanol	
Tipo de corrida	Isocrática	Isocrática
	Linear (0,05 a 0,5% de metanol)	
Velocidade do fluxo da fase móvel	0,5; 0,7; 0,9 e 1,0 mL/min	0,7 mL/min
Comprimento de onda para detecção	Varredura entre 205 e 215 nm	210 nm
Métodos de extração da amostra	Clarificação com soluções de <i>Carrez</i>	Clarificação com soluções de <i>Carrez</i>
	Centrifugação e diluição	
	Precipitação com ácido tricloroacético, centrifugação, neutralização e nova centrifugação	
Diluição da amostra de leite	10, 25, 50 e 100 vezes	25 vezes
Alíquotas de injeção	20 e 30 µL	30 µL

Tabela 5. Valores médios para os ácidos láctico, orótico e cítrico em amostras comerciais de leite UHT, pelo método CLAE.

Amostra	Código da marca	Tipo de leite	Ácidos orgânicos (mg/L)		
			Lático	Orótico	Cítrico
1	1	Integral	40,8	80,4	2.715,8
2	1	Integral	83,0	78,8	2.910,3
3	2	Integral	119,7	76,6	2.790,2
4	2	Integral	50,6	84,8	2.637,0
5	3	Integral	164,9	78,0	2.306,4
6	3	Integral	35,5	81,7	2.095,4
7	4	Integral	37,9	80,4	2.425,3
8	4	Integral	39,0	90,6	2.421,4
9	4	Integral	27,4	78,0	2.331,6
10	1	Integral	148,6	78,0	2.514,0
11	3	Integral	< 25,0	81,3	2.598,6
12	2	Integral	159,5	74,0	2.328,4
13	1	Integral	82,1	77,8	2.287,7
14	2	Integral	153,3	78,0	2.723,1
15	4	Integral	87,5	78,5	2.349,1
16	5	Integral	100,5	69,8	1.857,2
17	2	Integral	165,9	80,4	2.904,5
18	2	Integral	110,7	80,1	2.881,0
19	1	Integral	126,7	80,6	2.644,2
20	1	Integral	214,0	78,1	2.909,2
21	3	Integral	68,8	77,4	2.434,4
22	4	Integral	48,0	74,0	2.156,9
23	3	Integral	80,3	79,9	2.458,4
24	3	Integral	57,6	81,6	2.642,2
25	6	Integral	38,9	89,3	2.596,2
26	7	Integral	39,8	87,4	2.641,9

Continua

					Continuação
27	8	Desnatado	51,3	76,6	2.794,9
28	9	Integral	37,8	92,2	2.580,0
29	10	Integral	38,2	85,6	2.443,1
30	11	Integral	32,1	87,1	2.420,6
31	12	Integral	38,4	89,2	2.481,3
32	13	Integral	32,3	86,2	2.664,7
33	14	Integral	54,4	79,3	2.308,7
34	15	Integral	122,1	81,5	2.152,2
35	16	Integral	38,7	66,4	2.122,2
36	17	Integral	68,7	76,8	2.249,9
37	18	Integral	36,3	82,2	2.565,9
38	19	Integral	34,9	87,2	2.578,7
39	20	Integral	94,4	78,6	2.137,2
40	21	Integral	75,3	86,3	2.291,3
41	22	Integral	61,1	98,2	2.666,0
42	23	Integral	56,5	76,9	2.199,3
43	4	Integral	61,8	102,8	2.383,6
44	24	Integral	35,6	98,4	2.580,4
45	25	Integral	58,6	93,9	2.602,1
46	26	Integral	108,2	92,5	2.409,3
47	27	Semidesnatado	42,3	96,9	3.152,7
48	28	Integral	45,8	87,6	2.513,6
49	29	Integral	64,6	88,7	2.366,1
50	18	Integral	51,5	90,7	2.683,0
51	30	Integral	45,0	89,9	2.449,3
52	31	Semidesnatado	63,0	102,7	2.493,6
53	32	Integral	61,4	94,2	2.583,8
54	33	Desnatado	61,0	86,4	2.771,4

Tabela 6. Valores médios para os ácidos láctico, orótico e cítrico analisados por CLAE, em leite *in natura* submetido à fermentação controlada a 37 ± 1 °C por até 9 horas.

Tempo (horas)	Ácidos orgânicos (mg/L)			Acidez titulável (g/100 mL)
	Lático	Orótico	Cítrico	
0	12,5*	82,9	2.157,6	0,15
2	27,2	83,1	2.197,5	0,15
4	28,7	83,1	2.162,1	0,15
6	36,2	81,3	2.103,5	0,16
8	186,2	76,9	2.055,7	0,19
9	574,0	76,5	2.042,7	0,24
Média	144,1	80,6	2.119,8	0,20
Desvio padrão	220,3	3,1	62,6	0,036
CV (%)	152,8	3,9	3,0	20,9

*12,5 = Limite de quantificação dividido por 2; CV = coeficiente de variação.