

SARA ARAUJO VALLADÃO

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO OFICIAL IN 68/2006
PARA ANÁLISE DE AMIDO EM IOGURTE**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2012

SARA ARAUJO VALLADÃO

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO OFICIAL IN 68/2006
PARA ANÁLISE DE AMIDO EM IOGURTE**

Dissertação 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 Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana da Motta

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2012

V176a Valladão, Sara Araujo
Avaliação do Método Oficial in 68/2006 para análise de amido em
iogurte / Sara Araujo Valladão. – 2012.
127 f. : il.

Orientadora: Dra. Silvana da Motta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos.

1. Iogurte - Rotulagem - Teses. 2. Iogurte - Validação e perdas -
teses. 3. Amido - Teses. I. Motta, Silvana da. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 637.1



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

SARA ARAUJO VALLADÃO

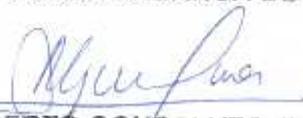
**“AVALIAÇÃO DO MÉTODO OFICIAL IN 68/2006 PARA ANÁLISE
DE AMIDO EM IOGURTE”**

APROVADA EM 27 DE MARÇO DE 2012

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. **MARIEM RODRIGUES RIBEIRO DA CUNHA**


Profa. Dra. **RENATA ADRIANA LABANCA DE ALMEIDA SANTOS**


Prof. Dr. **ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA**


Profa. Dra. **SILVANA DA MOTTA**
Orientadora e Presidente da Comissão

*Ao amado Fred pelo exemplo, apoio e
companheirismo de quem já percorreu estes
caminhos,*

*Aos meus Pais pelo amor e apoio
incondicional,*

*Às minhas irmãs Raquel e Aninha que sempre
acreditaram em mim,*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela inspiração e determinação para concluir este trabalho;

À orientadora Professora Dra. Silvana pelo acolhimento, dedicação, exemplo e paciência;

À colaboradora Professora Dra. Scheilla, pelo auxílio, incentivo e ânimo;

À Mariem, Tânia e Rita Lopes da Fundação Ezequiel Dias pelo incentivo e por proporcionarem a realização deste trabalho;

À Cláudia pelo imensurável apoio e companheirismo;

À Natalha e Jéssica, “minhas BicJr.”, pelos momentos de desafios e conquistas;

Àos meus companheiros de laboratório Cristiane, Flávio, Gizele, João, Liliane e Luciana pela atenção, amizade e momentos de intenso crescimento pessoal e profissional;

Ao Kléber pela atenção e disponibilidade;

Ao Maclênio da Indústria de Laticínios Nogueira e Rezende pelo fornecimento da amostra de amido modificado;

Aos amigos da Fundação Ezequiel Dias que sempre alegam o meu dia;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição em minha formação acadêmica e científica;

Aos Professores da graduação e amigos das iniciações científicas que me inspiraram a seguir pelos caminhos, muitas vezes tortuosos, da ciência;

Aos funcionários do PPGCA e da FAFAR pela disponibilidade e ajuda neste trabalho;

A todos os meus amigos do coração que de perto e de longe, de curta e de longa data, pela companhia, apoio, afeto, alegria constante e palavras de ânimo. Vocês são as flores do meu caminho!

À minha amada família, de sangue e de cartório, que sempre soube me incentivar, admirar e compreender;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho,

Meus sinceros agradecimentos!

*“Viver é afinar o instrumento,
de dentro pra fora e de fora pra dentro,
a toda hora e a todo momento.*

*Tudo é uma questão de manter a mente atenta, a
espinha ereta e o coração tranqüilo.”*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO GERAL.....	18
OBJETIVOS.....	20
REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1 FISCALIZAÇÃO DE ALIMENTOS E ROTULAGEM NO BRASIL.....	21
2 IOGURTE.....	25
2.1 COMPOSIÇÃO E REQUISITOS DE QUALIDADE.....	27
2.2 VALOR NUTRITIVO.....	29
2.3 PROCESSAMENTO DO IOGURTE NATURAL BATIDO.....	33
2.3.1 Matéria prima.....	33
2.3.2 Padronização.....	33
2.3.3 Homogeneização.....	34
2.3.4 Tratamento térmico.....	35
2.3.5 Fermentação e rompimento do coágulo.....	36
2.3.6 Resfriamento e acondicionamento.....	37
2.4 USO DE ESPESSANTES EM IOGURTES.....	38
3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	44
3.1 MÉTODO DE LANE-EYNON.....	44
3.2 IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS PELO TESTE DO LUGOL.....	46
4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO.....	48
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO TEOR DE GORDURA E LEVANTAMENTO DOS ESPESSANTES UTILIZADOS EM IOGURTES COMERCIAIS.....	57

RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
1 INTRODUÇÃO.....	59
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 MATERIAL.....	61
2.2 EQUIPAMENTOS.....	62
2.3 REAGENTES E PADRÕES.....	62
2.4 SOLUÇÕES.....	62
2.5 AMOSTRAGEM.....	63
2.6 LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA DE ESPESSANTES DECLARADOS NOS RÓTULOS DE IOGURTES COMERCIAIS.....	63
2.7 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DA SOLUÇÃO DE LUGOL PARA DETECÇÃO DE AMIDOS.....	64
2.8 IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS EM IOGURTES.....	64
2.9 ANÁLISE DE GORDURAS TOTAIS DOS IOGURTES COMERCIAIS.....	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1 AMOSTRAGEM.....	66
3.2 INCIDÊNCIA DE ESPESSANTES NOS RÓTULOS DE IOGURTES COMERCIAIS.....	67
3.3 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO TESTE DO LUGOL.....	68
3.4 DETECÇÃO DE AMIDOS PELO TESTE DO LUGOL E COMPARAÇÃO COM A DECLARAÇÃO DE ESPESSANTES NOS RÓTULOS.....	69
3.5 TEOR DE GORDURA.....	71
4 CONCLUSÕES.....	72
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO TITULOMÉTRICO DE LANE-EYNON DESCRITO NA IN 68/2006 DO MAPA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMIDOS EM IOGURTE	76
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	77
1 INTRODUÇÃO.....	78
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1 MATERIAL.....	79
2.2 EQUIPAMENTOS.....	80

2.3	REAGENTES E PADRÕES.....	80
2.4	MATÉRIA PRIMA.....	81
2.5	SOLUÇÕES.....	81
2.6	ELABORAÇÃO DO IOGURTE.....	83
2.6.1	Processamento do iogurte.....	84
2.6.2	Análises físico-químicas de controle de qualidade.....	85
2.6.2.1	Extrato seco total.....	85
2.6.2.2	Gorduras totais.....	85
2.6.2.3	Acidez titulável.....	86
2.6.2.4	Teor de proteínas.....	86
2.7	ANÁLISE QUANTITATIVA DE AMIDO - IN 68/2006 MAPA.....	87
2.7.1	Validação do método oficial.....	88
2.7.1.1	Limite de quantificação, exatidão e precisão.....	89
2.7.1.2	Seletividade.....	91
2.7.1.2.1	Testes com soluções padrão de gomas.....	91
2.7.1.2.2	Testes com goma guar adicionada ao iogurte.....	92
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
3.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE CONFORMIDADE DO IOGURTE FABRICADO.....	93
3.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PELA IN 68/2006	94
3.2.1	Limite de quantificação, exatidão e precisão.....	94
3.2.2	Seletividade.....	95
3.2.2.1	Testes com soluções padrão de gomas.....	95
3.2.2.2	Testes com goma guar adicionada ao iogurte.....	96
4	CONCLUSÕES.....	96
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
CAPÍTULO III - INVESTIGAÇÃO DAS PERDAS OCORRIDAS NA EXECUÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIDOS (IN 68/2006 MAPA).....		99
RESUMO.....		99
ABSTRACT.....		100
1	INTRODUÇÃO.....	101
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1	MATERIAL.....	103
2.2	EQUIPAMENTOS.....	103
2.3	REAGENTES E PADRÕES.....	104
2.4	SOLUÇÕES.....	104
2.5	MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO NO 1º FILTRADO DO MÉTODO DESCRITO NA IN 69/2006 MAPA.....	105
2.5.1	Validação do método desenvolvido para quantificação do amido no 1º	107

	filtrado por espectrofotometria.....	
2.5.1.1	Sensibilidade, linearidade e efeitos de matriz.....	108
2.5.1.2	Limites de detecção e quantificação.....	109
2.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESCRITO NA IN 68/2006 MAPA EXECUTADO A PARTIR DA ETAPA DE HIDRÓLISE ÁCIDA...	110
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
3.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DO PARA QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO PRESENTE NO 1º FILTRADO POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	113
3.1.1	Linearidade.....	113
3.1.2	Efeitos de matriz.....	118
3.1.3	Sensibilidade.....	120
3.1.4	Limites de detecção e quantificação.....	121
3.1.5	Resultados da quantificação da perda de amido pelo método espectrofotométrico.....	121
3.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO OFICIAL A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA.....	122
4	CONCLUSÕES.....	125
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
	CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	128
	ANEXO I.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Requisitos físico-químicos descritos no Padrão de Identidade e Qualidade do iogurte.....	28
Tabela 2	Principais componentes bioativos da gordura do leite.....	31
Tabela 3	Percentual da fração de ácidos graxos presente na gordura leite.....	31
CAPÍTULO I		
Tabela I.1	Mesorregiões geográficas definidas pelo IBGE indicando as cidades sede das GRS, com as respectivas estimativa de populacional, que coletaram amostras de iogurtes.....	66
Tabela I.2	Incidência dos espessantes nos rótulos de iogurtes comerciais.....	68
Tabela I.3	Incidência dos resultados do teste do lugol correlacionado com teor de gordura dos iogurtes comerciais.....	70
Tabela I.4	Percentual dos resultados do teste do lugol e teor de gordura frente ao declarado nos rótulos.....	71
CAPÍTULO II		
Tabela II.1	Mapa do preparo do iogurte adicionado de diferentes volumes da solução de padrão de amido a 12,5 % para os testes de limite de quantificação, exatidão e precisão.....	90
Tabela II.2	Desvios aceitáveis de repetitividade e reprodutibilidade em função das concentrações de amido estudadas.....	91
Tabela II.3	Mapa do preparo de alíquotas do iogurte, de 10 g cada, adicionadas de 2,0 g de goma guar 1,5 % e de 0,0; 0,4 e 1,0 g do padrão de amido de batata 12,5 %, correspondendo às concentrações de 0,3 % para a goma guar e 0,0; 0,50, 1,25 % para o amido de batata, respectivamente.....	93
Tabela II.4	Resultados parâmetros físico-químicos do PIQ do iogurte: teor de gordura, proteínas e acidez.....	94
Tabela II.5	Teor de carboidratos obtido a partir da hidrólise ácida de gomas e titulação com reagente de Fehling.....	95
CAPÍTULO III		
Tabela III.1	Mapa do preparo do iogurte adicionado de diferentes volumes da solução de padrão de amido a 12,5 % para os testes de limite de quantificação, exatidão e precisão.....	112
Tabela III.2	Desvios aceitáveis de repetitividade e reprodutibilidade em função das concentrações do amido estudadas.....	113
Tabela III.3	Estatísticas de análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio de linearidade, para a curva de amido de batata em água.....	117
Tabela III.4	Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de	119

	desvio da linearidade, para a curva de amido com Lugol e matriz.....	
Tabela III.5	Equação da reta em função do comprimento de onda evidenciando o comprimento de onda escolhido para as análises espectrofotométricas do amido.....	120
Tabela III.6	Resultados da quantificação da perda de amido ocorrida no 1º filtrado através do método do espectrofotométrico.....	122
Tabela III.7	Avaliação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos dos resultados de recuperação aparente do amido de batata.....	123
Tabela III.8	Médias de recuperação, desvios padrão relativos sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial para o amido de batata.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição da produção nacional de leite em litros.....	26
Figura 2	Esquema de funcionamento de um homogeneizador e corte transversal de um glóbulo de gordura.....	35
Figura 3	Estrutura dos monômeros dos espessantes goma carragena, carboximetilcelulose, pectina, goma guar e goma xantana.....	41
Figura 4	Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido.....	41
Figura 5	Estrutura dos monômeros de amilopectina e amilose.....	42
Figura 6	Mecanismo de hidrólise do amido em meio ácido formando glicose e dextrinas.....	44
Figura 7	Esquema da reação de oxidação dos aldeídos presente nas moléculas de açúcares através da redução do Cu^{2+} a Cu^+	45
Figura 8	Reação de polimerização do iodo com iodeto para formação dos ânions I_3^- e I_5^-	46
Figura 9	Representação esquemática da conformação espacial da amilose e do complexo de inclusão I_3 -amido.....	47
Figura 10	Espectro de absorção de complexos de iodo com diferentes fontes amiláceas.....	48
 CAPÍTULO I		
Figura I.1	Butirômetro de leite com amostra evidenciando a fração lipídica e a escala percentual.....	65
Figura I.2	Mapa da divisão geográfica das GRS de Minas Gerais evidenciando as que coletaram amostras de iogurte em 2010 e 2011.....	67
Figura I.3	Água destilada – branco (1) e soluções a 1% dos padrões de amido (2), amido modificado (3), goma guar (4), goma xantana (5), goma carragena (6), carboximetilcelulose (7) e pectina (8) antes e após adição do reagente Lugol.....	68
 CAPÍTULO II		
Figura II.1	Processamento do iogurte natural batido.....	85
Figura II.2	Bloco digestor (A) e destilador de amostras de alimentos (B) para análise de proteínas.....	87
Figura II.3	Método de análise quantitativa de amido em leites fermentados (IN 68/2006 MAPA).....	88
Figura II.4	Esquema da digestão ácida dos espessantes estudados.....	92
 CAPÍTULO III		
Figura III.1	Método de análise quantitativa de amido em leites fermentados evidenciando a presença de amido no 1º filtrado.....	106

Figura III.2	Método desenvolvido para quantificar a perda de amido no 1º filtrado do método IN 68/2006 MAPA.....	107
Figura III.3	Indicação de quais etapas não foram executadas no método de análise quantitativa de amido em leites fermentados, IN 68/2006 MAPA.....	111
Figura III.4	Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de calibração com padrão de amido, com indicação dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.....	114
Figura III.5	Gráfico de probabilidade normal da curva de padrão de amido.....	115
Figura III.6	Representação da homogeneidade das variâncias da curva de padrão de amido de batata.....	115
Figura III.7	Gráfico de Durbin-Watson da curva do amido de batata (0,04 a 0,60 mg/mL) em água.....	116
Figura III.8	Curva de calibração do amido de batata com solução de lugol obtida nos ensaios de avaliação de linearidade, na faixa de 0,04 a 0,60 mg/mL, com a equação da reta e o coeficiente de determinação.....	117
Figura III.9	Curva de calibração de padrão de amido de batata com solução de Lugol em água e em matriz, obtidas nos ensaios de avaliação de linearidade e efeito matriz, na faixa de 0,04 a 0,60 mg/mL com as respectivas equações da reta e coeficientes de determinação.....	119
Figura III.10	Escala de diluição da solução padrão de amido de batata em água 0,00 (0); 0,04 (1); 0,06 (2); 0,10 (3); 0,20 (4); 0,40 (5); 0,60 (6) mg/mL com adição de 125 µL de reagente de Lugol em cada tubo de ensaio.....	120
Figura III.11	Alíquotas de iogurte e amido antes (A) e após (B) a digestão ácida.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMC	Carboximetilcelulose
DIVISA	Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
g	Gramas
GRS	Gerência Regional de Saúde
HDL	High density lipid
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
INCQS/ Fiocruz	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOM	Instituto Octávio Magalhães
kg	Quilograma
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LDL	Low density lipid
m	Massa
m/m	Massa/massa
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Mín.	Mínimo
mL	Mililitro
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MS	Ministério da Saúde

nm	Nanômetro
nº	Número
°C	Graus Célcus
°D	Graus Dornic
PA.	Para Análise
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
PNAN	Política Nacional de Alimentação e Nutrição
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
RBC	Rede Brasileira de Calibração
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SISLAB	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
UHT	Ultra High Temperature - Ultra alta temperatura
VISA	Vigilância Sanitária

RESUMO

O monitoramento da qualidade dos alimentos disponíveis para população é de suma importância para a garantia das políticas públicas de uma alimentação saudável. O iogurte foi um dos produtos fiscalizados pela Vigilância Sanitária do estado de Minas Gerais no período de 2010 a 2011. De acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade dos Leites fermentados, é permitida a adição de no máximo 1 % de amidos ao iogurte, que tem como função melhorar características de viscosidade e textura, principalmente em iogurtes com teor reduzido de gordura. Esta limitação é necessária devido ao alto poder de hidratação dos amidos, que pode reduzir o valor nutricional pela substituição dos nutrientes por água. Através do teste do Lugol, detectou-se a presença de amidos em 75 % das 48 amostras analisadas sendo que apenas 35 % declaravam seu uso nos rótulos. Os espessantes mais citados foram as gomas guar, xantana e amido modificado. Ao todo, 53 % das amostras apresentaram teor de gordura inferior ao declarado no rótulo. Ao validar o método para análise quantitativa de amido em iogurtes previsto na Instrução Normativa 68/2006 do MAPA, constatou-se falta de exatidão e possibilidade de interferência das gomas adicionadas. Ao investigar as falhas do método, constatou-se perda de quase 40 % do amido na primeira etapa de filtração, 15 % na despolimerização incompleta do amido e cerca de 6 % na reação de Maillard na etapa de hidrólise ácida. Desta forma comprovou-se que o atual método descrito na IN 68/2006 não pode ser usado para quantificação de amidos em iogurte.

Palavras chave: amido, iogurte, rotulagem, validação e perdas

ABSTRACT

The monitoring of the food quality used by population is quite important for the guarantee of public policies for feeding healthy. The yogurt was one of the food products inspected by the “Vigilância Sanitária” of Minas Gerais state. According to the “Padrão de Identidade e Qualidade dos Leites fermentados”, the food starch content does not exceed 1 % in yogurt. This additive is typically used in low-fat yogurt as thickeners and texture in dairy processing. This limitation is necessary due to the great ability of the starches to hydrate that can reduce the nutritional value by substitution of the nutrients by water. Through the Lugol's reagent, it's detected the presence of the starches in 75 % of the 48 samples analysed, being that only 35 % declared their use in labels. The most common thickeners described in labels were guar gum, xanthan gum and modified starch. 53 % of the samples showed low fat level in comparison with declared in label. In the validation procedure for the starch's quantitative analysis method in yogurt recommended by “Instrução Normativa 68/2006 do MAPA”, it was evidenced inaccuracies and a possible interference of added gums. The investigation of the method's fails allowed to reveal starch loss near 40 % in the first stage of filtration, being 15 % by incomplete depolymerization of the starch and around 6 % by Maillard reaction on the acidic hydrolysis stage. Consequently, it was verified that the usual method describe in the “IN 68/2006” cannot be used to quantify starches in yogurt.

Key words: starch, yogurt, label, validation and low recoveries

INTRODUÇÃO GERAL

O leite é um alimento acessível ao consumidor e completo, que tem o diferencial de ser utilizado como matéria prima para vários produtos. Ao se inocular no leite uma cultura de bactérias fermentadoras como o *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* e permitir seu amplo desenvolvimento, estes microorganismos produzirão ao fim do processo o iogurte (BRASIL, 2007; CHANDAN, 2006).

O iogurte possui composição similar à do leite, porém é cerca de seis vezes mais digerível, fato atribuído às mudanças ocorridas, principalmente, pela fermentação bacteriana e pelo processamento. A adição de leite em pó e soros lácteos aumenta o conteúdo proteico e mineral. A adição de polpas e flavorizantes auxilia na aceitação deste produto pelos consumidores, além de diversificar seu valor nutricional. A presença de bactérias lácticas também proporciona ao iogurte a propriedade de equilíbrio da microbiota intestinal, atuando como probiótico (TAMIME e ROBINSON, 1991; EARLY, 2000; MARTIN, 2002; CHANDAN, 2006).

A origem dos leites fermentados se confunde com a do iogurte, sendo que este é reconhecidamente um alimento tradicional dos povos do Oriente Médio. Os primeiros iogurtes comerciais foram produzidos na França e na Espanha em 1920, e nos Estados Unidos, em 1940, mas somente a partir da década de 60 é que houve um aumento no consumo deste produto, devido a melhoria das técnicas de processamento, reconhecimento da qualidade nutritiva e da função terapêutica. No Brasil, o iogurte foi introduzido nos anos 30, com a imigração européia, a partir de um pequeno grupo de consumidores (TAMIME e ROBINSON, 1991; MARTIN, 2002).

A crescente procura por alimentos de relevante qualidade nutricional e que desempenham funções terapêuticas (alimentos funcionais), gerou um aumento no consumo de iogurtes (MARTIN, 2002). Sabe-se que a qualidade e autenticidade de produtos alimentícios é uma preocupação de ordem global. Portanto, é cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos inadequadamente rotulados ou de qualidade inferior, quer por razões econômicas, quer por razões de saúde pública (VELOSO et. al, 2002).

No Brasil, os órgãos de Vigilância Sanitária são responsáveis pela fiscalização e monitoramento da qualidade dos alimentos que estão dispostos à venda para os consumidores. A legislação brasileira (BRASIL, 2007) permite a adição de amido e

amidos modificados ao iogurte em uma proporção máxima de 1 % no produto final. Caso a indústria opte por sua utilização, a declaração deste ingrediente no rótulo é obrigatória. A adição de estabilizantes e espessantes é um artifício tecnológico que visa não só melhorar suas características sensoriais, mas também compensar o teor reduzido de sólidos lácteos e gordura, reduzindo, desta forma, os custos de produção e valor calórico. A substituição dos sólidos e gordura provenientes do leite por espessantes é uma prática questionável, uma vez que é tecnicamente possível elaborar um iogurte com firmeza e viscosidade adequadas sem estes aditivos (EARLY, 2000). A gordura do leite, apesar de rica em ácidos graxos considerados nocivos para a saúde (ácidos mirístico e palmítico), apresenta em sua constituição outros ácidos que são benéficos, como o ácido linoleico conjugado (CLA), cuja principal fonte alimentícia é a gordura láctea (LEDoux, et al., 2005).

Atualmente, a Instrução Normativa 68/2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento regulamenta os métodos oficiais para análises físico-químicas de produtos lácteos. Esta norma contempla a análise qualitativa do amido pelo teste do Lugol e quantitativa, que se baseia na clarificação e filtração do iogurte, para separação dos açúcares simples dos complexos, e digestão ácida do resíduo sólido gerado, que em seguida sofre nova clarificação e filtração. Este segundo filtrado é submetido à titulação com reagente de Fehling, de acordo o método de Lane-Eynon (BRASIL, 2006).

Em procedimentos de validação para garantir a confiabilidade do método de análise quantitativa de amido descrito na IN 68/2006, detectou-se que parte deste é perdido durante a primeira filtração, o que motivou o aprofundamento dos estudos a fim de verificar a exatidão e investigar as possíveis falhas do método oficial, que é uma ferramenta primordial para o efetivo controle dos padrões de identidade e qualidade de iogurtes no Brasil. A falta de exatidão e precisão de um método prejudica o monitoramento por parte dos organismos fiscalizadores impossibilitando a obtenção de resultados confiáveis em relação à utilização de ingredientes regulamentados, como o amido.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência do método descrito na Instrução Normativa 68/2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para quantificação de amidos em iogurte e avaliar a conformidade das informações declaradas nos rótulos de amostras comerciais em relação à presença de amidos e ao teor de gorduras totais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o percentual de uso e quais os principais espessantes empregados nas formulações dos iogurtes comercializados no estado de Minas Gerais através da análise das informações declaradas nos rótulos;
- Verificar a seletividade do teste qualitativo de identificação de amidos pelo reagente Lugol frente a outros espessantes;
- Comparar a declaração de amido e amidos modificados nos rótulos com resultados do teste de Lugol;
- Comparar os teores de gorduras totais declarados nos rótulos de iogurtes comerciais com os resultados obtidos das análises quantitativas pelo método butirométrico;
- Validar o método titulométrico de Lane-Eynon para análise quantitativa de amido em iogurtes descrito na IN 68/2006 MAPA;
- Investigar as perdas do método titulométrico de Lane-Eynon para análise quantitativa de amido em iogurtes descrito na IN 68/2006 MAPA e quantificá-las.

REVISÃO DA LITERATURA

1 FISCALIZAÇÃO DE ALIMENTOS E ROTULAGEM NO BRASIL

A alimentação e a nutrição constituem requisitos básicos para a promoção e a proteção da saúde, possibilitando a afirmação plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania. No plano individual e em escala coletiva, esses atributos foram consignados na Declaração Universal dos Direitos Humanos, promulgada há 50 anos, posteriormente reafirmados no Pacto Internacional sobre Direitos Econômicos, Sociais e Culturais e incorporados à legislação nacional em 1992 (BRASIL, 2001; BRASIL, 2003a).

O conceito de segurança alimentar evoluiu do simples abastecimento, na quantidade apropriada, para a incorporação do acesso universal aos alimentos e o aspecto nutricional relacionado com questões de composição, qualidade e ao aproveitamento biológico. Em 2006, através da Lei nº 11.346, foi regulamentado o atual Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (SISAN), com vistas a assegurar o Direito Humano à Alimentação Adequada e promover a integração entre diferentes setores governamentais. Para o alcance do propósito desta política, foram definidas diretrizes que integram a Política Nacional de Alimentação e Nutrição - PNAN e indicam as linhas de ações para o alcance do seu propósito. Entre elas consta o “Controle e Regulação dos Alimentos”, que no Brasil é uma responsabilidade compartilhada entre órgãos e entidades da Administração Pública, com destaque aos órgãos da Agricultura e do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2001; BRASIL, 2011).

A estruturação do atual modelo de controle sanitário de alimentos no Brasil é fragmentada e resulta, em alguns momentos, na desarticulação entre os órgãos de governo, antagonismo e duplicidade de ações. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) monitora a produção primária dos alimentos, desenvolvida em empresas beneficiadoras de produtos de origem vegetal (minimamente processados) e indústrias de processamento de bebidas e de produtos de origem animal. O objetivo é assegurar a sanidade das populações vegetais e rebanhos, além de garantir a idoneidade dos insumos e serviços utilizados na agropecuária. Compete ao Sistema Nacional de

Vigilância Sanitária (SNVS), pertencente ao Ministério da Saúde, controlar os estabelecimentos comerciais de serviços de alimentação, supermercados, entre outros; as indústrias processadoras de amendoins e derivados, água mineral natural, conservas vegetais, gelados comestíveis, sal para consumo humano, dentre outros, além de todos os produtos alimentícios expostos à venda. Os principais conflitos de competências são causados pela falta de clareza no enquadramento de alguns alimentos. Isso resulta em registro em dois ministérios diferentes, que gera duplicidade na normatização e fiscalização, e dificulta a entrada dos inspetores de saúde nos estabelecimentos que já sofreram fiscalização pelos agentes da Agricultura e vice-versa. Todavia, ações vêm sendo despendidas para minimizar esses conflitos e melhorar a integração entre os setores (BRASIL, 1999; BRASIL, 2001; LIMA, 2009).

Como parte integrante do SUS, seguindo seu princípio organizativo de hierarquização e regionalização, o SNVS engloba unidades nos três níveis de governo: federal, estadual e municipal. No nível federal, estão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), que integra o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB). O SISLAB é composto por 4 redes nacionais de laboratórios organizados em sub-redes, por agravos ou programas, de forma hierarquizada por grau de complexidade das atividades relacionadas à vigilância em saúde, compreendendo a vigilância epidemiológica, a vigilância em saúde, a vigilância sanitária - VISA e assistência médica. No nível estadual, estão as Vigilâncias Sanitárias Estaduais e o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de cada uma das 27 unidades da federação (26 Estados e o Distrito Federal). No nível municipal, estão as Vigilâncias Sanitárias Municipais nos municípios que já organizaram seus serviços de VISA (BRASIL, 1988; BRASIL, 1990; BRASIL, 1999; BRASIL, 2004; MINAS GERAIS, 2009).

A ANVISA é o órgão responsável por coordenar as ações do SNVS em nível nacional. Ela incumbe-se do controle pré-mercado com atividades que envolvem registro, aprovação de rotulagem, expedição de alvarás sanitários e/ou licenças sanitárias, dentre outros procedimentos de característica burocrática e do controle pós-mercado, que são atividades baseadas no processo e nos riscos, após a alocação dos produtos para o consumo. Os programas de monitoramento da qualidade dos alimentos são fundamentados no controle e fiscalização de amostras de diversos produtos alimentícios expostos ao consumo e na avaliação do padrão sanitário por meio de análises físico-químicas, microbiológicas, de contaminantes diversos, como metálicos, micotoxinas,

corpos estranhos, entre outros, além da fiscalização dos dizeres obrigatórios das embalagens. Os programas fornecem resultados analíticos que permitem traçar o perfil dos distintos alimentos e identificar os setores produtivos que necessitam de intervenção institucional de abrangência nacional e de caráter preventivo, a fim de garantir a melhoria da qualidade sanitária dos alimentos comercializados no país. Os principais critérios para seleção das categorias de alimentos monitorados são pautados em (BRASIL, 2001; ANVISA, 2003; LIMA, 2009):

- relevância do consumo por parte da população;
- risco epidemiológico;
- disponibilidade no mercado local;
- histórico de freqüentes irregularidades;
- viabilidade de colheita da amostra;
- viabilidade de análise laboratorial.

As ações de vigilância sanitária são realizadas tomando-se como referência a “Análise de Risco”, que torna possível a obtenção de informações acerca dos perigos envolvidos nos alimentos monitorados. Com vistas ao controle dos riscos identificados são adotadas medidas de intervenção e disponibilizadas informações sobre a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos para que sejam tomadas as providências cabíveis, como (ANVISA, 2003):

- encaminhamento dos laudos condenatórios das categorias de alimentos à área competente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento responsável pelo registro e inspeção dos estabelecimentos;
- notificação às empresas para adequação dos alimentos às legislações sanitárias;
- resoluções de interdição e apreensão de produtos com laudos condenatórios;
- inspeções sanitárias nos estabelecimentos fabricantes dos alimentos que apresentaram laudos condenatórios;
- elaboração e ou ajuste de regulamentos técnicos.

O Instituto Octávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) é o Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN/MG) e integra os sistemas de vigilância epidemiológica, vigilância sanitária e ambiental no âmbito municipal, estadual e federal. Seu trabalho está voltado para a prevenção e controle de doenças e para a promoção da saúde. Constitui-se por duas unidades e três divisões: Assessoria, Unidade de Higienização e Produção de Meios de Cultura, Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA) e Divisão de Planejamento e Gestão da Qualidade (FUNED, 2011).

A Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental desempenha importante papel na promoção e proteção da saúde no que se refere à fiscalização da produção e comercialização de alimentos, águas, medicamentos, saneantes, cosméticos, sangue e seus derivados e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária, ambiental e à saúde do trabalhador. Desenvolve suas atividades em estreita parceria com os órgãos de vigilância à saúde do Estado e Municípios, desde o planejamento, execução e avaliação dos programas e metas. A DIVISA busca atingir metas e seguir os requisitos junto à norma de Qualidade NBR ISO/IEC 17025:2005. As modalidades de análises realizadas são (MINAS GERAIS, 1997; FUNED, 2011):

- análise fiscal;
- análise de contraprova;
- análise em amostra única;
- análise para elucidação de surtos de doenças transmitidas por alimentos;
- análise de orientação/conformidade;
- análise em programas da qualidade.

As amostras de monitoramento de alimentos são colhidas pelos órgãos de Vigilância Sanitária, que as dividem em três invólucros padrão para assegurar as características da amostra e autenticidade. Um invólucro, junto a uma via do Termo de Coleta de Amostras, é entregue ao detentor ou responsável pelo alimento a fim de servir como contraprova e as duas outras são imediatamente encaminhadas ao laboratório, uma para a realização das análises e a outra para servir de testemunho. Cada invólucro deverá conter quantidades iguais de unidades, do mesmo lote e suficientes para a realização das análises. Quando a quantidade ou natureza da amostra não permitir sua coleta em triplicata, a coleta se dará em apenas um invólucro, como “amostra única”, que será encaminhada ao LACEN. A empresa é notificada e orientada a enviar um representante e/ou perito por ela indicado ou, na falta de ambos, de duas testemunhas para acompanhar a execução das análises fiscal (MINAS GERAIS, 1997; FUNED, 2011).

A fim de auxiliar na escolha por alimentos industrializados mais saudáveis a partir das informações contidas nos rótulos, a ANVISA publicou, em dezembro de 2003, a resolução RDC nº 360 – *Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados*, em atendimento à Política Nacional de Alimentação (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2003b).

Os rótulos são considerados elementos essenciais de comunicação entre produtos e consumidores por conter informações estratégicas que auxiliam nos tratamentos de redução dos riscos de doenças crônicas, tais como: diabetes melitus (açúcar),

hipertensão (sal), doença celíaca (trigo, aveia, centeio e cevada), intolerância à lactose (leite) entre outras. Há uma tendência geral por parte dos consumidores em conhecer o valor nutricional dos alimentos industrializados, principalmente no tocante à quantidade de calorias, gorduras, minerais e outros nutrientes que possam trazer algum tipo de benefício ou prejuízo aquele que o consome. O consumidor obtém informação sobre os alimentos através do conhecimento da família, mídia, educação, publicidade e através dos próprios rótulos. Dados recentes levantados junto à população demonstram que aproximadamente 70 % das pessoas consultam os rótulos dos alimentos no momento da compra (CHAGAS et al., 2009; DIAS et al., 2008; GRANDI e ROSSI, 2010; SILVA et al., 2011).

A evolução em termos de legislação no Brasil foi motivada pela necessidade de adequação aos parâmetros internacionais e pelo novo perfil de consumidor. Desta forma, os rótulos passaram a ser instrumento de uma estratégia educativa com o objetivo de informar e de facilitar a escolha de alimentos mais benéficos (DIAS et al., 2008).

A Resolução RDC 360/2003 determina que os rótulos devem apresentar obrigatoriamente, salvo algumas exceções, o teor de carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio por porção do alimento. Estas informações são utilizadas pelos órgãos de fiscalização para comparar a veracidade das declarações. Ela prevê ainda que poderá haver discordância entre o valor declarado no rótulo com os resultados laboratoriais de até 20 %, seja superior ou inferior. Caso se ultrapasse este limite, deve-se considerar que o parâmetro em questão está em desacordo com a legislação, ou seja não conforme (BRASIL, 2003b).

2 IOGURTE

A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes do complexo agroindustrial brasileiro, desempenhando um papel de relevância no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (CARVALHO, 2002).

Minas Gerais destaca-se como o maior estado produtor de leite (Figura 1). Em 2010, a produção atingiu cerca de 8,4 bilhões de litros/ano, participando com 27 % da produção brasileira segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). Como parte integrante da cadeia produtiva do leite, o iogurte foi um dos alimentos monitorados nos anos de 2010 e 2011 pela Vigilância Sanitária.

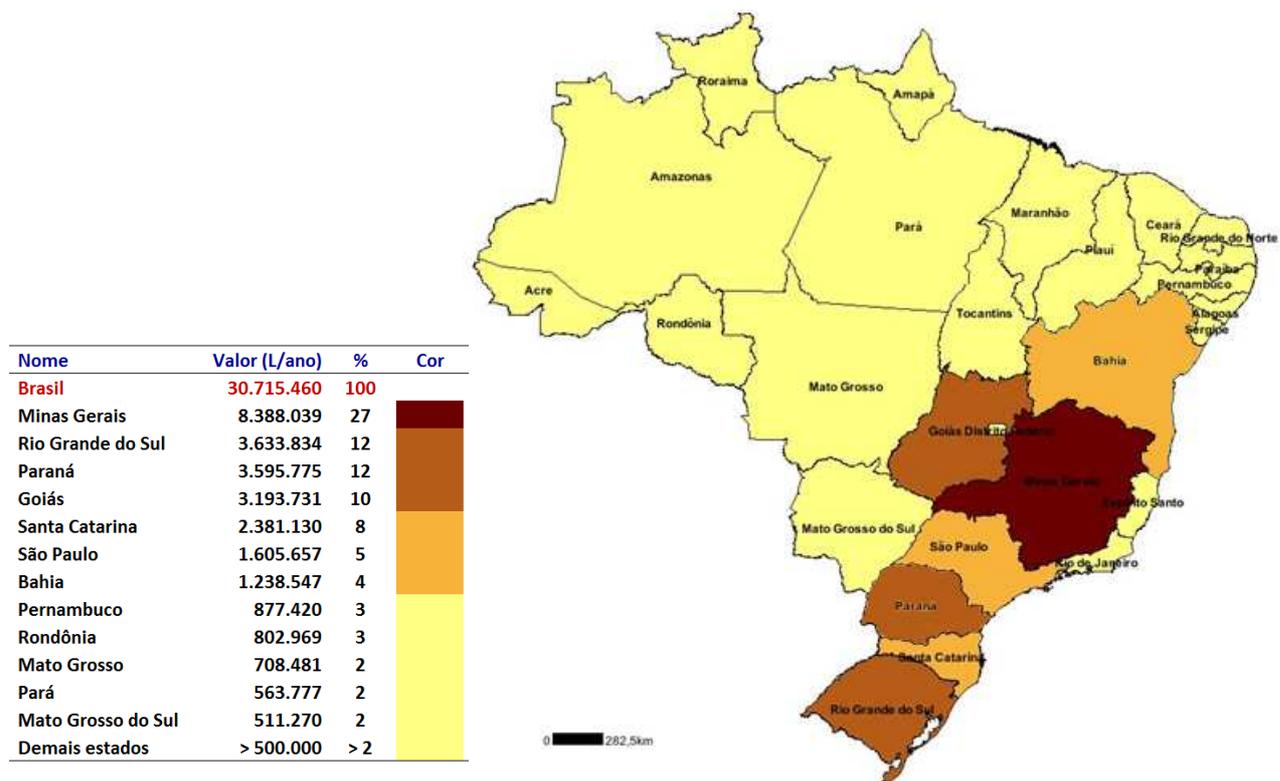


Figura 1 – Distribuição da produção nacional de leite em litros (IBGE, 2010)

Os leites fermentados constituem uma classe de produtos lácteos que inclui o iogurte, kefir, kumis kishk, coalhada entre outros. Caracterizam-se pela inoculação de microorganismos específicos que reduzem o pH ao transformar a lactose em ácido láctico e coagulam as proteínas (EARLY, 2000). A acidez provocada pela fermentação, além de estar associada ao desenvolvimento do sabor, torna estes produtos relativamente estáveis, e inibe o crescimento de bactérias deterioradoras (BASTIANI, 2009).

O iogurte é definido como um produto cuja fermentação se realiza através de cultivos simbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, os quais podem ser acompanhados, de forma complementar, por outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007). Os microorganismos inoculados devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (EARLY, 2000; BRASIL, 2007). O sabor suave do iogurte é conseguido pela ação simbiótica das duas culturas lácticas que durante a fermentação produzem o acetaldeído, o qual confere o sabor característico do iogurte, além do dióxido de carbono, ácido acético, acetoína, diacetil entre outros que também influenciam na textura e no aroma (EARLY, 2000; REIS, 2007).

O iogurte é reconhecidamente um alimento tradicional dos povos do Oriente Médio, os quais dispunham das bactérias fermentadoras e das condições ideais para seu desenvolvimento (ORDÓÑES, 2005; LONGO, 2006). Outros povos, em diferentes momentos, como Sumérios, Babilônios, Mesopotâneos, o Phroes do noroeste da África e os Indianos também passaram a dominar a técnica de produção do iogurte (TAMIME e ROBINSON, 1991) que se estendeu rápida e amplamente como pode ser observado nos numerosos produtos “tipo iogurte” que surgiram na antiguidade em diferentes partes do mundo: “Jugurt” na Turquia, “Leban” no Líbano, “Roba” no Iraque, “Tarro” na Hungria, “Skyr” na Islândia e “Shosim” no Nepal, entre outros (TAMIME e ROBINSON, 1991; EARLY, 2000). Sua popularidade na Europa deve-se, em grande parte, aos trabalhos do bacteriologista russo Elie Metchnikoff, que no início do século XIX estudou as bactérias utilizadas na elaboração deste produto. Em seu livro “A prolongação da vida”, escrito em 1907, Metchnikoff atribui a boa saúde e a extraordinária longevidade das populações búlgaras aos efeitos das bactérias contidas no leite ácido consumidas diariamente (EARLY, 2000; LONGO, 2006). É necessário salientar que suas observações se relacionavam com a ingestão de um produto diferente do que se conhece atualmente como o iogurte. Metchnikoff dedicou-se ao estudo de uma só linhagem, *Bulgarian bacillus*, que por muito tempo foi considerado o que hoje se conhece por *Lactobacillus bulgaricus*. Posteriormente, verificou-se que o *Lactobacillus acidophilus* deveria ser o microorganismo contido naqueles produtos devido à afinidade deste microorganismo com o trato intestinal humano (LONGO, 2006).

No início do Século XX, o iogurte era considerado medicamento, e era vendido apenas em farmácias. A partir de 1920 houve o início da industrialização do iogurte e sua popularização ocorreu por volta da década de 60 do século passado com a adição de polpa de frutas e açúcar, que mascara seu gosto ácido. Segundo o IBGE (2004), o consumo anual por renda *per capita* de iogurte no Brasil passou de 0,36 kg em 1974-1975 para 2,91 em 2002-2003. Nos últimos anos observou-se crescimento considerável na produção de iogurte, chegando a atingir uma produção média de 400 mil toneladas em 2007, o que representa 76 % do total de produtos lácteos (SILVA e NASCIMENTO, 2007).

2.1 COMPOSIÇÃO E REQUISITOS DE QUALIDADE

Atualmente existe uma variedade de iogurtes disponíveis no mercado. Estes variam em função do método de produção, dos ingredientes e aditivos utilizados que proporcionam produtos com sabores, consistência e valor calórico distintos.

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2007), o iogurte deve ser composto obrigatoriamente por leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura e deve-se utilizar como cultura láctea as bactérias *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Pode ser adicionado opcionalmente leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos, frutas em pedaços, polpa(s), suco(s), e outros preparados à base de frutas. Outras substâncias alimentícias, tais como: açúcares, mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate, especiarias, café, podem ser adicionadas sozinhas ou acompanhadas. É permitida a adição de amidos e/ou amidos modificados, em uma proporção máxima de 1 % (m/m) do produto final, sendo que os ingredientes opcionais não lácteos, sozinhos ou combinados, podem estar presentes em uma proporção máxima de 30 % (m/m) do produto final. O iogurte deve atender aos requisitos físico-químicos indicados na Tabela 1 (BRASIL, 2007):

Tabela 1 – Requisitos físico-químicos descritos no Padrão de Identidade e Qualidade do iogurte

Produto / parâmetro	Matéria gorda láctea (g/100g)	Acidez (g ác. láctico/100g)	Proteínas lácteas (g/100g)
Com creme	Mín. 6,0	0,6 a 1,5	Mín. 2,9
Integral	3,0 a 5,9	0,6 a 1,5	Mín. 2,9
Parcialmente desnatado	0,6 a 2,9	0,6 a 1,5	Mín. 2,9
Desnatado	Max. 0,5	0,6 a 1,5	Mín. 2,9

Fonte: BRASIL, 2007.

O padrão legal definido na legislação brasileira para composição química do iogurte é baseado no teor de gordura: com creme, integral, parcialmente desnatado e desnatado (BRASIL, 2007).

Para TAMIME e ROBSON (1991) o iogurte pode ser classificado de acordo com a consistência resultante da coagulação das proteínas e o modo de produção:

- *sólido (ou firme)*: quando o coágulo é formado pela fermentação, dentro da própria embalagem de venda, e o iogurte tem uma massa contínua semi-sólida. O envase é feito após a inoculação do fermento;
- *homogêneo (ou batido)*: formado por uma massa com estrutura de gel, que é quebrada após o resfriamento e seguida do envase.

O iogurte também pode ser classificado segundo o aroma que apresenta (MARTIN, 2002):

- *natural*: é o iogurte tradicional com seu típico sabor ácido acentuado;
- *com frutas*: é produzido por adição de frutas, usualmente frutas naturais, congeladas, purês, polpas, pedaços ou geléias de frutas;
- *aromatizado*: preparado por adição, ao iogurte natural, de açúcar e outros agentes adoçantes, saborizantes e corantes sintéticos.

2.2 VALOR NUTRITIVO

A importância do iogurte na alimentação humana deve-se principalmente aos atributos nutricionais do leite e, durante a fermentação, a proteína, a gordura e a lactose sofrem hidrólise parcial, tornando o produto facilmente digerível, além de ser utilizado na recomposição e estabilização da microbiota intestinal, por ser considerado agente regulador das funções digestivas (EARLY, 2000; MARTIN, 2002).

A composição do iogurte é similar à do leite, embora haja algumas diferenças devido a mudanças ocorridas pela fermentação bacteriana sobre a lactose e pela adição de leite em pó, com o objetivo de aumentar o teor de sólidos totais, permitindo maior conteúdo protéico (TAMIME e ROBINSON, 1991; EARLY, 2000; MARTIN, 2002). O iogurte natural, sem adição de polpa, contém traços de diversos mono e dissacarídeos, mas a lactose é o açúcar dominante representando cerca de 4 a 5 % (m/m) do iogurte. Estes carboidratos representam uma fonte de energia para o metabolismo humano (TAMIME e ROBSON, 1991). Estudos relatam que a lactose presente no iogurte estimula a absorção de cálcio e magnésio e apresenta um baixo índice glicêmico quando comparado com a glicose e a sacarose, fazendo com que o iogurte se torne adequado para diabéticos (CHANDAN et al., 2006). Ao contrário do leite, pessoas com intolerância à lactose também podem consumir iogurte e leites fermentados com relativa segurança. Há algumas teorias para explicar esta aparente contradição. A mais aceita é a de que os microorganismos do iogurte continuam metabolizando a lactose através da liberação das enzimas lactase e β -D-galactosidase mesmo após a ingestão do produto, fazendo com que a quantidade deste açúcar que chega ao intestino delgado seja tão pequena que não produz reações adversas (EARLY, 2000; CHANDAN et al., 2006). Também é possível que a difusão da lactose na mucosa intestinal seja dificultada pelos resíduos das proteínas lácteas coaguladas (EARLY, 2000).

Assim como o leite, as proteínas do iogurte apresentam elevado valor biológico. Tanto as caseínas como as proteínas do lactosoro (lactoalbuminas e lactoglobulinas) contém uma elevada proporção de aminoácidos essenciais. O aumento da digestibilidade das proteínas do iogurte é atribuída à formação do coágulo resultante da redução do pH do meio pelas bactérias fermentadoras e proteólise. As vantagens deste tipo de coágulo é a estrutura mais aberta dos agregados de caseína que facilitam o acesso das enzimas digestivas e assim a digestão (TAMIME e ROBSON, 1991). O grau de proteólise depende das cepas bacterianas utilizadas, mas em geral durante a incubação são liberados vários peptídeos e aminoácidos essenciais ou não, entre eles valina, ácido glutâmico, triptofano e metionina, que cobrem uma importante parte da ingestão diária recomendada (TAMIME e ROBSON, 1991; EARLY, 2000; ORDÓÑES, 2005).

A gordura do leite contém vários nutrientes necessários para a alimentação humana, como vitaminas lipossolúveis e lipídeos bioativos (Tabela 2). Contudo, o leite contém relativamente baixas proporções de ácidos graxos insaturados e altas proporções de ácidos graxos saturados, como os ácidos mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), que favorecem o aumento plasmático de LDL em humanos (Tabela 3). Apesar das dificuldades em correlacionar a dieta com o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, ambos os ácidos graxos têm sido associados com o aumento das taxas de colesterol, risco para doenças cardiovasculares, trombozes, resistência à insulina, ganho de peso e obesidade (GRANT, 1998; WARENSJÖ et al., 2004; STOOP, 2009). Um balanço ideal de consumo entre os ácidos graxos saturados e insaturados seria de em torno de 10 % de ácidos graxos poliinsaturados, 82 % de monoinsaturados e 8 % de saturados (SILVA et al., 2006a).

Tabela 2 – Principais componentes bioativos da gordura do leite

Ácidos graxos e composição percentual		Efeitos sobre a saúde
Saturados	C4:0 – ácido butírico (3,1 %)	Modulador das funções gênicas; Anticarcinogênico;
	C8:0 – ácido caprílico (1,5 %)	Atividade antiviral; Contribui para redução de tumores;
	C10:0 – ácido cáprico (3,4 %)	Antiviral; Inibidor da COX-1 e COX-2;
	C12:0 – ácido láurico (4,1 %)	Inibidor da COX-1 e COX-2; Antiviral; Antibacteriano (<i>Helicobacter pylori</i>); Anti agregador plaquetário;
	C14:0 – ácido mirístico (10,2 %) C16:0 – ácido palmítico (29,4 %)	Aumenta LDL e HDL;
Insaturados	Mono C18:1 – ácido oléico (28,2 %)	Prevenção de doenças cardiovasculares; Estabilização de membranas;
	Poli C18:2 – ácido linoleico conjugado (CLA) (0,5 %)	Anticarcinogênico/antimutagênico; Antidiabéticos; Inibição de aterosclerose;
	Poli C18:2 n6 – ácido linoléico (0,5 %) C18:3 n3 – ácido linolênico (0,5 %) C20:5 n3 – ácido eicosapenaenóico (EPA) (0,03 %)	Ácidos graxos essenciais.

Fonte: MAIA, 1987; LEDOUX et al., 2005

Tabela 3 – Percentual da fração de ácidos graxos presente na gordura do leite

Ácidos graxos	g ác. graxo/100g gordura do leite
C4:0 – 18:0 (SFA)	66,1
C18 insaturado (UFA)	29,7

SFA = ácido graxo saturado; UFA = ácido graxo insaturado

Fonte: MAIA, 1987; SILVA et al., 2006a; STOOP, 2009.

No processamento do iogurte, a etapa de homogeneização do leite quebra os glóbulos de gordura em partículas menores e as lipases produzidas pelas bactérias lácticas liberam parcialmente os ácidos graxos e o colesterol. Com isso a emulsificação das gorduras pelos sais biliares se torna mais eficiente e facilita a digestão e absorção dos ácidos graxos (TAMIME e ROBINSON, 1991).

Dos minerais presentes no iogurte destacam-se cálcio (114 a 130 mg/100mL), potássio (116 a 176 mg/100mL), cloro (90 a 110 mg/100mL), fósforo (53 a 72 mg/100mL), sódio (35 a 90 mg/100mL) e magnésio (9 a 14 mg/100mL) em teores mais elevados e ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês como elementos traços, em concentrações inferiores a 0,6 mg/100mL. Estes minerais estão presentes no meio, em equilíbrio, sob a forma coloidal e solúvel. Apenas 20 a 30 % do cálcio e do magnésio do leite estão presentes sob a forma iônica. O restante está ligado aos ânions citrato e fosfato como constituintes da porção coloidal. Com a redução do pH do leite pela fermentação, a forma coloidal é progressivamente convertida à forma iônica. No pH de 4,4 a maior parte dos minerais estão presentes sob a forma iônica, solúvel e difusível, tornando o iogurte uma importante fonte de cálcio para o consumo humano, principalmente para portadores de intolerância à lactose e osteoporose (TAMIME e ROBSON, 1991; CHANDAN et al., 2006).

Os valores de niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e vitamina B12 são, geralmente, reportados como superiores nos diferentes tipos de produtos lácticos fermentados, principalmente o iogurte, quando comparados ao leite (FERREIRA, 2001). A disponibilidade de vitaminas no iogurte pode variar de acordo com o processamento e a formulação. Muitas vitaminas são sensíveis ao tratamento térmico, podendo ser posteriormente suplementadas (EARLY, 2000). As vitaminas do leite contribuem para o desenvolvimento das bactérias lácticas que, por sua vez, produzem outras vitaminas, aumentando assim a variedade destas presentes no iogurte. De uma forma geral, o iogurte é considerado um alimento equilibrado e adequado a qualquer dieta (LONGO, 2006).

As bactérias lácticas (*Lactobacillus* e *Streptococcus*) produzem metabólitos, como por exemplo o ácido láctico, que tem efeito antagônico sobre o crescimento de vários microorganismos. Têm sido reportados na literatura compostos antibacterianos produzidos por *Lactobacillus bulgaricus* que atuam na inibição da *Salmonella*, *Shigella*, e *Escherichia coli* (MARTIN 2002). A literatura também ressalta o efeito hipocolesterolêmico das culturas lácteas do iogurte que causam desconjugação ou dehidroxilação dos sais biliares no intestino delgado, provocando conseqüentemente perda de ácidos biliares, impedindo-os de serem reciclados. Devido a isso, o organismo usa mais colesterol para

fabricar sais biliares, diminuindo o nível de colesterol sérico. Autores também apontaram como fatores responsáveis pelos efeitos hipocolesterolêmicos do iogurte a inibição da síntese de colesterol a partir do acetato pela presença de hidroximetilglutarato (fator inibitório de síntese de colesterol) (MARTIN, 2002).

2.3 PROCESSAMENTO DO IOGURTE NATURAL BATIDO

2.3.1 Matéria prima

O leite destinado à fabricação do iogurte deve ser de ótima qualidade. De uma maneira geral, deve apresentar como características fundamentais ausência total, ou presença mínima, de substâncias estranhas, ausência de organismos patogênicos, ser isento de antibióticos, acidez máxima entre 0,14 a 0,18 g ác. láctico/100g, apresentar sabor e odor normais, extrato seco desengordurado em torno de 8,5 a 11 % e ser proveniente de úberes sãos, não infectados (BEHMER, 1985; TAMIME e ROBINSON, 1991; OLIVEIRA e CARUSO, 1996).

A *cultura starter* ou iniciadora para o processo fermentativo pode ser adquirida de duas formas: as indústrias compram os iniciadores e os propaga, em leite integral ou mais frequentemente em leite desnatado, para atingir o volume de inóculo necessário para sua produção. Porém, é necessário a disponibilidade de instalações e mão de obra qualificada para a manutenção dos cultivos; ou pode-se adquirir a *cultura starter* em quantidade suficiente para incubá-la diretamente em volume definido de leite. Esse sistema evita problemas com iniciadores inativos, desequilibrados e contaminações com bactérias competitivas (ORDÓÑES, 2005).

A diferenciação da composição entre os diversos iogurtes presentes no mercado se dá através da adição de ingredientes tais como amidos, gomas, pectinas, gelatinas, aromatizantes, saborizantes, frutas em forma de pedaços, polpa, sucos e outros preparados à base de frutas dentro de limites regulamentados pelo Padrão de Identidade e Qualidade dos Leites Fermentados (BEHMER, 1985; TAMIME e ROBINSON, 1991; BRASIL, 2007).

2.3.2 Padronização

A padronização é uma etapa que visa garantir que o iogurte apresente uma composição química constante, evitando variações de sabor, aroma, textura e aspecto

entre um lote e outro. O iogurte deve ser padronizado quanto ao teor de gordura e sólidos não-gordurosos, denominado extrato seco desengordurado (ESD) (CHANDAN et al., 2006).

No iogurte batido a porcentagem de ESD deve estar na faixa de 8,5 a 10 %. O iogurte tradicional, com textura mais firme, deve ter 12 % (FERREIRA, 2001). Para padronizar estes valores de ESD é desejável que adicione sólidos lácteos ao leite que será utilizado no processo. O aumento de sólidos não-gordurosos proporciona um produto mais consistente e redução da tendência de sinérese, desprendimento do soro após a formação do coágulo (FERREIRA, 2001; LONGO, 2006).

É prática comum e regulamentada pela legislação brasileira a adição de leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos com o objetivo de se alcançar a concentração de sólidos necessária para a melhor consistência do iogurte (TAMIME e ROBINSON, 1991; OLIVEIRA e CARUSO, 1996; CHANDAN et al., 2006; BRASIL, 2007).

2.3.3 Homogeneização

O principal objetivo da homogeneização é a redução dos glóbulos de gordura, que são constituídos por um núcleo central, contendo a gordura, envolvido por uma película de natureza lipoprotéica conhecida com o nome de membrana. O processo industrial para homogeneização do leite consiste em passá-lo através de um pequeno orifício, sob elevada pressão, o que reduz mecanicamente o tamanho dos glóbulos, até que seja atingido o diâmetro em torno de 1 a 2 μm (Figura 2). Este processo visa aumentar a estabilidade e consistência dos produtos fermentados, proporcionando um melhor corpo e brilho através da redução do tamanho dos glóbulos de gordura, evitando sua coalescência e a formação da linha de nata (CHANDAN et al., 2006; ORDÓÑES, 2005).

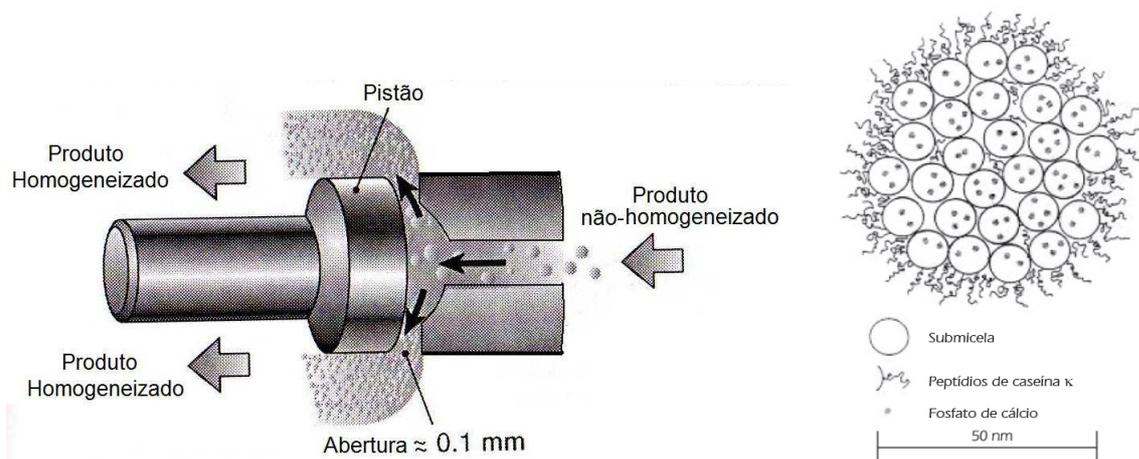


Figura 2 – Esquema de funcionamento de um homogeneizador e corte transversal de um glóbulo de gordura (CHANDAN et al., 2006)

A homogeneização também provoca uma série de efeitos secundários: modificação da membrana, por aumentar consideravelmente a superfície total dos glóbulos de gordura; maior acesso das lipases aos triglicérides, porque componentes originais da membrana não são suficientes para recobrir os novos glóbulos; a cor se torna mais branca em razão de maior efeito dispersante da luz; diminuição da tendência à auto-oxidação, porque os cátions localizados na membrana, especialmente o cobre, migram para o soro; homogeneização dos ingredientes adicionados à formulação, como os espessantes e os açúcares (ORDÓÑES, 2005).

O leite homogeneizado apresenta um gel mais firme devido à mudança na capacidade de retenção de água das proteínas do soro, causada pela sua desnaturação. Desta forma, é obtido um produto mais cremoso, de melhor sabor e digestibilidade (TAMIME e ROBINSON, 1991; OLIVEIRA e CARUSO, 1996; LONGO, 2006).

2.3.4 Tratamento térmico

Após a homogeneização, o leite sofre tratamento térmico que envolve temperatura e tempo bem mais elevados que aqueles usualmente empregados na pasteurização do leite destinado ao consumo direto. Podem ser utilizados os binômios 80 °C / 30 min.; 85 °C / 9 min. ou 90 °C / 3 min. (CHANDAN et al., 2006). O tratamento térmico abaixo do indicado resulta em desnaturação incompleta, enquanto tratamentos térmicos acima do indicado resultarão em perda da funcionalidade pela excessiva desnaturação das proteínas (HANSEN, 2000). O principal objetivo desta etapa é destruir os microorganismos patogênicos e desnaturar parcialmente as proteínas, melhorando as propriedades do leite como substrato para as bactérias da cultura láctica. A desnaturação

assegura que o coágulo do produto fermentado seja firme devido à precipitação das proteínas durante o processo de acidificação. Também são inativados compostos que possam ter efeito inibidor sobre as culturas lácticas, enzimas indesejáveis que poderiam desenvolver sabor e odor de ranço e liberação do oxigênio dissolvido (TAMIME e ROBINSON, 1991; OLIVEIRA e CARUSO, 1996; LONGO, 2006).

O tratamento térmico prolongado pode favorecer a reação de Maillard em que ocorre a condensação entre açúcares redutores, como a lactose, e grupos amina, como aminoácidos, caseínas, lactoalbuminas e lactoglobulinas, peptídeos, na proporção de 1:1. Essa reação é extremamente desejável em alguns alimentos como café, cacau, carne cozida, pão, pois confere o sabor, aroma e cor característicos aos mesmos. Porém, é extremamente indesejável em outros, como leite em pó, ovos e derivados desidratados, pois pode resultar na perda de nutrientes como aminoácidos essenciais. Apesar de ser uma reação muito estudada, o seu mecanismo ainda não foi totalmente elucidado em razão de sua complexidade (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

A velocidade da reação de Maillard é máxima em pH próximo a neutralidade (pH 6 - 7). Em meio ácido, predomina a forma protonada do grupo NH_2 de aminoácidos, eliminando a nucleofilicidade desse grupo e, assim, retardando a reação com o grupo carbonila do açúcar. Em meio alcalino, ocorre rápida degradação de carboidratos (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

2.3.5 Fermentação e rompimento do coágulo

O resfriamento subsequente a 40/45 °C permite que se adicione a *cultura starter*, que pode variar de 0,5 a 3 % do volume de leite, dependendo da fonte utilizada. Após a inoculação, a mistura deve ser incubada em tanques apropriados ao iogurte batido; a temperatura de incubação normalmente é escolhida dentro da faixa de 40 a 45 °C e a fermentação é processada até que se atinja pH em torno de 4,5 a 4,6. Concluída a fermentação, bate-se o coágulo para obter a consistência desejada (TAMIME e ROBINSON, 1991; OLIVEIRA e CARUSO, 1996; ORDÓÑES, 2005).

Após a inoculação o *S. thermophilus* é o primeiro a desenvolver-se. Seu crescimento promove a produção dos ácidos fórmico, pirúvico e principalmente o lático. Com isso, ocorre a acidificação e abaixamento do potencial oxiredutor do meio, estimulando assim o desenvolvimento do *L. bulgaricus*. Este, por sua vez, passa a crescer, reduzindo ainda mais o pH e liberando ao meio aminoácidos como a glicina, histidina e valina que estimulam o crescimento do *S. thermophilus*. A contínua redução do

pH inibe o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus* e, por ser mais resistente à acidez, aumenta em número sua população. No final do processo, existe um número bem maior de *L. bulgaricus* do que *S. thermophilus*. Ao pH 4,3, ambas bactérias passam a ser inibidas. O *Lactobacillus* é o principal produtor de compostos responsáveis pelo sabor e o aroma característico do iogurte, como acetaldeído, diacetil, entre outros (TAMIME e ROBINSON, 1991; MARTIN, 2002; LONGO, 2006).

2.3.6 Resfriamento e acondicionamento

Atualmente recomenda-se que o resfriamento do iogurte seja realizado em fases sucessivas para evitar a retração em excesso do coágulo, que favorece a sinérese. O resfriamento é feito primeiro de forma rápida, até 30 °C, para iogurtes com frutas ou aromatizados. É nesta etapa que se adiciona a polpa e/ou corantes, aromatizantes, e saborizantes. Depois, mais lentamente, a 20 °C, e mais tarde a 14,5 °C, antes de chegar finalmente a uma temperatura de 2 a 4 °C. Assim consegue-se a melhor textura, sem causar acidificação excessiva. O resfriamento antes do envase é realizado mediante trocadores de calor de placas ou tubulares. Estes últimos causam menor dano à estrutura do coágulo, proporcionando um produto ligeiramente mais viscoso (BEHMER, 1985; TAMIME e ROBINSON, 1991; OLIVEIRA e CARUSO, 1996; LONGO, 2006; ORDÓÑES, 2005).

A refrigeração do iogurte interrompe o crescimento das bactérias lácticas, que mantém, no entanto, uma certa atividade metabólica. Devido a este fato, o produto apresenta tendência a aumentar a acidez durante o armazenamento enquanto a sua viscosidade diminui. O iogurte fabricado em boas condições de higiene e mantido sob temperatura de 2 a 8 °C permanece comestível por aproximadamente 20 a 30 dias. (TAMIME e ROBINSON, 1991). De uma forma geral, a refrigeração de alimentos, quer sejam frescos ou processados, permite aumentar a vida útil deles para períodos relativamente longos, com repercussão mínima nas suas características nutritivas e sensoriais. A manutenção da cadeia do frio para os iogurtes é de suma importância. Sob temperaturas de 2 a 8 °C, as bactérias lácticas são mantidas em estado latente, inibindo quase totalmente a sua atividade fermentativa. Com a quebra da cadeia do frio, estas irão intensificar sua atividade aumentando a acidez do meio e prejudicando sua viabilidade, além de comprometer as propriedades sensoriais como sabor, odor, textura e consistência através da aceleração das atividades químicas e enzimáticas (LONGO, 2006; SILVA e FREITAS, 2010).

As embalagens de iogurte evoluíram desde as clássicas de vidro até as atuais de materiais plásticos, sobretudo polietileno de alta densidade e poliestireno. Estas são quimicamente inertes, não possuem sabor nem odor, apresentam boa resistência a impactos, são leves e de grande facilidade para o fechamento térmico (TAMIME e ROBINSON, 1991; LONGO, 2006).

2.4 USO DE ESPESSANTES EM IOGURTES

Os espessantes são representados pelos polissacarídeos que possuem a capacidade de modificar e controlar a mobilidade da água em sistemas alimentícios após dissolverem-se ou dispersarem-se. São formados por polímeros de monossacarídeos. A maioria contém unidade glicosil que, em média, possui três grupos hidroxila. Cada um desses grupos tem a possibilidade de formar ligações de hidrogênio com uma ou mais moléculas de água. Além disso, o átomo de oxigênio do anel e o átomo de oxigênio que liga um anel de açúcar ao outro também podem formar ligações de hidrogênio com a água. Estes polímeros possuem cadeia longa, alto peso molecular e podem ser extraídos de algas marinhas, sementes, exsudados de árvores e de colágeno animal. Alguns são produzidos por síntese microbiana e outros pela modificação de polissacarídeos naturais (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; BELITZ, et al., 2009; FENNEMA, 2010).

Segundo TAMIME e ROBINSON (1991), as concentrações em massa de estabilizantes recomendadas para o iogurte são: 0,02 a 0,2 % para pectinas e amidos modificados; 0,2 a 0,5 % para agar - agar, goma de alfarroba, goma guar, alginatos, gelatina e carragenatos; 1 a 2 % para amidos. A legislação Brasileira estabelece adição no máximo de 1 % do produto final para amidos e/ou amidos modificados (BRASIL, 2007), 1 % de pectina, pectina amidada e gelatina e de 0,5 % (m/m) isolados ou combinados para os demais espessantes (BRASIL, 2007). Esta limitação se dá em função do alto poder de hidratação dos espessantes, principalmente das gomas, que possibilita a adição de água ao iogurte sem perda de viscosidade, porém com grande prejuízo ao valor nutricional. Um gel de polissacarídeo, embora não contenha 1 % de polímero, pode conter até 99 % de água em volume (BELITZ, et al., 2009; FENNEMA, 2010).

O cálculo da quantidade necessária de estabilizante/espessante deve ser considerado cuidadosamente, porque se a concentração for muito baixa, não exercerá suas propriedades funcionais e se for excessivamente alta, pode levar ao aparecimento de defeitos de aspecto e textura (EARLY, 2000). As moléculas dos espessantes são capazes de formar uma rede mediante ligações com os componentes do leite,

principalmente os íons cálcio, devido a presença de grupos carregados negativamente, como, por exemplo, os grupos carboxílicos (EARLY, 2000).

A utilização de espessantes nas formulações de iogurtes visa manter a viscosidade durante o processo de elaboração, modificar a estrutura e a textura, evitar a sinérese, especialmente durante o armazenamento e transporte, facilitar a suspensão das partículas de frutas e podem influenciar na cremosidade e untuosidade do produto (TAMIME e ROBINSON, 1991; EARLY, 2000).

Com exceção dos amidos, os espessantes, principalmente os celulósicos, podem ser considerados fontes de fibras. Estes desempenham importantes funções, como contribuir para o aumento do peristaltismo e bolo fecal, absorver possíveis metabólitos tóxicos produzidos pela microbiota intestinal ou provenientes da alimentação, além de retardar a hiperglicemia pós-prandial, o que é recomendável para pessoas portadoras de diabetes ou intolerância a lactose (TAMIME e ROBSON, 1991; FENNEMA, 2010).

A goma carragena é extraída de algas *Chondrus crispus*, também conhecida como musgo irlandês, que cresce de forma abundante ao longo da costa do Atlântico Norte, incluindo Estados Unidos da América, Canadá e Península Ibérica. É uma mistura de, no mínimo, cinco polímeros distintos: κ (kappa), λ (lâmbida), μ (um), ι (iota) e ν (nu). Dessas frações, a κ e a λ são as mais importantes em alimentos. O peso molecular e a estrutura das frações determinam suas propriedades funcionais e a proporção das diferentes frações varia com a espécie da alga e hábitat. As carragenas são misturas de várias galactanas sulfatadas unidas por ligações alternadas α -1,3 e β -1,4 (Figura 3). A habilidade da carragena de estabilizar o leite é dependente do número e da posição de grupos sulfatos na sua estrutura. O ânion carragenato reage com as proteínas (complexo proteína - carragenato) e forma uma dispersão coloidal estável (BOBBIO e BOBBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

A carboximetilcelulose (CMC) é ampla e extensivamente usada como goma para alimentos em função de suas propriedades reológicas e ausência de toxicidade. O tratamento da polpa de madeira purificada, com hidróxido de sódio 18 %, produz celulose alcalina. Quando esta reage com o sal sódico do ácido cloroacético, forma-se o sal sódico do éter carboximetílico (Figura 3). Ela dissolve-se em água e forma um fluido não Newtoniano, cuja viscosidade diminui com o aumento de temperatura. As soluções são estáveis na faixa de pH de 5 a 10, com estabilidade máxima na faixa de pH de 7 a 9. A CMC forma sais solúveis com cátions monovalentes, mas a solubilidade diminui na

presença de cátions bivalentes e os cátions trivalentes podem provocar sua precipitação (BOBBIO e BOBBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

A pectina comercial é obtida da casca de frutas cítricas e do bagaço de maçã. São polímeros compostos principalmente por unidades de α -D-ácidos galacturônicos ligados por ligações glicosídicas α -1,4, encontrados na lamela média das células vegetais (Figura 3). O grupo das substâncias pécticas abrange substâncias com diferentes propriedades e difíceis de serem separadas umas das outras. Um aspecto que as diferencia é o grau de metoxilação: grupos com metilas esterificados ao grupo carboxílico da molécula. Os graus de metoxilação influenciam fortemente as propriedades funcionais, tais como: solubilidade, capacidade de gelificação, temperatura e condições de gelificação das pectinas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

Entre as gomas naturais comercializadas, a goma guar produz a mais alta viscosidade sendo pouco afetada pelo pH e por sais, entretanto, grandes quantidades de sacarose podem reduzir sua viscosidade. Apresenta sinergismo com outras gomas. É uma galctomanana que contém unidades de manose e galactose unidas por ligações β -1,4 e ramificações de uma única unidade ligadas na posição O-6 (Figura 3). É obtida pela moagem do endosperma de sementes de *Cyamosis tetragonolobus* (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular produzido pelas bactérias da espécie *Xanthomonas campestris*. Foi a primeira goma produzida em escala industrial por fermentação. Apresenta uma estrutura similar à celulose, contendo grupos de oligossacarídeos ligados a ácido pirúvico (Figura 3). É estável em uma ampla faixa de pH e na faixa de temperatura de 0 a 100 °C. É compatível com muitos sais e ácidos presentes em alimentos e interage de forma sinérgica com a goma guar (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

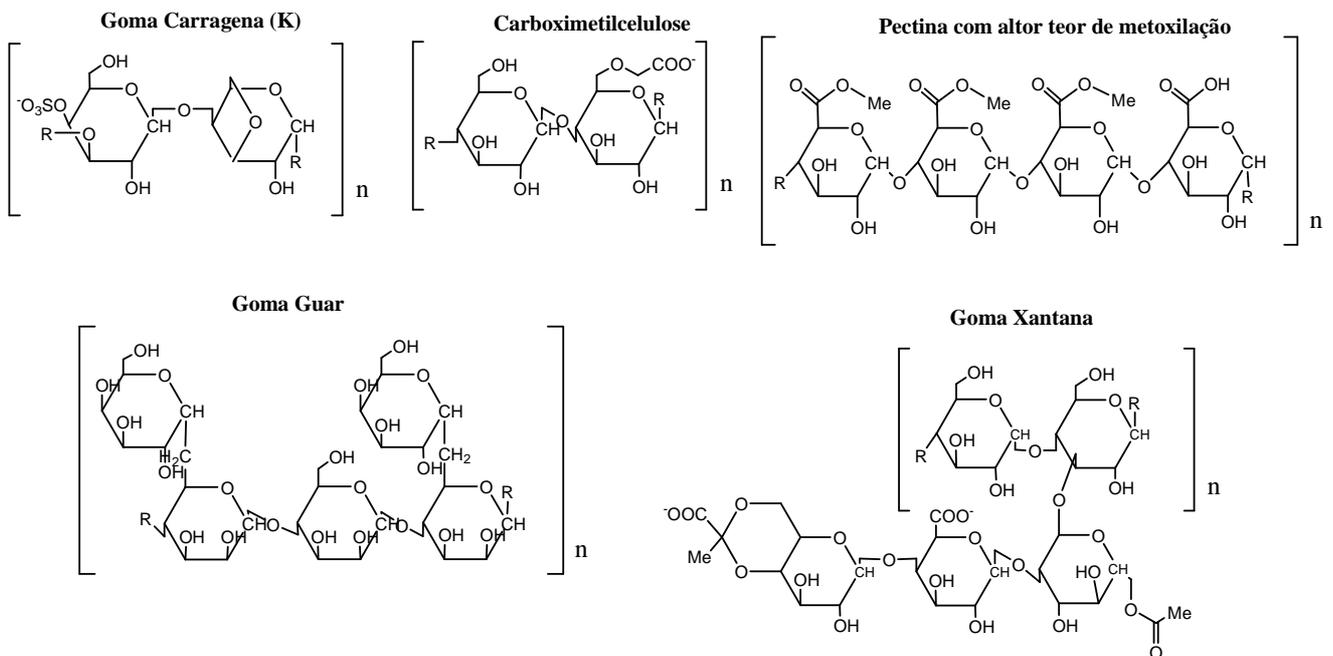


Figura 3 – Estrutura dos monômeros dos espessantes goma carragena, carboximetilcelulose, pectina, goma guar e goma xantana (RIBERIO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010)

As características químicas, físicas e os aspectos nutricionais do amido o destacam dos demais carboidratos. Ele é a reserva alimentar predominante das plantas, fornecendo 70 - 80 % das calorias de consumo humano no mundo, sendo a matéria prima alimentar mais abundante e barata disponível (BOBBIO e BOBBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010). É encontrado na natureza em partículas características denominadas grânulos. Estes são constituídos de moléculas de amilose e amilopectina dispostas de modo radial, que apresentam regiões cristalinas e não cristalinas em camadas alternadas (Figura 4) (BOBBIO e BOBBIO, 2003; DENARDIN e SILVA, 2009; FENNEMA, 2010).

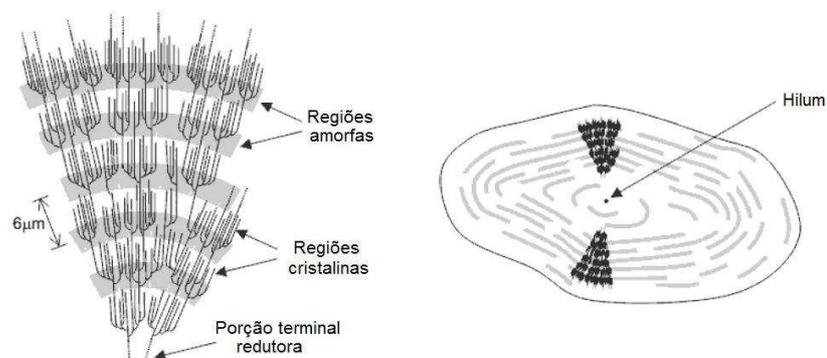


Figura 4 – Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido (BELITZ et al., 2009)

A amilose é essencialmente uma cadeia linear de α -D-glicoses unidas em ligações glicosídicas α -1,4, contendo de 350 a 1000 unidades apresentando estrutura helicoidal, α -hélice, formada por ligações de hidrogênio entre os radicais hidroxilas das moléculas de glicose (Figura 5). Por serem helicoidais, com o interior hidrofóbico, as cadeias de amilose são capazes de formar complexos de inclusão com porções hidrofóbica lineares de moléculas que se ajustam ao tubo, como os ácidos graxos e o triiodeto (I_3^-) (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; DENARDIN e SILVA, 2009; FENNEMA, 2010).

A amilopectina apresenta uma estrutura ramificada, constituída por cadeias lineares de 20 a 25 unidades. Essas cadeias estão unidas entre si através de ligações glicosídicas α -1,6 (Figura 5). A amilopectina é constituída por 10 a 500 mil unidades de glicose e apresenta uma estrutura esférica (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

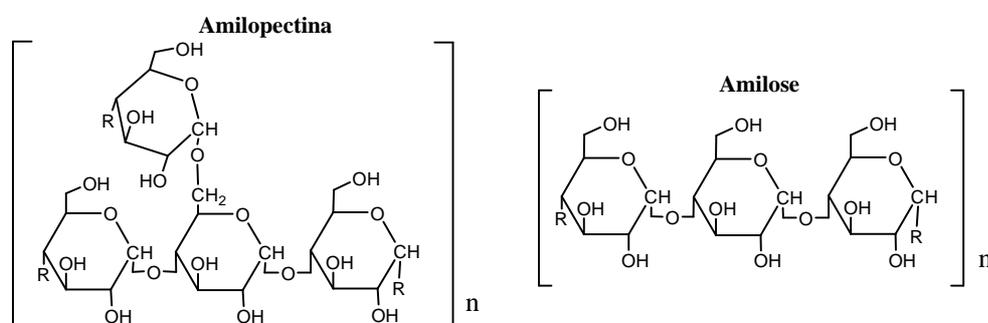


Figura 5 – Estrutura dos monômeros de amilopectina e amilose (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010)

A proporção entre amilose/amilopectina varia com a espécie, grau de maturação e manipulação genética dos vegetais. Dependendo do teor de amilose, o amido pode ser classificado em: amido comum, ceroso ou baixo teor de amilose (*waxy*) e com alto teor de amilose (*high-amylose*) e apresenta aplicações distintas na indústria. O amido de milho normal se caracteriza pela formação de um gel consistente e é bastante utilizado em sopas desidratadas e molhos que requerem viscosidade a quente. Para produtos que necessitam de armazenamento sob refrigeração é indicado o amido ceroso, que apresenta maior estabilidade a baixas temperaturas devido ao fato de praticamente não possuir amilose. Os géis feitos com esses amidos são fracos e altamente viscosos. Os amidos com alto teor de amilose gelificam e formam filmes com facilidade, sendo utilizados principalmente em produtos como os *nuggets*, aos quais confere crocância e previne a penetração excessiva de óleo durante a fritura (BELITZ, et al., 2009; WEBER et al., 2009).

Os amidos comerciais são obtidos a partir de sementes de cereais, principalmente de milho, trigo, arroz, tubérculos e raízes, em especial batata e mandioca (WEBER et al., 2009; FENNEMA, 2010).

Os amidos modificados são produtos obtidos a partir do amido com a finalidade de atender às necessidades específicas da indústria de alimentos, como melhorar as características das massas e dos géis devido ao aumento de resistência ao calor, ao cisalhamento e à acidez (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; BELITZ et al., 2009).

As modificações podem ser de um só tipo, porém, com frequência os amidos são preparados pela combinação de dois, três e, algumas vezes, quatro processos, que podem ser químicos ou físicos. As modificações químicas compreendem as reações de hidrólise ácida, com formação de dextrinas, oxidação, esterificação, eterificação e formação de ligações cruzadas. As modificações físicas compreendem a alteração da estrutura cristalina pelo processo de pré-gelatinização, que causa ruptura da ordem molecular no interior dos grânulos, evidenciado pelo inchaço irreversível do grânulo, perda da birrefringência e da cristalinidade. Este processo produz uma goma viscosa, constituída de uma fase contínua e amilose solubilizada e/ou moléculas de amilopectina, e uma fase descontínua de grânulos remanescentes. Em particular, o amido é adicionado ao leite que será destinado à produção do iogurte antes do processamento térmico, permitindo assim a formação do gel (EARLY, 2000; BOBBIO e BOBBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; BELITZ, et al., 2009; FENNEMA, 2010).

As moléculas de amido, assim como todas as moléculas de polissacarídeos, são despolimerizadas por ácidos a quente devido à presença de carbono anomérico. A hidrólise química dos polissacarídeos é influenciada por vários fatores, tais como pH, temperatura, configuração anomérica (α é mais susceptível que β), forma e tamanho do anel. De uma forma geral a sensibilidade a hidrólise diminui com o aumento das associações intermoleculares. As ligações glicosídicas são mais facilmente quebradas em meios ácidos que alcalinos. A hidrólise das ligações glicosídicas ocorre de forma aleatória para produzir, inicialmente, fragmentos muito grandes e, no final do processo, moléculas menores como as dextrinas e monômeros de glicose (Figura 6). Na formação de dextrinas pode ocorrer o fenômeno de reversão em que as cadeias de ligações glicosídicas lineares (α -1,4) são transformadas em cadeias menores e ramificadas cuja ligação α -1,6 predomina. A extensão destas modificações varia de acordo com o tipo de amido utilizado e o ambiente químico da reação (BRIMHALL, 1944; THOMPSON e WOLFROM, 1958; RIBEIRO E SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

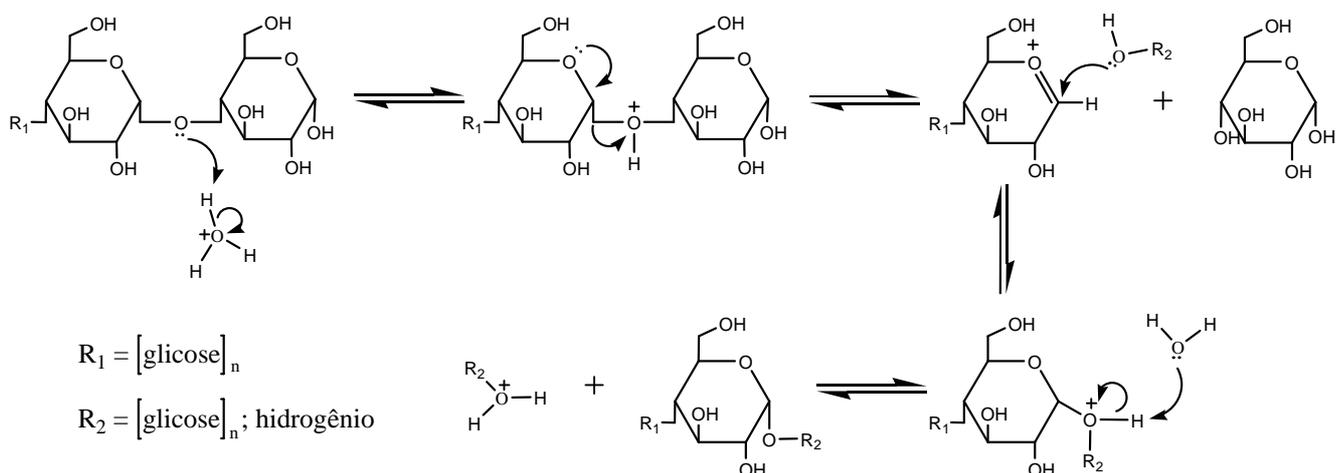


Figura 6 – Mecanismo de hidrólise do amido em meio ácido formando glicose e dextrinas (BRIMHALL, 1944; CAREY, 2000; BRUICE, 2006)

3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

3.1 MÉTODO DE LANE-EYNON

Aldoses são açúcares redutores, desde que possuam um aldeído funcional de cadeia aberta. Em soluções alcalinas as cetoses se interconvertem em aldoses por meio de um intermediário enólico, fenômeno conhecido como tautomeria. De uma forma geral, qualquer carboidrato que contenha uma função hemiacetal livre é um açúcar redutor (CAREY, 2000; BOBBIO e BOBBIO, 2003).

Os açúcares redutores em soluções alcalinas são capazes de reduzir sais de cobre, prata, bismuto e mercúrio a compostos de valência menores ou ao estado metálico (CECCHI, 2003; BELITZ, et al. 2009).

A solução de sulfato de cobre (Cu^{2+}) complexada com tartarato em meio básico (Reagente de Fehling) é capaz de oxidar aldeídos alifáticos ao seu ácido carboxílico correspondente. A formação de um precipitado vermelho tijolo de óxido de cobre ($\text{Cu}_2\text{O}_{(s)}$) é indicativo de teste positivo para aldeídos (Figura 7). O químico alemão H. V. Fehling foi o primeiro pesquisador a indicar as proporções adequadas dos reagentes (CAREY, 2000; DEMIATE et al., 2002).

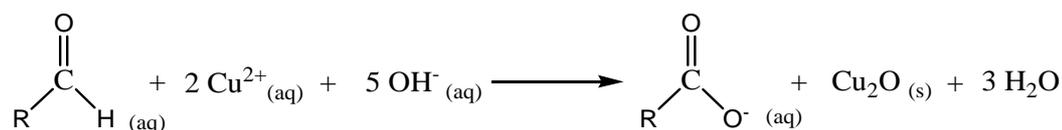


Figura 7 – Esquema da reação de oxidação dos aldeídos presente nas moléculas de açúcares através da redução do Cu^{2+} a Cu^+ (CAREY, 2000)

Usualmente, as reações coloridas baseadas nas propriedades redutoras dos açúcares não são específicas e necessitam de remoção de substâncias interferentes para posterior identificação e quantificação. Essas substâncias podem ser pigmentos solúveis, substâncias opticamente ativas (aminoácidos etc.), constituintes fenólicos, lipídeos e proteínas. Os interferentes podem ser separados por descoloração, tratamento com resina trocadora de íons, ou clarificação com vários agentes clarificantes. A função desses clarificantes é de precipitar as substâncias que podem interferir na medida física ou química dos açúcares. Para os lácteos utilizam-se as soluções de ferrocianeto de potássio e sulfato de zinco, em que a presença de metais pesados precipitam substâncias coloidais, por exemplo, as proteínas, ou o precipitado formado na reação com metais pesados, como ferricianeto de zinco, combina e co-precipita as proteínas. Para separar os açúcares solúveis do precipitado, utiliza-se papel de filtro, o qual retém a borra gerada e a fração lipídica (CAREY, 2000; CECCHI, 2003).

O método de Lane-Eynon, descrito na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2006), baseia-se na adição a um erlenmeyer da solução de carboidratos a ser quantificada até próximo ao ponto de viragem teórico e 5 mL de cada uma das soluções de Fehling A (solução de cobre) e Fehling B (solução alcalina de tartarato). Submete-se o conjunto ao aquecimento até atingir o ponto de ebulição, adiciona-se a solução de azul de metileno a 2 % e titula-se vagarosamente a solução e carboidratos até que observe o ponto de viragem. O azul de metileno é um indicador de oxi-redução que muda de azul para incolor, porém, como existe o precipitado de óxido de cobre, a cor observada na viragem é de azul para vermelho-tijolo. Existem dois fatores importantes a serem seguidos nesse método para maior exatidão dos resultados (DEMIATE et al., 2002; CECCHI, 2003; AOAC, 2006; BRASL, 2006):

1. A solução deve ficar constantemente em ebulição durante a titulação, porque o Cu_2O formado pode ser novamente oxidado pelo O_2 do ar, mudando a cor novamente para azul;
2. A titulação deve levar no máximo 3 minutos, porque pode haver caramelização dos açúcares com o aquecimento prolongado.

O aquecimento de soluções de carboidratos a temperaturas próximas ao ponto de ebulição da água, em particular da sacarose e açúcares redutores, em ausência de compostos nitrogenados, promove um complexo grupo de reações envolvidas na caramelização. A reação é facilitada por pequenas quantidades de ácidos e alguns sais. Ainda que não envolva a reação entre carboidratos e proteínas, a caramelização é similar à reação de Maillard. O produto final, o caramelo, contém uma mistura complexa de compostos poliméricos formados a partir de compostos cíclicos insaturados e de alto peso molecular. O aquecimento causa desidratação da molécula de açúcar, por um mecanismo que envolve enolização e β -eliminação, com a introdução de ligações duplas ou a formação de anéis anidros. São formados então os intermediários furanos e hidroximetilfurfural (HMF). Os anéis insaturados podem condensar formando polímeros de coloração marrom, as melanoidinas e os caramelos. As frações de baixo peso molecular presentes na mistura caramelizada contêm, além do açúcar que não reagiu, ácido pirúvico e aldeídos (BOBBIO e BOOBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS PELO TESTE DO LUGOL

O teste do Lugol, também conhecido como solução/reagente de Lugol, foi elaborado pela primeira vez em 1829 como uma solução elementar de iodo e iodeto de potássio em água pelo pesquisador francês J.G.A. Lugol (NEUZIL, 2002).

A solução de Lugol é composta por 10 g de iodeto de potássio e 5 g de iodo dissolvidos em 100 mL de água destilada. O iodeto de potássio é adicionado para aumentar a solubilidade do iodo por formação do ânion triatômico I_3^- . O iodo pode se polimerizar e formar o I_5^- (Figura 8) (CAREY, 2000; MORITA e ASSUMPCÃO, 2007).

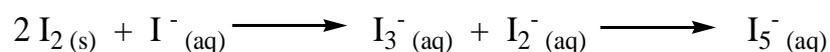


Figura 8 – Reação de polimerização do iodo com iodeto para formação dos ânions I_3^- e I_5^- (CAREY, 2000)

Atualmente a solução de Lugol é utilizada como antiséptico, desinfetante, reagente de rotina para detecção de amido, quantificação de amilose, em exames de colposcopia, coloração de GRAM, investigação de neoplasias bucais, entre outros (KNUTSON, 1999; NEUZIL, 2002; SIMÕES, 2009; GONDIM, et al. 2011; WANG et al., 2011).

O complexo de inclusão azul formado pelo iodo com amilose (Figura 9) é normalmente utilizado para mensurar o conteúdo de amilose nos amidos por

espectrofotometria e ou potenciometria. A diferenciação entre amido comum, ceroso e com alto teor de amilose é de grande importância na indústria alimentícia devido às suas várias e específicas aplicações. Nos métodos espectrofotométricos existem variações em termos de absorvidade e comprimento de onda em função do comprimento de onda máximo de absorção utilizado ($\lambda_{m\acute{a}x}$), dependendo do grau de polimerização e da estrutura das moléculas de amilose, que determina a composição do complexo da cadeia de iodo com as hélices da amilose (KNUTSON, 1999; LIU et al., 2009; WEBER et al., 2009).

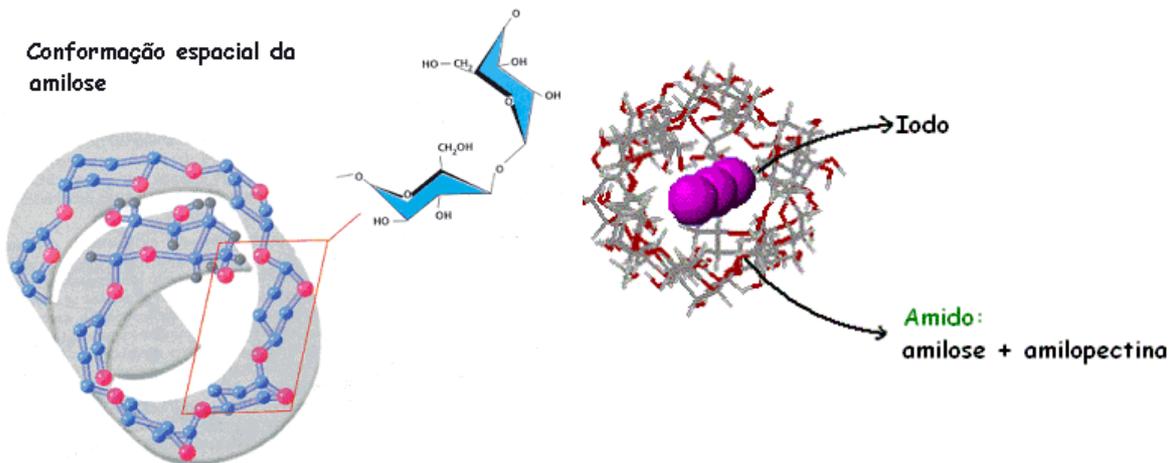


Figura 9 – Representação esquemática da conformação espacial da amilose e do complexo de inclusão I_3 -amido (SOUZA e NEVES, 2011)

Estudos demonstraram que a estrutura primária de cadeia de poliiodo é composta por subunidades I_3^- e I_5^- , combinadas para formar quatro cadeias de poliiodo dominante (I_9^{3-} , I_{11}^{3-} , I_{13}^{3-} e I_{15}^{3-}), que apresentam diferentes espectros de absorção com complexo de amilose. As absorções máximas destes espectros são de 480 - 510, 610 - 640, 690 - 720 e 730 - 760, respectivamente. A Figura 10 evidencia os espectros de absorção produzidos por fontes amiláceas com diferentes tamanhos das cadeias glicosídicas α -1,4. Estas produzem espectros distintos, constantes, significativos e quantificáveis (KNUTSON, 1999; WANG et al., 2011).

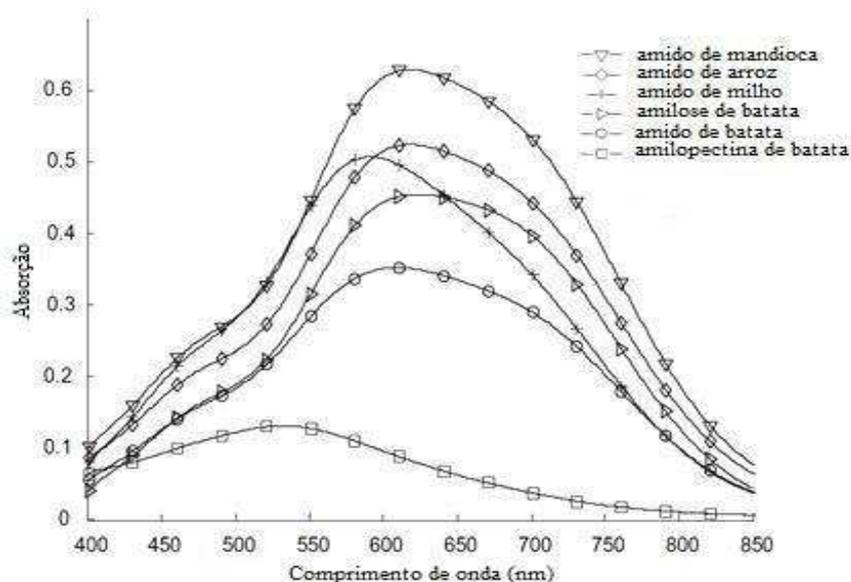


Figura 10 – Espectro de absorção de complexos de iodo com diferentes fontes amiláceas (WANG et al., 2011)

4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação pode ser definida como a confirmação da adequação de um determinado método para o propósito de uso (*fitness for purpose*). Trata-se da comprovação, por meio de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (ABNT, 2005a).

Ter validado um método significa que o procedimento, que inclui toda a sequência analítica, é aceito como correto. O uso de testes estatísticos adequados torna as decisões menos subjetivas e o processo de validação de métodos analíticos mais fácil de demonstrar e implementar (IUPAC, 2002; SILVA e ALVES, 2006).

Além dos procedimentos de validação para garantir a confiabilidade da medição, é necessário que o laboratório disponha de procedimentos operacionais padrões, que devem ser conduzidos por pessoal habilitado, utilizando equipamentos calibrados, instalados e mantidos em local que apresentem condições ambientais adequadas, dentre outros requisitos descritos na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (ABNT, 2005b; INMETRO, 2005; FILHO et al., 2011).

Vários são os documentos que podem ser utilizados como referência na estruturação de procedimentos de validação intralaboratorial de métodos analíticos. No

Brasil, o documento orientativo de referência é o DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (INMETRO, 2010). Uma abrangente revisão foi elaborada por SOUZA (2007) a fim de propor um protocolo embasado em normas nacionais e internacionais e critérios estatísticos. Os principais parâmetros estudados na validação intralaboratorial de métodos quantitativos são: linearidade, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, exatidão (veracidade), precisão e limites de detecção e quantificação. SOUZA (2007) e o INMETRO (2010) definem os parâmetros conforme abaixo:

- *linearidade*: habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma faixa de concentração. A Faixa linear de trabalho é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio, ou seja, o intervalo de concentração do analito no qual o método pode ser considerado como validado.
- *sensibilidade*: demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de calibração, obtida por regressão linear, e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. Varia em função do analito e da técnica de detecção utilizada.
- *efeito de matriz*: possibilidade de compostos interferentes presentes na matriz do analito estudado potencializar ou reduzir o sinal e magnitude do efeito do analito.
- *seletividade*: grau no qual um método pode quantificar o analito acuradamente na presença de interferentes.
- *exatidão*: proximidade de concordância entre resultados de um ensaios com o valor de referência aceito para a propriedade medida.
- *precisão*: proximidade de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos sob condições estipuladas. Usualmente especificado em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns são a repetitividade e a reprodutibilidade.
- *repetitividade*: grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. Expressa quantitativamente em termos de característica de dispersão dos resultados.

- *reprodutibilidade*: grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.
- *limite de detecção*: menor quantidade ou concentração de analito em uma amostra que pode ser confiavelmente distinguida de zero.
- *limite de quantificação*: menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO 9000:2005. Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 35 p. (a)
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p. (b)
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Desenvolvido por ANVISA, 2003. *Programa Nacional da Qualidade dos Alimentos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/index.html>. Acesso em: 20 jan. 2012.
- AOAC (Association Official Methods of analysis AOAC International), *Official Methods of Analysis*. 18 ed. Washington: AOAC, 2006. met. 44.1.15, 44 p.
- BASTIANI, M. I. D. *Logurte adicionado de concentrado protéico de soro de leite e farinha de linhaça: desenvolvimento, qualidade nutricional e sensorial*. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, 2009. 97 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- BEHMER, M. L. *Laticínios: leite, manteiga, queijo, caseína e instalações, produção, industrialização, análise*. 15 ed. São Paulo: Nobel, 1985. 322 p.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4 ed. Berlin: Springer, 2009. 1070 p.
- BOBBIO F. O.; BOBBIO, F. A. *Introdução à química de alimentos*. 3 ed. Campinas: Varela, 2003. 238 p.
- BRASIL. *Constituição da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF: Senado Federal, 1988.

- BRASIL, Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial*, Brasília, 19 setembro 1990.
- BRASIL, Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial*, Brasília, 27 janeiro 1999.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde. *Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação aos consumidores; educação para o consumo saudável*. Brasília: Athalaia, 2001. 57 p.
- BRASIL, Ministério da Saúde – MS. *Política Nacional de Alimentação e Nutrição*. 2 ed. Brasília, 2003 (a).
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC n. 360 de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dezembro, 2003 (b).
- BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n. 2031 de 23 de setembro de 2004. Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. *Diário Oficial*, Brasília, 24 setembro 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68 de 12 de dezembro de 2006. Aprova os métodos Analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Anexo V Métodos Quantitativos - Glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e amido (método Lane-Eynon). *Diário Oficial*, Brasília, 14 dezembro 2006.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial*, Brasília, 24 outubro 2007, p. 5.
- BRASIL, Ministério da Saúde – MS. *Política Nacional de Alimentação e Nutrição*. 3 ed. Brasília, 2011.
- BRIMHALL, B. Structure of pyrodextrins. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1944.
- BRUCE, P. Y. *Química orgânica*. 4 ed. vol. 1. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. 590 p.
- CAREY, F. A. *Inorgânica Chemistry*. 4 ed – International Edition. Boston: MC Graw Hill, 2000. 1270 p.
- CARVALHO, L. A. *Sistema de Produção de Leite - Cerrado*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2002. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/index.html>. Acesso em: 11 jan. 2010.

- CECCHI, H. M. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2 ed. Campinas: Unicamp, 2003. 207 p.
- CHAGAS, T. V. B.; FIGUEIREDO, F. J.; NASCIMENTO S. R. MACIEL, M. I. *Avaliação da rotulagem de iogurtes desnatados e parcialmente desnatados*. Congresso Brasileiro de Economia Doméstica, 20, 2009, Fortaleza. Resumo expandido Congresso Brasileiro de Economia Doméstica, 20, Fortaleza: CBED, 2009.
- CHANDAN, R. C.; WHITE, C. H.; KILARA, A.; HUI, Y. H. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Iowa: Blackwell, 2006. 364 p.
- DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. *Exact and Soil Sciences, Agrarian S. and Engineering*, n.8, v. 1, p. 65 – 78, 2002.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural, Santa Maria*, n. 3, v. 39, p. 945 – 954, 2009.
- DIAS, F. F. G.; PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Avaliação da rotulagem nutricional obrigatória em embalagens segundo o modelo padrão da ANVISA. *Revista Analytica*. n. 34, p. 56 – 67, 2008.
- EARLY, R. *Tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia, 2000. 459 p.
- FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. 4 ed. University of Wisconsin: Marcel Dekker, 2010. 900 p.
- FERREIRA, C. L. L. F. *Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos*. Viçosa: Imprensa Universitária – Universidade Federal de Viçosa, 2001. 112 p.
- FILHO, O. B.; PRADA, R. R.; MENEGHESSO, C.; LANÇAS, F. M. Desvendando a medição nos ensaios químicos: 1 - A curva analítica ou de calibração. *Revista Scientia Chromatographica*, v. 3 n. 3, 251-261, 2011.
- FUNED. Fundação Ezequiel Dias. *Manual de Coleta de Amostras*. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br> Acesso em: 20 dez. 2011.
- GONDIM, C. S.; COELHO, O. A. M.; ALVARENGA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Validação de método qualitativo para pesquisa de adição de amido em leite. SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 9, 2011, Campinas. *Resumos do SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS*, 9, Campinas: SLACA, 2011.

- GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de produtos lácteos fermentados. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, n. 69, v. 1, p. 62-68, 2010.
- GRANT, W. B. Milk and other dietary influences on coronary heart disease. *Alternative Medicine Review*, v. 3 n. 4, p. 281- 294, 1998.
- HANSEN, C. *Preocupações e defeitos em iogurtes batidos*. Cristian Hansen, n. 55 p. 2-3, 2000.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Em 30 anos, importantes mudanças nos hábitos de consumo dos brasileiros*. Comunicação Social, 2004. Disponível em::
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=171&id_pagina=1> Acesso em: 30 out. 2011.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Tabela 23 – Produção de leite no período de 01/01 a 31/12 e participações relativa e acumulada no total da produção, segundo as Unidades da Federação e os 20 municípios com as maiores produções, em ordem decrescente – 2010, 2010b*. Disponível em <<http://www.ibge.com.br>> Acesso em 20 dez. 2011.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry); THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.
- KNUTSON, C. A. Evaluation of variations in amylose-iodine absorbance spectra. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, p. 65-74, 1999.
- LEDOUX, M.; CHARDIGNY, J. M.; DARBOIS, M. SOUSTRE, Y.; SÉBÉDIO, J. L.; LALOUX, L. Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acids (CLA) isomers. *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 18, p. 409-425, 2005.
- LIMA, T. A. S. *Gerência de Inspeção e Controle de Riscos de Alimentos – GICRA/ANVISA*. Brasília, 2009. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 20 jan. 2012.
- LIU, J.; FEI, L.; MALADEN, M.; JAMAKER, B. R.; ZHANG, G. Iodine binding property of a ternary complex consisting of starch, protein, and free fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 351–355, 2009.

- LONGO, G. *Influência da adição de lactase na produção de iogurtes*. Curitiba: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFP, 2006, 89p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- MAIA, L. H. S. *Características de identidade e qualidade e estabilidade de manteigas tipo extra produzidas no Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia da UFRRJ. 1987, 164p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- MARTIN, A. F. *Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz da USP, 2002. 35 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- MINAS GERAIS, Secretaria De Estado Da Saúde De Minas Gerais. Superintendência De Vigilância Sanitária. *Alimentos - Procedimentos básicos*. Belo Horizonte. 1997.
- MINAS GERAIS, Secretaria Estadual de Saúde. *Compêndio do 2º Encontro Estadual de Saúde*. Belo Horizonte, 2009.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança, descarte de produtos químicos*. 2 ed. São Paulo: Blücher, 2007.
- NEUZIL, E. Jean Guillaume Auguste Lugol (1788-1851): his life and his works: a brief encounter, 150 years after his death. *History Science Medical*, v. 36, n. 4, p. 451-464, 2002.
- OLIVEIRA J.A.; CARUSO B. G. J. *Leite: Obtenção e Qualidade do Produto Fluido e Derivados*. v. 2. Piracicaba: FEALQ, 1996. 80 p.
- ORDÓÑES, J. A. *Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal*. v. 2 São Paulo: Artmed, 2005. 279 p.
- REIS, R. C. *Iogurte "Light" sabor morango: equivalência de doçura, caracterização sensorial e impacto da embalagem na intenção de compra do consumidor*. Viçosa: Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, 2007. 128p. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. *Química de Alimentos*. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184 p.
- SILVA, D.C.; SANTOS, W. B. R. ; Padre, R.G.; DAMASCENO, J. C.; KAZAMA, R.; PETIT, H.; ZAMBOM, M. A. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com grãos de linhaça e monensina sódica. In: *Congresso Brasileiro De Qualidade Do*

- Leite*, II, 2006a, Goiânia. Anais do II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006 (a).
- SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo, 2006, São Paulo. *Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP*, 2006.
- SILVA, E. B.; NASCIMENTO, K. O. Avaliação da Adequação da rotulagem de iogurtes. *Ceres: Nutrição & Saúde*, vol. 2, n. 1, p. 9-14, 2007.
- SILVA, D. R.; FREITAS, R. V. L. Avaliação da temperatura de estocagem de lácteos nas gôndolas dos supermercados da cidade de São Luís de Montes Belos- GO. *Láctea: Revista Eletrônica do Curso de Tecnologia em Laticínios*. p. 26-39, 2010. Disponível em: <<http://www.simg.ueg.br/lactea/lactea.pdf>> Acesso em: Jan. 2012.
- SILVA, C. A. O.; VALLADÃO, S. A.; RIBEIRO, G. B.; CUNHA, M. R. R. Ocorrência de amidos em iogurtes comerciais. Simpósio Latino Americano De Ciência De Alimentos, 9, 2011, Campinas. *Resumos do Simpósio Latino Americano De Ciência De Alimentos*, 9, Campinas: SLACA, 2011.
- SIMÕES, C. A. *Uso da solução de Lugol para a detecção de segundos tumores primários de boca e orofaringe em portadores de carcinoma epidermóide na cabeça e pescoço: correlação dos achados na histopatologia com a imunexpressão do p53 e metalotioneína*. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da USP, 2009. 168p. (Tese, Doutorado em Ciências).
- SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Belo Horizonte: Departamento de Ciência de Alimentos da UFMG, 2007, 296p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- SOUZA, K. A. F; NEVES, V. A. *Pesquisa de polissacarídeos: reação com o iodo*. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.htm> Acesso em: 20 jun. 2011.
- STOOP, W. M. *Genetic variation in bovine milk fat composition*. Wageninge: Departamento de Alimentação Animal e Genômica. Wageninge University, 2009, 176p. (Tese de Doutorado em Alimentação Animal e Genômica - Animal Breeding and Genomics).
- TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. *Yogur: Ciência e tecnologia*. Zaragoza: Acribia, 1991. 368 p.

- THOMPSON A.; WOLFROM, M. L. *The composition of pyrodextrins*. Contribution from the Department of Chemistry of the Ohio State University. 1958.
- VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, A. M. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova*, vol. 25, n. 4, pág. 609-615, 2002.
- WANG, J. P.; YUA, B.; XU, X., YANG, N.; JIN Z.; KIM, J. M. Orthogonal-function spectrophotometry for the measurement of amylose and amylopectin contents. *Food Chemistry*, v 127, p. 102-108, 2011.
- WARENSJÖ, E.; JANSSON, J. K., BERGLUND, L.; BOMAN, K.; WEINEHALL, B. A. L.; LINDAHL, B; HALLMANS, G.; VESSBY, B. Estimated intake of milk fat is negatively associated with cardiovascular risk factors and does not increase the risk of a first acute myocardial infarction. *A prospective case-control study. British Journal of Nutrition*, v. 91, p. 635 – 642, 2004.
- WEBER, F H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 4, p. 748 - 753, 2009.

CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DO TEOR DE GORDURA E LEVANTAMENTO DOS ESPESSANTES UTILIZADOS EM IOGURTES COMERCIAIS

RESUMO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária é o órgão responsável pela regulação de alimentos embalados. Em atendimento às demandas nacional e estadual, o Programa de Monitoramento de Alimentos fiscaliza uma amostragem dos produtos disponíveis para o consumidor no estado de Minas Gerais. O iogurte foi um dos alimentos monitorados durante os anos de 2010 e 2011. Neste período, em 48 amostras de 29 indústrias diferentes, foram avaliadas as declarações de espessantes nos rótulos, o teor de gordura e a presença de amidos. Testou-se a capacidade do reagente Lugol distinguir o amido das gomas guar, xantana, carragena, carboximetilcelulose e pectina. O reagente mostrou-se seletivo para detecção de amido. Os espessantes mais utilizados foram a goma guar (35 %), amido modificado (35 %) e goma xantana (27 %). O amido foi declarado em apenas 10 % do total das amostras coletadas, porém sua presença foi detectada em 75 % dos iogurtes analisados. Em 36 % das amostras o teor de gordura estava abaixo do valor declarado e 17 % acima, ambos ultrapassando o limite tolerado pela legislação. Os resultados evidenciaram a ampla utilização dos amidos em iogurtes, respaldando a necessidade do monitoramento deste parâmetro, assim como o teor de gordura, devido ao alto percentual de não conformidade.

Palavras chave: monitoramento; avaliação da qualidade; rotulagem; amidos; teor de gordura.

ABSTRACT

The *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* is a governmental agency responsible for regulating packaged foods. In attendance to the Brazilian demands, the Food Monitoring Program inspect a sample of available products for consumers in the Minas Gerais state. The yogurt was one of the food products inspected between 2010 and 2011. In this period, It was checked out the declaration of thickeners, fat level and the presence of the starches in labeling of the 48 samples belong to 29 different industries. It was examined the ability of the Lugol's reagent to distinguish between the starch and some gums, like guar gum, xanthan, carrageenan, carboxymethyl cellulose and pectin. This reagent showed selectivity in the detection of the starch. The most used thickeners was the guar gum (35 %), xanthana (27 %) and modified-starch (35 %). The starch was mentioned in labels in only 10 % of the total amount of sample collected, however it was detected starches in 75 % of the samples. 36 % of the samples showed low fat level and 17 % high fat level in comparison with describe in labels. The large utilization of starches in yogurts warned to the necessity to monitor this parameter, as well as the fat content, due to high rate of the noncompliance.

Key words: monitoring, quality assessment label, starch, fat content.

1 INTRODUÇÃO

A Constituição Brasileira de 1988 declara que a saúde é um direito social e resulta de diversas condições, tais como alimentação, educação, trabalho, renda, acesso aos serviços de saúde, dentre outras, sendo um direito garantido por meio da implantação de políticas econômicas e sociais, que devem promover a integração de diversos setores do governo. O Sistema Único de Saúde (SUS) é o meio de concretização desse direito (BRASIL, 1988; CUSTÓDIO et al., 2011).

A Lei Orgânica da Saúde, nº 8080/1990, dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde e inclui como campo de atuação do SUS as ações em vigilância sanitária. A lei nº 9782/1999 definiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para coordenar suas ações em nível nacional, sendo esta um dos instrumentos de que o SUS dispõe para realizar seu objetivo de prevenção e promoção da saúde (BRASIL, 1990; BRASIL, 1999).

A ANVISA regulamenta, controla e fiscaliza produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública. Dentre os produtos submetidos a sua jurisdição incluem-se os alimentos, as bebidas, seus insumos, embalagens (rótulos), aditivos alimentares entre outros (BRASIL, 1999).

A Vigilância Sanitária Estadual de Minas Gerais é representada pela Superintendência de Vigilância Sanitária, que se estrutura por meio de 28 Gerências Regionais de Saúde (GRS) reponsáveis, na área de alimentos, por executar a fiscalização de estabelecimentos, concessão de alvará sanitário, coleta de amostras de alimentos e água para os diferentes programas de monitoramento, apuração de denúncias e de surtos de doenças transmitidas por alimentos e água (BRASIL, 1999; MINAS GERAIS, 2012).

Vinculado à Secretaria Estadual de Saúde e parte integrante do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, o Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN/MG) é representado pelo Instituto Octávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Este é responsável, entre outras atribuições, pelas análises físico-químicas e microbiológicas dos alimentos coletados pelas Vigilâncias Sanitárias (VISAs) municipais (FUNED, 2011).

O Programa de Monitoramento dos Alimentos (PROGVISA) é uma das ações da VISA e do LACEN de Minas Gerais que desde o ano 2000 fornece dados relativos à qualidade dos alimentos tal como se encontram disponibilizados no comércio. Estes

dados servem de subsídio para o planejamento e estruturação de suas ações de promoção e proteção à saúde, como também para elaboração ou revisão da legislação sanitária (ANVISA, 2003; MINAS GERAIS, 2012).

Os critérios utilizados na escolha dos alimentos monitorados contemplam principalmente as demandas dos programas nacionais, estaduais e regionais como, por exemplo, o Programa de Análise do Teor Nutricional (PATEN), Programa do Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade de Alimentos (CQUALI-Leite), Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC) e Monitoramento do Teor de Iodo no Sal para Consumo Humano (Pró-iodo). Os critérios de escolha dos programas nacionais são embasados principalmente nos potenciais riscos à saúde da população e doenças transmitidas por alimentos (ANVISA, 2003; MINAS GERAIS, 2012).

Anualmente são monitorados no estado de Minas Gerais cerca de 30 tipos de produtos alimentícios. Os resultados analíticos são comparados com os padrões de identidade e qualidade específicos de cada alimento e demais legislações pertinentes. Caso a análise indique alguma irregularidade, são tomadas providências objetivando a proteção da saúde do consumidor, como interdição cautelar do produto, a instauração de processo administrativo sanitário, notificação da empresa e fiscalização sanitária do estabelecimento produtor (ANVISA 2003; MINAS GERAIS, 2012).

O Padrão de Identidade e Qualidade de leites fermentados (IN 46/2007 MAPA) estabelece para os iogurtes a definição, classificação, composição, requisitos físico-químicos e microbiológicos, lista de ingredientes obrigatórios e opcionais, tabela de aditivos permitidos com os limites máximos estabelecidos e o regulamento de rotulagem específico do produto (BRASIL, 2007). Os amidos fazem parte dos ingredientes opcionais e as gomas são aditivos que podem ser utilizados na fabricação do iogurte. Os polissacarídeos representam uma classe de aditivos que podem ser utilizados como substitutos de gordura (*fat replacers*). Quando adicionados aos alimentos proporcionam as propriedades de corpo e espessamento, produzindo assim uma similaridade aos produtos tradicionais ricos em gordura ou até fornecendo algumas vantagens tecnológicas, sensoriais ou de custo, pois geralmente os substituintes de gordura agregam água à formulação (PINHEIRO e PENNA, 2004; PEDROSO, 2006). Dos alimentos comercializados com substitutos de gordura, os iogurtes foram os produtos que obtiveram a melhor aceitação no mercado americano. Mais de 80 % dos iogurtes vendidos em 2001, nos EUA, eram produzidos com substitutos de gordura (SIVIERI e OLIVEIRA 2002).

No Brasil, a indústria de laticínios é bastante expressiva, apresentando elevado nível de desenvolvimento tecnológico. É prática comum o processamento de mais de um tipo de iogurte em seu mix de produtos para atender os vários segmentos do mercado. A decisão de utilizar ou não gomas e amidos varia de acordo com a formulação de cada produto. Análises físico-químicas são necessárias para averiguar a veracidade das declarações dos rótulos (LONGO, 2006; REIS, 2007).

No presente estudo objetivou-se identificar quais espessantes são utilizados nas formulações de iogurtes através da lista de ingredientes contidas nos rótulos de iogurtes recolhidos no comércio de Minas Gerais pelas VISAs Municipais participantes do PROGvisa, no período de 2010 e 2011, e comparar as declarações do rótulo com os resultados obtidos em análises laboratoriais de teste qualitativo de Lugol para detecção de amido e quantitativo de gordura total nesses produtos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As vidrarias volumétricas e equipamentos de medição utilizados neste trabalho foram calibrados por empresas acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

Os ensaios foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química Bromatológica e Cromatografia da Divisão de Vigilância Sanitária da Fundação Ezequiel Dias.

2.1 MATERIAL

- Balão volumétrico de 100 e 1000 mL;
- bastão de vidro;
- béquer de 50, 100 e 250 mL;
- butirômetro de Gerber para leite com rolha;
- espátula de aço inox;
- luvas de vaqueta;
- pipeta volumétrica de 1 e 11 mL;
- proveta de 10 mL.

2.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica com resolução de 0,0001g – *Metler mod. AG 285*;
- banho-maria com *ajuste digital de temperatura* – *Marconi*;
- capela de exaustão - *Buzzatos*;
- centrífuga de Gerber – *Fanem mod. 202*;
- densímetro com intervalo entre 1,700 a 1,900 g/mL.

2.3 REAGENTES E PADRÕES

- Ácido sulfúrico concentrado (densidade de 1,840g/ mL a 20°C) PA, *Vetec*;
- água deionizada;
- álcool isoamílico PA, *Merck*;
- amido de batata 98 % PA, *Sigma*;
- amido modificado comercial, *Cornign*;
- carboximetilcelulose 98 % PA, *Genkor*;
- goma carragena 98 % PA, *Genkor*;
- goma guar 98 % PA, *Genkor*;
- goma xantana 98 % PA, *Genkor*;
- Iodeto de potássio PA, *Vetec*;
- Iodo ressublimado PA, *Merck*;
- pectina 98 % PA, *Genkor*.

2.4 SOLUÇÕES

Ácido sulfúrico d= 1,820 g/mL: misturou-se a 120 mL de água destilada 925 mL de ácido sulfúrico concentrado d = 1,840 g/mL em banho de gelo. A solução foi aferida com densímetro ao atingir temperatura de 20 °C.

Solução de Lugol: 10 g de iodeto de potássio e 5 g de iodo ressublimado foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Soluções a 1 % de cada padrão: amido de batata, amido modificado, goma guar, goma xantana, goma carragena, carboximetilcelulose e pectina: foram elaboradas soluções distintas a partir de 1 g de cada um dos padrões de amido de batata, amido modificado, goma guar, goma xantana, carboximetilcelulose e

pectina que foram solubilizados em de água destilada à 90 °C e completado o volume para 100mL, respectivamente.

2.5 AMOSTRAGEM

As VISAs Municipais participantes PROGVISA coletaram 48 amostras de 29 marcas diferentes de iogurtes comercializados no território de Minas Gerais entre 2010 e 2011. Tais amostras foram encaminhadas para análise no Laboratório de Química Bromatológica e Cromatografia da FUNED. Observou-se a aleatoriedade das amostras sem priorizar marcas, estabelecimentos ou alguma característica do produto como, por exemplo, o conteúdo de gordura.

Levantou-se, junto ao termo de coleta das amostras, o número de amostras de iogurtes que foram recolhidas por cada uma das 28 Gerências Regionais de Saúde (GRS) para averiguar sua representatividade no estado. Sabe-se que, dos 30 tipos de alimentos pactuados para o monitoramento anual, a distribuição da coleta entre as gerencias é embasada nos seguintes fatores: oferta do produto; existência de indústrias na região; facilidade de transporte, coleta, acondicionamento e envios das amostras. Esta última característica é um fator limitante para o envio do iogurte. A manutenção da cadeia do frio nos produtos lácteos é de suma importância. Uma vez interrompida, as características físico-químicas e microbiológicas são comprometidas, inviabilizando as análises fiscais. Desta forma, as regionais que dispunham apenas dos serviços dos correios (SEDEX) para envio de amostras coletaram apenas alimentos não perecíveis, enquanto que os alimentos perecíveis ficaram restritos às GRSs que possuíam transporte próprio. Devido à sua perecibilidade e ao prazo de validade inferior a 30 dias, o iogurte foi coletado como amostra única, e não em triplicata, em quantidade suficiente para suprir todas as análises laboratoriais (FUNED, 2011).

2.6 LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA DE ESPESSANTES DECLARADOS NOS RÓTULOS DE IOGURTES COMERCIAIS

Tendo em vista que para a obtenção de textura e aspecto diferenciado pode-se utilizar espessantes sozinhos ou em mistura, realizou-se o levantamento da incidência de espessantes declarados nos rótulos dos iogurtes. Para tal, contabilizou-se o número de

vezes que cada espessante foi declarado nos rótulos das amostras e calculou-se o percentual de incidência com base no total de amostras.

2.7 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DA SOLUÇÃO DE LUGOL PARA DETECÇÃO DE AMIDOS

Avaliou-se a seletividade da solução de Lugol pela sua capacidade de distinguir os amidos de outras gomas alimentícias utilizadas comercialmente.

Foram elaboradas soluções distintas a 1 % com os padrões: de amido de batata, amido modificado comercial, goma guar, goma carragena, goma xantana, carboximetilcelulose e pectina.

Transferiu-se 5 mL de cada solução em triplicata para tubos de ensaios, mais um tubo contendo 5 mL de água destilada (amostra controle), adicionou-se 5 mL de água para cada tubo, perfazendo um total de 10 mL, e 2 gotas do reagente Lugol. Agitou-se e observou-se a coloração. O desenvolvimento da cor azul escuro indicou a presença de amido (BRASIL, 2006).

2.8 IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS EM IOGURTES

O teste do Lugol foi realizado em todas as amostras coletadas pelas VISAs municipais devido à possibilidade das indústrias alterarem a formulação dos iogurtes em diferentes lotes sem, no entanto, modificar os dizeres dos rótulos.

Recolheu-se 10 mL de cada amostra, adicionou-se 5 mL de água destilada, aqueceu-se e adicionou-se e 2 gotas do reagente Lugol. A mistura foi agitada e observou-se a coloração. O desenvolvimento de cor azul escuro indicou a presença de amido (BRASIL, 2006).

Utilizou-se a estatística não-paramétrica de significância “Qui-quadrado” para comparar a classificação do iogurte segundo seu teor de gordura com os resultados do teste do lugol. Para os cálculos considerou-se $\alpha = 0,05$.

2.9 ANÁLISE DE GORDURAS TOTAIS DOS IOGURTES COMERCIAIS

Os resultados de análise com desvio de no máximo $\pm 20\%$ em relação ao valor declarado nos rótulos de teor de gorduras totais foram considerados satisfatórios, dentro do valor tolerado pela legislação, de acordo com o estabelecido na RDC 360/2003 ANVISA para alimentos embalados (BRASIL, 2003; BRASIL, 2006).

O preparo da amostra para a análise do teor de gorduras totais foi realizada conforme IAL (2004): pesou-se cerca de 25,00 g da amostra de iogurte em béquer e transferiu-se quantitativamente, com auxílio de um bastão de vidro e água destilada, para um balão volumétrico de 50 mL. A um butirômetro de leite, adicionou-se 10 mL da solução de ácido sulfúrico $d=1,820$ g/mL, 11 mL da amostra previamente preparada e 1 mL de álcool isoamílico. Fechou-se com rolha para butirômetro. Com auxílio de luvas de vaqueta, homogeneizou-se a mistura observando os requisitos de biossegurança. A amostra foi centrifugada em centrífuga de Gerber por 5 minutos e transferida para banho-maria a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. As operações de centrifugação e incubação foram repetidas antes de verificar a porcentagem de gordura na escala do aparelho (Figura I.1). Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o teor de gordura (IAL, 2004; BRASIL, 2006):



Figura I.1 – Butirômetro de leite com amostra evidenciando a fração lipídica e a escala percentual

Utilizou-se a estatística não-paramétrica de significância “Qui-quadrado” para comparar a classificação do iogurte segundo seu o teor de gordura com os resultados para o limite de referência, definido pela RDC/360/2006, de 20% em relação ao valor declarado no rótulo. Para os cálculos considerou-se $\alpha = 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AMOSTRAGEM

A coleta de amostras contemplou 9 das 12 mesorregiões geográficas definidas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE e as cidades sede das GRS estão dentro dos 50 municípios de maior população do estado, como demonstrado na Tabela I.1 e Figura I.2 (IBGE, 2010). Desta forma, pode-se inferir que a amostragem realizada pelas VISAs municipais é representativa em relação aos 853 municípios de Minas Gerais, e que a oferta de iogurtes representa o consumo no estado.

Tabela I.1 – Mesorregiões geográficas definidas pelo IBGE indicando as cidades sede das GRS, com as respectivas estimativa de populacional, que coletaram amostras de iogurtes

Mesorregião IBGE	GRS	Posição*	Habitantes**
Metropolitana BH	Belo Horizonte	1º	2385639
	Itabira	23º	110663
Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba	Uberlândia	2º	611903
Zona da Mata	Juiz de fora	4º	520810
	Ubá	28º	102782
Norte de Minas	Montes Claros	6º	366134
Central Mineira	Sete Lagoas	11º	216399
Noroeste de Minas	Patos de Minas	16º	139848
Vale do Mucuri	Teófilo Otoni	17º	135153
Campo das Vertentes	Barbacena	19º	127217
Sul/Sudoeste de Minas	Alfenas	46º	74297
Jequitinhonha	-	-	-
Oeste de Minas	-	-	-
Vale do Rio Doce	-	-	-

* Posicionamento em relação ao número de habitantes no estado de Minas Gerais em 2011.

** Estimativa de habitantes para o ano de 2011 segundo o IBGE (2010).

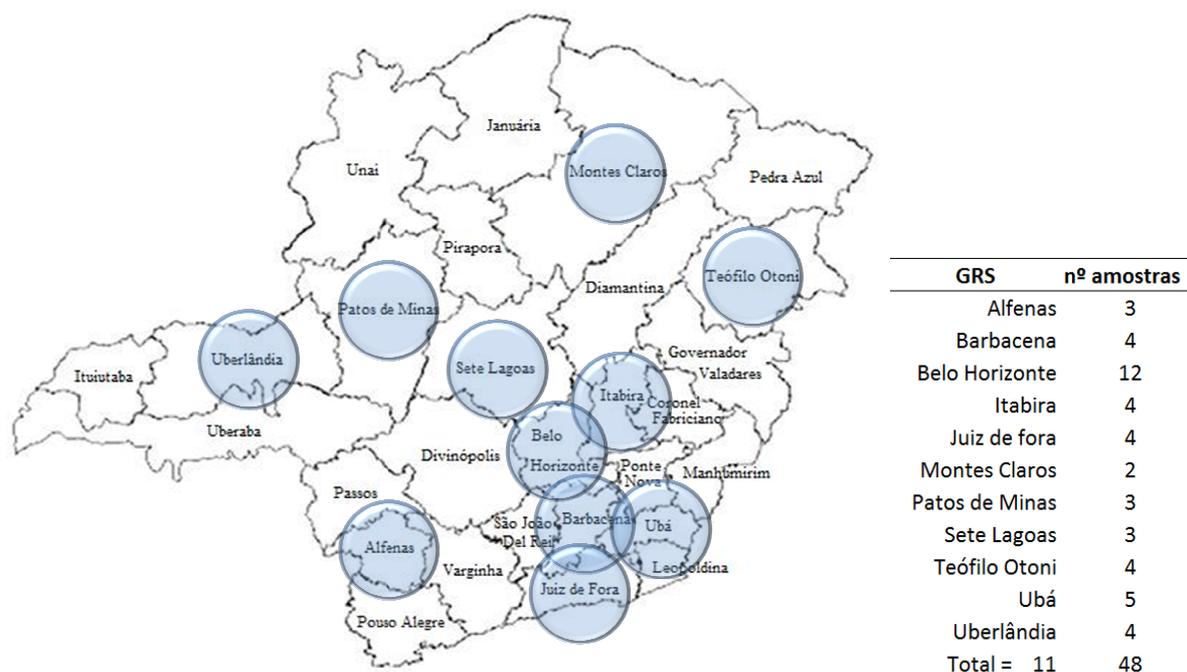


Figura I.2 – Mapa da divisão geográfica das GRS de Minas Gerais evidenciando as que coletaram amostras de iogurte em 2010 e 2011

3.2 INCIDÊNCIA DE ESPESSANTES NOS RÓTULOS DE IOGURTES COMERCIAIS

Dos 48 rótulos analisados, 35 (73 %) declararam utilizar algum tipo de espessante. Constatou-se que a goma guar, o amido modificado e a goma xantana foram os três espessantes mais utilizados pela indústria, representando respectivamente 35, 35 e 27 % do total das amostras. O amido comum (sem modificações) foi declarado em apenas 10 % do total dos rótulos, como pode ser observado na Tabela I.2.

Segundo SILVA (2008) a preferência das indústrias pelo amido modificado sobre o amido comum pode ser explicada pelas limitações do amido comum frente às condições de processamento e pelo avanço da tecnologia de modificação física dos amidos sem adição de produtos químicos. De forma geral, as modificações do amido o tornam mais resistente ao calor e às forças de cisalhamento e acidez, melhorando as características das massas e dos géis (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

Tabela I.2 – Incidência dos espessantes nos rótulos de iogurtes comerciais

Espessantes*	Incidência	%
goma guar	17	35
amido modificado	17	35
nenhum espessante	13	27
goma xantana	13	27
gelatina	8	17
goma carragena	6	13
amido	5	10
carboximetilcelulose	4	8
pectina	4	8
goma alfarroba	2	4
goma jataí	2	4
Total de amostras	48	100

* Vide Anexo 1 para detalhamento das gomas declaradas nos rótulos

3.3 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO TESTE DO LUGOL

O reagente de Lugol foi capaz de diferenciar o amido e amido modificado dos demais espessantes testados: goma guar, goma xantana, goma carragena, carboximetilcelulose e pectina. Este resultado indica que o reagente Lugol é seletivo para os amidos. A Figura I.3 mostra as soluções padrões a 1 % de cada espessante antes e após adição do reagente Lugol.

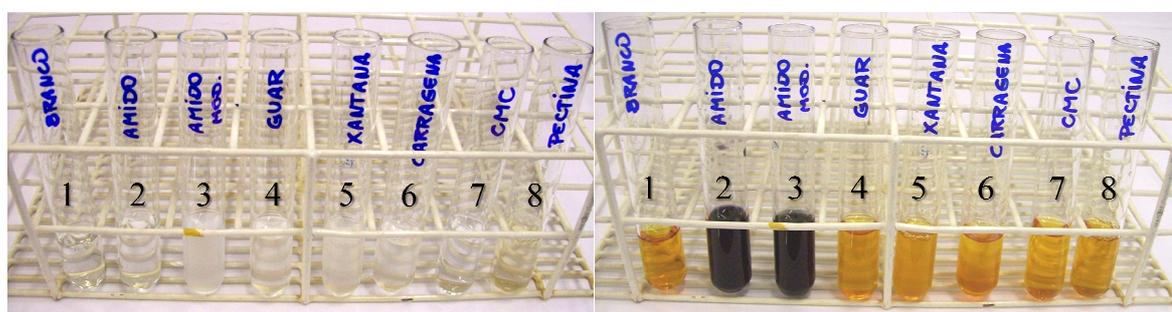


Figura I.3 – Água destilada - branco (1) e soluções a 1 % dos padrões de amido (2), amido modificado (3), goma guar (4), goma xantana (5), goma carragena (6), carboximetilcelulose (7) e pectina (8) antes e após adição do reagente Lugol

As gomas alimentícias são compostas de duas ou mais unidades de monossacarídeos diferentes e, em sua maioria, apresentam conformação linear e não há relatos na literatura da formação de complexos de inclusão das gomas com iodo de forma semelhante à amilose, o que indica, mais uma vez, que este teste é seletivo para amidos (BELITZ et al., 2009; FENNEMA, 2010). Após extensa busca pela literatura não se encontrou referências sobre testes de seletividade do lugol frente a outras substâncias alimentícias.

Segundo o levantamento da incidência dos espessantes, item 3.1, pode-se observar que o estudo da seletividade do reagente Lugol contempla as 07 gomas mais citados nos rótulos (Tabela I.2). Estas também representam as gomas de menor custo, o que torna os iogurtes comercialmente mais rentáveis, como pode ser constatado na larga utilização da goma guar (35 %), que além de seu custo moderado, possui o maior poder espessante entre as gomas estudadas. Assim, uma pequena quantidade utilizada é suficiente para atingir a textura desejada.

3.4 DETECÇÃO DE AMIDOS PELO TESTE DO LUGOL E COMPARAÇÃO COM A DECLARAÇÃO DE ESPESSANTES NOS RÓTULOS

Ao realizar o teste do Lugol, observou-se que, das 48 amostras de iogurte analisadas, 36 foram positivas para a presença de amido, representando 75 % do total. Destas amostras, apenas 21 declararam amido e/ou amidos modificados, 8 apresentaram algum dos demais espessantes e 7 não indicaram espessante no rótulo. Portanto, 31 % dos fabricantes por falta de informação, ou por má-fé, cometeram fraude por não declarar a presença desses ingredientes nos rótulos.

Pela declaração do teor de gordura total presente na tabela nutricional dos rótulos observou que, 11 amostras eram integrais, 33 parcialmente desnatadas, 3 desnatadas e 1 amostra não apresentava tabela nutricional (Tabela I.3). Constatou-se que 5 das amostras integrais e 10 das parcialmente desnatadas foram positivas para o teste do Lugol sem, no entanto, declarar amidos no rótulo, representando 45 e 30 % respectivamente do total de amostras de cada classe. Para os iogurtes desnatados, o teste do Lugol foi coerente com o informado.

Tabela I.3 – Incidência dos resultados do teste do Lugol correlacionado com teor de gordura dos iogurtes comerciais

Classificação do iogurte	Lugol (+)		Lugol (-)		Total
	amidos declarados	amidos não declarados	<i>amidos declarados</i>	<i>amidos não declarados</i>	
Integral	4	5	2	0	11 (23%)
Parcialmente desnatado	16	10	7	0	33 (69%)
Desnatado	1	0	2	0	3 (6%)
Não declarado	0	0	0	1	1 (2%)
Total	21 (44%)	15 (31%)	12 (25%)	0 (0%)	48 (100%)

Segundo o teste do Qui-quadrado $\chi^2_{4GL} = 6,26$ ($p > 0,05$) não foi possível atribuir alguma influência da classificação de iogurte com os resultados obtidos pelo teste do lugol. Sendo assim, é possível inferir que o amido é utilizado em proporções semelhantes em todas as classificações de teor de gordura dos iogurtes.

A gordura e as proteínas são os componentes do leite que apresentam maior valor comercial para os laticínios em função da diversidade de derivados que podem ser produzidos (PINHEIRO e PENNA, 2004). A gordura é considerada um ingrediente chave para os aspectos sensoriais dos alimentos, contribuindo para o sabor, cremosidade, aparência, aroma e odor e, quando removida, é normalmente substituída por água e outros ingredientes para reconstituir as propriedades desejadas no alimento, mantendo a palatabilidade e um menor aporte calórico. É sabido que nenhum produto sozinho é capaz de substituir a gordura em todas as aplicações. Por exemplo, as gomas embora muito utilizadas com esse fim, contribuem apenas para efeitos secundários de textura e corpo. Já os amidos proporcionam a mesma sensação de lubrificação que as gorduras e conferem várias propriedades desejáveis aos produtos, como viscosidade, textura, sensação ao paladar e aumento da estabilidade. Tendo em vista as vantagens tecnológicas proporcionadas pelo amido, era de se esperar sua ampla utilização nas formulações de iogurtes em substituição à gordura, principalmente com a crescente preocupação por parte do governo e da população em reduzir a incidência de obesidade e risco de doenças cardiovasculares (PINHEIRO e PENNA, 2004; DIAS, 2007).

3.5 TEOR DE GORDURA

Uma amostra de iogurte foi desconsiderada ao compilar os resultados a seguir por não apresentar tabela nutricional no rótulo.

Ao confrontar o teor de gorduras totais informado pelo rótulo com o resultado da análise do produto, observou-se que 22 das 47 amostras apresentaram desvio de até 20 % para variação entre o valor declarado e valor encontrado conforme estabelecido na RDC 360/2003 da ANVISA. As outras 25 amostras, representando 53 % do total, estavam em desacordo com o teor de gordura informado. Destes, 36 % extrapolaram para baixo os 20 % tolerados pela legislação, representando 64 % do total de amostras integrais, 27 % das parcialmente desnatadas e 33 % das desnatadas (Tabela I.4).

Segundo o teste do Qui-quadrado $\chi^2_{6GL} = 4,52$ ($p > 0,05$) não foi possível atribuir alguma influência da classificação de iogurte com os resultados encontrados para o limite de referência definido pela RDC 360/2003, de 20 %. Sendo assim, é possível inferir que o percentual de não conformidade em relação à legislação é semelhante em todas as classificações de teor de gordura.

Tabela I.4 – Percentual de desvio do teor de gordura total declarado no rótulo em relação ao encontrado nas análises de gorduras

Classificação do iogurte	Teor de gordura x rótulo			Total
	< 20%	até 20%	> 20%	
Integral	7 (64%)	4 (36%)	0 (0%)	11 (100%)
Parcialmente desnatado	9 (27%)	17 (52%)	7 (21%)	33 (100%)
Desnatado	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)	3 (100%)
Total	17 (36%)	22 (47%)	8 (17%)	47 (100%)

Uma explicação para este desvio de qualidade pode ser atribuído a um erro no cálculo utilizado para a elaboração da tabela nutricional, que deve considerar a adição de outros ingredientes não lácteos, como os espessantes e polpas, que diluem os componentes do leite. Outra hipótese é a retirada intencional de gordura e adição substitutos de gordura, como os amidos, que irão proporcionar ao produto aspecto semelhante ao iogurte com seu teor de gordura original. Do total de amostras, 17 % apresentaram desvio acima do valor declarado, sendo 21 % das parcialmente desnatadas e 33 % das desnatadas. Este fato pode ser atribuído a falhas no processo de desnate do leite ou análise da matéria prima, que contribuem para desvios de qualidade do iogurte.

Das amostras integrais coletadas 67 % foram não conforme quanto ao teor de gordura declarado e quase metade das amostras (45 %) utilizavam amidos nas formulações. Estes resultados respaldam a hipótese de que as indústrias estão reduzindo o teor de gordura original destes produtos e acrescentando amidos para recompor suas características sensoriais.

O teor de gordura acima do valor declarado prejudica o consumidor com restrição de ingestão de gordura em sua dieta. O aumento do poder aquisitivo da população e o acesso à informação estão fazendo com que haja uma crescente preocupação do consumidor com a qualidade nutricional dos alimentos e seus riscos inerentes. Sabe-se que a composição da gordura do leite é rica em ácidos graxos saturados, principalmente C14:0 e C16:0 que são comprovadamente fatores de risco para doenças cardiovasculares, e pobre em ácidos graxos insaturados. De posse desta informação, muitos consumidores optam por produtos com teor reduzido de gordura sem, no entanto, abrir mão das características sensoriais proporcionadas pela gordura. Este é o caso dos iogurtes parcialmente desnatados. BRANDÃO e FONTES (2011) relataram que o mercado de lácteos para fins especiais (*light e diet*) vem apresentando crescimento maior do que o de lácteos tradicionais, devido ao aumento da preocupação com o excesso de peso corporal. Percebendo esta mudança de comportamento, a indústria oferece ao mercado uma maior variedade de produtos com teor de gordura reduzido (MARTIN, 2002; REIS, 2007). Tal fato pode ser associado com o alto percentual de iogurtes parcialmente desnatados (69 %) coletados pelas VISAS municipais, como pode ser observado na Tabela I.3.

Após extensa busca pela literatura não se encontrou referências sobre o monitoramento ou avaliação do percentual de gordura de iogurtes comerciais.

4 CONCLUSÕES

No presente estudo constatou-se que grande parte dos fabricantes (73 %) declarava nos rótulos a utilização de espessantes em suas formulações.

Os três espessantes mais citados foram as gomas guar, amido modificado e a goma xantana. O amido foi declarado em apenas 10 % das amostras.

O teste do Lugol foi seletivo para detecção de amido em relação às gomas guar, xantana, carragena, carboximetilcelulose e pectina.

Detectou-se pelo teste do Lugol a presença de amidos em 75 % do total de amostras analisadas, destas apenas 44 % declaravam sua presença nos rótulos. Este significativo percentual de uso de amidos frente a sua não declaração evidencia a relevância do monitoramento deste parâmetro como mais um indicador de conformidade das declarações contidas nos rótulos.

Mais da metade das amostras (53 %) foram insatisfatórias quanto ao teor de gordura declarado nos rótulos, sendo a maior parte inferior ao informado (36 %).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Desenvolvido por ANVISA, 2003. *Programa Nacional da Qualidade dos Alimentos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/index.html>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4 ed. Berlin: Springer, 2009. 1070 p.

BRANDÃO, S. C. C; FONTES, A. C. L. Tendências na fabricação de lácteos light e diet. Tendências e avanços do agronegócio do leite nas Américas: mais leite = mais saúde. *Congresso Panamericano de leite*. Disponível em: http://www.fepale.org/sitio_viejo/lechesalud/documentos/5SebastiaoBrandao.pdf> Acesso em dezembro 2011.

BRASIL. *Constituição da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF: Senado Federal, 1988.

BRASIL, Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial*, Brasília, 19 setembro 1990.

BRASIL, Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial*, Brasília, 27 janeiro 1999.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC n. 360 de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dezembro, 2003.

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68 de 12 de dezembro de 2006. Aprova os métodos Analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Anexo V Métodos Quantitativos - Glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e amido (método Lane-Eynon). *Diário Oficial*, Brasília, 14 dezembro 2006. Seção 1.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial*, Brasília, 24 outubro 2007, p. 5.
- CUSTÓDIO, M. B.; FURQUIM, N. R.; SANTOS, G. M. M.; CYRILLO, D. C. Segurança Alimentar e Nutricional e a construção de sua política: uma visão histórica. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, vol. 18 nº 1, 1-10, 2011.
- DIAS, A. A. *Substitutos de gorduras aplicados em alimentos para fins especiais*. Brasília: Centro de Excelência em Turismo, UnB, 2007. 53 p. (Monografia Especialista em Tecnologia dos Alimentos).
- FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. 4 ed. University of Wisconsin: Marcel Dekker, 2010. 900 p.
- FUNED. Fundação Ezequiel Dias. *Manual de Coleta de Amostras*. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br> Acesso em: 20 dez. 2011.
- IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018 p.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Tabela 23 – Produção de leite no período de 01/01 a 31/12 e participações relativa e acumulada no total da produção, segundo as Unidades da Federação e os 20 municípios com as maiores produções, em ordem decrescente – 2010*, 2010b. Disponível em <http://www.ibge.com.br> Acesso em 20 dez. 2011.
- LONGO, G. *Influência da adição de lactase na produção de iogurtes*. Curitiba: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFP, 2006, 89p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- MARTIN, A. F. *Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz da USP, 2002. 35 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- MINAS GERAIS, Desenvolvido pela Secretaria de Estado da Saúde. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/politicas_de_saude/visa/gerencia-de-vigilancia-sanitaria-de-alimentos-gva Acesso em: 10 janeiro, 2012.

- PEDROSO, R. A. *Avaliação da Influência de amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru*. Ponta Grossa: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006. 74p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- PINHEIRO M. V. S.; PENNA, A. L. B. Substitutos de Gordura: tipos e aplicações em produtos lácteos. *Alimentação e Nutrição*, Araraquara, v. 15, n. 2, 175 – 186, 2004.
- REIS, R. C. *logurte “Light” sabor morango: equivalência de doçura, caracterização sensorial e impacto da embalagem na intenção de compra do consumidor*. Viçosa: Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, 2007. 128p. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. *Química de Alimentos*. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184 p.
- SILVA, T. P. L. *Efeitos de tratamentos hidrotérmicos nas propriedades viscográficas e amidos resistentes em fécula de mandioca*. Botucatu: Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Unesp, 2008. 82 p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia).
- SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida de prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replacers” (Litesse e Dairy-lo). *Ciência Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 22, n. 1, p. 24-31, 2002.

CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MÉTODO TITULOMÉTRICO DE LANE-EYNON DESCRITO NA IN 68/2006 DO MAPA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMIDOS EM IOGURTE

RESUMO

A adição de espessantes ao iogurte é um recurso tecnológico que visa melhorar as características sensoriais deste produto lácteo. Porém, devido ao seu alto poder de hidratação, se os espessantes forem adicionados além do estipulado pela legislação, pode haver substituição dos componentes nutritivos por água. Para garantir a qualidade dos alimentos, os órgãos fiscalizadores dispõem de métodos oficiais para executar suas análises, como o descrito na IN 68/2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para quantificação de amido em iogurtes (método: Lane-Eynon). Como este método não apresenta seus dados de desempenho, ele deve ser validado para comprovar sua eficiência e confiança. Pela falta de material de referência, elaborou-se iogurte natural batido, que foi utilizado para os estudos de validação: limite de quantificação, exatidão, precisão e seletividade. Durante a execução dos procedimentos, foram observadas perdas inerentes ao método que impossibilitaram a obtenção de resultados para calcular o limite de quantificação, a exatidão e a precisão. Constatou-se que os espessantes estudados na seletividade (gomas xantana, guar, carboximetilcelulose e pectina) são capazes de sofrer hidrólise ácida e serem titulados com o reagente de Fehling. Estudou-se também a hidrólise ácida do amido de bata, cuja recuperação foi de 85 %.

Palavras chave: iogurte; espessantes; amido; método oficial; validação.

ABSTRACT

The thickeners addition is a technological strategy that aim to improve in quality of the sensorial characteristics of this dairy product. However, due to high hydration ability, if the thickeners were added beyond to the limits permitted by law, it could occur the substitution nutritive components by water. To the guarantee of the food quality, the inspection agencies yield official methods for the execute the necessary analysis, such as the starch quantification in yogurts (Lane-Eynon method) described in "IN 68/2006" of the "Ministério da Agricultura e Pecuária". Like this method doesn't show its performance data, it can be validate to testify its efficiency and assurance. In consequence of the complete lack of reference material, it was necessary the elaboration of the stirred natural yogurt to be used in the validation studies: quantification limit, accuracy and selectivity. During the procedures execution, It was observed inherent losses to the method that precluded to calculate the quantification limit and accuracy. It was found that the thickeners evaluated in the seletivity assay are hydrolyzable in acidic solution and titrated with Fehling's solution. The acid hydrolyses of the starch potato was analyzed and the recovery was 85 %.

Key words: yogurt, thickeners, starch, official method and validation.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos fermentados, principalmente derivados do leite, tem sido estimulado por profissionais de saúde, em função de seu perfil nutricional, que apresenta proteínas de alto valor biológico e microorganismos capazes de promover benefícios à saúde (SILVA & NASCIMENTO, 2007). Além destes atributos, o processamento e a fermentação do iogurte transformam-no em alimento facilmente digerível, porque modificam as proteínas, as gorduras e a lactose (EARLY, 2000; MARTIN, 2002). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), por meio da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), verificou que o consumo per capita de iogurte passou de 0,36 kg em 1974/1975 para 2,9 kg em 2002/2003 (IBGE, 2010). Este aumento de consumo, de cerca de 8 vezes em 30 anos, tem sido atribuído às recomendações dos profissionais da saúde e à estabilização da economia a partir da década de 90 (MARTIN, 2002; SILVA e NASCIMENTO, 2007). Tal cenário tem estimulado a segmentação do mercado com o lançamento de produtos diversificados, focados no conteúdo calórico, no baixo teor de gordura, nos benefícios para a saúde relacionados com o conteúdo microbiano, na consistência dos produtos, entre outros, a fim de manter a curva de consumo ascendente, atendendo às várias classes sociais (EARLY, 2000; LONGO, 2006).

A busca por produtos economicamente mais acessíveis e/ou diferenciados fez da adição de espessantes em iogurtes uma prática rotineira, uma vez que auxiliam na retenção de água, evitando a sinérese, e favorecem o aumento da viscosidade, melhorando as características sensoriais de produtos com teor reduzido de sólidos lácteos e matéria graxa (TAMIME e ROBINSON, 1991).

A verificação da qualidade e autenticidade de produtos alimentícios é uma função dos órgãos fiscalizadores. A fim de controlar, entre outros, a adição de ingredientes não lácteos ao iogurte, a legislação brasileira estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para Leites Fermentados, descrito na Instrução Normativa (IN) 46/2007 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este regulamento determina a adição de, no máximo, 1 % (m/m) de amido e/ou amidos modificados, 1 % (m/m) de pectina e gelatina e 0,5 % (m/m) para os demais espessantes, isolados ou combinados ao produto final (BRASIL, 2007). A limitação da adição de espessantes visa proteger a população do consumo de iogurtes com valor nutricional abaixo do esperado (TAMIME e ROBINSON, 1991). Quer por razões econômicas, quer por razões de saúde pública, a detecção no mercado de produtos em desconformidade com a legislação é um desafio

constante para os analistas de alimentos pertencentes aos órgãos de fiscalização, como os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) brasileiros.

A IN 68/2006 MAPA regulamenta os métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. No *Anexo V* desta IN estão descritas as análises quantitativas das quais consta o método de quantificação do amido adicionado ao iogurte (BRASIL, 2006). Apesar de se tratar de um método oficial, a IN 68/2006 MAPA não declara os dados de desempenho do referido método, o que torna necessário a realização dos procedimentos de validação, visando atestar a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao propósito pretendido pelo método (SOUZA, 2007, INMETRO, 2010).

Desta forma, o objetivo neste trabalho foi validar o método de quantificação de amido em iogurtes proposto pela IN 68/2006 MAPA *Glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e amido (método: Lane-Eynon)* para avaliar sua eficiência para ser adotado em análises fiscais oficiais pelo LACEN/MG.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As vidrarias volumétricas e equipamentos de medição utilizados neste trabalho foram calibrados por empresas acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

Os ensaios foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química Bromatológica e Cromatografia da FUNED.

2.1 MATERIAL

- Balão volumétrico de 100, 200, 500 e 1000 mL;
- bastão de vidro;
- béquer de 20, 50, 100, 250 e 2000 mL;
- béquer de polietileno de 250 mL;
- bureta de 10 e 25 mL;
- butirômetro de Gerber para leite com rolha;
- condensador de bolas;
- erlenmeyer com boca esmerilhada de 250 mL;

- erlenmeyer de 250 mL;
- erlenmeyer de boca larga de 500 mL;
- espátula de aço inox;
- frascos de vidro com rolha rosqueável de metal de 500 mL;
- funil com haste;
- gral de porcelana e pistilo;
- luvas de vaqueta;
- papel de filtro qualitativo;
- pesa filtro com tampa;
- pipeta volumétrica de 1, 5, 10 e 11 mL;
- proveta de 10 mL;
- tubo de Kjeldahl.

2.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica com resolução de 0,0001g – *Metler mod. AG 285*;
- balança semi-analítica com resolução de 0,01g – *Micronal mod. B1600*;
- banho-maria com *ajuste digital de temperatura* – *Marconi*;
- bloco aquecedor para Kjeldahl - *Velp mod. DK6*;
- capela de exaustão - *Buzzatos*;
- centrífuga de Gerber – *Fanem mod. 202*;
- chapa aquecedora com agitação magnética - *Corning*;
- destilador de Kjeldahl – *Velp mod. UDK 140*;
- eletrodo de pH – *Digimed mod. 10F6365*;
- eletrodo de temperatura – *Digimed mod. DMF-N1*;
- estufa de secagem a 105°C – *Fanen*;
- potenciômetro – *Digimed mod. DM 20*.

2.3 REAGENTES E PADRÕES

- Acetato de zinco para análise (PA), *Vetec*;
- ácido acético PA, *Vetec*;
- ácido bórico PA *Vetec*;
- ácido clorídrico 37 % PA, *Merck*;
- ácido sulfúrico concentrado (densidade de 1,840 g/mL a 20 °C) PA, *Vetec*;

- água deionizada;
- álcool etílico PA, *Vetec*;
- álcool isoamílico PA, *Merck*;
- amido de batata PA, *Sigma Aldrich*;
- amido modificado comercial, *Cornign*;
- azul de metileno PA, *Vetec*;
- biftalato de potássio PA, *Merck*;
- carboximetilcelulose PA *Genko*;
- fenolftaleína PA, *Vetec*;
- ferrocianeto de potássio PA, *Vetec*;
- glicose anidra PA, *Sigma Aldrich*;
- goma carragena PA, *Corning*;
- goma guar PA *Genko*;
- goma xantana PA, *Genko*;
- hidróxido de sódio PA, *Vetec*;
- pectina PA *Genko*;
- sulfato de cobre pentahidratado PA, *Merck*;
- sulfato de potássio PA, *Vetec*;
- sulfato de sódio anidro PA, *Quimex*;
- tartarato duplo de sódio e potássio PA, *Merck*;
- verde de bromocresol PA, *Vetec*;
- vermelho de metila PA, *Fluka*.

2.4 MATÉRIA PRIMA

- Cultura láctea para iogurte liofilizada, *Biorich*;
- leite em pó, *Itambé*;
- leite desnatado UHT, *Cemil*.

2.5 SOLUÇÕES

Ácido sulfúrico d= 1,820 g/mL: misturou-se a 120 mL de água deionizada 925 mL de ácido sulfúrico concentrado d = 1,840 g/mL em banho de gelo. A densidade da solução foi medida com densímetro ao atingir temperatura de 20 °C.

Indicador misto: 33 mg verde de bromocresol e 66 mg de vermelho de metila foram dissolvidos para 100 mL com álcool etílico.

Mistura catalítica: 100 g de sulfato de sódio anidro e 10 g de sulfato de cobre pentahidratado foram triturados com auxílio de gral e pistilo até obtenção de pó fino.

Solução alcoólica de fenolftaleína 1 %: 1 g de fenolftaleína foi dissolvido para 100 mL com álcool etílico.

Solução de acetato de zinco 30 %: 30 g de acetato de zinco foram dissolvidos para 100 mL de água deionizada.

Solução de ácido bórico 4 %: 4 g de ácido bórico foram dissolvidos para 100 mL com água deionizada.

Solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L: 9 mL de ácido clorídrico 37 %, com auxílio de bureta de 10 mL, foram transferido para balão de volumétrico de 1000 mL, contendo aproximadamente 200 mL de água deionizada, completou-se o volume.

Solução de Fehling A: 69,3 g de sulfato de cobre pentahidratado foram dissolvidos em água deionizada e o volume completado para 1000 mL.

Solução de Fehling B: 100 g de hidróxido de sódio foram dissolvidos em aproximadamente 300 mL de água deionizada. Adicionou-se ao poucos, com auxílio de banho de gelo 346 g de tartarato duplo de sódio e potássio. O volume foi completado para 1000 mL.

Padronização da solução de Fehling com glicose: misturou-se 5 mL da solução de Fehling A e 5 mL da solução de Fehling B e titulou-se com 1,0000 g de glicose, previamente seca em estufa a 105 °C por 1 hora, dissolvida em 100 mL de água deionizada de acordo com o método de Lane Eynon. Utilizou-se azul de metileno como indicador. O fator de correção foi calculado utilizando-se a média de 3 determinações.

Solução de ferrocianeto de potássio 15 %: 15 g de ferrocianeto de potássio foram dissolvidos para 100 mL de água deionizada.

Solução de hidróxido de sódio 0,135 mol/L: 10 g de hidróxido de sódio PA foram dissolvidos com 10 mL água deionizada, em banho de gelo. A decantação dos carbonatos foi realizada deixando a solução em repouso por 10 dias. Após, transferiu-se 5,4 mL do sobrenadante, com auxílio de bureta de 10 mL, para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água deionizada. A solução foi armazenada em frasco de polietileno.

Padronização da solução de hidróxido de sódio 0,135 mol/L: 0,2000 g de bifitalato de potássio previamente seco em estufa a 105 °C por 1 hora, foi titulado com a solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L utilizando-se como indicador a solução de fenolftaleína 1 %. O fator de correção foi calculado utilizando-se a média de 3 determinações.

Solução de hidróxido de sódio a 40 %: 400 g de hidróxido de sódio foram dissolvidos em água destilada, em banho de gelo, e o volume completado para 1000 mL. A solução foi armazenada em frasco de polietileno.

Solução de hidróxido de sódio a 50 %: 500 g de hidróxido de sódio foram dissolvidos em água destilada, em banho de gelo, e o volume completado para 1000 mL. A solução foi armazenada em frasco de polietileno.

Solução de padrão de amido de batata 12,5 %: 6,25 g de amido de batata foram solubilizados em 50 mL de água deionizada a 90 °C.

Solução de padrão de goma guar 1,5 %: 0,75 g de goma guar foi solubilizada em 50 mL de água deionizada a 90 °C.

Soluções a 1 % de cada padrão: amido de batata, amido modificado, goma guar, goma xantana, goma carragena, carboximetilcelulose e pectina: foram elaboradas soluções distintas a partir de 1 g de cada um dos padrões (amido de batata, amido modificado, goma guar, goma xantana, carboximetilcelulose e pectina), que foram solubilizados em água deionizada a 90 °C e completado o volume para 100 mL.

2.6 ELABORAÇÃO DO IOGURTE

Na indisponibilidade de material de referência certificado, optou-se por elaborar um lote de iogurte natural batido desnatado sem adição de amido, suficiente para contemplar todas as análises e que atendesse aos parâmetros físico-químicos previstos pelo Padrão de Identidade e Qualidade do Iogurte: teor de proteínas, teor de gorduras e acidez. O teor de proteínas foi estimado pelo método “Nitrogênio Total: micro-Kjeldahl”, o de gordura pelo “Método: Butirométrico para leite fluido” e acidez pelo método “Acidez titulável de leite fermentado” descritos na IN 68/2006 MAPA (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007).

Considerando-se que o amido é usualmente utilizado para compensar o baixo teor de gordura láctea, utilizou-se para a elaboração do iogurte leite desnatado. Optou-se pelo leite disponível no comércio com tratamento UHT devido à padronização prévia desta

matéria prima e por sua vida de prateleira, cerca de 6 meses, que possibilitaria a preparação de um segundo lote de iogurte, se necessário, e minimizar as possíveis variações entre lotes. Foram adquiridos em um supermercado de Belo Horizonte seis litros de leite UHT de uma mesma marca e lote. Verificou-se o teor de extrato seco total pelo “*Método: Gravimétrico*” e o teor de gordura pelo “*Método: Butirométrico para leite fluido*”, ambos descritos na IN 68/2006 MAPA (BRASIL, 2006).

2.6.1 Processamento do iogurte

Executou-se o processamento de acordo com o proposto por TAMIME e ROBINSON (1991) e utilizou-se a proporção de leite/cultura láctea recomendada pelo fabricante do preparado liofilizado da cultura láctea (BIORICH, 2011).

Inicialmente foi adicionado a 3 de leite cerca de 60 g de leite em pó desnatado, equivalente a 2 % (m/v), para ajustar litros teor do extrato seco para 12 %. A mistura foi homogeneizada e submetida a tratamento térmico de 85 °C por 9 minutos. Após este ciclo, o leite foi resfriado para cerca de 40 °C. Em seguida, inoculou-se 3 sachês de 400 mg do preparado liofilizado de cultura láctea para iogurte da marca Biorich[®], adquirida no comércio de Belo Horizonte. A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria à temperatura de 40 a 45 °C, por cerca de 4 horas, para possibilitar a fermentação. Neste período a acidez foi monitorada, a cada 30 minutos, pelo método “*Acidez titulável de leite fermentado*”, descrito na IN 68/2006 MAPA (BRASIL, 2006), até que se atingisse 0,6 % de ácido láctico. Ao atingir o pH de 4,6, procedeu-se ao rompimento do gel formado e a interrupção do aquecimento por resfriamento em banho de gelo até temperatura de refrigeração de 5 a 7 °C. Em seguida, o iogurte foi fracionado em 6 potes estéreis de vidro de 500 mL, previamente esterilizados em autoclave, com tampa metálica, os quais foram armazenados sob refrigeração de 2 a 8 °C até o momento das análises (Figura II.1).

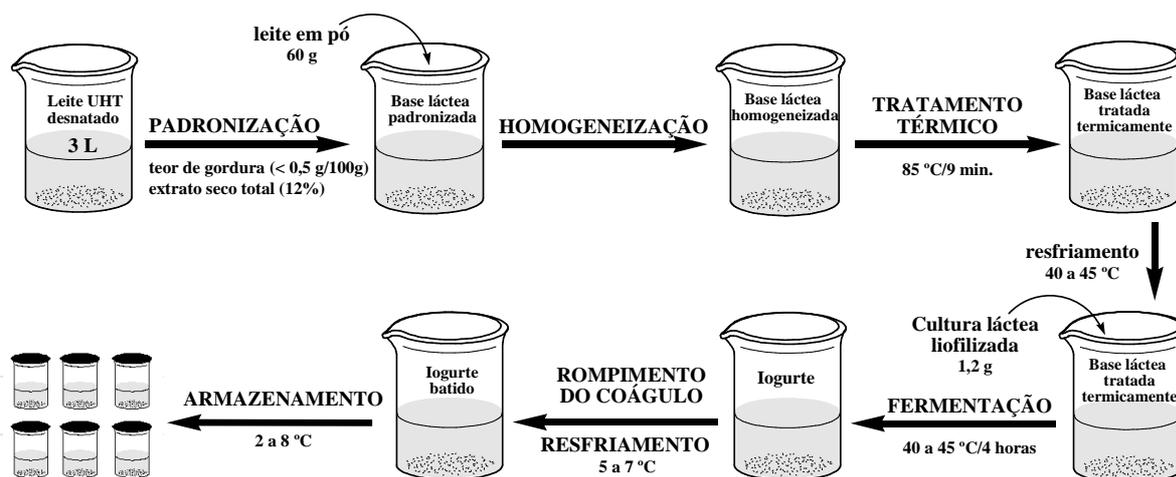


Figura II.1- Processamento do iogurte natural batido

2.6.2 Análises físico-químicas de controle de qualidade

2.6.2.1 Extrato seco total

A um pesa-filtro previamente tarado adicionou-se cerca de 5 g de leite fluido homogeneizado. O conjunto foi aquecido em banho-maria fervente por 30 minutos e, posteriormente, em estufa a 105 °C, por cerca de 2 horas. Transferiu-se o pesa-filtro com a amostra para um dessecador, aguardou-se cerca de 30 minutos para que atingisse a temperatura ambiente e realizou-se a primeira pesagem. Repetiram-se as operações de aquecimento, por 1 hora, resfriamento e pesagem. Este processo foi repetido até que a massa medida não excedesse a 1 mg entre duas pesagens consecutivas (BRASIL, 2006).

$$\% \text{ extrato seco total} = \frac{m2 - m0}{m1 - m0} \times 100$$

Sendo:

m_0 = massa da cápsula e tampa, em gramas;

m_1 = massa da cápsula, tampa e amostra, em gramas;

m_2 = massa da cápsula, tampa e amostra seca, em gramas.

2.6.2.2 Gorduras totais

O leite foi homogeneizado na própria embalagem (BRASIL, 2006). O iogurte foi diluído com água: pesou-se cerca de 25,00 g do iogurte e transferiu-se quantitativamente, com auxílio de um bastão de vidro e água destilada, para um balão volumétrico de 50 mL (IAL, 2004).

A um butirômetro de leite, adicionou-se 10 mL da solução de ácido sulfúrico $d = 1,820 \text{ g/mL}$, 11 mL da amostra previamente preparada e 1 mL de álcool isoamílico. Fechou-se com rolha para butirômetro. Com auxílio de luvas de vaqueta, homogeneizou-se a mistura observando os requisitos de biossegurança. A amostra foi centrifugada, em centrífuga de Gerber, por 5 minutos e transferida para banho-maria a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos. As operações de centrifugação e incubação foram repetidas antes de verificar a porcentagem de gordura na escala do aparelho. Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o teor de gordura do iogurte (BRASIL, 2006):

$$\% \text{ gordura} = \text{leitura} \times \frac{50}{\text{massa da amostra (g)}}$$

2.6.2.3 Acidez titulável

A cerca de 10,00 g da amostra de iogurte, adicionou-se 20 mL de água deionizada. Com o auxílio de um potenciômetro, titulou-se com solução de hidróxido de sódio $0,135 \text{ mol/L}$ padronizada até atingir $\text{pH} = 8,3$. Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular a acidez (BRASIL, 2006):

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{V \times Fc \times 0,9}{\text{massa da amostra (g)}}$$

Sendo:

V: volume da solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol/L}$ gasto na titulação, em mL;

Fc: fator de correção da solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol/L}$;

0,9: fator de conversão para ácido láctico.

2.6.2.4 Teor de proteínas

A um tubo de Kjeldahl, adicionou-se cerca de 1,00 g da amostra de iogurte, 2,5 g da mistura catalítica e 7 mL de ácido sulfúrico. O bloco digestor foi aquecido gradativamente, por rampas de temperaturas pré-definidas, até atingir $400 \text{ }^\circ\text{C}$ e a solução se tornar azul-esverdeada, livre de material não digerido. Após a digestão, o tubo de Kjeldahl foi transferido para o aparelho destilador que adicionou os reagentes, conforme programa estabelecido no equipamento: 50 mL de hidróxido de sódio 50 % e 20 mL de ácido bórico 4 % e 100 mL de água deionizada (Figura II.2). O destilado obtido foi titulado

com solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L, utilizando-se indicador misto. Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o teor de proteínas (BRASIL, 2006):

Sendo:

V: volume da solução de HCl 0,1 mol/L gasto na titulação, em mL;

Fc: fator de correção da solução de HCl 0,1 mol/L;

F: fator de transformação de nitrogênio em proteína ($F= 6,39$ para produtos lácteos);



Figura II.2 – Bloco digestor (A) e destilador de amostras de alimentos (B) para análise de proteínas

2.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DE AMIDO - IN 68/2006 MAPA

A IN 68/2006 MAPA descreve em seu *Anexo V* o método *Glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e amido (método a Lane-Eynon)* para quantificação, dentre outros, de amidos adicionados em iogurtes (BRASIL, 2006).

O método de análise quantitativa de amido está descrito no anexo V da IN 68/2006 e se aplica a iogurtes.

Pesou-se cerca de 10,00 g da amostra diretamente em balão volumétrico, clarificou-se com 5 mL de cada uma das soluções de ferrocianeto de potássio 15 % e acetato de zinco a 30 %. A mistura foi agitada e completou-se o volume com água deionizada. Após sedimentação, filtrou-se em papel de filtro. O resíduo sólido foi lavado no próprio funil com porções de álcool etílico e transferido para outro erlenmeyer, com auxílio de 100 mL de água deionizada. Adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico concentrado e aqueceu-se sob refluxo em banho-maria durante 2 horas. O resíduo sólido hidrolisado foi esfriado e neutralizado com solução de hidróxido de sódio a 40 %, a

solução alcoólica de fenolftaleína 1 % foi utilizada para verificar a neutralização. Transferiu-se quantitativamente o material para balão volumétrico de 200 mL e clarificou-se novamente com 5 mL de cada uma das soluções de ferrocianeto de potássio 15 % e acetato de zinco a 30 %. Após completar o volume, filtrou-se para béquer de 200 mL e titulou-se com 5 mL dos reagentes de Fehling A e B, como mostrado na Figura II.3. Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o teor de carboidratos (BRASIL, 2006):

$$\% \text{ de carboidratos} = \frac{100 \times Vb \times T \times 0,90}{\text{massa da amostra (g)} \times Vt}$$

Sendo:

T: título da solução de Fehling;

Vb: volume do balão volumétrico utilizado;

Vt: volume de amostra gasto na titulação, em mL;

0,9: fator de conversão de glicose para amido.

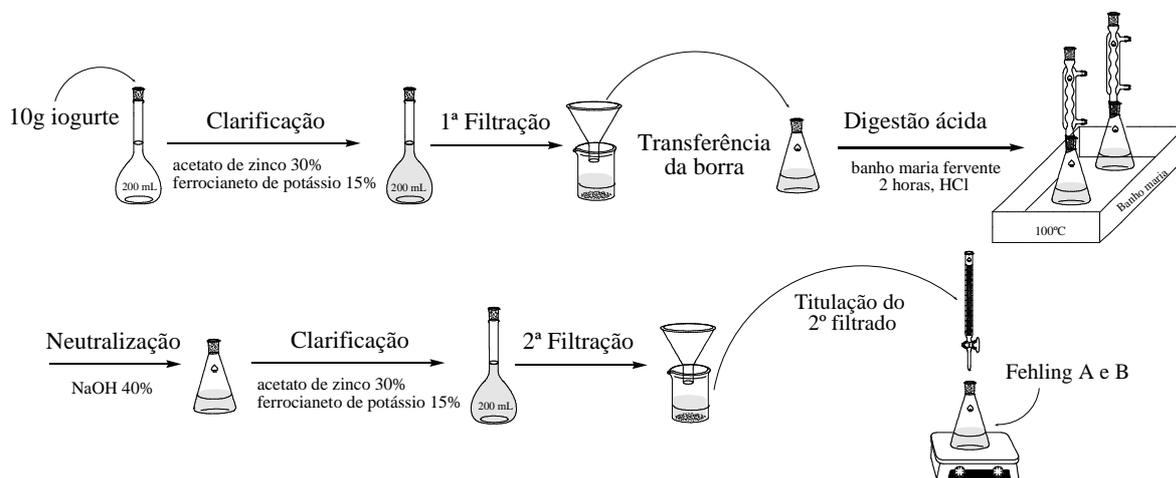


Figura II.3 – Método de análise quantitativa de amido em leites fermentados (IN 68/2006 MAPA)

2.7.1 Validação do método oficial

Delineou-se validação quantitativa intralaboratorial para método titulométrico de amido em iogurtes. Os parâmetros de desempenho foram embasados nos protocolos propostos por SOUZA (2007) e INMETRO (2010), assim como os testes estatísticos e as premissas a eles associadas: limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão e seletividade. Por se tratar de um método titulométrico direto, que não emprega o recurso de curva de calibração para quantificação do analito, não foi necessário avaliar os parâmetros linearidade, efeitos de matriz e sensibilidade. Por não se tratar da determinação de um analito presente na matriz em concentrações traços, o limite de detecção também não foi estudado (INMETRO, 2010).

Devido à ausência de material de referência certificado para o escopo analítico em questão, utilizou-se como amostra o iogurte natural batido, fabricado no laboratório, puro e adicionado dos padrões de amido de batata 12,5 % e de goma guar 1,5 %. Houve necessidade de dividir a validação em 2 etapas. Na primeira etapa, só com o amido, foram estudados o limite de quantificação, a exatidão e a precisão. Na segunda etapa, foi avaliada a seletividade para determinação do amido, tendo a goma guar como interferente potencial.

A adequação do método foi avaliada com base nos resultados dos parâmetros determinados, considerando os critérios de aceitabilidade. O nível de significância adotado nos testes de hipótese foi $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram realizados em planilhas do *Microsoft Office Excel2007*[®].

2.7.1.1 Limite de quantificação, exatidão e precisão

O limite de quantificação, exatidão e precisão experimentais foram definidos em ensaios com a amostra de iogurte natural batido elaborada no laboratório. Alíquotas de 10 g do iogurte foram adicionadas de diferentes massas da solução estoque de padrão de amido de batata a 12,5 %, correspondendo às concentrações de: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; e 1,25 g/100g respectivamente, em 6 repetições aleatórias e independentes. Utilizou-se como grupo controle alíquotas de 10 g em 6 repetições de iogurte sem adição de amido (Tabela II.1). Como o objetivo no experimento foi investigar o desempenho do método, considerando-se a possibilidade de perda do amido, optou-se por adicionar teores de amido próximos ao valor máximo estipulado pela legislação, ou seja, 1 g/100g (BRASIL, 2007). Para avaliar a precisão intermediária dos resultados, as análises foram repetidas em um segundo dia variando-se o analista, vidrarias e reagentes.

TABELA II.1 – Mapa do preparo do iogurte adicionado de diferentes volumes da solução de padrão de amido a 12,5 % para os testes de limite de quantificação, exatidão e precisão

Teor de amido no iogurte g/100g	Alíquota de iogurte (g)	Alíquota da solução estoque de amido (g)
0,00	10	-
0,25	10	0,20
0,50	10	0,40
0,75	10	0,60
1,00	10	0,80
1,25	10	1,00

Valores extremos (*outliers*) foram investigados nos resultados de recuperação aparente obtidos para cada nível de concentração pelo teste de Grubbs. As estatísticas de Grubbs foram calculadas simultaneamente para um valor extremo (G_1), dois valores vicinais (G_2) e dois valores polares (G_3). A indicação de valor extremo por pelo menos uma destas estatísticas foi suficiente para remoção do dado. Após eliminação do valor extremo, o teste de Grubbs foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados (SOUZA, 2007).

O limite de quantificação foi investigado a partir da adição de concentrações crescentes do padrão de amido ao iogurte. Devido à possibilidade de interferência da matriz, presença de lactose, optou-se por iniciar o estudo a partir de 0,25 g/100g. O cálculo teórico para o limite de quantificação do amido, utilizando-se o volume total de clarificado contido no balão volumétrico de 200 mL, foi de 0,45 g/100g:

$$\% \text{ de carboidratos} = \frac{100 \times 200 (Vb) \times 0,05 (T) \times 0,90}{10,00 (m) \times 200 (Vt)} = 0,45 \text{ g/100g}$$

Sendo:

T : título da solução de Fehling;

Vb : volume do balão volumétrico utilizado;

Vt : volume de amostra gasto na titulação, em mL;

m = massa da amostra em gramas.

Exatidão foi investigada por meio da média de recuperação aparente obtida para as doze replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. O critério

adotado para considerar os resultados como satisfatórios foi recuperação de 80 a 110 % (EC, 2002).

Precisão, sob condições de repetitividade, foi expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR_r) obtido para as replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Este parâmetro foi considerado aceitável quando dentro de dois terços do desvio padrão de reprodutibilidade calculado pela equação de Horwitz modificada por Thompson (SOUZA, 2007). Para as concentrações estudadas, 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 g/100g, foram calculados pela equação de Horwitz os valores limites para os desvios padrão sob condições de reprodutibilidade (DPR_R) e, a partir de 2/3 destes valores, os desvios padrão de repetitividade (DPR_r) (Tabela II.2).

Equação de Horwitz $\sigma_{RH} = 0,02c^{0,8495}$

Sendo:

c = concentração teórica adicionada do analito expressa como fração de massa

Tabela II.2 – Desvios aceitáveis de repetitividade e reprodutibilidade em função das concentrações de amido estudadas

Concentração (g/100g)	DPR_r	DPR_R (%) = CV (%)
0,25	3,29	4,93
0,50	2,96	4,44
0,75	2,78	4,18
1,00	2,67	4,00
1,25	2,58	3,87

DPR_r = desvio padrão sob condições de repetitividade; DPR_R = desvio padrão sob condições de reprodutibilidade.

2.7.1.2 Seletividade

2.7.1.2.1 Testes com soluções padrão de gomas

A adição de gomas nas formulações comerciais de iogurte é uma prática rotineira. Estes polissacarídeos possuem estrutura molecular semelhante ao amido e, portanto, também são despolimerizadas por ácidos a quente podendo gerar fragmentos redutores. O sal de cobre presente no reagente de Fehling reage de forma inespecífica com a função hemiacetal livre dos açúcares redutores. Para investigar esta hipótese, elaborou-se, soluções a 1 % de cada um dos padrões de espessantes estudados: goma guar, goma xantana, carboximetilcelulose, pectina, amido modificado comercial e amido de batata.

O procedimento de hidrólise ácida foi realizado, de forma independente, para cada uma das soluções padrão de espessante, em triplicata. Transferiu-se para erlenmeyer de boca esmerilhada alíquota de 10 g, submeteu-se ao processo de hidrólise ácida através da adição de 10 mL de ácido clorídrico concentrado e aquecimento da solução em banho-maria fervente com refluxo por 2 horas. Resfriou-se em água corrente, neutralizou-se com hidróxido de sódio 40 % (verificando a neutralização através da adição de solução alcoólica de fenolftaleína 1 %), transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e titulou-se com reagente de Fehling (Figura II.4). Uma vez que o objetivo foi avaliar a possibilidade de interferência dos espessantes na análise, utilizou-se o mesmo fator de correção de amido para glicose (0,9) no cálculo do total de amido presente na amostra.

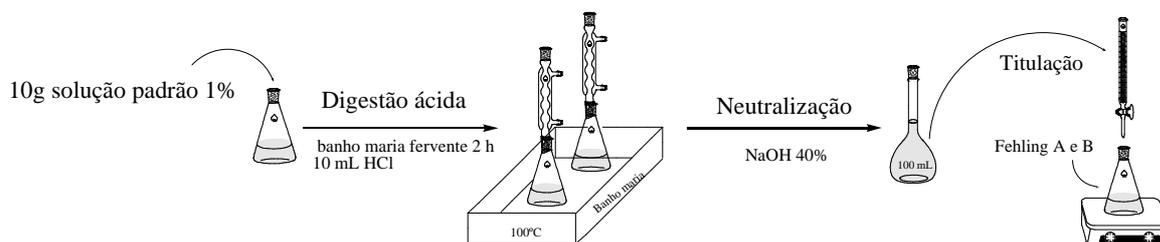


Figura II.4 – Esquema da digestão ácida dos espessantes estudados

2.7.1.2.2 Testes com goma guar adicionada ao iogurte

Escolheu-se a goma guar para os testes de seletividade com o iogurte por ser a goma mais utilizada (35 %) nas formulações dos iogurtes comerciais. Elaborou-se solução estoque de goma guar a 1,5 %, da qual se adicionou massas de 1,00 g a alíquotas de 10 g do iogurte, em triplicata, contendo 0,40 e 1,00 g da solução de padrão de amido a 12,5 %, correspondendo às concentrações de 0,50 e 1,25 g/100g respectivamente. Utilizou-se como grupo controle alíquotas de 10 g de iogurte, em triplicata, contendo 2,00 g da solução de padrão de goma guar a 1,5 % (Tabela II.3).

TABELA II.3 – Mapa do preparo de alíquotas do iogurte, de 10 g cada, adicionadas de 2,0 g de goma guar 1,5 % e de 0,0; 0,4 e 1,0 g do padrão de amido de batata 12,5 %, correspondendo às concentrações de 0,3 % para a goma guar e 0,0; 0,50, 1,25 % para o amido de batata, respectivamente

Teor de amido no iogurte %	Alíquota de iogurte (g)	Alíquota da solução estoque de amido 12,5 % (g)	Alíquota da solução estoque de goma guar 1,5% (g)
0,00	10	-	2,00
0,50	10	0,40	2,00
1,25	10	1,00	2,00

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE CONFORMIDADE DO IOGURTE FABRICADO

O leite utilizado para elaboração do iogurte apresentou extrato seco total igual a 10 g/100g e teor de gordura de 0,3 g/100g, se mostrando adequado para a elaboração do iogurte.

A Tabela II.4 apresenta os valores médios de teor de gordura, teor de proteínas e acidez do iogurte natural batido produzido no laboratório. O teor de gordura, 0,49 g/100g, se encontrou dentro do máximo estipulado pela legislação (máximo de 0,5 g/100g) para ser denominado desnatado. O teor de proteínas, 3,38 g/100g, atendeu ao requisito mínimo exigido de 2,9 g/100g. A acidez se mostrou adequada, 0,73 g de ácido láctico/100g, indicando que a fermentação foi suficiente para reduzir o pH do meio sem torná-lo muito ácido. Estas análises evidenciaram a caracterização do iogurte como desnatado e sua adequação ao Padrão de Identidade e Qualidade dos leites fermentados, portanto apto a ser utilizado no processo de validação do método.

Tabela II.4 – Resultados parâmetros físico-químicos do PIQ do iogurte: teor de gordura, proteínas e acidez

Parâmetro	Legislação (g/100g)	Valor encontrado (g/100g)
Teor gordura	Desnatado: máx. 0,5	0,49 ± 0,00
Teor proteínas	Mín. 2,9	3,38 ± 0,07
Acidez em ácido láctico	0,6 a 1,5	0,73 ± 0,01

3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PELA IN 68/2006

3.2.1 Limite de quantificação, exatidão e precisão

Não foi possível observar o ponto final da titulação (ausência da coloração azul), mesmo após a adição de todo o conteúdo obtido do 2º filtrado ao reagente de Fehling, aproximadamente 200 mL. Este fato ocorreu em todas as replicatas de todos os níveis de concentrações de amido estudados (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 g/100g). Portanto, não foi possível quantificar o amido e, conseqüentemente, não foi possível estimar a recuperação aparente do amido adicionado ao iogurte e estudar a precisão. Considerando que o limite de detecção teórico do método é de 0,45 g/100g, pode-se inferir que houve relevante perda durante sua execução, uma vez que não se pode quantificar o amido na concentração máxima estipulada pela legislação Brasileira (1 g/100g). Caso um laboratório oficial, ao executar tal análise, consiga quantificar o amido presente nos iogurtes, é indício de que a indústria adicionou este espessante em teores acima do permitido pela legislação. Sendo assim, é imperativa a alteração do método de análise proposto pela IN 68/2006 para que haja eficácia na fiscalização da qualidade dos produtos lácteos cuja adição de amido é permitida.

Após extensa busca pela literatura, não foram encontrados trabalhos que relatem tal falta de exatidão ou qualquer outro problema relacionado a este método. Normas internacionais como a *Official Methods of Analysis* (AOAC) e *Fédération Internationale Du Lait* (FIL) também não indicam método para quantificação de amidos em produtos lácteos (AOAC, 2006).

3.2.2 Seletividade

3.2.2.1 Testes com soluções padrão de gomas

Neste estudo foi avaliada a hidrólise das gomas, sem adição de matriz e sem passar pelas etapas de clarificação e filtração. Após a hidrólise ácida e titulação dos resíduos dos espessantes em questão (amido de batata, amido modificado, gomas xantana, guar, carboximetilcelulose e pectina) foi possível calcular a recuperação de 85 % para o amido de batata, 77 % para o amido modificado e 60 % para a goma guar. Para a goma xantana, carboximetilcelulose e pectina não foi possível observar o ponto final da titulação com o reagente de Fehling. Porém, observou-se a presença de precipitado vermelho tijolo indicando que parte do Cu^{2+} reagiu com os produtos da hidrólise das gomas (Tabela II.5). A partir destas observações confirmou-se a possibilidade das gomas interferirem no resultado final do cálculo dos carboidratos, uma vez que seus produtos de hidrólise são oxidados pelo reagente de Fehling e podendo ser quantificados como amido, caso estejam presentes nas formulações dos iogurtes.

A recuperação da solução padrão de amido, apesar de estar dentro da faixa de aceitabilidade de 80 % a 110 % definida na EC (2002), pode ser considerada baixa uma vez que o método descrito na IN 68/2006 MAPA para quantificar o amido possui várias etapas. Isoladamente a hidrólise ácida do amido produz uma perda de 15 %. Este fato pode ser explicado pela hidrólise incompleta do amido com formação de dextrinas, além da glicose.

Tabela II.5 – Teor de carboidratos obtido a partir da hidrólise ácida de gomas e titulação com reagente de Fehling

Espessante	Teor de carboidratos (mg/100mL)	Recuperação (%)
Amido de batata	0,85 ± 0,03	85
Amido modificado	0,77 ± 0,06	77
Goma Guar	0,60 ± 0,03	60
Goma Xantana	presença de	-
Carboximetilcelulose	precipitado	-
Pectina	vermelho tijolo	-

3.2.2.2 Testes com goma guar adicionada ao iogurte

Como no estudo de exatidão e precisão não foi possível quantificar o amido adicionado, provavelmente devido à perdas ocorridas nas etapas da análise, optou-se por não executar o estudo da seletividade das gomas na matriz uma vez que o objetivo principal de quantificação o amido não foi alcançado.

4 CONCLUSÕES

O iogurte elaborado no laboratório se mostrou adequado, segundo seus parâmetros físico-químicos de qualidade, para ser utilizado no processo de validação do método.

O método proposto pela IN 68/2006 MAPA se mostrou falho, uma vez que não foi possível quantificar o amido acrescentado nos níveis estudados.

A hidrólise ácida é capaz de despolimerizar os espessantes estudados, gomas xantana, guar, carboximetilcelulose e pectina, e seus resíduos são oxidados pelo reagente de Fehling. Foi observada recuperação de 60 % da solução de goma guar. Nos demais espessantes foi observado a formação de precipitado vermelho tijolo indicando a produção de óxido de cobre, porém abaixo do limite de quantificação do reagente de Fehling.

A hidrólise ácida nas condições propostas pelo método descrito na IN 68/2006 MAPA não é capaz de despolimerizar totalmente o amido de batata. Constatou-se recuperação de 85 % da solução deste padrão. Para se utilizar um eventual fator de correção para a hidrólise ácida do amido, é necessário aprofundar os estudos com variações nas condições de hidrólise e testes com outras fontes amiláceas para verificar se este comportamento de hidrólise incompleta pode ser generalizado.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIORICH. *Como preparar*. Disponível em: <<http://www.biorich.com.br/>> Acesso em: 18 jun. 2011.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial*, Brasília, 24 outubro 2007, p. 5.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68 de 12 de dezembro de 2006. Aprova os métodos Analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Anexo V Métodos Quantitativos - Glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e amido (método Lane-Eynon). *Diário Oficial*, Brasília, 14 dezembro 2006. Seção 1.
- EARLY, R. *Tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia, 2000. 459 p.
- EC (European Commission). *Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results*. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002.
- IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2004. 1018 p.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Brasileiro come menos arroz com feijão e mais comida industrializada em casa*. Comunicação Social, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1788&id_pagina=1> Acesso em: 30 out. 2011.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia). DOQ-CGCRE-008 – *Orientação sobre validação de métodos analíticos*, rev. 03, fev. 2010.
- LONGO, G. *Influência da adição de lactase na produção de iogurtes*. Curitiba: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFP, 2006, 89p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- MARTIN, A. F. *Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz da USP, 2002. 35 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SILVA, E. B.; NASCIMENTO, K. O. Avaliação da Adequação da rotulagem de iogurtes. *Ceres: Nutrição & Saúde*, vol. 2, n. 1, p. 9-14, 2007.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Belo Horizonte: Departamento de Ciência de Alimentos da UFMG, 2007, 296p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. *Yogur: Ciência e tecnologia*. Zaragoza: Acribia, 1991. 368 p.

CAPÍTULO III – INVESTIGAÇÃO DAS PERDAS OCORRIDAS NA EXECUÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE AMIDOS (IN 68/2006 MAPA)

RESUMO

A confirmação da exatidão e precisão de um método analítico é essencial para que os resultados obtidos sejam confiáveis e a credibilidade do laboratório seja mantida. Durante os procedimentos de validação do método titulométrico de Lane-Eynon descrito na IN 68/2006 do MAPA para quantificação de amidos em iogurte, foi constatada falta de exatidão. Este método se baseia na clarificação e filtração do iogurte, para separação dos açúcares simples dos complexos. O resíduo sólido é hidrolisado por ácido a quente, neutralizado, clarificado, novamente filtrado e titulado com reagente de Fehling. Detectou-se presença de amido no primeiro filtrado a partir do teste do Lugol. Desenvolveu-se e validou-se um método por espectrofotometria para quantificar o teor de amido presente neste filtrado. Constatou-se a perda de cerca de 30 a 38% do amido adicionado ao iogurte. Executou-se o método descrito da IN 68/2006 a partir da etapa de digestão ácida, a fim de verificar a exatidão e precisão das etapas subseqüentes: hidrólise, neutralização, clarificação, filtração e titulação. Constatou-se perda de 30 a 38 % de amido no primeiro filtrado e cerca de 6 % na digestão ácida da amostra. Constatou-se também falta de exatidão e precisão do método quando executado a partir da hidrólise ácida.

Palavras chave: exatidão, precisão; amido; perdas.

ABSTRACT

The verification of the accuracy of an analytical method is essential for that results obtained are reliable and the credibility of the laboratory is maintained. During the validation procedures of a Lane-Eynon method described in IN 68/2006 of MAPA for quantifying starch in yogurt, it was observed lack of accuracy. Such method is based in clarification and filtration of the yogurt for separation of complex from simple sugars. The solid residue is hydrolyzed by hot acid, neutralized, clarified, filtered again and titrated with Fehling's reagent. Starch was detected in the filtrate by Lugol' reagent. The method for quantifying starch by *spectrophotometer* in the first filtrate was developed and validated. It was found around 30 to 38% of starch added to yogurt. The execution of the method described in IN 68/2006 from hydrolysis stage to verify accuracy of the next stages: hydrolysis, neutralization, clarification, filtration and titration. it was lost around 6% in the acidic hydrolysis. It was found a lack of accuracy and precision of the method when executed from the acid hydrolysis.

Key words: accuracy, starch and low recoveries

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é indiscutível a importância do trabalho com qualidade em qualquer esfera profissional. No que diz respeito aos laboratórios, é pré-requisito a demonstração da competência técnica, através de evidência objetiva para garantir resultados com qualidade requerida, alicerçada em regras harmonizadas internacionalmente, é pré-requisito para a credibilidade de qualquer laboratório (IAL, 2005; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

De forma geral, os laboratórios que desenvolvem suas atividades no controle de qualidade de alimentos optam por seguir as recomendações da Norma ABNT ISO/IEC 17025:2005 – *Requisitos Gerais Para a Competência de Laboratórios de Ensaio de Calibração* que contempla em seu escopo requisitos para alcançar competência tanto gerencial quanto técnica.

Entre os quesitos técnicos está a validação de métodos, que deve ser suficientemente abrangente para atender às necessidades de uma determinada aplicação (IAL, 2004; ABNT, 2005). Ao executar um método analítico, tem-se como objetivo que os resultados obtidos reflitam o valor verdadeiro do parâmetro mensurado e que este seja repetitivo. Caso se constate principalmente falta de exatidão durante os procedimentos de validação, deve-se interromper a validação e reavaliar a marcha analítica proposta. Quando adequado, é necessário verificar as possíveis fontes de perdas e buscar alternativas para evitá-las ou minimizá-las. Se a investigação das perdas for demasiadamente dispendiosa, demorada ou inviável é necessário buscar métodos alternativos e até mesmo desenvolver novos métodos (INMETRO, 2010).

Em laboratórios de análise fiscal, como o Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN, resultados exatos e repetitivos são de extrema importância, tendo em vista que várias ações das VISAS se respaldam nos laudos analíticos. O monitoramento da qualidade de alimentos é feito por meio de amostragem. Para garantir a autenticidade do processo, o fiscal sanitário deve recolher, quando não perecível, três amostras da mesma marca, quantidade e lote de fabricação em quantidade suficiente para todas as análises físico-químicas e microbiológicas. Para os alimentos perecíveis, em virtude de sua natureza, recolhe-se apenas uma amostra, também em quantidade suficiente para contemplar todas as análises. As amostras devem ser embaladas em invólucros de segurança que evidenciam tentativas de violação.

Após o recolhimento dos produtos, o estabelecimento que sofreu fiscalização recebe o termo de coleta de amostras e um invólucro. Assim, passa a ser o detentor ou responsável pela amostra que poderá servir como contraprova. As outras duas amostras são encaminhadas imediatamente ao laboratório, uma para a realização das análises, outra para servir de testemunho. A empresa fiscalizada tem o direito garantido por lei de solicitar uma segunda análise do seu produto, caso a primeira gere laudo demonstrando que tal alimento estava em desacordo com a legislação. Então é agendada a análise de contraprova do invólucro que ficou sob a guarda do estabelecimento comercial que deverá ser realizada com a presença de um perito nomeado pela indústria. Caso o resultado seja similar ao primeiro, a VISA prossegue com o processo administrativo. Caso o resultado seja divergente, o LACEN tem o direito de realizar a análise testemunho. Todas estas análises são realizadas em dias distintos e podem ser utilizados diferentes lotes de reagentes. A comprovação da repetitividade de um método analítico proporciona ao laboratório credibilidade e reduz divergências quanto aos resultados. Para as amostras perecíveis, após a apreensão do alimento, é agendada a execução das análises na presença de um perito indicado pela indústria fabricante. A certeza da exatidão e o conhecimento das etapas críticas de um método permitem ao analista executar a análise e emitir resultados com confiabilidade e segurança necessária para contra argumentar possíveis discussões a respeito do resultado analítico (MINAS GERAIS, 1997; FUNED, 2011).

Em estudos de validação do método titulométrico de Lane-Eynon, descrito na IN 68/2006 do MAPA para quantificação de amidos em iogurte, foi constatada falta de exatidão. Em linhas gerais, este método baseia-se na clarificação e filtração do iogurte para separar a lactose do amido, que posteriormente sofre digestão ácida seguida de nova clarificação e filtração. O filtrado é então titulado de acordo o método de Lane-Eynon, no qual se adiciona 5 mL dos reagentes de Fehling A e B a um erlenmeyer e prossegue-se com a titulação a quente com o filtrado, utilizando-se azul de metileno como solução indicadora (BRASIL, 2006).

Neste trabalho teve-se como objetivo investigar as possíveis fontes de perdas no método oficial de quantificação de amidos em iogurtes a fim de determinar o impacto destas discrepâncias e servir de subsídio para futuras alterações deste método.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As vidrarias volumétricas e equipamentos de medição utilizados neste trabalho foram calibrados por empresas acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

Os ensaios foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química Bromatológica e Cromatografia da FUNED.

2.1 MATERIAL

- Balão volumétrico de 50, 100 e 1000 mL;
- bastão de vidro;
- béquer de 50, 100 e 250 mL;
- béquer de polietileno de 250 mL;
- bureta de 10 e 25 mL;
- condensador de bolas;
- cubeta de vidro quadrada de 1 cm;
- erlenmeyer com boca esmerilhada de 250 mL;
- erlenmeyer de 250 mL;
- erlenmeyer de boca larga de 500 mL;
- espátula de aço inox;
- funil com haste;
- luvas de vaqueta;
- papel de filtro qualitativo;
- pipeta volumétrica de 5 mL;
- proveta de 10 mL.

2.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica com resolução de 0,0001g – *Metler mod. AG 285*;
- balança semi-analítica com resolução de 0,01g – *Micronal mod. B1600*;
- banho-maria com *ajuste digital de temperatura* – *Marconi*;

- chapa aquecedora com agitação magnética - *Corning*;
- espectrofotômetro – *Shimadzu* (UV - 1601).

2.3 REAGENTES E PADRÕES

- Acetato de zinco, PA, *Vetec*;
- ácido clorídrico 37% PA, *Merck*;
- água deionizada;
- álcool etílico PA, *Vetec*;
- amido de batata PA, *Sigma*;
- fenolftaleína PA, *Vetec*;
- ferrocianeto de potássio PA, *Vetec*;
- glicose PA, *Sigma*;
- hidróxido de sódio PA, *Vetec*;
- Iodeto de potássio PA, *Vetec*;
- Iodo ressublimado PA, *Merck*;
- sulfato de cobre pentahidratado PA, *Merck*;
- sulfato de potássio PA, *Vetec*;
- tartarato duplo de sódio e potássio PA, *Merck*.
- vermelho de metila PA, *Fluka*.

2.4 SOLUÇÕES

Solução de acetato de zinco 30 %: 30 g de acetato de zinco foram dissolvidos para 100 mL de água deionizada.

Solução alcoólica de fenolftaleína 1 %: 1 g de fenolftaleína foi dissolvido para 100 mL com álcool etílico.

Solução de Fehling A: 69,3 g de sulfato de cobre pentahidratado foram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 1000 mL.

Solução de Fehling B: 100g de hidróxido de sódio foi dissolvido em aproximadamente 300 mL de água destilada. Adicionou-se ao poucos, com auxílio de banho de gelo 346 g de tartarato duplo de sódio e potássio. O volume foi completado para 1000 mL.

Padronização da solução de Fehling com glicose: misturou-se 5 mL da solução de Fehling A e 5 mL da solução de Fehling B e titulou-se com 1,0000 g de glicose, previamente seca em estufa a 105°C por 1 hora, dissolvida 100 mL de água destilada de acordo com o método de Lane Eynon. Utilizou-se azul de metileno como indicador. O fator de correção foi calculado utilizando-se a média de 3 determinações.

Solução de ferrocianeto de potássio 15 %: 15 g de ferrocianeto de potássio foram dissolvidos para 100 mL de água deionizada.

Solução de hidróxido de sódio a 40 %: 400 g de hidróxido de sódio foram dissolvidos em água destilada, em banho de gelo, e o volume completado para 1000 mL. A solução foi armazenada em frasco de polietileno.

Solução de Lugol: 10 g de iodeto de potássio e 5 g de iodo foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Solução de padrão de amido de batata 12,5 %: 6,25 g de amido de batata foi solubilizado em água destilada a 90 °C e o volume completado para 50 mL.

2.5 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO NO 1º FILTRADO DO MÉTODO DESCRITO NA IN 68/2006 MAPA

A Instrução Normativa 68/2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento estabelece método titulométrico para quantificação de amidos em iogurtes. Este se baseia em precipitar o amido através de clarificantes e separá-lo dos demais açúcares simples pelo processo de filtração. O resíduo sólido é lavado com álcool etílico e posteriormente transferido para um erlenmeyer no qual sofrerá hidrólise com ácido clorídrico em banho-maria fervente. O amido despolimerizado é neutralizado, novamente clarificado, para reter o conteúdo protéico e lipídico, e filtrado. Este segundo filtrado é utilizado na titulação com reagente de Fehling para quantificar a glicose proveniente do amido. Ao validar este método, constatou-se falta de exatidão dos resultados através de estudos de repetitividade. Ao adicionar concentrações conhecidas de amido ao iogurte, próximas ao máximo estabelecido pela legislação (1 g/100g), não foi possível observar o ponto final da titulação com o reagente de Fehling, indicando que houve perdas durante a execução do método.

Através do teste do lugol com o primeiro filtrado detectou-se a presença de amido (Figura III.1). Este fato evidenciou que a primeira etapa de filtração poderia ser uma relevante fonte de perda.

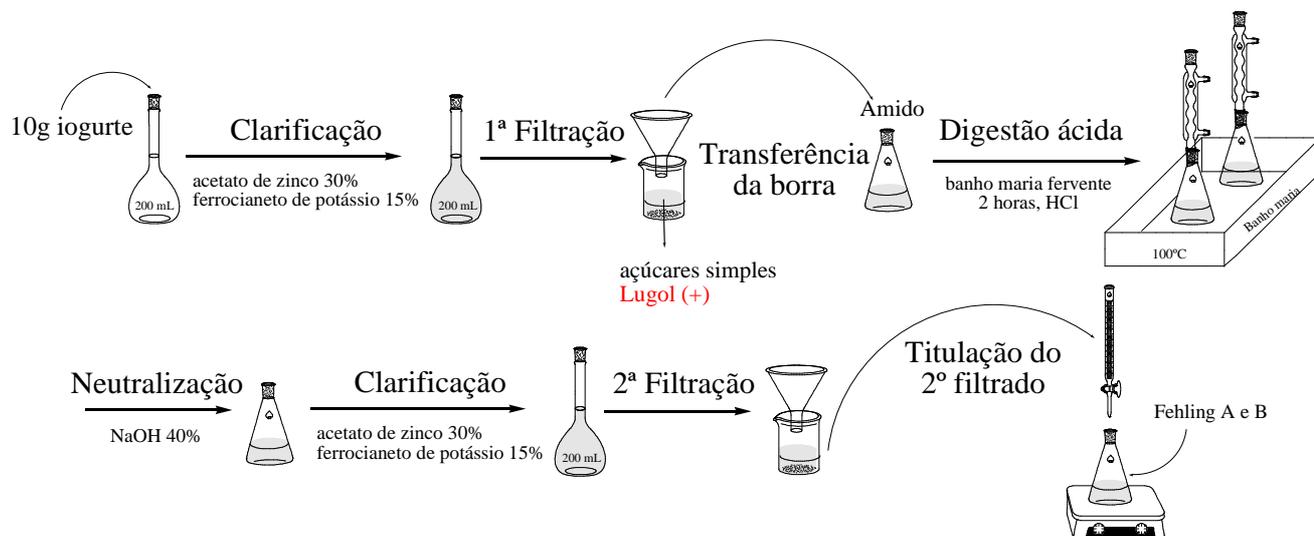


Figura III.1 - Método de análise quantitativa de amido em leites fermentados evidenciando a presença de amido no 1º filtrado

O reagente de Lugol é tradicionalmente utilizado em testes qualitativos com o objetivo de detectar a presença de amido (BRASIL, 2006). A literatura também relata usos da cor produzida pelo complexo I_3 -amido para monitorar reações de oxirredução do iodo com fármacos e para quantificar o teor de amilose em alimentos através da espectrofotometria. Tendo em vista os relatos na literatura e por se tratar de uma reação rápida e de baixo custo, optou-se por desenvolver um método espectrofotométrico para quantificar a cor produzida pelo complexo I_3 -amido e conseqüentemente mensurar o amido presente no filtrado da primeira etapa filtração (PEREIRA et al, 2002; LIU et al, 2009).

O reagente de Lugol, se adicionado em excesso e/ou à soluções concentradas de amido, satura rapidamente os sítios ativos das cadeias de amilose e produz cor azul intensa impedindo a quantificação do complexo formado por espectrofotometria, uma vez que em altas concentrações a lei de Lambert-Beer não pode ser observada (LIU et al, 2009).

O método baseou-se em recolher 2 mL do 1º filtrado, obtido a partir do iogurte, adicionado de padrão de amido nas concentrações 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; e 1,25 g/100g, para balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 125 μ L de Lugol, completou-se o volume com um filtrado isento de amido, e realizou-se leitura no espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 580 nm, conforme indicado na Figura III.2.



Figura III.2 – Método desenvolvido para quantificar a perda de amido no 1º filtrado do método IN 68/2006 MAPA

2.5.1 Validação do método desenvolvido para quantificação do amido no 1º filtrado por espectrofotometria

Delineou-se validação quantitativa intralaboratorial para método espectrofotométrico para investigação do teor de amido presente no 1º filtrado obtido durante a execução do método *Glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e amido (método Lane-Eynon)*, IN 68/2006 MAPA. Os parâmetros de desempenho foram embasados nos protocolos propostos por SOUZA (2007) e INMETRO (2010), assim como os testes estatísticos e as premissas a eles associadas: faixa linear, efeitos de matriz, sensibilidade e limites de detecção e quantificação teóricos. Uma vez que o objetivo deste método é estimar a presença de amido no 1º filtrado, optou-se por não estudar os parâmetros exatidão e precisão. A seletividade não foi estudada por se tratar de iogurte elaborado no laboratório com adição controlada de amido à formulação. Utilizou-se como grupo controle filtrados obtidos a partir de alíquotas de iogurtes sem amido, que foram preparados de acordo com o método desenvolvido: adicionou-se 125 µL de Lugol e completou-se o volume do balão de 25 mL com o filtrado.

A adequação do método foi avaliada com base nos resultados dos parâmetros determinados, considerando os critérios de aceitabilidade. O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram realizados em planilhas do *Microsoft Office Excel 2007*[®].

Foi utilizada solução padrão de amido de batata (12,5 %) e amostra de iogurte natural batido fabricado no laboratório.

Valores extremos foram investigados nos resultados para o cálculo do limite de detecção teórico pelo teste de Grubbs. As estatísticas de Grubbs foram calculadas simultaneamente para um valor extremo (G_1), dois valores vicinais (G_2) e dois valores polares (G_3). A indicação de valor extremo por pelo menos uma destas estatísticas foi suficiente para remoção do dado. Após eliminação do valor extremo, o teste de Grubbs foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados (SOUZA, 2007).

2.5.1.1 Sensibilidade, linearidade e efeitos de matriz

A sensibilidade foi avaliada a partir de testes com diferentes comprimentos de onda (540, 550, 560, 580, 600 e 620 nm), dos quais avaliou-se qual apresentava maior coeficiente angular referente à equação da reta.

Para os ensaios de linearidade e efeitos de matriz foram elaboradas duas curvas de calibração: uma com padrão de amido em água e outra com padrão de amido adicionado ao primeiro filtrado obtido do iogurte fabricado (matriz), isento de amido, nas concentrações de 0,04; 0,06; 0,10; 0,20; 0,40 e 0,60 mg/mL, sendo cada nível elaborado com três replicatas independentes. Estas soluções foram analisadas em ordem aleatória, no mesmo dia. Brancos das curvas foram preparados como ferramenta de controle de qualidade, avaliação do ruído e ajuste do zero instrumental, mas não foram incluídos nos cálculos.

Após ajuste exploratório dos dados de cada curva pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), os gráficos de resíduos (erros) da regressão foram examinados para investigação de perfis óbvios, indicados como valores extremos (*outliers*) fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{res}$ (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; MAGALHÃES e LIMA, 2007; SOUZA, 2007; INMETRO, 2010).

Sendo:

$\alpha = 0,05$;

n= número de pontos da curva;

$t_{(1-\alpha/2; n-2)}$ = distribuição de t-Student com confiança de 0,975 e n-2 graus de liberdade, que varia em função do número de *outliers* retirados;

S_{res} = desvio padrão dos resíduos da regressão, obtido a partir da raiz do Quadrado Médio ou variância (QM) do quadro ANOVA para os resíduos.

Os valores extremos foram confirmados e tratados pelo teste dos resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado sucessivamente até que novos valores extremos não fossem detectados, ou até que surgisse uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; MAGALHÃES e LIMA, 2007; SOUZA, 2007; INMETRO, 2010).

Foram avaliadas as seguintes violações das premissas relacionadas à análise de regressão: normalidade (Ryan-Joiner), homogeneidade da variância dos resíduos (Brown-Forsythe ou Levene modificado) e independência dos resíduos da regressão (Durbin-Watson). Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio

da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; MAGALHÃES e LIMA, 2007; SOUZA, 2007; INMETRO, 2010).

Uma vez comprovadas as premissas para a análise de regressão e linearidade das curvas de calibração com água e matriz, a avaliação dos efeitos de matriz foi realizada por comparação das inclinações e interseções obtidas para a curva do analito em água com as inclinações e interseções estimadas para a curva matriz, nas respectivas faixas de concentração estudadas. O Teste de F foi utilizado para avaliar a premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas. No caso de resultado não significativo, variâncias homogêneas, as inclinações e interseções foram comparadas pelo Teste de t com as variâncias combinadas. Se o resultado for significativo, variâncias heterogêneas, o Teste de t é empregado utilizando as variâncias amostrais de cada curva (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; MAGALHÃES e LIMA, 2007; SOUZA, 2007).

2.5.1.2 Limites de detecção e quantificação

O estudo dos limites visou obter orientação sobre a estimativa dos menores valores de concentração do analito que podem ser detectados e quantificados pelo método. Utilizou-se como amostra branca o filtrado obtido da primeira etapa de filtração do iogurte, sem adição de amido, em 10 replicatas independentes.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das seguintes estatísticas descritas por INMETRO (2010). Valores extremos nos resultados foram investigados pelo teste de Grubbs.

$$LD = X_{\text{médio}} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \qquad LQ = X_{\text{médio}} + 10 \cdot s$$

Sendo:

$\alpha = 0,01$;

n= número replicatas da leitura do branco;

$X_{\text{médio}}$ = médias dos valores dos brancos da amostra;

$t_{(1-\alpha; n-1)}$ = distribuição de t-Student com confiança de 0,99 % e n-1 graus de liberdade, que varia em função do número de outliers retirados;

s= desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.

2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESCRITO NA IN 68/2006 MAPA EXECUTADO A PARTIR DA ETAPA DE HIDRÓLISE ÁCIDA

Estudou-se a exatidão e a precisão do método oficial (IN 68/2006 MAPA), eliminando-se as etapas de clarificação, a primeira filtração, que é uma potencial etapa de perda, e a transferência do resíduo sólido. Desta forma foi possível investigar a ocorrência ou não de perdas em outras etapas do método: pesou-se cerca de 10,00 g da amostra diretamente em erlenmeyer de boca esmerilhada. Adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico concentrado e aqueceu-se sob refluxo em banho-maria durante 2 horas. O resíduo sólido hidrolisado foi esfriado e neutralizado com solução de hidróxido de sódio a 40 %, a solução alcoólica de fenolftaleína 1 % foi utilizada para verificar a neutralização. Transferiu-se quantitativamente o material para balão volumétrico de 200 mL e clarificou-se novamente com 5 mL de cada uma das soluções de ferrocianeto de potássio 15 % e acetato de zinco a 30 %. Após completar o volume, filtrou-se para béquer de 200 mL e titulou-se com os reagentes de Fehling (5 mL de Fehling A e 5 mL de Fehling B), como mostrado na Figura III.3. Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular o teor de carboidratos (BRASIL, 2006):

$$\% \text{ de carboidratos} = \frac{100 \times Vb \times T \times 0,90}{\text{massa da amostra (g)} \times Vt}$$

Sendo:

T: título da solução de Fehling;

Vb: volume do balão volumétrico utilizado;

Vt: volume de amostra gasto na titulação, em mL;

0,9: fator de conversão de glicose para amido.

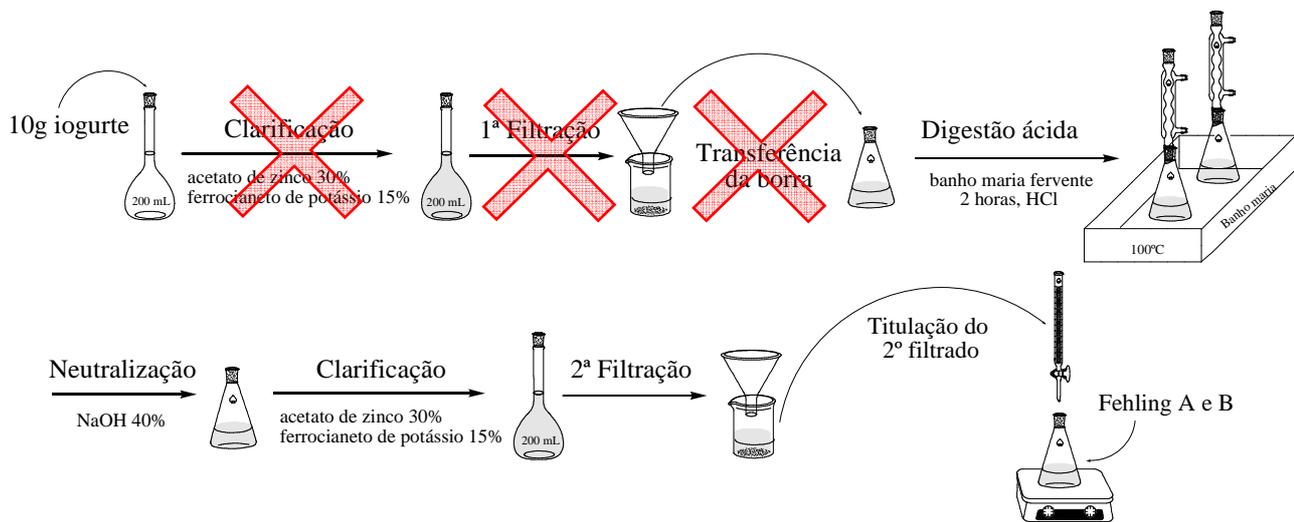


Figura III.3 – Indicação de quais etapas não foram executadas no método de análise quantitativa de amido em leites fermentados, IN 68/2006 MAPA

A quantificação do amido a partir da digestão ácida é prevista na IN 20/99 do MAPA para produtos de salsicharia (BRASIL, 1999). Uma vez que no processamento da salsicha não há adição ou presença de açúcares simples, como por exemplo lactose e glicose, em quantidades significativas não é necessário separá-los do amido, diferentemente do que acontece no iogurte, que possui lactose na sua composição original (TAMIME e ROBINSON, 1991; BRASIL, 1999).

Delineou-se a validação quantitativa intralaboratorial para o método titulométrico de amido em iogurtes (IN 68/2006 MAPA) executado a partir da hidrólise ácida, excluindo-se as etapas de clarificação, filtração e transferência do resíduo sólido. Como o objetivo desta validação foi investigar a possibilidade de perdas nas etapas subsequentes à primeira filtração, estudaram-se os parâmetros exatidão (recuperação) e precisão que foram embasados nos protocolos propostos por SOUZA (2007) e INMETRO (2010), assim como os testes estatísticos e as premissas a eles associadas. A adequação do método foi avaliada com base nos resultados dos parâmetros determinados, considerando os critérios de aceitabilidade. O nível de significância adotado nos testes de hipótese foi $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram realizados em planilhas do *Microsoft Office Excel 2007*[®].

Devido à ausência de material de referência certificado para o escopo analítico em questão, utilizou-se como amostra o iogurte natural batido, fabricado no laboratório, puro e adicionado do padrão de amido de batata 12,5 %.

A exatidão e a precisão experimentais foram definidas em ensaios com a amostra de iogurte elaborada no laboratório, adicionada de diferentes alíquotas da solução estoque de padrão de amido de batata a 12,5 %, da qual se adicionou as massas: 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; e 1,00 g, a alíquotas de 10 g do iogurte, correspondendo às

concentrações de: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; e 1,25 g/100g respectivamente, em sextuplicatas aleatórias e independentes. Utilizou-se como grupo controle alíquotas de 10 g em sextuplicata de iogurte sem adição de amido conforme descrito na Tabela III.1. Uma vez que a etapa de separação dos açúcares simples dos complexos não foi executada (primeira filtração), as amostras de iogurte sem adição de amido foram utilizadas para descontar o teor de lactose presente no iogurte elaborado.

Como o objetivo do experimento foi investigar o desempenho do método, considerando-se a possibilidade de perda do amido, optou-se por adicionar teores de amido próximos ao valor máximo estipulado pela legislação, ou seja, 1 g/100g (BRASIL, 2007). Para avaliar a precisão intermediária dos resultados, as análises foram repetidas em um segundo dia variando-se o analista, vidrarias e reagentes.

TABELA III.1 – Mapa do preparo do iogurte adicionado de diferentes volumes da solução de padrão de amido a 12,5 % para os testes de limite de quantificação, exatidão e precisão

Teor de amido no iogurte g/100g	Alíquota de iogurte (g)	Alíquota da solução estoque de amido (g)
0,00	10	-
0,25	10	0,20
0,50	10	0,40
0,75	10	0,60
1,00	10	0,80
1,25	10	1,00

Valores extremos foram investigados nos resultados de recuperação aparente obtidos para cada nível de concentração, incluindo as alíquotas de iogurte sem adição de amido, pelo teste de Grubbs.

A exatidão foi investigada por meio da média de recuperação aparente obtida para as doze replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração (INMETRO, 2010). O critério adotado para considerar os resultados como satisfatórios foi recuperação de 80 a 110 % (EC, 2002).

Precisão, sob condições de repetitividade, foi expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR_r) obtido para as replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Este parâmetro foi considerado aceitável quando dentro de dois terços do desvio padrão de reprodutibilidade calculado pela equação de Horwitz modificada por

Thompson (SOUZA, 2007). Para as concentrações estudadas, 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 g/100g, foram calculados pela equação de Horwitz os valores limites para os desvios padrão sob condições de reprodutividade (DPR_R) e, a partir de 2/3 destes valores, os desvios padrão de repetitividade (DPR_r) (Tabela II.2).

Equação de Horwits $\sigma_{RH} = 0,02c^{0,8495}$

Sendo:

c = concentração teórica adicionada do analito expressa como fração de massa

Tabela III.2 – Desvios aceitáveis de repetitividade e reprodutibilidade em função das concentrações de amido estudadas

Concentração (g/100g)	DPR_r	$DPR_R (\%) = CV (\%)$
0,25	3,29	4,93
0,50	2,96	4,44
0,75	2,78	4,18
1,00	2,67	4,00
1,25	2,58	3,87

DPR_r = desvio padrão sob condições de repetitividade; DPR_R = desvio padrão sob condições de reprodutibilidade

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DO PARA QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO PRESENTE NO 1º FILTRADO POR ESPECTROFOTOMETRIA

3.1.1 Linearidade

O gráfico exploratório dos resíduos da regressão indicou a presença de valores extremos, na curva de calibração do amido em água, pelo critério do intervalo entre $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{res}$, os quais foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. O gráfico dos resíduos da regressão, com indicação dos valores extremos detectados e removidos, estão apresentados na Figura III.4. Ao todo foram observados três valores extremos, sendo um valor no nível 0,1 mg/mL, outro em 0,2 mg/mL e o terceiro no nível

0,6 mg/mL. A remoção destes pontos possibilitou um melhor ajuste da equação de regressão. Tendências não foram observadas pela inspeção visual do gráfico exploratório dos resíduos da regressão, após o tratamento dos valores extremos.

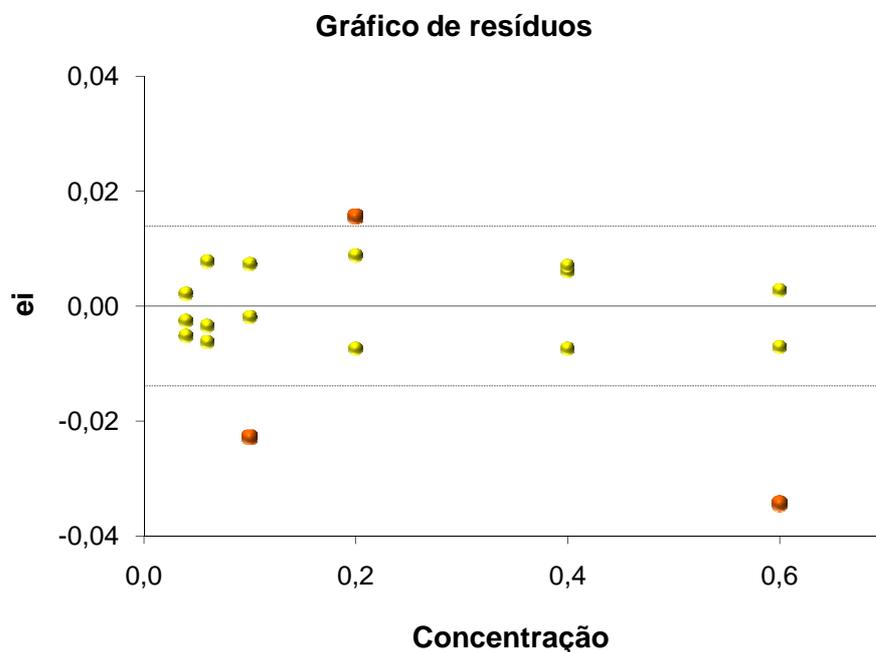


Figura III.4 – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de calibração com padrão de amido, com indicação dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife

e_i = resíduos da regressão; ● = valor extremo, $\pm t(1-\alpha/2; n-2)S_{res}$.

A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner ($p > 0,10$), cujo coeficiente de correlação obtido foi de 0,9517 com valor crítico de 0,9506. Este resultado indica correlação significativa entre os resíduos da regressão obtidos para a curva e os valores normais teoricamente esperados, como pode ser observado na Figura III.5.

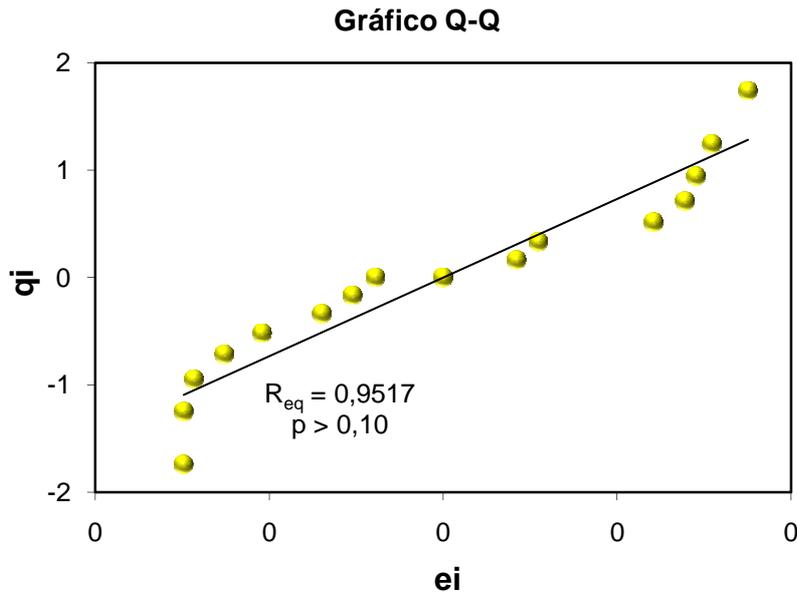


Figura III.5 – Gráfico de probabilidade normal da curva de padrão de amido

e_i = resíduos da regressão; q_i = valor nominal esperado; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; p = significância do desvio da distribuição normal

A premissa da homogeneidade da variância dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi confirmada, demonstrando homocedasticidade. A estatística t de Levene foi de $t = -1,0703$ com significância estimada de $p > 0,3026$, como indicado na Figura III.6.

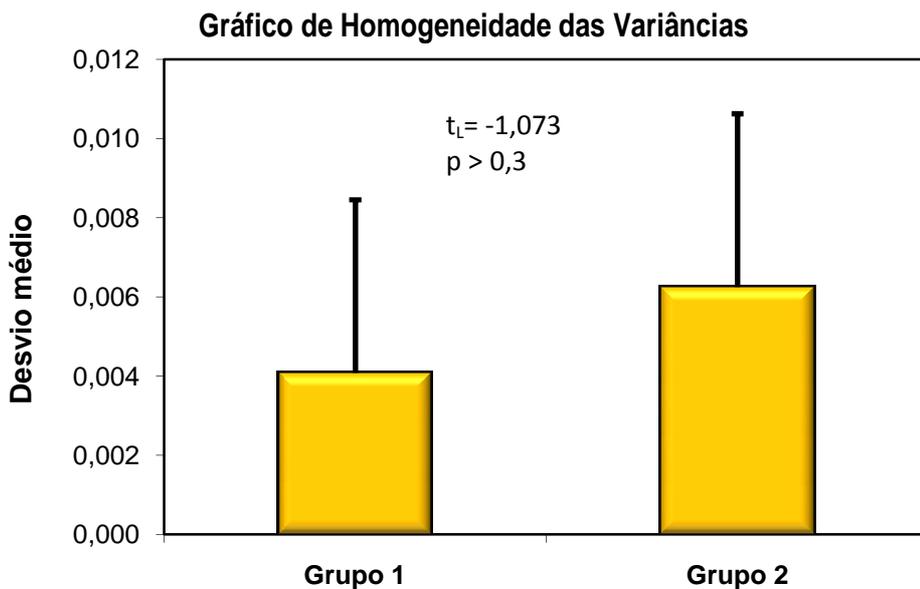


Figura III.6 – Representação da homogeneidade das variâncias da curva de padrão de amido de batata

A premissa de independência dos resíduos da regressão foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson. O perfil homogêneo de distribuição dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos de Durbin-Watson sugeriu que não houve tendências positivas ou negativas, como pode ser observado na Figura III.7. A estatística calculada foi de $d = 2,268$ indicando que não houve autocorrelação ($p > 0,10$), sendo os valores de $dU = 1,36$ e $4-du = 2,64$.

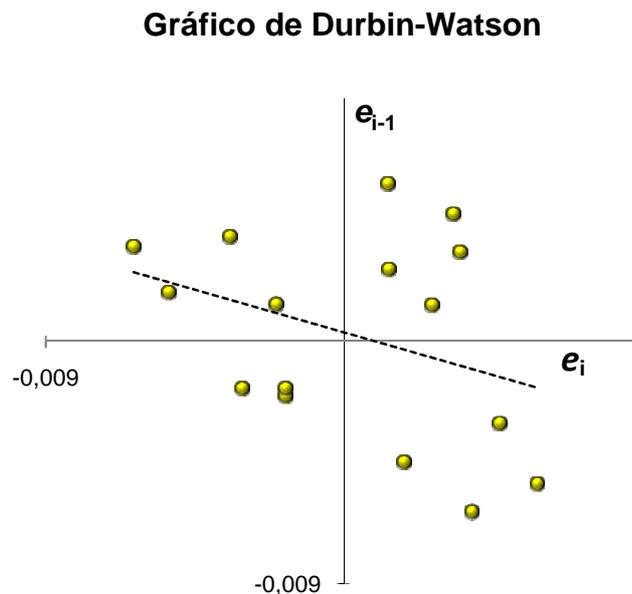


Figura III.7 – Gráfico de Durbin-Watson da curva do amido de batata (0,04 a 0,6 mg/mL) em água

A confirmação das três premissas (normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos) indicou a adequação do uso do MMQO, sem ponderações, para estimativa dos parâmetros da regressão. A curva de calibração apresentou regressão significativa ($p < 0,001$) enquanto desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) foram observados, indicando ajuste ao modelo linear na faixa estudada de 0,04 a 0,6 mg/mL (Tabela III.3). A curva de calibração com as respectivas equações e coeficientes de determinação está ilustrada na Figura. III.8.

Tabela III.3 – Estatísticas de análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio de linearidade, para a curva de amido de batata em água

Estatística	Curva de amido em água
<i>Regressão</i>	
<i>F</i>	28156,74
<i>P</i>	$5,67 \times 10^{-26}$
<i>Desvio da Linearidade</i>	
<i>F</i>	2,965
<i>p</i>	$6,90 \times 10^{-2}$

F= razão entre variâncias; *p* = significância.

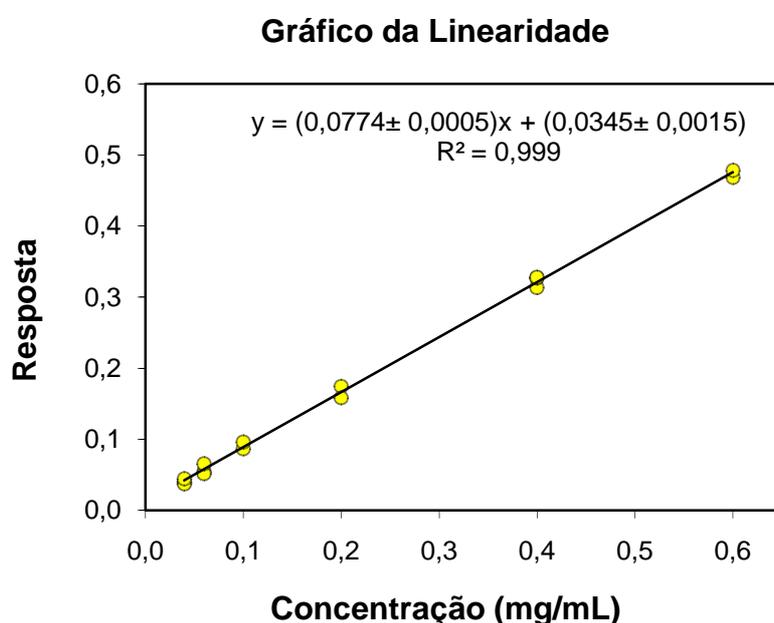


Figura III.8 – Curva de calibração do padrão de amido de batata em água com solução de Lugol obtida nos ensaios de avaliação de linearidade, na faixa de 0,04 a 0,6 mg/mL, com a equação da reta e o coeficiente de determinação

Testes iniciais de linearidade foram realizados em faixas de concentração mais amplas para a validação aqui apresentada. No entanto, as premissas da regressão não foram atendidas nestas faixas. Nos intervalos de 0,02 a 0,8 mg/mL, 0,2 a 0,6 mg/ml houve detecção de 2 valores extremos, confirmação da homocedasticidade ($p > 0,05$) e da ausência de autocorrelação ($p < 0,01$), porém foi observado desvio da normalidade ($p < 0,01$). Já no intervalo de 0,04 a 0,7 mg/mL houve detecção de 1 valor extremo, confirmação da homocedasticidade ($p > 0,05$) e da ausência de autocorrelação ($p < 0,01$), porém também foi observado desvio da normalidade ($p < 0,01$). Estes resultados

preliminares levaram a um estreitamento da faixa de trabalho para o intervalo de 0,04 a 0,6 mg/mL demonstrado.

3.1.2 Efeitos de matriz

As curvas de padrão de amido em água (curva em água) e de padrão de amido em matriz (curva de matriz) obtidas estão apresentadas na Figura III.9. Valores extremos foram detectados na curva em água nos níveis de 0,10; 0,20 e 0,60 mg/mL, enquanto 4 valores foram diagnosticados na curva de matriz nos níveis 0,04, 0,20, 0,40 e 0,60 mg/mL pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

Todas as premissas relativas ao MMQO foram confirmadas: distribuição normal dos resíduos da regressão ($p > 0,10$) foi observada com coeficientes de correlação de Ryan-Joiner de 0,9517 e 0,9770 para as curvas em água e de matriz, sendo os valores críticos de 0,9506 e 0,9481 respectivamente; homocedasticidade foi obtida com estatísticas de Levene de -1,073 para a curva em água e de -0,680 para a curva de matriz ($p > 0,05$); independência dos resíduos da regressão foi indicada pelas estatísticas de Durbin-Watson de 2,268 ($dU = 1,36$ e $4-dU = 2,64$) para a curva em água ($p > 0,10$). Porém, a curva de matriz apresentou teste não conclusivo para $\alpha = 0,05$ uma vez que a estatística calculada foi de 2,866 ($dU = 1,35$ e $4-dU = 2,65$). Neste teste optou-se por adotar para a curva de matriz $\alpha = 0,05$ cujos valores de dU e $4-dU$ são 1,06 e 2,94 respectivamente, que indica a independência dos resíduos para este nível de confiança.

Desvios da linearidade não significativos ($p > 0,05$) foram observados pelos Testes de F como descrito na Tabela III.4. Estes resultados sinalizam a possibilidade de comparação das inclinações e interseções pelo Teste de t para avaliação dos efeitos de matriz.

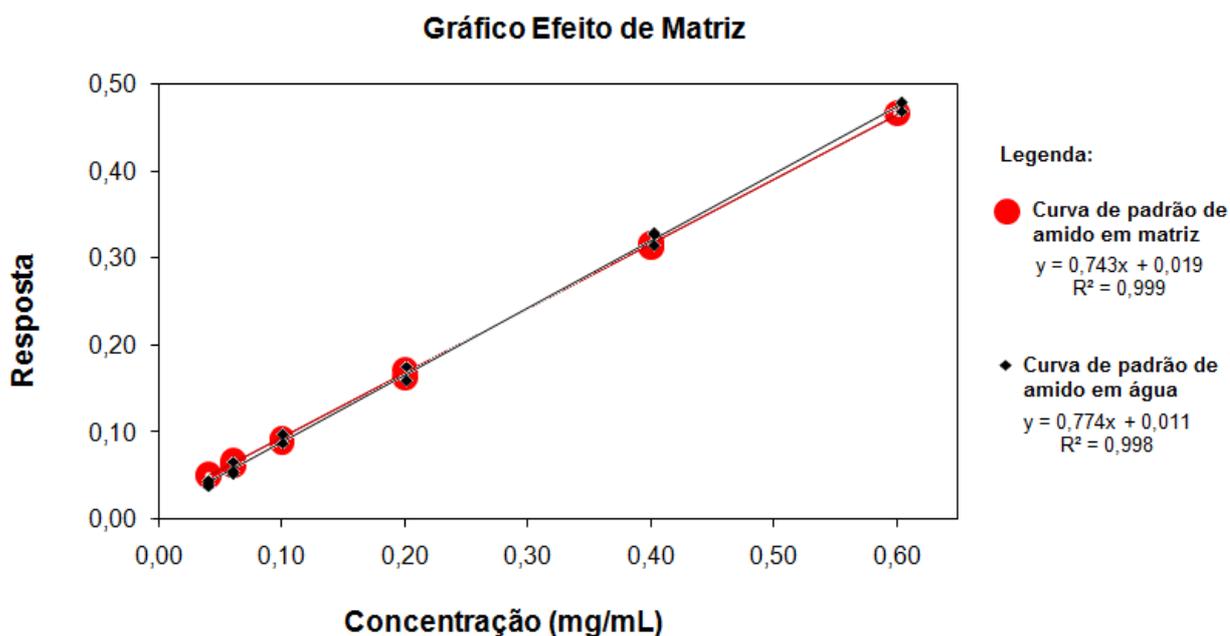


Figura III.9 - Curva de calibração de padrão de amido de batata com solução de Lugol em água e em matriz, obtidas nos ensaios de avaliação de linearidade e efeito matriz, na faixa de 0,04 a 0,60 mg/mL com as respectivas equações da reta e coeficientes de determinação

Tabela III.4 – Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio da linearidade, para a curva de amido com Lugol e matriz

Estatística	Curva de amido com Lugol
<i>Regressão</i>	
<i>F</i>	8551,33
<i>p</i>	$1,04 \times 10^{-19}$
<i>Desvio da Linearidade</i>	
<i>F</i>	0,217
<i>p</i>	$9,22 \times 10^{-1}$

F = razão entre variâncias; *p* = significância

Efeitos de matriz foram detectados na faixa de trabalho da curva de amido. O Teste de F indicou heterocedasticidade ($p < 0,05$) das variâncias dos resíduos das curvas de água e de matriz, sendo necessário utilizar o Teste de t com as variâncias amostrais de cada curva para comparação dos parâmetros interseção e inclinação. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) quando as inclinações ($T_b = 3,23193$, com $p = 0,00123$) e interseções ($t_a = 3,02946$, com $p = 0,00245$) estimadas para a curva de água e para a curva de matriz foram comparadas. A partir destes resultados, concluiu-se que as

soluções padrão de amido em água preparadas conforme descrito neste trabalho fornecem respostas que diferem daquelas obtidas para amostras elaboradas com o filtrado adicionado de concentrações equivalentes de amido. Conseqüentemente, a curva de matriz deve ser utilizada para as determinações dos valores estimados para a perda de amido na etapa de filtração do método oficial.

3.1.3 Sensibilidade

Ao avaliar as equações da reta obtidas a partir dos comprimentos de onda estudados (540; 550; 560; 580; 600; 620), 580 nm apresentou maior coeficiente angular, ou seja, uma pequena variação na concentração do analito produz resposta mais significativa frente ao detector neste comprimento de onda quando comparada com os outros (Tabela III.5). PEREIRA et al. (2002) também utilizou o comprimento de onda de 580 nm em análises cromatográficas de controle de qualidade de dipirona, cuja fase móvel empregava o complexo triiodeto-amido. A dipirona ao entrar em contato com o iodeto sofre oxidação causando um decréscimo na linha de base que pode ser quantificado através do detector de UV-Visível.

Os demais comprimentos de onda estudados também poderiam ser utilizados para as análises, uma vez que a variação entre os respectivos coeficientes angulares, descritos na Tabela III.5, é pequeno.

Tabela III.5 – Equação da reta em função do comprimento de onda evidenciando o comprimento de onda escolhido para as análises espectrofotométricas do amido

Comprimento de onda (nm)	Equação da reta	R ²
540	$Y = 0,0755x + 0,0037$	0,995
550	$Y = 0,0768x + 0,0051$	0,995
560	$Y = 0,0771x + 0,0038$	0,996
580	$Y = 0,0774x + 0,0345$	0,997
600	$Y = 0,0749x + 0,0060$	0,997
620	$Y = 0,0742x + 0,0049$	0,998

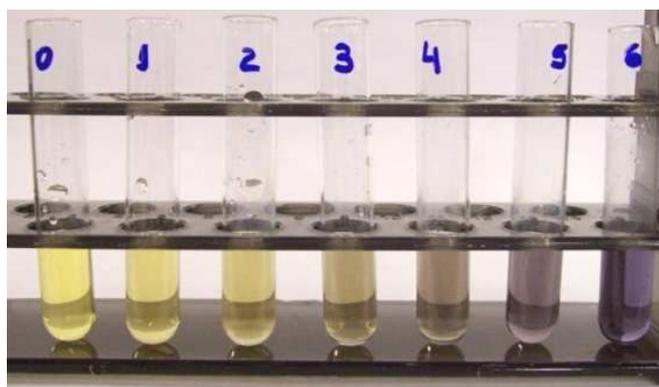


Figura III.10 – Escala de diluição da solução padrão de amido de batata em água 0,00 (0); 0,04 (1); 0,06 (2); 0,10 (3); 0,20 (4); 0,40 (5); 0,60 (6) mg/mL com adição de 125 μ L de reagente de Lugol em cada tubo de ensaio

3.1.4 Limites de detecção e quantificação

No experimento de limites de detecção e quantificação com amostra branca, ao aplicar o teste de Grubbs sucessivamente, foi possível detectar e retirar 03 valores extremos, restando ainda 07 replicatas, contemplando o mínimo recomendado pelo INMETRO (2010).

O limite de detecção teórico calculado pela média do branco mais o desvio padrão com valor de t unilateral para 99 % de confiança foi de 0,0150 mg/mL. O limite de quantificação teórico encontrado foi de 0,0259 mg/mL. Apesar da possibilidade de quantificação neste nível de concentração, o estudo da faixa linear identificou desvio da linearidade em concentrações abaixo de 0,04 mg/mL. Optou-se por adotar o primeiro nível de concentração da faixa linear (0,04 mg/mL) como limite de quantificação do método.

3.1.5 Resultados da quantificação da perda de amido pelo método espectrofotométrico

Observou-se que houve perda de cerca de 30 a 39 % do amido adicionado ao iogurte fabricado nos 5 níveis de concentração estudados (Tabela II.6). Se for considerada apenas esta etapa de perda, a recuperação final do amido é de apenas 61 a 70 %, estando abaixo do mínimo aceitável recomendado pela EC (2002), de 80 a 110 %.

Tabela III.6 – Resultados da quantificação da perda de amido ocorrida no 1º filtrado através do método do espectrofotométrico

Concentração de amido adicionado ao iogurte (g/100g)	Percentual de perda de amido no 1º filtrado (%) ± Coeficiente de Variação
0,25	30,24 ± 4,70
0,50	34,55 ± 8,47
0,75	37,67 ± 6,46
1,00	38,54 ± 7,80
1,25	37,68 ± 7,10

O método espectrofotométrico, além de ser aprovado quanto aos critérios de desempenho estudados, é rápido, utiliza reagentes pouco corrosivos e apresenta menor custo se comparado à digestão ácida, que é uma alternativa para quantificação do amido. Em experimentos futuros, de modificação do método para quantificação de amidos, será possível investigar clarificantes e sistemas de filtração alternativos ao atual e avaliar sua eficiência sem a necessidade de executar as etapas subsequentes (transferência do resíduo sólido, digestão ácida, clarificação, filtração e titulação) do método proposto pela IN 68/2006.

A etapa de clarificação pode ser uma possível fonte de perda de amido. O gel formado entre as proteínas do leite e o amido depende do seu grau de gelatinização, concentração na formulação e osmolaridade do meio. Ao se adicionar agentes clarificantes o gel formado é quebrado e parte das moléculas de amido podem ser separadas da borra (TAMIME e ROBINSON, 1991; CONSIDINE et al., 2010). Estas moléculas, altamente solúveis em água, podem ser carreadas no processo de filtração, justificando assim a presença de amido no primeiro filtrado.

3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OFICIAL A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de valores extremos pelo teste de Grubbs, tendo sido retirado apenas um valor no nível de 1,00 g/100g. Os resíduos, obtidos pela diferença entre a recuperação aparente média e os valores individuais de recuperação aparente obtidos em cada dia, para cada nível de concentração, apresentaram distribuição normal ($p > 0,01$; $R_{eq} = 0,8947$) segundo o teste

de Ryan-Joiner e homocedasticidade ($p > 0,1$) segundo o teste de Levene modificado (Tabela III.7), permitindo a estimativa de DPR_r e DPR_R por análise de variância.

Tabela III.7 – Avaliação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos dos resultados de recuperação aparente do amido de batata

Estatística	Concentração (g/100g)				
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25
<i>Normalidade</i>					
<i>R</i>	0,9725	0,9524	0,9656	0,9533	0,9095
<i>p</i>	$p > 0,01$				
<i>Homocedasticidade</i>					
<i>F_{cal}</i>	$3,72 \times 10^{-30}$	$3,68 \times 10^{-30}$	$4,08 \times 10^{-30}$	$1,27 \times 10^{-29}$	$1,97 \times 10^{-29}$
<i>p</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

R= coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; *p*= significância; *F_{cal}*= estatística F de Levene.

As médias de recuperação aparente alcançadas para amostras adicionadas de padrão de amido nas concentrações estudadas (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 g/100g) variaram entre 77,17 e 80,43 % (Tabela III.8). Os DPR_r estiveram entre 1,94 % a 9,16% e os valores de DPR_R variaram de 1,94 % a 9,16 %. Valores de DPR_r e DPR_R idênticos foram estimados para os níveis 0,25 e 1,00 g/100g uma vez que a estimativa da variância de repetitividade foi maior que a do ensaio, sendo atribuído o valor de zero para a variação entre ensaios.

Tabela III.8 – Médias de recuperação, desvios padrão relativos sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial para o amido de batata

Concentração (g/100g)	MR %	Valores encontrados		Critérios de aceitabilidade	
		DPR_r (%)	DPR_R (%)	DPR_r (%)*	DPR_R (%)*
0,25	80,43	9,16	9,16	3,29	4,93
0,50	80,23	6,25	8,13	2,96	4,44
0,75	78,71	5,47	6,91	2,78	4,18
1,00	77,17	1,94	1,94	2,67	4,00
1,25	78,99	3,51	3,62	2,58	3,87

MR%= média de recuperação aparente; DPR_r = desvio padrão sob condições de repetitividade;

DPR_R = desvio padrão sob condições de reprodutibilidade; * Critério de aceitabilidade de DPR_r e DPR_R .

Apesar dos níveis 0,25 e 0,50 g/100g terem atingido o valor mínimo aceito para recuperação, 80 %, os DPR_r e DPR_R encontram-se acima dos valores críticos calculados de aceitabilidade ($DPR_r= 3,29; 2,96$ e $DPR_R= 4,93; 4,44$ respectivamente), sugerindo falta de repetitividade e reprodutividade do método nestes níveis estudados. Logo a elevada dispersão dos valores da recuperação aparente pode mascarar a falta de exatidão do método nestes níveis (Tabela III.8).

Nos níveis de concentração de 0,75; 1,00 e 1,25 g/100g a recuperação aparente foi inferior a 80 %, indicando falta de exatidão do método. Os valores de $DPR_r= 5,47$ e $DPR_R= 6,91$; encontrados para o nível 0,75 g/100g foram superiores aos calculados, $DPR_r= 2,78$ e $DPR_R= 4,18$ respectivamente, indicando falta de repetitividade e reprodutividade. Para o nível de 1,00 g/100g os valores de $DPR_r= 1,94$ e $DPR_R= 1,94$ foram inferiores aos calculados, $DPR_r= 2,67$ e $DPR_R= 4,00$, indicando repetitividade e reprodutividade para este nível. No nível 1,25 g/100g o valor de $DPR_R= 3,62$ foi inferior ao calculado, $DPR_R= 3,87$, indicando reprodutividade dos dados, apesar do valor de $DPR_r= 3,51$ ser inferior ao $DPR_r= 2,58$ calculado. Também pode-se observar que o aumento do nível de concentração do amido adicionado ao iogurte houve tendência em reduzir o desvio padrão encontrado, indicando que em concentrações próximas ao valor estipulado pela legislação (1 g/100g), o método é reprodutivo.

A falta de exatidão do método pode ser atribuída à despolimerização incompleta do amido, como demonstrado em estudos de hidrólise ácida do amido de batata em que provavelmente há formação de compostos de menor peso molecular, as dextrinas, e à reação de Maillard, uma vez que foi observado escurecimento da amostra após a digestão ácida (Figura III.11). Cerca de 3 % (m/m) do iogurte é composto de proteínas. O processo de fermentação provoca a desnaturação das proteínas, tornando os grupos nitrogenados mais disponíveis à reação com os açúcares redutores além de liberar aminoácidos para o meio, que quando aquecidos podem sofrer a reação de Maillard. É pouco provável que este escurecimento seja atribuído à reação de caramelização, uma vez que a solução de amido ficou translúcida após a digestão ácida, atuando como grupo controle. O fator determinante para o aparecimento da coloração marrom entre as duas soluções é a presença dos grupos amino do iogurte (FENNEMA, 2010).

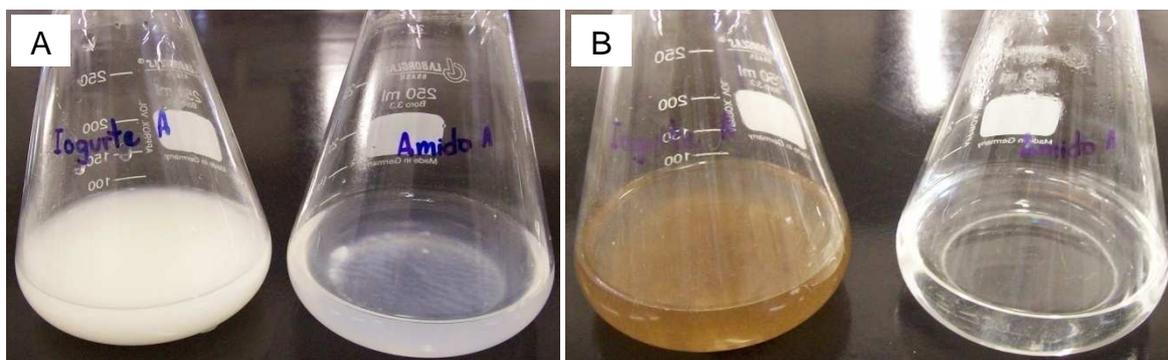


Figura III.11 – Alíquotas de iogurte e amido antes (A) e após (B) a digestão ácida

4 CONCLUSÕES

O método de quantificação do amido presente no primeiro filtrado por espectrofotometria se mostrou adequado para o uso pretendido, de acordo com os parâmetros de desempenho avaliados: sensibilidade, linearidade, efeitos de matriz, limites de detecção e quantificação. Este método poderá ser utilizado em estudos de otimização das etapas de clarificação e filtração para monitorar a perda de amido ocorrida ou não, sem necessidade de se executar a marcha analítica do método descrito na IN 68/2006 até o fim, otimizando recursos.

A perda de amido na primeira etapa de filtração do método descrito na IN 68/2006 MAPA, de cerca de 30 a 39 %, se mostrou relevante como fonte de inexatidão.

Ao executar o método para quantificação de amidos (IN 68/2006 MAPA) a partir da hidrólise ácida, constatou-se falta de exatidão, uma vez que a recuperação foi inferior a 80 %, tal fato pode ser atribuído despolimerização incompleta do amido e à reação de Maillard.

Ao considerarmos que o método (IN 68/2006 MAPA) apresenta no total cerca de 60 % de perdas, fica evidente sua inaplicabilidade para o monitoramento da adição de amido aos iogurtes dentro do estabelecido pela legislação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 - *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio de calibração*. 2 ed. p. 31, 2005.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 20 de 21 de julho de 1999. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura. *Diário Oficial*, Brasília, 27 julho 1999.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68 de 12 de dezembro de 2006. Aprova os métodos Analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Anexo V Métodos Quantitativos - Glicídios redutores em lactose, glicídios não redutores em sacarose e amido (método Lane-Eynon). *Diário Oficial*, Brasília, 14 dezembro 2006.
- CONSIDINE, T.; NOISUWAN, A.; HEMAR, Y.; WILKINSON, B.; BRONLUND, J. KASAPIS, S. Rheological investigation of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: a review. *Food Hydrocolloids*. Article in press, p. 1-10, September, 2010.
- EC (European Commission). *Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of result*. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002.
- FUNED. Fundação Ezequiel Dias. *Manual de Coleta de Amostras*. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br> Acesso em: 20 dez. 2011.
- IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2004. 1018 p.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia). DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos analíticos, rev. 03, fev. 2010.
- LIU, J.; FEI, L.; MALADEN, M.; JAMAKER, B. R.; ZHANG, G. Iodine binding property of a ternary complex consisting of starch, protein, and free fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 351–355, 2009.
- MAGALHÃES, M. N.; LIMA, A. C. P. *Noções de probabilidade e estatística*. 6 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2007. 392 p.
- MINAS GERAIS, Secretaria De Estado Da Saúde De Minas Gerais. Superintendência De Vigilância Sanitária. *Alimentos - Procedimentos básicos*. Belo Horizonte. 1997.

- PEREIRA, A. V.; PENCKOWSKI, L.; VOSGERAU, M.; SASSÁ, M. F. Determinação espectrofotométrica de dipirona em produtos farmacêuticos por injeção em fluxo pela geração de íons triiodeto. *Química Nova*, vol. 25, nº 4, 553-557, 2002.
- SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Belo Horizonte: Departamento de Ciência de Alimentos da UFMG, 2007, 296p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, n. 552, p. 25-35, 2005.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

As vantagens tecnológicas proporcionadas pelos amidos fazem com que seu uso pela indústria seja relevante.

Constatou-se através do teste do reagente Lugol que 75 % dos iogurtes recolhidos pelo PROGVISA apresentavam amidos em suas formulações. Destes, apenas 35 % declaravam utilizar amidos nos rótulos.

A maior parte dos iogurtes disponibilizados para a população declaravam-se parcialmente desnatados (69 %) e destes quase a metade apresentaram desvio superior a ± 20 % ao valor declarado no rótulo.

O método proposto pela IN 68/2006 MAPA não se mostrou apto a quantificar amidos em iogurtes comerciais. Ao todo, foi perdido cerca de 56 % do amido adicionado ao iogurte. Desta, em torno de 35 % pode ser atribuído à primeira etapa de filtração do método descrito na IN 68/2006 MAPA, 15 % à hidrólise incompleta do amido e 6 % à reação de Maillard durante o processo de hidrólise ácida.

O estudo detalhado das etapas em que houve as perdas, e sua quantificação, evidencia a inaplicabilidade do método oficial (IN 68/2006 MAPA) na quantificação de amidos em iogurtes.

ANEXO 1 – Discriminação dos espessantes declarados por amostra

Amostra nº	1 Tipo de espessante	Amostra nº	02 Tipos de espessantes	Amostra nº	3 Tipos de espessantes
1	Amido modificado	13	Amido	22	Amido modificado goma guar gelatina
2	Amido modificado	14	Amido	23	Amido modificado goma guar gelatina
3	Amido modificado	15	Amido modificado	24	Amido modificado goma guar gelatina
4	Amido modificado	16	Amido modificado	25	Amido modificado goma guar goma xantana
5	Carboximetilcelulose	17	Amido modificado	26	Amido modificado goma guar goma xantana
6	Carboximetilcelulose	18	Goma guar	27	Amido modificado goma xantana gelatina
7	Goma alfarroba	19	Goma guar	28	Goma jataí goma guar pectina
8	Goma carragena	20	Goma guar		
9	Goma carragena	21	Goma guar		
10	Goma carragena				
11	Goma guar				
12	Goma xantana				

Amostra nº	4 Tipos de espessantes		
29	Amido	goma guar	gelatina goma xantana
30	Amido	goma guar	pectina goma jataí
31	Amido modificado	carboximetilcelulose	gelatina goma guar
32	Amido modificado	carboximetilcelulose	goma carragena goma xantana
33	Amido modificado	goma xantana	gelatina goma guar
Amostra nº	5 Tipos de espessantes		
34	Amido modificado	goma xantana	goma guar goma alfarroba gelatina

Amostras que utilizaram gomas = 34
 Amostras que não utilizaram gomas = 14
Total geral = 48

