

CARINA DE SOUZA GONDIM

**MÉTODOS QUALITATIVOS PARA DETECÇÃO
DE ADULTERANTES EM LEITE CRU:
VALIDAÇÃO INTRA E INTERLABORATORIAL**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2016

CARINA DE SOUZA GONDIM

**MÉTODOS QUALITATIVOS PARA DETECÇÃO
DE ADULTERANTES EM LEITE CRU:
VALIDAÇÃO INTRA E INTERLABORATORIAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Colaboradoras: Profa. Dra. Itziar Ruisánchez

Profa. Dra. Maria Pilar Callao

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2016

Gondim, Carina de Souza.

G637m Métodos qualitativos para detecção de adulterantes em leite cru: validação intra e interlaboratorial / Carina de Souza Gondim. – 2016.

244 f. : il.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza.

Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira.

Colaboradores: Itziar Ruisánchez e

Maria Pilar Callao.

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

1. Validação de método – Teses. 2. Validação intra e interlaboratorial – Teses. 3. Ensaio colaborativo – Teses. 4. Métodos qualitativos – Teses. 5. Espectroscopia no infravermelho médio – Teses. 6. Leite – Adulteração e inspeção – Teses. 7. Alimentos – Análise – Teses. I. Souza, Scheilla Vitorino Carvalho de. II. Junqueira, Roberto Gonçalves. III. Ruisánchez, Itziar. IV. Callao, Maria Pilar. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VI. Título.

CDD: 664.07



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

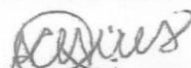
FOLHA DE APROVAÇÃO


MÉTODOS QUALITATIVOS PARA DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU: VALIDAÇÃO INTRA E INTERLABORATORIAL

CARINA DE SOUZA GONDIM

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

Aprovada em 07 de dezembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Profa. Dra. Ana Clarissa dos Santos Pires
Universidade Federal de Viçosa - UFV


Profa. Dra. Cristiane Bonaldi Cano
Instituto Adolfo Lutz - IAL


Profa. Dra. Scheilla Vitorino C. de Souza Ferreira (Orientadora)
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda
Faculdade de Farmácia - UFMG


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


Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena
Instituto de Ciências Exatas - UFMG

Belo Horizonte, 7 de dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira e Roberto Gonçalves Junqueira pelo exemplo, paciência, confiança e amizade.

À toda equipe do Laboratório de Bromatologia da BRO-UPAA, especialmente, aos que colaboraram na execução do projeto: Amanda Sellos, Isabella Pierotte, Isadora Melo, Linda Lys Calderaro Lafayette, Marina de Penna e Palhares, Otávio Mazzoni Coelho, Pedro Paulo Borges Santos, Roberto César de Souza; Ronália Leite Alvarenga e Sandra Regina dos Santos.

Ao *Chemometrics, Qualimetrics and Nanosensors Group, Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry*), e às professoras Itziar Ruisánchez e Maria Pilar Callao pela amizade, aprendizado e convivência ao longo da minha estadia na *Universitat Rovira i Virgili*.

Aos servidores e técnicos-administrativos da Faculdade de Farmácia, pela presteza e cordialidade, em especial à Elaine Cristina da Costa, Dhionne Correa Gomes, Gilmar Rodrigues Moreira, Marcos da Costa Lage e Úrsula Regiane Martins Rodrigues.

Ao Setor de Serviços Gerais da Escola de Veterinária e aos servidores das Fazendas Modelo de Pedro Leopoldo e Experimental Professor Hélio Barbosa, ambas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela disponibilidade no uso das instalações e fornecimento de amostras de leite.

Aos Laboratórios de Química Bromatológica e de Medicamentos do Serviço de Química da Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA) / Instituto Otávio Magalhães (IOM) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), sobretudo à analista e pesquisadora de saúde e tecnologia Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva, pela colaboração na realização de análises, uso das instalações e equipamentos, e pela participação nos estudos de validação interlaboratorial dos métodos clássicos.

Aos demais laboratórios colaboradores que participaram dos estudos de validação interlaboratorial dos métodos clássicos: Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Laboratório de Análise Físico-Química em Alimentos do Laboratório de Química Agropecuária do Instituto Mineiro de Agropecuária (LAFQ/LQA/IMA); GMO Centro de Pesquisas e Controle de Qualidade Ltda., Hidrocepe Serviços de Qualidade Ltda.; NUGAP - Núcleo Global de Análise e Pesquisa Ltda.; Ita Alimentos - Laticínios Ita Indústria e Comércio de Alimentos Ltda.; Itambé Alimentos S.A.; e Trevo Alimentos - Nogueira e Rezende Indústria de Laticínio Ltda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na concessão das bolsas dos Programas Demanda Social (DS) e de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS | V |
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XI |
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 2. OBJETIVOS | 6 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 6 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 6 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 8 |
| 3.1. ADULTERAÇÃO EM LEITE | 8 |
| 3.1.1. CADEIA PRODUTIVA | 8 |
| 3.1.2. REGULAMENTAÇÃO, FISCALIZAÇÃO E MONITORAMENTO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE | 10 |
| 3.1.3. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE | 13 |
| 3.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER | 18 |
| 3.3. MÉTODOS QUALITATIVOS | 22 |
| 3.3.1. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS | 23 |
| 3.3.1.1. Validação intralaboratorial | 25 |
| 3.3.1.2. Validação interlaboratorial | 26 |
| 3.3.1.3. Parâmetros de desempenho | 27 |
| 3.4. MÉTODOS MULTIVARIADOS E QUIMIOMETRIA | 34 |
| 3.4.1. Pré-processamento de dados espectrais | 35 |
| 3.4.2. Métodos de classificação não-supervisionados | 37 |
| 3.4.3. Métodos de classificação supervisionados..... | 39 |
| 3.4.3.1. <i>Partial least squares discriminant analysis</i> (PLS-DA)..... | 39 |
| 3.4.3.2. <i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i> (SIMCA) | 40 |
| Capítulo I - MÉTODOS QUALITATIVOS PARA DETECÇÃO DE RECONSTITUINTES DE DENSIDADE (AMIDO, CLORETO E SACAROSE) EM LEITE CRU: VALIDAÇÃO INTRA E INTERLABORATORIAL E MELHORIA DE DESEMPENHO..... | 44 |
| I.1 INTRODUÇÃO..... | 45 |
| I.2 MATERIAIS E MÉTODOS | 47 |
| I.2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS..... | 47 |
| I.2.2 MÉTODOS..... | 47 |
| I.2.3 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL | 48 |
| I.2.3.1 Amostras..... | 48 |
| I.2.3.2 Otimização | 49 |
| I.2.3.3 Validação | 50 |
| I.2.4 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL | 53 |
| I.2.5.1 Materiais de teste..... | 55 |
| I.2.5.2 Testes de homogeneidade..... | 57 |
| I.2.5.3 Testes de estabilidade | 59 |
| I.2.5.4 Organização dos ensaios interlaboratoriais | 59 |

| | | |
|---------|--|----|
| I.2.5.5 | Análise estatística | 61 |
| I.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 62 |
| I.3.1 | OTIMIZAÇÃO | 62 |
| I.3.4.1 | Amido | 62 |
| I.3.4.2 | Cloretos | 63 |
| I.3.4.3 | Sacarose | 66 |
| I.3.2 | VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL | 68 |
| I.3.2.1 | Amido | 68 |
| I.3.2.2 | Cloretos | 73 |
| I.3.2.3 | Sacarose | 78 |
| I.3.3 | AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ADEQUAÇÃO DO PROPÓSITO DE USO (<i>FITNESS FOR PURPOSE</i>) | 84 |
| I.3.4 | VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL | 85 |
| I.3.4.1 | Testes de homogeneidade e estabilidade | 85 |
| I.3.4.2 | Análise de agrupamento hierárquica (HCA) | 85 |
| I.3.4.3 | Ensaio colaborativos | 87 |
| I.3.4.4 | Comentários dos colaboradores | 96 |
| I.4 | CONCLUSÕES | 97 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Capítulo II- | DETECÇÃO DE CONSERVANTES EM LEITE CRU: VALIDAÇÃO INTRA E INTERLABORATORIAL DE MÉTODOS QUALITATIVOS OFICIAIS | 98 |
| II.1 | INTRODUÇÃO | 99 |
| II.2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 101 |
| II.2.1 | REAGENTES E EQUIPAMENTOS | 101 |
| II.2.2 | MÉTODOS | 102 |
| II.2.3 | VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL | 106 |
| II.2.3.1 | Amostras | 107 |
| II.2.3.2 | Testes preliminares | 107 |
| II.2.3.3 | Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância | 108 |
| II.2.3.4 | Seletividade - interferentes | 109 |
| II.2.3.5 | Robustez | 110 |
| II.2.4 | AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (<i>FITNESS FOR PURPOSE</i>) | 111 |
| II.2.5 | VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL | 112 |
| II.2.4.1 | Materiais de teste | 114 |
| II.2.4.2 | Testes de homogeneidade | 115 |
| II.2.4.3 | Testes de estabilidade | 116 |
| II.2.4.4 | Organização dos ensaios interlaboratoriais | 116 |
| II.2.4.5 | Análise estatística | 118 |
| II.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 119 |
| II.3.1 | VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL | 119 |
| II.3.1.1 | Cloro e hipoclorito | 119 |
| II.3.1.2 | Peróxido de hidrogênio – método do guaiacol | 125 |
| II.3.1.3 | Peróxido de hidrogênio – método do óxido de vanádio | 130 |
| II.3.2 | AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (<i>FITNESS FOR PURPOSE</i>) | 133 |
| II.3.3 | VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL | 134 |
| II.3.3.1 | Testes de homogeneidade e estabilidade | 134 |
| II.3.3.2 | Análise de componentes principais (PCA) | 135 |

| | | |
|----------|------------------------------------|-----|
| II.3.3.3 | Ensaio colaborativos..... | 136 |
| II.3.3.4 | Comentários dos colaboradores..... | 139 |
| II.4 | CONCLUSÕES | 140 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| Capítulo III | - VALIDAÇÃO DA PROVA DO ÁCIDO ROSÓLICO PARA DETECÇÃO DE FRAUDE EM LEITE POR NEUTRALIZANTES DE ACIDEZ | 141 |
| III.1 | INTRODUÇÃO | 142 |
| III.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 143 |
| III.2.1 | REAGENTES E EQUIPAMENTOS | 143 |
| III.2.2 | MÉTODO..... | 143 |
| III.2.3 | OTIMIZAÇÃO | 145 |
| III.2.4 | VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL..... | 145 |
| III.2.4.1. | Amostras | 145 |
| III.2.4.2. | Testes preliminares | 146 |
| III.2.4.3. | Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância..... | 147 |
| III.2.4.4. | Robustez | 148 |
| III.2.5 | AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (<i>FITNESS FOR PURPOSE</i>)..... | 149 |
| III.2.6 | VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL..... | 149 |
| III.2.6.1 | Preparação dos materiais de teste | 152 |
| III.2.6.2 | Testes de homogeneidade e estabilidade | 154 |
| III.2.6.3 | Organização do estudo interlaboratorial..... | 154 |
| III.2.6.4 | Análise estatística..... | 156 |
| III.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 157 |
| III.3.1 | OTIMIZAÇÃO | 157 |
| III.3.2 | VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL..... | 159 |
| III.3.2.1 | Testes preliminares | 159 |
| III.3.2.2 | Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância..... | 160 |
| III.3.2.3 | Robustez | 167 |
| III.3.3 | AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (<i>FITNESS FOR PURPOSE</i>)..... | 167 |
| III.3.4 | VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL..... | 169 |
| III.3.4.1 | Testes de homogeneidade e estabilidade | 169 |
| III.3.4.2 | Análise de agrupamento hierárquica (HCA) | 170 |
| III.3.4.3 | Ensaio colaborativos..... | 171 |
| III.3.4.4 | Comentários dos colaboradores..... | 174 |
| III.4 | CONCLUSÕES | 175 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Capítulo IV | - APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO NA DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU: DIFERENTES ABORDAGENS PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO | 176 |
| IV.1 | INTRODUÇÃO | 177 |
| IV.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 179 |
| IV.2.1 | AMOSTRAS | 179 |
| IV.2.2 | REAGENTES, EQUIPAMENTOS E <i>SOFTWARES</i> | 180 |
| IV.2.3 | ANÁLISE DE DADOS..... | 181 |
| IV.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 186 |
| IV.3.1 | Pré-processamento de dados e análise exploratória..... | 186 |

| | | |
|--------|--|-----|
| IV.3.2 | SIMCA <i>one-class</i> | 191 |
| IV.3.3 | Modelos SIMCA multiclassés | 192 |
| IV.4 | CONCLUSÕES | 197 |
| 4. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 199 |
| 5. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 201 |
| 6. | ANEXOS – EXEMPLOS DE DOCUMENTOS ELABORADOS PARA OS ENSAIOS COLABORATIVOS DE VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL | 219 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 Parâmetros de desempenho dos métodos qualitativos e respectivas equações de cálculo..... | 31 |
| Tabela I.1. Preparação dos materiais de teste | 57 |
| Tabela I.2 Avaliação de diferentes tipos e números de movimentos para a agitação manual dos tubos de ensaio contendo amostras não adulteradas e adicionadas de cloretos a 2,27 g.L ⁻¹ | 64 |
| Tabela I.3 Taxas de falso-negativos, de sensibilidade, de falso-positivos, de seletividade, acordância e concordância para amostras não adulteradas e adulteradas com amido. | 71 |
| Tabela I.4 Taxas de falso-negativos, de sensibilidade, de falso-positivos, de seletividade, acordância e concordância para amostras não adulteradas e adulteradas com cloreto de sódio..... | 75 |
| Tabela I.5 Taxas de falso-negativos, de sensibilidade, de falso-positivos, de seletividade, acordância e concordância para amostras não adulteradas e adulteradas com sacarose | 80 |
| Tabela I.6 Taxas de falso-positivos, falso-negativos e confiabilidade obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos clássicos para detecção de amido, cloretos e sacarose em leite | 88 |
| Tabela I.7 Valores de acordância e concordância obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos modificados para detecção de amido, cloretos e sacarose em leite..... | 89 |
| Tabela I.8 Parâmetros estatísticos e limites inferiores (5%) e superiores (95%) estimados para probabilidade de detecção dos reconstituintes para os métodos qualitativos clássicos modificados de detecção de amido, cloretos e sacarose em leite..... | 90 |
| Tabela I.9 Limites das regiões de perda de confiabilidade e limites de detecção estimados para os métodos qualitativos clássicos modificados para detecção de amido, cloretos e sacarose em leite em processos intra e interlaboratoriais | 91 |
| Tabela II.1 Analitos, números de níveis e faixas de concentração avaliados na validação dos métodos qualitativos oficiais para detecção de conservantes em leite cru | 109 |
| Tabela II.2 Concentrações dos analito e interferentes utilizados na etapa de avaliação da seletividade dos métodos qualitativos oficiais para detecção de conservantes em leite cru | 110 |
| Tabela II.3 Concentrações dos analitos, fatores e níveis avaliados no estudo da robustez dos métodos qualitativos oficiais para detecção de conservantes em leite cru | 111 |
| Tabela II.4 Preparação dos materiais de teste para validação interlaboratorial dos métodos de detecção de conservantes em leite | 115 |

| | |
|--|-----|
| Tabela II.5 Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de seletividade, de sensibilidade, de confiabilidade e valores de acordância e concordância obtidos para cada concentração de hipoclorito de sódio estudada..... | 121 |
| Tabela II.6 Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de seletividade, de sensibilidade, de confiabilidade e valores de acordância e concordância obtidos para os níveis de concentração de peróxido de hidrogênio estudados..... | 128 |
| Tabela II.7 Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de seletividade, de sensibilidade, de confiabilidade e valores de acordância e concordância obtidos para os níveis de concentração de peróxido de hidrogênio estudados..... | 131 |
| Tabela II.8 Valores médios (n=3) para contagem microbiana para amostras de leite cru não adulteradas e adulteradas com conservantes..... | 133 |
| Tabela II.9 Valores de taxa de falso-positivos, taxa de falso-negativos, taxa de confiabilidade, acordância e concordância obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos para detecção de cloro e hipoclorito em leite..... | 136 |
| Tabela II.10 Parâmetros estatísticos e limites inferiores (5%) e superiores (95%) estimados para probabilidade de detecção do método qualitativo para detecção de cloro e hipoclorito em leite..... | 137 |
| Tabela II.11 Valores de taxa de falso-positivos, taxa de falso-negativos, taxa de confiabilidade, acordância e concordância obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos para detecção de peróxido de hidrogênio (método do guaiacol) em leite..... | 138 |
| Tabela II.12 Parâmetros estatísticos e limites inferiores (5%) e superiores (95%) estimados para probabilidade de detecção do método qualitativo do guaiacol para detecção de peróxido de hidrogênio em leite..... | 139 |
| Tabela III.1 Analitos, critérios para resultados positivos, números de níveis e faixas de concentração avaliados na validação dos métodos qualitativos oficiais para detecção de neutralizantes da acidez em leite cru..... | 148 |
| Tabela III.2 Concentrações dos analitos, fatores e níveis avaliados no estudo da robustez dos métodos qualitativos oficiais para detecção de neutralizantes da acidez em leite cru..... | 149 |
| Tabela III.3 Preparação dos materiais de teste para validação interlaboratorial do método do ácido rosólico modificado para detecção de neutralizantes de acidez em leite..... | 154 |
| Tabela III.4 Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de seletividade, de sensibilidade, de confiabilidade e valores de acordância e concordância obtidos para bicarbonato de sódio..... | 162 |
| Tabela III.5 Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de seletividade, de sensibilidade, de confiabilidade e valores de acordância e concordância obtidos para carbonato de sódio..... | 163 |
| Tabela III.6 Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de seletividade, de sensibilidade, de confiabilidade e valores de acordância e concordância obtidos para hidróxido de sódio..... | 164 |

| | |
|--|-----|
| Tabela III.7 Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de seletividade, de sensibilidade, de confiabilidade e valores de acordância e concordância obtidos para citrato de sódio | 164 |
| Tabela III.8 Taxas de falso-negativos, taxas de falso-positivos e taxas de confiabilidade obtidas na validação interlaboratorial do método do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez em leite..... | 172 |
| Tabela III.9 Valores de acordância e concordância obtidos na validação interlaboratorial do método do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez em leite. | 173 |
| Tabela III.10 Parâmetros estatísticos, limites inferior (5%) e superior (95%) estimados para a probabilidade de detecção de neutralizantes de acidez em leite | 174 |
| Tabela IV.1 Lista de adulterantes avaliados e respectivas faixas de concentração | 180 |
| Tabela IV.2 Taxas de seletividade do modelo SIMCA de classe única para cada tipo de amostra de leite adulterada..... | 191 |
| Tabela IV.3 Classificação das amostras para o modelo SIMCA multiclasse..... | 192 |
| Tabela IV.4 Taxas de sensibilidade, seletividade e inconclusivos para o modelo SIMCA multiclasse | 193 |
| Tabela IV.5 Parâmetros de desempenho para os modelos SIMCA two-class | 194 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação esquemática do espectro eletromagnético com destaque para a região do infravermelho..... | 19 |
| Figura 2. Representação esquemática de acessório de refletância total atenuada .. | 22 |
| Figura 3 Curva de desempenho para determinação da região de perda de confiabilidade e limite de detecção com os respectivos dados experimentais. | 33 |
| Figura 4. Métodos de classificação não supervisionados. (a) Exemplo de gráfico de análise de componentes principais (PCA), componente principal 1 (PC1) versus componente principal 2 (PC2). (b) Exemplo de dendrograma obtido por análise de agrupamento hierárquica (HCA)..... | 39 |
| Figura 5 Representação esquemática dos modelos utilizados na classificação SIMCA (<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i>), sendo a reta o modelo de uma componente principal (PC); o plano, o de duas PCs; e o cubo o modelo de três PCs. | 41 |
| Figura 6 Representação esquemática das áreas de aceitação/rejeição para os modelos SIMCA original e formulado pelo pacote PLS-Toolbox..... | 43 |
| Figura I.1. Representação do procedimento de amostragem de leite cru utilizado para as etapas de otimização e validação dos métodos de detecção de amido, cloretos e sacarose. | 49 |
| Figura I.2. Esquema proposto para validação interlaboratorial de métodos qualitativos: etapas principais, delineamento experimental mínimo, parâmetros de desempenho e critérios de aceitabilidade. | 54 |
| Figura I.3. Organização dos estudos interlaboratoriais, incluindo testes de homogeneidade, estabilidade, para validação dos métodos qualitativos modificados de detecção de adulterantes em leite: amido, cloretos e sacarose. | 58 |
| Figura I.4. Fluxogramas dos métodos qualitativos de detecção de amido, sendo (a) método oficial; e (b) método modificado..... | 62 |
| Figura I.5. Cores observadas na otimização do método de detecção de amido em leite..... | 63 |
| Figura I.6. Cores observadas na otimização dos métodos de detecção de cloretos em leite..... | 65 |
| Figura I.7. Fluxogramas dos métodos qualitativos de detecção de cloretos, sendo (a) método oficial e (b) método modificado..... | 66 |
| Figura I.8. Fluxogramas dos métodos qualitativos de detecção de sacarose, sendo (a) método oficial; e (b) método modificado. | 67 |
| Figura I.9. Cores observadas na otimização dos métodos de detecção de sacarose em leite..... | 68 |
| Figura I.10. Curvas de desempenho com respectivas regiões de perda de confiabilidade e pontos experimentais (●) para os métodos de detecção de amido em leite, sendo (a) método oficial e (b) método modificado. | 70 |

| | |
|---|-----|
| Figura I.11 Curvas de desempenho com respectivas regiões de perda de confiabilidade e pontos experimentais (●) para os métodos de detecção de cloretos em leite, sendo (a) método oficial e (b) método modificado. | 76 |
| Figura I.12. Curvas de desempenho com respectivas regiões de perda de confiabilidade e pontos experimentais (●) para os métodos de detecção de sacarose em leite, sendo (a) método oficial e (b) método modificado. | 82 |
| Figura I.13. Análise de agrupamentos hierárquicos: dendrograma com as distâncias entre os laboratórios colaboradores. | 86 |
| Figura I.14. Estimativa dos limites inferiores e superiores para as probabilidades de detecção e intervalos de predição para os limites de detecção para os métodos qualitativos modificados de detecção de amido, cloretos e sacarose. | 92 |
| Figura II.1 Cores observadas no método qualitativo oficial estabelecido na Instrução Normativa 68/2006 para detecção de cloro e hipoclorito em leite. | 102 |
| Figura II.2 Fluxograma do procedimento analítico do método qualitativo oficial estabelecido na Instrução Normativa 68/2006 para detecção de cloro e hipoclorito em leite. | 103 |
| Figura II.3 Cores observadas para o método oficial do guaiacol estabelecido na Instrução Normativa 68/2006 para detecção de peróxido de hidrogênio em leite ... | 104 |
| Figura II.4 Representação da reação química do método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio em leite cru estabelecido na Instrução Normativa 68/2006. | 104 |
| Figura II.5 Cores observadas para o método oficiais do óxido de vanádio estabelecido na Instrução Normativa 68/2006 para detecção de peróxido de hidrogênio em leite. | 105 |
| Figura II.6 Fluxogramas dos procedimentos analíticos dos métodos qualitativos oficiais estabelecidos na Instrução Normativa 68/2006 para detecção de peróxido de hidrogênio em leite, sendo a) método do guaiacol e (b) método do óxido de vanádio. | 105 |
| Figura II.7 Representação do procedimento de amostragem de leite cru utilizado para as etapas de otimização e validação métodos oficiais para detecção de conservantes em leite. | 106 |
| Figura II.8 Organização dos estudos interlaboratoriais, incluindo testes de homogeneidade, estabilidade, para validação dos métodos qualitativos de detecção de conservantes: cloro/ hipoclorito e peróxido de hidrogênio (método do guaiacol). | 113 |
| Figura II.9 Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo de logito) com respectivas regiões de perda de confiabilidade e pontos experimentais (●) para o método de detecção de cloro e hipoclorito em leite, sendo (a) etapa de identificação de cloro livre e (b) etapa de identificação de hipoclorito. | 123 |
| Figura II.10 Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo de Boltzman) com respectivas regiões de perda de confiabilidade e pontos experimentais (●) para o método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio em leite, sendo (a) Faixa 1 - níveis de concentração entre 0,0001 e 0,0022%% e (b) Faixa 2 - níveis de concentração entre 0,1 e 2,2%%. | 129 |

| | |
|---|-----|
| Figura II.11 Curva de desempenho obtida por regressão não linear (modelo probito) com respectiva região de perda de confiabilidade e pontos experimentais (●) para o método do óxido de vanádio para pesquisa de peróxido de hidrogênio em leite | 132 |
| Figura II.12 Gráficos de escores da análise de componentes principais..... | 135 |
| Figura III.1 Fluxograma do método qualitativo oficial do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite. | 144 |
| Figura III.2 Representação do procedimento de amostragem de leite cru utilizado para as etapas de otimização e validação dos métodos do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez. | 146 |
| Figura III.3 Delineamento experimental do processo de validação interlaboratorial do método do ácido rosólico modificado para detecção de neutralizantes de acidez em leite..... | 151 |
| Figura III.4 Exemplos de cores observadas no método do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite..... | 158 |
| Figura III.5 Fluxograma do método qualitativo modificado do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite..... | 159 |
| Figura III.6. Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo probito) com respectivas regiões de perda de confiabilidade (---) e pontos experimentais (●) para o método do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez..... | 166 |
| Figura III.7 Escala de cores para o método do ácido rosólico e valores de acidez e pH associados..... | 167 |
| Figura III.8 Análise de agrupamentos hierárquica: dendrograma com as distâncias entre os laboratórios colaboradores..... | 170 |
| Figura IV.1 Representação esquemática do delineamento experimental para amostragem e preparação de amostras brancas e adulteradas..... | 179 |
| Figura IV.2 Representação esquemática para a estratégia de classificação para análise de dados multivariados..... | 183 |
| Figura IV.3 Espectros de amostras não adulteradas e adulteradas de leite cru submetidos a diferentes técnicas de pré-processamentos de dados..... | 188 |
| Figura IV.4 Análise de componentes principais para amostras não adulteradas e adulteradas - Gráficos de <i>scores</i> | 190 |
| Figura IV.5 Resultados de classificação de modelos SIMCA two-class..... | 196 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ACO | Acordância |
| AOAC | <i>AOAC International</i> |
| ATR | Refletância total atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>) |
| CGCRE | Coordenação Geral de Acreditação |
| CON | Concordância |
| CQuali-Leite | Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos |
| DPDC | Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor |
| EV | Escola de Veterinária |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FSSAI | <i>Food Safety and Standards Authority of India</i> |
| HCA | Análise de Agrupamentos Hierárquica (<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>) |
| HPTLC | Cromatografia em camada delgada de alto desempenho (<i>High performance thin layer chromatography</i>) |
| IDF | <i>International Dairy Federation</i> |
| IN | Instrução Normativa |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| ISO | <i>International Standards Organization</i> |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| IV | Infravermelho |
| IVTF | Infravermelho com transformada de Fourier |
| Lacens | Laboratórios Centrais de Saúde Pública |
| LD | Limite de detecção |
| LINA | Leite instável não ácido |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MIR | Infravermelho médio (<i>Mid-infrared</i>) |
| MRC | Material de Referência Certificado |
| MSC | Correção de Espalhamento Multiplicativo (<i>Multiplicative Scatter Correction</i>) |
| NIR | Infravermelho próximo (<i>Near-infrared</i>) |
| PCA | Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>) |
| PLS-DA | Partial Least Squares Discriminant Analysis |

| | |
|--------------------|---|
| PNMQL | Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite |
| POD | Probabilidade de detecção (<i>Probability of Detection</i>) |
| R ² adj | Coefficiente de correlação ajustado |
| RBQL | Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados de Qualidade de Leite |
| RGB | <i>Red, Green and Blue</i> |
| RIISPOA | Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal |
| RMSE | Raiz quadrada do erro quadrático médio (<i>Root mean square error</i>) |
| RMSEC | Raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (<i>Root mean square error of calibration</i>) |
| RMSECV | Raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (<i>Root mean square error of cross validation</i>) |
| RPC | Região de perda de confiabilidade |
| SDA | Secretaria de Defesa Agropecuária |
| SIF | Serviço de Inspeção Federal |
| SIMCA | <i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i> |
| SISBI-POA | Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal |
| SNV | Varição Normal Padrão (<i>Standard Normal Variate</i>) |
| SNVS | Sistema Nacional de Vigilância Sanitária |
| TCF | Taxa de confiabilidade |
| TFN | Taxa de falso-negativos |
| TFP | Taxa de falso-positivos |
| TrAC | <i>Trends in Analytical Chemistry</i> |
| TSB | Taxa de sensibilidade |
| TST | Taxa de seletividade |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UHT | <i>Ultra High Temperature</i> |
| UV | Ultravioleta |
| VIS | Visível |

RESUMO

Métodos qualitativos clássicos e instrumentais vêm sendo utilizados na detecção de adulterantes em leite, embora poucos estudos de validação destes métodos estejam disponíveis na literatura. Os principais objetivos desse trabalho foram: i) validar provas qualitativas relacionadas à adulteração do leite por processos intra e interlaboratoriais, propondo melhorias nos procedimentos analíticos, assim como estratégias para a validação interlaboratorial dos mesmos; e ii) avaliar o uso da técnica de espectroscopia no infravermelho médio por refletância total atenuada (ATR) na detecção de adulterantes em leite cru por meio de diferentes abordagens de classificação. Os métodos clássicos avaliados foram aqueles descritos na legislação brasileira para detecção de amido, cloretos, sacarose, cloro e hipoclorito, peróxido de hidrogênio e neutralizantes de acidez (método do ácido rosólico). Em geral, essas provas apresentaram desempenho satisfatório em relação aos parâmetros característicos de métodos qualitativos, sendo as versões modificadas dos métodos de detecção de amido, cloretos e sacarose mais eficientes na detecção dos adulterantes do que as versões oficiais, fato ratificado pelos processos de validação interlaboratoriais. A aplicação da técnica de espectroscopia no infravermelho médio foi avaliada por meio de estratégia sequencial envolvendo diferentes abordagens de classificação. A abordagem não-objetivada foi considerada inadequada para determinação dos adulterantes: água, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e hipoclorito de sódio. Na abordagem objetivada, modelos *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) de duas classes apresentaram desempenho superior ao modelo SIMCA estabelecido para todas as classes de adulterantes. O método instrumental foi considerado adequado como ferramenta de triagem de amostras adulteradas. A avaliação de ambas as metodologias proporcionou maior conhecimento de técnicas amplamente utilizadas no controle e monitoramento de fraude em leite.

Palavras-chave: validação intralaboratorial, ensaio colaborativo, métodos qualitativos, espectroscopia no infravermelho médio, adulteração em leite.

ABSTRACT

Classical and instrumental qualitative methods have been used in the detection of adulterants in milk, although few studies related to their performance are available in the literature. In this context, the main objectives of this work were: i) to validate qualitative classical tests for detection of milk adulterations by in-house and collaborative processes, proposing improvements in the analytical procedure and strategies for their interlaboratorial validation; and ii) to evaluate the use of mid infrared spectroscopy by attenuated total reflectance (ATR) also in the detection of milk adulterations by different classification approaches. The classical methods evaluated were those described in Brazilian legislation for the detection of starch, chlorides, sucrose, chlorine and hypochlorite, hydrogen peroxide and neutralizers (rosic acid method). In general, these tests presented satisfactory performance, considering the characteristic parameters of qualitative methods, being the modified versions of the methods of detection of starch, chlorides and sucrose, more efficient in the detection of adulterants than the official versions, that was confirmed by interlaboratorial validation processes. The application of infrared spectroscopy technique was performed through a sequential strategy that involved different classification approaches. In the untargeted approach, the determination of the adulterants water, sodium bicarbonate, sodium chloride and sodium hypochlorite was considered unsuitable. In the targeted approach, the two-class *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) models performed better than the SIMCA model established for all the adulterants. The instrumental method was considered suitable as a screening tool for adulterated milk samples. The evaluation of both methodologies provided a deeper knowledge about techniques widely used in the control and monitoring of milk frauds.

Keywords: in-house validation, collaborative trials, qualitative methods, infrared spectroscopy, milk adulteration.

1. INTRODUÇÃO

Alimentos que possuem alto valor comercial ou que são submetidos a uma série de etapas de processamento antes de chegar ao mercado consumidor são aqueles com maior probabilidade de ser objeto de adulteração (Karoui & Baerdemaeker, 2007). Neste contexto, o leite e seus derivados se destacam, sendo vulneráveis a diversos tipos de adulteração que visam maximizar os lucros de sua produção (Souza et al., 2011).

A literatura demonstra que eventos envolvendo adulteração de alimentos ocorrem com regularidade, apesar de serem tratados como episódicos e, no caso das fraudes em leite, há uma persistência de tais práticas, apesar da legislação e fiscalização existentes, o constitui um desafio vivenciado pela cadeia produtiva láctea e órgãos regulamentadores (Zocche et al., 2002; Silva et al., 2009; Firmino et al., 2010; Mendes et al., 2010; Afzal et al., 2011; Balabin & Smirnov, 2011; Souza et al., 2011; Down to Earth, 2012; Ellis et al., 2012; Moore, Spink & Lipp, 2012; Santos, Wentzel & Pereira-Filho, 2012; UOL, 2013; Spink & Moyer, 2013; Veja, 2014; G1, 2015; Ellis & Goodacre, 2016). No Brasil, o modelo atual de inspeção, que não prevê a inspeção permanente em indústrias de laticínios, contribui para esse cenário, gerando impactos econômicos, de saúde pública e de direitos do consumidor.

A Instrução Normativa (IN) número 68 de 2006 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SDA/MAPA) estabelece os métodos físico-químicos para controle da qualidade do leite e seus derivados (Brasil, 2006), incluindo provas qualitativas clássicas para detecção de fraudes, tais como adição de água, reconstituintes de densidade, conservantes e neutralizantes de acidez (Tronco, 2010; Brasil, 2006; Mendes et al., 2010). Ao contrário dos métodos quantitativos descritos na IN 68/2006, que são referenciados aos normalizados pela *International Organization for Standardization* (ISO) e *International Dairy Federation* (IDF), os métodos qualitativos para detecção de adulterantes não são normalizados (Brasil, 2006).

Apesar de não estarem normalizadas, tais provas estão previstas na legislação brasileira desde 1981 (Brasil, 1981), sendo desde então utilizadas por

laboratórios oficiais e de indústrias de laticínios no controle e detecção de adulterações. Além disso, somente nos últimos anos, estudos de avaliação de desempenho das provas qualitativas relacionadas à qualidade do leite e seus derivados vêm sendo reportados (Silva et al., 2011; Rios et al., 2011; Silva, 2013, Tamanini et al., 2013; Silva et al.; 2015), embora sejam limitados por não representarem processos de validação apropriados.

Os métodos qualitativos previstos na legislação brasileira incluem determinações independentes para diferentes analitos, o que resulta em um número significativo de testes e em um considerável consumo de tempo, amostras e reagentes, além da geração de resíduos (BRASIL, 2006). Atualmente, há uma tendência de substituição desses procedimentos clássicos por técnicas instrumentais, que respondam a demandas globais de segurança, qualidade e rastreabilidade dos alimentos (Cifuentes, 2012).

Técnicas de infravermelho (IV), como espectroscopia de absorção no infravermelho médio (MIR) e no infravermelho próximo (NIR), têm sido amplamente utilizadas na determinação das propriedades e da qualidade do leite e, nas últimas décadas, seu emprego na detecção de adulterações vem sendo estudado (Etzion et al., 2004; Kawasaki et al., 2008; Cassoli, 2010; Cassoli, Sartori & Machado, 2011; Santos, Pereira-Filho & Rodriguez-Saona, 2013, Botelho et al., 2015; Liu et al., 2015).

Embora publicações recentes tenham apresentado procedimentos para a validação de métodos qualitativos (Langton et al., 2002; Ellison & Fearn, 2005; Macarthur & Holst, 2012; Gondim et al., 2014; López, Callao & Ruisánchez, 2015) e de calibração multivariada (Olivieri et al., 2006; ASTM, 2012), a existência de um protocolo harmonizado ainda se faz necessária. Neste contexto, estudos envolvendo métodos qualitativos clássicos e multivariados para detecção de adulterantes em leite são raros, limitados em relação aos parâmetros de desempenho e restritos a processos intralaboratoriais (Silva, 2013; Botelho et al., 2015; Silva et al., 2015).

Uma vez que qualquer programa de monitoramento da qualidade de alimentos deve estar estruturado com base na confiabilidade dos métodos analíticos

nele empregados (Gowik, 2009; Gondim, 2012), a indústria de produtos lácteos deve dispor de métodos de controle adequados para avaliação de autenticidade tanto do leite quanto de seus derivados (Santos, Pereira-Filho & Rodriguez-Saona, 2013). A complexidade, variabilidade e instabilidade da matriz leite, associada à falta de experiência em análise de produtos lácteos, são pontos altamente críticos que podem afetar a confiabilidade do controle analítico, mesmo quando métodos clássicos e consolidados são adotados (De Noni, 2004).

O cenário exposto motivou o desenvolvimento do presente trabalho com foco na validação dos diferentes métodos qualitativos relacionados à detecção de adulterantes em leite cru, incluindo as provas clássicas descritas na legislação brasileira em versões originais e modificadas, além de propor a técnica de espectroscopia no IV médio associada à quimiometria como alternativa para classificação de amostras adulteradas, contribuindo de maneira significativa para a garantia da confiabilidade dos resultados obtidos tanto em laboratórios oficiais quanto naqueles de controle de qualidade das indústrias de laticínios.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Validar métodos qualitativos clássicos para detecção de adulterantes em leite cru, avaliando suas respectivas adequações aos propósitos de uso e propondo alterações nos procedimentos analíticos visando um melhor desempenho, e avaliar o emprego da quimiometria associada à técnica de espectroscopia no MIR para detecção de amostras adulteradas de leite cru com base em diferentes abordagens de classificação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar, em processos intralaboratoriais, os métodos clássicos oficiais para detecção dos adulterantes em leite cru, incluindo aqueles para detecção de reconstituintes da densidade (amido, cloreto de sódio e sacarose), neutralizantes de acidez (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, citrato de sódio e hidróxido de sódio) e conservantes (hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio).
- Propor modificações aos métodos clássicos oficiais, visando à melhoria no desempenho analítico, e validar as versões modificadas em processos intralaboratoriais.
- Comparar o desempenho dos métodos clássicos, nas versões oficiais e modificadas, por meio dos parâmetros de desempenho característicos de métodos qualitativos: taxas de sensibilidade (TSB), de seletividade (TST), de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN) e de confiabilidade (TCF); região de perda de confiabilidade (RPC); limite de detecção (LD); acordância (ACO); concordância (CON); seletividade na presença de interferentes e robustez.

- Propor estratégias para o desenvolvimento de estudos colaborativos interlaboratoriais para a validação de métodos qualitativos, incluindo aspectos de organização, preparo e avaliação de itens de ensaio e análise dos resultados.
- Realizar estudos colaborativos para validação interlaboratorial das versões modificadas dos métodos de detecção de amido, cloreto de sódio, sacarose e neutralizantes de acidez, e das versões oficiais dos métodos de detecção de cloro e hipoclorito e de detecção de peróxido de hidrogênio em leite cru, envolvendo laboratórios de diferentes segmentos da cadeia produtiva.
- Avaliar o uso de metodologia por MIR associada à análise multivariada na detecção dos adulterantes (amido, cloreto de sódio, sacarose, formaldeído, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, citrato de sódio e hidróxido de sódio) em leite cru, por meio de modelos de classificação multivariados, considerando diferentes estratégias de classificação e avaliação dos parâmetros de desempenho: TSB, TST, taxa de inconclusivos, RPC e LD.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ADULTERAÇÃO EM LEITE

3.1.1. CADEIA PRODUTIVA

O leite é definido como “produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas” (Brasil, 2011). De ponto de vista físico-químico, trata-se de um sistema coloidal composto de diferentes fases. A fase contínua é composta por uma solução de água, lactose, sais orgânicos e inorgânicos, e vitaminas. Já nas fases dispersas, estão presentes os glóbulos de gordura, micelas de caseína e demais proteínas do soro (Fox & McSweeney, 1998; Bezerra et al., 2010). O leite de alta qualidade pode ser caracterizado como um alimento livre de agentes patogênicos, resíduos e contaminantes, que apresenta reduzida contagem de microrganismos deterioradores, sabor agradável, adequada composição e baixa contagem de células somáticas (CCS) (Alves, 2001; Santos, 2004).

A produção mundial de leite para o ano de 2015 foi estimada em aproximadamente 500 milhões de toneladas, sendo os quatro maiores produtores (Estados Unidos, Índia, China e Brasil) responsáveis por quase 35% da produção mundial (FAOSTAT, 2016). Ainda neste ano, o Brasil processou cerca de 24 bilhões de litros de leite, sendo Minas Gerais o estado maior produtor com aproximadamente $\frac{1}{4}$ da produção nacional (IBGE, 2016).

A indústria de alimentos em geral possui papel de destaque na economia brasileira. Entre seus diferentes segmentos, o setor de laticínios está entre os quatro principais setores, com uma participação estimada em aproximadamente 10% da indústria alimentícia no país (Carvalho, 2010). Especificamente em relação ao segmento da pecuária, apenas a indústria de laticínios registrou crescimento (8,92%)

entre os meses de janeiro e setembro 2016, em relação ao mesmo período do ano anterior (CEPEA/CNA, 2016).

Nas últimas décadas, o agronegócio do leite vem passando por importantes modificações em virtude das recentes transformações ocorridas no país, como a política de abertura comercial, o plano de estabilização econômica, a desregulamentação do mercado, a nova estrutura de produção e comercialização, o fortalecimento da representação dos produtores, a maior competição no setor industrial e também o aumento da exigência do consumidor por produtos de qualidade (Vilela et al., 2002; Zoccal & Gomes, 2005; Carvalho, 2010).

Apesar dos avanços nas técnicas de manejo, na nutrição animal e nas condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos que viabilizaram a complexa e sofisticada produção e comercialização do leite, essa cadeia produtiva, no Brasil, ainda é bastante heterogênea. Diversos modelos de produção ainda são observados no país, desde propriedades de subsistência, com produção diária inferior a dez litros, até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo, que utilizam tecnologias avançadas e possuem produção diária maior que 50 mil litros. Uma das consequências desta grande disparidade é a baixa produtividade média brasileira, indicando que muito ainda precisa ser aprimorado sob o ponto de vista genético, nutricional e, principalmente, de manejo para se atingir os patamares alcançados pelos principais produtores mundiais (Zoccal & Gomes, 2005; Tronco, 2010).

Em geral, alimentos alvo de adulteração incluem os que possuem alto valor comercial, que passam por diversas etapas de processamento antes de serem comercializados ou, ainda, que são produzidos em alta escala em todo o mundo (Cordella et al., 2002; Karoui & Baerdemaeker, 2007). No caso específico do leite, devido ao fato de se tratar de uma matéria-prima composta por uma grande variedade de substâncias, a modificação da sua composição por adição e/ou a substituição por outros ingredientes não lácteos é uma prática recorrente (De La Fuente & Juarez, 2005).

A adulteração do leite realizada com o objetivo aumentar de forma fraudulenta seu volume, reduzindo o custo do produto e aumentando o lucro final

compreende o tipo mais comum de fraude (Almeida et al., 2012; Ellis et al., 2012; Rani et al., 2012, OMS, 2016). No entanto, com o advento do pagamento por qualidade, outras substâncias passaram a ser adicionadas ao leite com o objetivo de diminuir o nível de contaminação microbiana (Tronco, 2010; Rodrigues, 2015).

A verificação da autenticidade de produtos alimentares é de primordial importância tanto para consumidores quanto para indústrias, em todos os níveis do processo de produção, desde as matérias-primas até os produtos acabados. Do ponto de vista regulamentar, os padrões de identidade e qualidade são estabelecidos por meio da definição de indicadores que especificam as características e a composição de cada produto. Do ponto de vista econômico, a autenticidade de produtos é essencial para evitar a concorrência desleal que pode desestabilizar e atrapalhar a economia regional ou até mesmo a economia nacional, uma vez que um produto de boa procedência e que atenda aos padrões de qualidade se torna menos competitivo comercialmente que o produto adulterado (Cordella et al., 2002; Silva et al., 2009). Além disso, a adulteração dos alimentos pode causar danos à saúde do consumidor pela ingestão de produtos químicos, com consequências potencialmente graves em termos de saúde pública, o que reforça a importância da verificação da autenticidade dos alimentos (Ellis et al., 2012; Rodrigues, 2015; Ellis & Goodcare, 2016).

3.1.2. REGULAMENTAÇÃO, FISCALIZAÇÃO E MONITORAMENTO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE

A legislação brasileira define como leite fraudado “aquele que for adicionado de água, subtraído de qualquer dos seus componentes, ou adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição. Além disso, é considerado fraudado o leite comercializado ou exposto ao consumo: de categoria inferior rotulado como de categoria superior, cru vendido como pasteurizado; ou sem as devidas garantias de inviolabilidade” (Brasil, 1952).

No Brasil, a inspeção e fiscalização de matérias-primas e alimentos competem tanto aos órgãos de Agricultura e Pecuária quanto aos de Vigilância

Sanitária. Os órgãos da Agricultura realizam a fiscalização nos estabelecimentos de processamento de leite e nas propriedades rurais. Ao MAPA cabem as ações nos estabelecimentos de comércio interestadual e internacional; às Secretarias de Agricultura estaduais são incumbidas as ações nos estabelecimentos que façam o comércio intermunicipal; e às Secretarias de Agricultura municipais, as ações nos estabelecimentos que façam apenas comércio municipal. Ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) cabe o monitoramento do leite no comércio. A execução dessa ação fica sob a responsabilidade dos órgãos de Vigilância Sanitária estaduais, distrital e/ou municipais em articulação com os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) (Brasil, 2008; Brasil, 2012).

Lançado em 1998 e regulamentado em 2002 pela IN 51/2002 do MAPA, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) tem por objetivo alavancar o setor leiteiro com base em padrões de qualidade, visando à oferta de produtos com melhor nível sanitário para o mercado nacional e ampliação da participação brasileira no mercado internacional, além de adequar as normas publicadas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) às realidades de produção e consumo de leite no Brasil. A IN 51/2002, na qual são estabelecidas as normas para a produção leiteira no país, teve seu texto atualizado pela IN 62/2011, sendo, na ocasião, determinadas novas normas de produção, identidade e qualidade de leites tipo A (pasteurizado e cru refrigerado) além da regulamentação da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (Brasil, 1952; Brasil, 2011). Como consequências da adoção dessas medidas, foi organizada a Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados de Qualidade de Leite (RBQL), que envolve setores científicos e econômicos da cadeia produtiva leiteira (Nero et al., 2005; Milinski & Ventura, 2010; Brasil, 2011; Santos et al., 2012).

Além disso, após operação da Polícia Federal, em 2007, denominada Operação Ouro Branco, que provou a ocorrência de adulteração em leite cru utilizado na produção de leite *ultra high temperature* (UHT), foi implantado o Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos (CQuali-Leite). Trata-se de uma iniciativa conjunta da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do

Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor (DPDC) do Ministério da Justiça e do MAPA, no sentido de integrar as ações dos órgãos envolvidos no controle de alimentos e fortalecer as medidas de prevenção e combate aos desvios de qualidade, incluindo irregularidades e fraudes. Assim, o CQuali-Leite tem como objetivo fiscalizar os estabelecimentos produtores e processadores e monitorar a conformidade dos leites pasteurizado, UHT e em pó, em suas diversas classificações, bem como o combate ao comércio informal do leite (Brasil, 2008; Brasil, 2012).

No contexto internacional, as normas de fiscalização e as metodologias empregadas no monitoramento do leite variam de acordo com o país. Nos Estados Unidos, a normalização dos métodos para controle de leite compete ao *Food and Drug Administration* (FDA), sendo utilizados como referência os métodos da *AOAC International* (AOAC), ISO e do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, uma publicação da *American Public Health Association* (Marshall, 1992). Estas normas, no entanto, não abrangem métodos qualitativos para controle de leite.

Na Índia, segundo maior produtor mundial de leite, as normas relativas a alimentos, sua produção, armazenamento, distribuição, venda e importação são estabelecidas pela *Food Safety e Standards Authority of Índia* (FSSAI) (Índia, 2006). No *Manual of Methods of Analysis of Foods – Milk and milk products* da FSSAI são determinados vários métodos qualitativos para detecção de diferentes substâncias, como adulterantes, e contaminantes (Índia, 2015), incluindo informações sobre limites de detecção para alguns métodos.

Em 2008, após o incidente da adulteração de leite com melamina, o Conselho de Estado da China aprovou o *Regulation on the Supervision and Administration of the Quality and Safety of Dairy Products* com o objetivo de promover a qualidade e segurança dos produtos derivados de leite. Entre diversas normas e procedimentos estabelecidos nesse regulamento, está a proibição da adição de quaisquer substâncias ao leite fresco ao longo da cadeia produtiva (China, 2008; Ellis et al., 2012; OMS, 2016).

Para análise de leite e seus derivados, a União Europeia tem como referência os métodos normalizados pela ISO e IDF (EC, 2008). No entanto, para métodos qualitativos, a única publicação ISO/IDF existente se refere à pesquisa de antimicrobianos (comunicação pessoal, A. Dubois, IDF, 2012). Por outro lado, ensaios qualitativos para controle de leite podem estar previstos em normas de seus países-membros, como é o caso de Portugal. Entre as normas portuguesas estabelecidas pelo Instituto Português de Qualidade (IPQ), encontram-se diversos ensaios para análise preliminar do leite e, em relação à presença de adulterantes, pode ser citada a prova para detecção de cloretos (IPQ, 1979).

Apesar das diversas normas internacionais relativas ao controle e fiscalização de alimentos, a adulteração de alimentos ainda constitui um desafio para a cadeia produtiva, sendo o leite um dos alvos mais comuns de adulteração (Afzal et al., 2011; Down to Earth, 2012; Moore, Spink & Lipp, 2012; Spink & Moyer, 2013).

Especificamente, no Brasil, diversas publicações têm relatado casos de adulteração, tanto em leite cru como processado, por a adição de água, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, formol, nitrato, cloreto, cloro, sacarose, urina e soro de leite (Pina et al., 2007; Mendes et al.; 2010; Silva et al., 2009; Firmino et al.; 2010; Rosa-Campos et al., 2011; Souza et al.; 2011; UOL, 2013; G1, 2015).

3.1.3. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE

Os laboratórios de análise de alimentos atuam num contexto de constante necessidade de modernização e atualização dos métodos analíticos, em função dos avanços tecnológicos, que refletem tanto aspectos toxicológicos como de identidade e qualidade dos alimentos. Contudo, nem sempre a evolução dos métodos analíticos se dá na mesma velocidade que os progressos da área de ciência de alimentos. Assim, além de falta de disponibilidade de metodologias sofisticadas, seu uso também pode ser dispendioso e inadequado para determinados laboratórios. Nesse contexto, dependendo do analito e sua concentração no alimento, a utilização de métodos tradicionais pode ser mais eficiente e menos custosa (IAL, 2008)

Métodos qualitativos e quantitativos envolvendo diferentes procedimentos analíticos têm sido relatados para a detecção de adulterantes em leite (Karthek et al., 2011; Ellis et al., 2012). Em geral, os métodos qualitativos estão relacionados a técnicas sensoriais, nas quais os sentidos humanos são usados para gravar e interpretar a resposta (Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004), e são representados por métodos que envolvem respostas imunológicas (Renny et al., 2005) e reações químicas (Brasil, 2006; Tronco, 2010; Souza et al., 2011, Índia, 2015). As técnicas instrumentais envolvem tanto métodos qualitativos quanto quantitativos e incluem métodos alternativos e convencionais, tais como potenciométricos (Velooso et al., 2002), cromatográficos (Rani et al., 2012), espectroscópicos (Almeida et al., 2012; Jawaid et al., 2014; Botelho et al., 2015; Liu et al., 2015), amperométricos (Silva et al., 2012), condutimétrico e espectrofotométricos (Lima, Fernees & Rangel, 2004), sensores de impedância (Das et al., 2011) e análise de imagem digital (Santos, Wentzell & Pereira-Filho, 2012; Santos & Pereira-Filho, 2013).

Métodos qualitativos para detecção de adulterantes em leite baseados em provas clássicas têm sido objeto de várias publicações de órgão oficiais nacionais (Brasil, 1981; Brasil, 2006; IAL, 2008) e internacionais (IPQ, 1979; Índia, 2015). A IN 68/2006 do MAPA (Brasil, 2006) descreve Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos, incluindo métodos qualitativos para análise de leite fluido (Brasil, 2006). No âmbito do Ministério da Saúde, existe a publicação do Instituto Adolfo Lutz (IAL), intitulada Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos, que aborda métodos qualitativos para leite *in natura*, pasteurizado e UHT (IAL, 2008). Tais métodos são utilizados nos laboratórios de análise de alimentos para detecção de fraudes e falhas na sua obtenção ou processamento (Tronco, 2010; Brasil, 2012).

Compostos como amido, cloretos, sacarose, soro lácteo, ureia e urina são adicionados ao leite para encobrir o tipo de fraude mais comum em leite, que é a adição de água ao leite. Alguns desses compostos, classificados como reconstituintes da densidade do leite, são capazes de atribuir ao leite uma característica de normalidade, mascarando índices de crioscopia, densidade e refração. Soro lácteo, ureia e urina são empregados para ajustar o teor de nitrogênio

relacionado às proteínas (Tronco, 2010; Firmino et al., 2010, Kartheek et al., 2011; Liu et al., 2015; Rodrigues, 2015).

Os métodos de detecção de amido, cloretos e sacarose compõem o rol de provas clássicas qualitativas para detecção de reconstituintes de densidade em leite. A presença de amido em leite é determinada pelo surgimento de coloração azul após aquecimento da amostra, resultado da reação de adsorção entre iodo e amido. A identificação de cloreto é baseada na sua reação com nitrato de prata na presença do indicador cromato de potássio. O desenvolvimento da cor amarela indica resultado positivo, ou seja, presença de cloreto em quantidades superiores à faixa considerada normal em leite. Já a sacarose pode ser detectada por meio do desenvolvimento de uma cor vermelha escura obtida pela condensação de cetonas com resorcinol em meio ácido (Brasil, 2006; Tronco, 2010; Índia, 2015).

A neutralização do leite com agentes alcalinos é também uma das adulterações mais comuns e frequentemente empregadas para mascarar a alteração do leite sofrida pelo excesso de acidez. A neutralização excessiva altera consideravelmente a composição química do leite, saponificando sua gordura e hidrolisando suas proteínas, alterando o sabor, textura, consistência e retardando sua coagulação no processo de produção de queijos (Rodrigues, 2015). A presença de neutralizantes pode ser detectada pelos métodos qualitativos do ácido rosólico e de fenolftaleína. Ambas as substâncias são indicadores ácido-base que mudam de cor conforme o pH do meio. Ao reagirem doando ou recebendo prótons, os indicadores sofrem uma alteração na sua configuração eletrônica que causa a mudança de cor. No método do ácido rosólico, a observação da cor vermelho-carmim indica resultado positivo para presença de neutralizantes (Brasil, 2006, Índia, 2015).

A fraude pela adição de conservantes ao leite visa à redução da microbiota original, desenvolvida após a ordenha pela não observância de corretas práticas de manejo e higiene, assim como no armazenamento do mesmo. A adição de conservantes está também relacionada ao sistema de pagamento por qualidade do leite, no qual vários parâmetros são avaliados para uma melhor remuneração da matéria-prima. A contagem de bactérias totais é um dos parâmetros observados,

sendo que quanto menor o nível de contaminação microbiana, maior o valor pago ao produtor pelo litro de leite (Tronco, 2010; Rodrigues, 2015).

O composto denominado conservante é aquele que possui ação bactericida ou bacteriostática e que atua diretamente sobre a microbiota presente, mascarando a qualidade do leite e podendo causar danos à saúde do consumidor, pela ingestão de produtos químicos que não devem estar presentes no leite de consumo (Rodrigues, 2015). A presença de conservantes no leite também pode afetar a fabricação de produtos fermentados uma vez que essas substâncias podem inibir o crescimento de culturas lácteas sensíveis, dificultando a obtenção e/ou alterando a qualidade desses produtos. Entre os conservantes utilizados estão ácido bórico, dicromato de potássio, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e formaldeído (Tronco, 2010).

A detecção de cloro e hipocloritos tem como fundamento a formação de iodo livre a partir do iodeto de potássio, pela ação do cloro livre ou hipoclorito, em meio ácido, que dá a amostra uma coloração amarela. Os testes preveem ainda a adição de solução de amido para confirmação do resultado positivo (Brasil, 2006; IAL, 2008; Tronco, 2010; Índia, 2015).

A presença de peróxido de hidrogênio em leite pode ser identificada em duas provas. Pelo método do guaiacol, a detecção se dá pela atuação da enzima peroxidase, naturalmente presente no leite, sobre o peróxido de hidrogênio. O oxigênio liberado nessa reação reage com o guaiacol, formando o tetraguaiacol, responsável pela formação da coloração salmão característica. Já no método de detecção com óxido de vanádio, o óxido reage com o peróxido de hidrogênio, em meio ácido, formando o ácido ortoperoxivanádico de coloração rósea ou vermelha (Brasil, 2006; IAL, 2008; Índia, 2015).

Além das provas qualitativas clássicas, diversos testes para detecção de adulterantes vêm sendo desenvolvidos, sendo alguns já disponíveis no mercado. O “Anti-Fraude Kit” (Entelbra Indústria Eletrônica, Londrina, Brasil) é composto de tiras plásticas preparadas para detecção de neutralizantes (bicarbonato de cálcio e soda cáustica), peróxido de hidrogênio e ureia em leite cru. O Formfix (Macofren

Tecnologias Químicas, Brasília, Brasil) consiste em um teste qualitativo no qual um reagente líquido quando em contato com a amostra gera uma cor, que indica a presença ou ausência do adulterante formaldeído. Com as fitas teste Quantofix® Formaldehyde (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemanha), a determinação da presença do formaldeído pode ser realizada por meio de interpretação visual (semi-quantitativo) ou com uso de leitor eletrônico (quantitativo).

Considerando as técnicas instrumentais, destaca-se a sua associação com métodos quimiométricos. Nos últimos anos, a espectroscopia no infravermelho, comumente empregada na determinação de parâmetros de qualidade do leite, vem sendo utilizada na detecção de fraudes em leite (Almeida et al., 2012; Ellis et al., 2012; Santos, Wentzell & Pereira-Filho, 2012; Santos & Pereira-Filho, 2013; Jawaid et al., 2014; Botelho et al., 2015; Scampicchio et al., 2016). Estas metodologias têm por vantagens a capacidade de analisar amostras com pouca ou nenhuma etapa de preparação, facilidade de uso, rápida coleta de dados e capacidade de serem empregadas como técnicas de impressão digital (Karoui & Baerdemaeker, 2007; Santos & Pereira-Filho, 2013; López et al.; 2014). No entanto, por apresentarem sensibilidade limitada, um desempenho inferior aos métodos clássicos tem sido reportado (Silva, 2013; Índia, 2012; Zang et al., 2014; Botelho et al., 2015; Gondim et al., 2015; Liu et al., 2015; Silva et al., 2015).

3.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Os métodos espectrométricos são baseados nas espectroscopias: atômica e molecular. Espectroscopia é um termo geral empregado para designar a ciência que trata das interações entre os diversos tipos de radiação e a matéria, sendo que essas interações podem ocorrer na forma de absorção, emissão e espalhamento de radiação. Os métodos espectrométricos mais utilizados são aqueles baseados na radiação eletromagnética, sendo a luz e o calor radiante as mais conhecidas (Holler, 2009).

O espectro de energia eletromagnética pode ser dividido em várias regiões delimitadas por limites experimentais baseados em métodos de produção e detecção de radiações. Apesar de não apresentarem significado especial em si, esses limites possuem significado químico, já que interações físicas seguem mecanismos diferentes e fornecem tipos de informação distintos (Ewing, 1972). Na **Figura 1**, uma representação esquemática das bandas do espectro eletromagnético com destaque para a região do infravermelho é apresentada. Os limites definidos nas figuras são apresentados em comprimento de onda, uma grandeza física inversamente proporcional ao número de onda, que pode ser definida como o número de comprimentos de onda por unidade de distância.

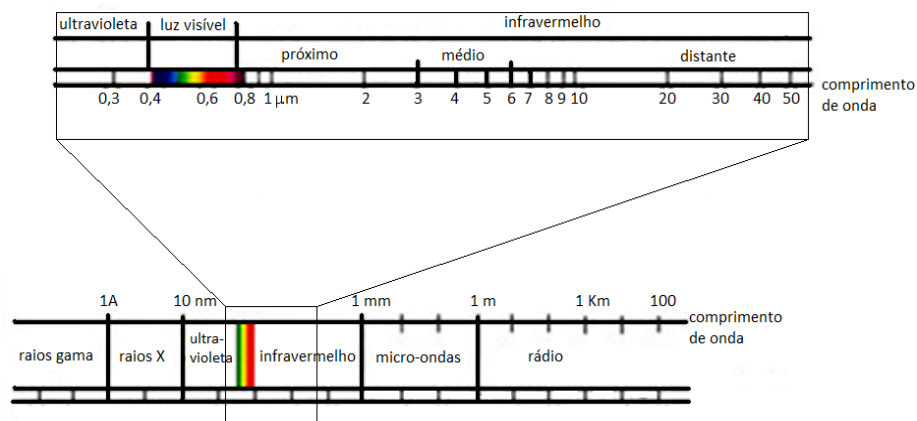


Figura 1. Representação esquemática do espectro eletromagnético com destaque para a região do infravermelho.

Fonte: Steffen, 2016 (adaptado).

A espectroscopia de absorção no infravermelho se baseia nas transições vibracionais, resultado das interações entre as moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes. O resultado dessa interação fornece evidências da natureza das ligações presentes e da presença dos grupos funcionais numa determinada molécula (Pavia, 2009).

A região IV compreende a radiação com números de onda aproximadamente no intervalo de 12800 a 10 cm^{-1} . Tanto do ponto de vista da aplicação como da instrumentação, o espectro IV é dividido em NIR, MIR e distante. No caso do NIR e MIR, as transições moleculares são vibrações moleculares. Já no IV distante, ocorrem rotações moleculares e vibrações fracas (Ewing, 1972; Skoog, 2002; Holler, 2009).

A absorção da radiação IV depende do aumento da energia de vibração ou de rotação associado com uma ligação covalente, desde que esse aumento resulte numa variação do momento dipolar da molécula. Assim, quase todas as moléculas contendo ligações covalentes mostrarão algum grau de absorção seletiva no IV (Ewing, 1972; Skoog, 2002; Holler, 2009). Espectros de IV de compostos covalentes poliatômicos são complexos, consistindo em numerosas bandas de absorção agudas, mesmo quando a amostra absorvente é um líquido puro, o que contrasta

com espectros usuais de ultravioleta e visível, que se relacionam com amostras em forma de soluções líquidas diluídas (Ewing, 1972).

As técnicas e aplicações de métodos baseados nessas três regiões espectrais do IV diferem significativamente. Medidas na região do NIR, de 4000 a 14000 cm^{-1} , são feitas com fotômetros e espectrofotômetros com projetos e componentes semelhantes aos instrumentos usados em espectrofotometria no ultravioleta e visível. Instrumentos NIR têm sido utilizados na determinação de espécies inorgânicas, hidrocarbonetos de baixa massa molecular e compostos simples de interesse na agricultura e indústria. A região mais amplamente utilizada atualmente é a MIR, de 670 a 4000 cm^{-1} , tanto em análises qualitativas como quantitativas, graças ao desenvolvimento dos espectrômetros nas últimas décadas (Skoog, 2002).

Até o início da década de 80, a maioria dos instrumentos para a região do MIR era do tipo dispersivo, baseada em redes de difração. A partir de então, houve uma grande mudança nesses equipamentos de modo que, atualmente, a maior parte deles é do tipo de transformada de Fourier. No espectrômetro com transformada de Fourier, a codificação é obtida dividindo-se a fonte em dois feixes cujos caminhos ópticos podem ser variados periodicamente para se obter padrões de interferência. Com essa variação, obtém-se uma sequência de interferências construtivas e destrutivas e, conseqüentemente, variações na intensidade de radiação recebida pelo detector, denominado interferograma. A transformada de Fourier é usada para o processamento de dados, convertendo o interferograma para a forma mais familiar do espectro, semelhante ao da espectrometria no infravermelho convencional (Silverstein, Bassler & Morrill, 1994; Skoog, 2002; Holler, 2009).

Um espectrômetro baseado em princípios interferométricos consiste basicamente de uma fonte, um interferômetro, um compartimento de amostra, um detector e um computador. A maioria dos instrumentos de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) disponíveis comercialmente está baseada no interferômetro de Michelson. No interferômetro, a radiação infravermelha com diversos comprimentos de onda é transmitida através de uma amostra, cria padrões

de interferência de diferentes comprimentos de onda que são absorvidos diferencialmente. A técnica de cálculo de transformação de Fourier consiste na conversão do sinal bruto num espectro de absorção reconhecível, semelhante ao produzido por um espectrômetro ultravioleta/visível (UV/VIS) (Silverstein, Bassler & Morrill, 1994; Skoog, 2002; Holler, 2009).

O aparecimento de espectrômetros com transformada de Fourier relativamente baratos na década de 90 ampliou o número e o tipo de aplicações da radiação no MIR. Esse aumento surgiu como consequência do aumento considerável na relação sinal-ruído e no LD que podem ser obtidos com instrumentos interferométricos.

A região MIR era usada principalmente em análise orgânica qualitativa e determinação de estruturas baseada em espectros de absorção. No entanto, passou a ser utilizada também em análise quantitativa de amostras complexas, tanto por espectrometria de absorção quanto de emissão (Skoog, 2002). Espectros de reflexão MIR são empregados em análises de amostras complexas, de difícil manipulação como polímeros, fibras, alimentos, produtos agrícolas, entre outros. Essa difusão do uso da espectrometria MIR pode ser vinculada à tecnologia de IVTF, mas também ao desenvolvimento dos acessórios de refletância total atenuada (ATR- *Attenuated Total Reflectance*).

O acessório ATR opera medindo as alterações que ocorrem em um feixe de IV que sofre reflexão interna total ao entrar em contato com a amostra. Quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal do acessório de ATR) para um menos denso (amostra), ocorre uma reflexão (**Figura 2**). A fração do feixe incidente refletida aumenta com o ângulo de incidência e quando se dá além de certo ângulo crítico, a reflexão é total. No entanto, durante o processo de reflexão, o feixe se comporta como se de fato penetrasse um pouco no meio menos denso antes que a reflexão ocorra. A radiação penetrante, denominada onda evanescente, depende do comprimento de onda da radiação incidente, dos índices de refração dos dois materiais e do ângulo do feixe incidente em relação à interface. Se o meio menos denso absorve a radiação evanescente, ocorre a atenuação de feixe nos comprimentos de onda das bandas de absorção. Uma das maiores vantagens da

ATR é que os espectros de grande variedade de amostras líquidas e sólidas podem ser obtidos rapidamente com mínimo de etapas de preparação e reprodutibilidade espectral (Skoog, 2002).

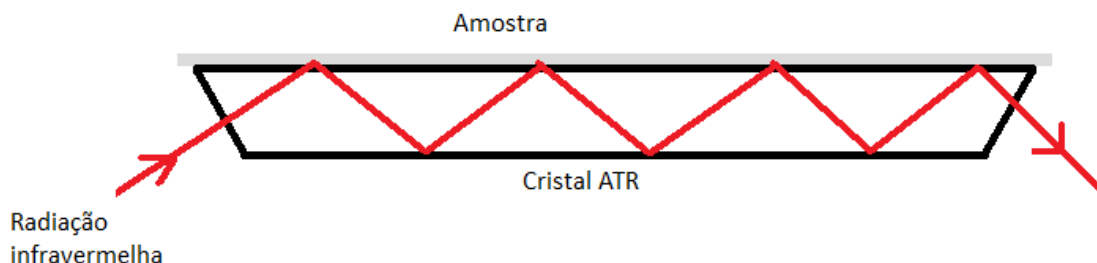


Figura 2. Representação esquemática de acessório de refletância total atenuada (ATR).

Fonte: Souza, 2009 (adaptado).

Os avanços na instrumentação da espectroscopia de IV e a combinação com métodos quimiométricos tornaram essa técnica uma poderosa ferramenta para a determinação da qualidade e autenticidade de alimentos. A quimiometria é uma ferramenta de análise multivariada de dados associada a métodos ricos em dados instrumentais, ou seja, multivariados. Com a quimiometria, os métodos podem ser usados qualitativamente, para agrupar ou classificar amostras desconhecidas com características similares, e quantitativamente, para determinar analitos em amostras (Rodríguez-Saona & Allendorf, 2011; Santos, Pereira-Filho & Rodríguez-Saona, 2013).

3.3. MÉTODOS QUALITATIVOS

Métodos qualitativos são definidos como aqueles que fornecem como resposta a presença ou ausência de determinado analito em uma amostra. Assim, os resultados de uma análise qualitativa seriam respostas binárias como: presente/ausente, positivo/negativo ou sim/não (Currie, 1995; Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; AOAC, 2014).

Song et al. (2001), no entanto, apontam para o fato de que alguns métodos qualitativos podem apresentar, além de respostas binárias, resultados inconclusivos. Do ponto de vista prático, esses resultados são importantes, já que influenciam os parâmetros de desempenho dos métodos e, conseqüentemente, sua aplicação (Song et al., 2001; Rios et al., 2003; López, Ruisánchez & Callao, 2015).

Além disso, atualmente, as análises qualitativas não estão restritas à detecção de compostos, mas incluem diversas aplicações como identificação, classificação e autenticação dos mais diferentes produtos e materiais, incluindo alimentos (Milman, 2011; Szymanska et al., 2015). Essa expansão se deve em grande parte pelo emprego de técnicas quimiométricas que permitem que, tanto dados qualitativos como quantitativos, sejam analisados para objetivos qualitativos (Moore, Spink & Lipp, 2012; Szymanska et al., 2015).

A ampliação das áreas de aplicação das análises qualitativas sugere também um aumento de sua importância na rotina de sistemas de garantia de qualidade. Nesse contexto, a validação de métodos é considerada um processo fundamental para garantia da qualidade, uma vez que assegura que o método analítico empregado é confiável e adequado ao propósito de uso (Moore, Spink & Lipp, 2012; López, Callao & Ruisánchez, 2015).

3.3.1. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS

A validação pode ser definida como a confirmação da adequação de determinado método para o propósito de uso (*fitness for purpose*) e se aplica a um protocolo definido, para a determinação de analitos específicos, numa faixa de concentração, em um determinado grupo de matrizes, por um tipo de teste em particular, tendo um propósito específico de uso (Thompson, Ellison & Wood, 2002; Gondim, 2012). Assim, a validação é a comprovação, pelo fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos mínimos de aceitação para uma aplicação ou uso específico pretendido foram atendidos, provando sua aplicabilidade para um determinado propósito de uso (ABNT, 2005; Peters, Drummer & Musshoff, 2007, Souza, 2007; Gondim, 2012).

Antes serem implementados nas rotinas dos laboratórios, os métodos de ensaio devem passar por diferentes etapas. Durante o desenvolvimento do método, são avaliadas as condições de desempenho para sua otimização, após a qual o mesmo passa por estudos preliminares de validação. Esses testes preliminares têm por objetivo estabelecer os critérios para a validação e avaliação dos parâmetros de desempenho. Após a validação e avaliação da adequação ao seu propósito de uso, políticas para a revalidação são estabelecidas. Nessa etapa, parte específica ou todo o processo de validação é repetido, por razões particulares, como cronogramas preestabelecidos, falha em um ou mais parâmetros, além de mudanças em procedimentos, incluindo equipamentos, pacotes (*softwares*), entre outros. Alguns autores, no entanto, destacam o fato de que em condições reais o processo de implementação dos métodos não ocorre em etapas distintas, sequenciais e independentes, mas sim como um processo iterativo no qual desenvolvimento e validação ocorrem simultaneamente (Green, 1996; Jenke, 1996; Huber, 1998; Tuomela, Stanescu & Krohn, 2005; Souza, 2007; Gondim, 2012; EURACHEM, 2014).

A validação de um método pode ser estruturada em processos intra e interlaboratoriais e, apesar das vantagens e desvantagens apresentadas por cada processo, eles são complementares e não excluem um ao outro. Um estudo colaborativo ou interlaboratorial, não pode ser conduzido sem que o método tenha sido previamente avaliado em ensaios de validação intralaboratoriais. No entanto, um método que apresente parâmetros de desempenho adequados, avaliados em processos intralaboratoriais, não pode ser considerado oficial ou padrão sem a realização de estudos colaborativos complementares (Wood, 1999; Taverniers, De Loose & Van Bockstaele, 2004; Souza, 2007).

Diversas publicações sobre procedimentos de validação de métodos qualitativos estão disponíveis na literatura, apesar de não haver um documento harmonizado, que determine quais parâmetros devem ser avaliados em cada tipo de processo, como no caso dos métodos quantitativos (EC, 2002; Thompson, Ellison & Wood, 2002; Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; Cárdenas & Valcárcel, 2005; Ellison

& Fearn, 2005; INMETRO, 2010; Macarthur & Holst, 2012; EURACHEM, 2014; Gondim et al., 2014; López, Ruisánchez & Callao, 2015).

3.3.1.1. Validação intralaboratorial

“Validação intralaboratorial corresponde a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado” (EC, 2002). Validações intralaboratoriais, em geral, fornecem resultados relativamente rápidos sobre o desempenho de uma nova metodologia através da realização de um número significativo de testes, nos quais são analisadas diferentes combinações de analitos, níveis de concentração e matrizes, em pequenos intervalos de tempo (Van Der Voet, Van Rhijn & Van De Wiel, 1999, Souza, 2007; Gondim, 2012).

Vários são os documentos que podem ser utilizados como referência na elaboração de procedimentos de validação intralaboratorial de métodos analíticos. Como referência nacional pode-se citar a publicação DOQ-CGCRE-008 da Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (INMETRO, 2010). Entre as principais referências internacionais estão o guia harmonizado pela AOAC, ISO e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a diretiva da União Europeia *Commission Decision* (CD) 2002/657/EC e os guias da EURACHEM e AOAC, sendo esse último específico para validação de métodos qualitativos (EC, 2002; Thompson, Ellison & Wood, 2002; EURACHEM, 2014; AOAC, 2014).

Além dos documentos citados, diferentes trabalhos tratam especificamente da validação e avaliação de desempenho de métodos qualitativos. Em 2005, a revista *Trends in Analytical Chemistry* (TrAC) publicou uma edição especial sobre métodos qualitativos. Protocolos de validação também foram propostos por diferentes autores (Macarthur & Holst, 2012; Gondim et al., 2014; López, Ruisánchez & Callao; 2015). A proposta de Gondim et al. (2014) constituiu um protocolo inovador e sistematizado das etapas experimentais e de análise de dados nos processos de

validação de métodos qualitativos, o qual já foi aplicado a diferentes técnicas de ensaio (Gondim et al., 2014; Gondim et al., 2015; Coelho, 2016; Miaw et al., 2016; Santos, 2016). O tutorial publicado por López, Ruisánchez & Callao (2015) é uma referência na validação de métodos qualitativos multivariados.

3.3.1.2. Validação interlaboratorial

De acordo com Van der Voet, Van Rhijn & Van de Wiel (1999), um método pode ser considerado completamente validado após ser submetido a um processo validação interlaboratorial, já que nesse procedimento o mesmo é submetido e avaliado em relação às duas condições extremas de precisão: repetibilidade e reprodutibilidade. Esses estudos colaborativos ou interlaboratoriais de avaliação de desempenho de métodos, como também são denominados os processos de validação interlaboratoriais, envolvem a análises de amostras idênticas (ou de uma mesma amostra), por uma mesma metodologia, por laboratórios distintos (Horwitz, 1995; EC, 2002; Souza, 2007).

Esse tipo de estudo, realizado de acordo com o procedimento descrito no protocolo harmonizado pela AOAC, ISO e IUPAC (Youden & Steiner, 1975; Horwitz, 1995; AOAC, 2002), é considerado em diversos segmentos um “padrão ouro de validação” (Van Der Voet, Van Rhijn & Van De Wiel, 1999; Wood, 1999; Souza, 2007). A validação por estudos colaborativos é indicada para métodos utilizados em grande quantidade de laboratórios na determinação de analitos estáveis em matrizes bem definidas (Thompson, Ellison & Wood, 2006).

No entanto, como nos processos de validação intralaboratorial, em se tratando de métodos qualitativos, não há um protocolo harmonizado e poucos são os trabalhos que abordam a validação interlaboratorial desses métodos, podendo ser citadas iniciativas independentes, como os artigos publicados por Langton et al. (2002) e Ellison & Fearn (2005) e o já citado protocolo proposto por Macarthur & Holst (2012).

Langton et al. (2002) propuseram as estatísticas ACO e CON para assumirem o papel análogo da repetibilidade e reprodutibilidade, respectivamente. Estas duas estatísticas indicam se o procedimento usado é suficientemente padronizado (Langton et al., 2002; Ellison & Fearn, 2005; Gondim et al., 2014).

Ellison & Fearn (2005), além de incluírem a avaliação de ACO e CON propostas por Langton et al., (2002), discutiram aspectos relativos aos testes de homogeneidade, considerando as dificuldades na avaliação por métodos qualitativos, indicando, que a homogeneidade seja verificada por um método quantitativo. Ainda de acordo com esses autores, o tratamento de amostras anômalas (*outliers*) deve ser feito antes da análise estatística dos resultados emitidos pelos laboratórios colaboradores. Neste caso, uma investigação do impacto dos resultados dos participantes sobre as taxas de falsos resultados e uma inspeção dos materiais fornecidos foram sugeridas como formas de evitar que resultados aberrantes impactem negativamente os resultados do estudo de validação.

O protocolo proposto por Macarthur & Holst (2012) foi elaborado para ensaios colaborativos, podendo também ser aplicado a processos intralaboratoriais. O protocolo se baseia no cálculo da estimativa da probabilidade de se obter uma resposta positiva dentro de um intervalo de predição. O intervalo é calculado a partir do desvio padrão da reprodutibilidade. Em seguida, uma simples representação dos intervalos de predição para probabilidade de detecção *versus* a concentração da substância analisada é usada para fornecer a estimativa do limite de detecção e da probabilidade de resultados falso-positivos.

3.3.1.3. Parâmetros de desempenho

Os parâmetros de desempenho constituem um conjunto de atributos mensuráveis que definem a qualidade de um método analítico e podem ser classificados em principais, básicos e de produtividade. Os parâmetros principais são aqueles que compõem o resultado analítico e estão relacionados com as propriedades metrológicas de rastreabilidade e incerteza. São exemplos de parâmetros principais a veracidade e a representatividade. Os parâmetros

relacionados ao procedimento analítico são os parâmetros básicos. Esses parâmetros servem de base para os parâmetros principais e correspondem aos atributos de precisão, robustez, sensibilidade e seletividade. A velocidade, relação custo/efetividade e os fatores pessoais compõem os parâmetros analíticos de produtividade (Cárdenas & Valcárcel, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim, 2012).

Estratégias adequadas de amostragem e a correta aplicação de protocolos de amostragem são essenciais para a representatividade em análises qualitativas. Isso porque um resultado com 100% de confiabilidade proveniente de uma amostra não representativa acarreta uma resposta inadequada sob o ponto de vista da qualidade do método. Uma adequada seleção das amostras implica em um delineamento que empregue amostras numa faixa representativa de concentrações para obtenção de estimativas confiáveis de sensibilidade e seletividade. O número de replicatas nas análises qualitativas também é de fundamental importância, já que um número reduzido de amostras pode não permitir estimativas adequadas de probabilidades (Cárdenas & Valcárcel, 2005; Ellison & Fearn, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim, 2012).

No caso dos métodos qualitativos, a aplicação direta dos princípios de metrologia tradicionais não é adequada. Para esses métodos, a avaliação de parâmetros como veracidade, precisão, incerteza, sensibilidade e seletividade estão relacionados, respectivamente, aos parâmetros característicos TFP/TFN, ACO/CON; RPC, TSB e TST (Cárdenas e Valcárcel, 2005; Ellison & Fearn, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; EURACHEM, 2014; Gondim et al., 2014; Lopéz, Callao & Ruisánchez, 2015).

Assim, a veracidade de um método qualitativo pode ser definida como uma medida de quão bem um teste binário de classificação identifica corretamente ou exclui uma condição, representada pelas proporções de resultados positivos verdadeiros e falsos, ou seja, TFP, TFN e também pela TCF (Ellison & Fearn, 2005; NATA, 2013; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim et al., 2014).

Especificamente, a TFP é definida como a probabilidade de se obter um resultado positivo para uma amostra que não contém o analito e pode ser calculada pela razão entre o número de resultados positivos incorretos e o total de amostras nas quais o analito não está presente. Já a TFN é determinada pela proporção de resultados negativos incorretos para amostras que sabidamente contêm o analito, ou seja, é a probabilidade de se obter um resultado negativo para uma amostra na qual o analito está presente (Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; Ellison & Fearn, 2005; Trullols et al., 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim, 2012).

A confiabilidade também é uma propriedade dos testes qualitativos relacionada à veracidade e é definida como a probabilidade de se obter resultados corretos, positivos ou negativos, em uma bateria de testes independentes (Cárdenas & Valcárcel, 2005; Rios & Téllez, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim, 2012).

Nos métodos qualitativos, a veracidade - representada pelas TFP e TFN - está bastante relacionada à TSB e à TST. Enquanto a sensibilidade é definida como a capacidade do método em detectar como positivas amostras verdadeiramente positivas, a seletividade define a habilidade do método em classificar como negativas amostras verdadeiramente negativas (Pulido et al., 2003; Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; Cárdenas & Valcárcel, 2005; Ellison & Fearn, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim et al., 2014).

O parâmetro da seletividade pode ser ainda avaliado em relação aos possíveis interferentes que podem acarretar um efeito inibidor ou potencializador na detecção do analito pelo método. Para estudo do efeito do possível interferente, os testes complementares de seletividade devem considerar amostras que contenham o possível interferente na presença e ausência do analito (Pulido et al., 2003; Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; Cárdenas & Valcárcel, 2005; Ellison & Fearn, 2005; EC, 2002; INMETRO, 2010; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; EURACHEM, 2014; Gondim et al., 2014).

As taxas de falsos resultados (TFP e TFN), TSB, TST e TCF podem ser estimadas pela aplicação das equações apresentadas na **Tabela 1**, que são obtidas

de tabelas de contingência (Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; Ellison & Fearn, 2005; Trullols et al., 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim et al., 2014).

Tabela 1 Parâmetros de desempenho dos métodos qualitativos e respectivas equações de cálculo

| Parâmetro | Equação | |
|------------------------------|--|---------|
| Taxa de falso-positivo (TFP) | $TFP = \frac{FP}{FP + TN} \times 100$ | (eq. 1) |
| Taxa de falso-negativo (TFN) | $TFN = \frac{FN}{FN + TP} \times 100$ | (eq. 2) |
| Taxa de seletividade (TST) | $TST = \frac{TN}{FP + TN} \times 100$ | (eq. 3) |
| Taxa de sensibilidade (TSB) | $TSB = \frac{TP}{FN + TP} \times 100$ | (eq. 4) |
| Taxa de confiabilidade (TCF) | $TCF = 100 - (TFP + TFN)$ | (eq. 5) |
| Acordância (ACO) | $ACO = \frac{\{k(k - 1) + (n - k)(n - k - 1)\}}{n(n - 1)}$ | (eq. 6) |
| Concordância (CON) | $CON = \frac{2\{k(k - nb)\} + nb(nb - 1) - ACO_m\{nb(n - 1)\}}{n^2b(b - 1)}$ | (eq. 7) |

FP = número de resultados falso-positivos; TN = número de resultados negativos verdadeiros; FN = número de resultados falso-negativos; TP = número de resultados positivos verdadeiros; k = número de resultados positivos obtidos; n = número de materiais de teste; b = número de baterias analíticas ou de laboratórios colaboradores; ACO_m = valor médio de acordância.

Fonte: Gondim et al., 2014.

A incerteza é um parâmetro associado à dispersão dos resultados. No entanto, dada à natureza binária e probabilística dos métodos qualitativos, a incerteza não pode ser expressa como um intervalo numérico. Desse modo, a incerteza para os métodos qualitativos é definida como uma região onde há probabilidade de ocorrência de erros. Essa região, denominada RPC, abrange uma faixa de concentração do analito na qual o método fornece resultados falsos, sendo, portanto, delimitada por limites superiores e inferiores de concentração (Pulido et al., 2003; Rios et al., 2003; Simonet, Rios & Valcárcel, 2004; Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004, Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim et al., 2014).

Em análises qualitativas, o LD, também denominado $CC\alpha$, é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, confiavelmente como positiva, numa dada matriz, o que corresponderia a uma determinada taxa de resultados falso-negativos, geralmente 5%. Esta definição se aplica a cenários nos quais um limite máximo de concentração de analito é permitido. Em um contexto no qual se deseja determinar uma quantidade mínima, uma determinada taxa de falso-positivos deve ser considerada, usualmente 5%. Nesse caso, o limite definido é denominado capacidade de detecção ($CC\beta$). Apesar de não poderem ser consideradas ao mesmo tempo, para o estabelecimento do LD do método, essas probabilidades coincidem, respectivamente, aos limites superior e inferior da RPC. Além do LD, atributo inerente ao método, outros limites podem ser utilizados como referências quantitativas em resultados de métodos qualitativos, como limites impostos pela legislação ou pelo cliente (EC, 2002; Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; Cárdenas & Valcárcel, 2005). Em métodos qualitativos cuja resposta está relacionada a uma propriedade intrínseca e que não envolvem a detecção de analitos específicos, como em casos de designação de origem de alimentos, a determinação dos parâmetros LD e RPC não é aplicável uma vez que o critério de decisão (LD) não pode ser relacionado a um valor quantificável (López, Callao & Ruisánchez, 2015).

Curvas de probabilidades de detecção, curvas POD (*probability of detection curves*) ou curvas de desempenho são comumente empregadas em estudos de LD e RPC (incerteza) (Song et al., 2001; Rios et al., 2003; Simonet, Rios & Valcárcel, 2004; Trullols, Ruisánchez & Rius, 2004; Ellison & Fearn, 2005; Rios & Téllez, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Magnusson, 2014; Gondim et al., 2014; Gondim et al., 2015; López, Callao & Ruisánchez, 2015). Como apresentado na **Figura 3**, para obter a curva POD de um método qualitativo, os dados experimentais (porcentagem de resultados positivos *versus* concentração do analito) são ajustados por regressão não-linear para uma função ou modelo empírico, que apresente uma adaptação adequada aos dados (Ellison & Fearn, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim et al., 2014). Os limites da RPC, e conseqüentemente, o LD são usualmente definidos pelas interseções entre a curva de desempenho obtidas e

as probabilidades de se obter 5 e 95% de resultados positivos (Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim et al., 2014).

Vale ressaltar que, assim como na regressão linear, os resíduos da regressão não linear também devem ser avaliados em relação à normalidade, independência e homoscedasticidade por meio de testes estatísticos específicos (Durbin & Watson, 1951; Levene, 1960; Shapiro-Wilk, 1965; Brown & Forsythe, 1974; Mazucheli & Achcar, 2002; Shoemaker, 2003; Motulsky & Christopoulos, 2003; Souza & Junqueira, 2005).

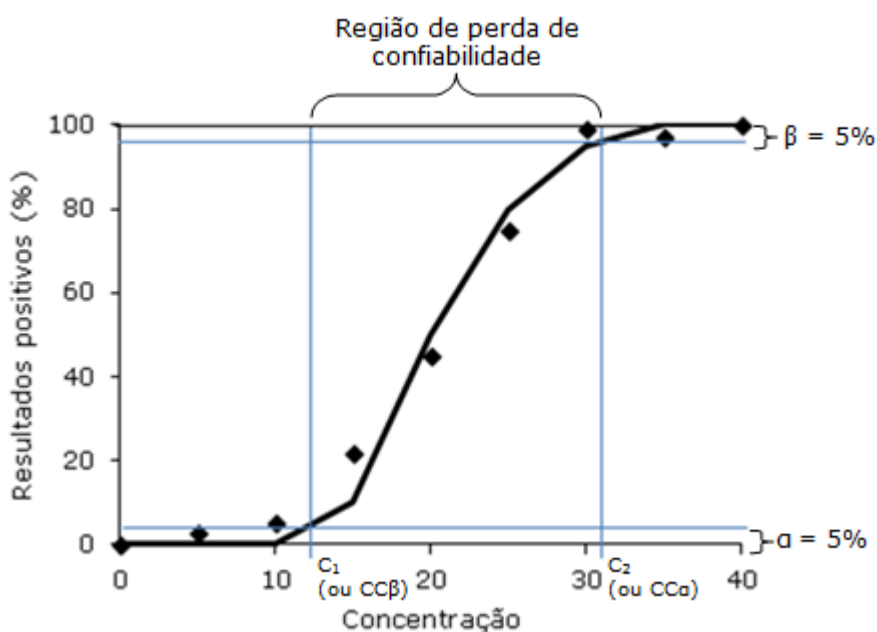


Figura 3 Curva de desempenho para determinação da região de perda de confiabilidade (RPC) e limite de detecção (LD) com os respectivos dados experimentais.

Fonte: Simonet, Ríos & Valcárcel, 2004; Gondim, 2012 (adaptado).

A robustez é a estimativa da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas alterações nas variáveis do procedimento analítico. O estudo da robustez tem por objetivo determinar as variáveis críticas do método que afetam a

confiabilidade dos resultados. Estudos de robustez são realizados por meio de experimentos fatoriais nos quais são avaliadas alterações nas taxas de falsos resultados e de confiabilidade. As amostras envolvidas nesses estudos devem conter o analito em concentrações externas ao intervalo da RPC, já que nessa região os fatores experimentais exercem maior influência sobre os resultados (Ellison, 2000; Rios et al., 2003; Cárdenas & Valcárcel, 2005; Aguilera et al., 2006; Gondim et al., 2014).

Por fim, a precisão em métodos qualitativos é substituída pelos parâmetros ACO e CON. “ACO é a probabilidade de obter, para duas amostras idênticas, analisadas no mesmo laboratório, sob condições de repetitividade, o mesmo resultado. CON é a probabilidade de se obter o mesmo resultado para duas amostras idênticas, testadas em laboratórios diferentes, sob condições de reprodutibilidade. Esse parâmetro é estimado pelas proporções correspondentes de pares de resultados de dados concordantes” (Langton et al., 2002; Ellison & Fearn; 2005; Gondim 2012). Em estudos intralaboratoriais, conduzidos sob condições de precisão intermediária, ACO e CON podem ser avaliadas em experimentos que representam as condições de rotina do laboratório, variando condições como analistas e equipamentos (Thompson, Ellison & Wood, 2002). ACO e a CON são calculadas por meio de fórmulas baseadas em cálculos de probabilidade e análise combinatória (**Tabela 1**) (Langton et al., 2002; Gondim, Junqueira & Souza, 2011; Gondim, 2012; Gondim et al., 2014).

3.4. MÉTODOS MULTIVARIADOS E QUIMIOMETRIA

Nas últimas décadas, os laboratórios vêm convivendo com uma crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química associada ao avanço tecnológico dos microprocessadores e microcomputadores, o que tornou necessário o desenvolvimento de técnicas mais complexas de tratamentos de dados do ponto de vista matemático e estatístico. Nesse contexto, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, dando origem a uma nova disciplina, denominada de Quimiometria (Bruns & Faigle, 1985; Sena et al., 2000; Ferreira, 2015).

A quimiometria tem como principal objetivo extrair o máximo de informação dos dados químicos a partir de métodos multivariados que consideram diferentes modelos matemáticos e estatísticos (Massart et al., 1997; Sena et al., 2000). Com o advento da quimiometria, métodos comumente utilizados em química orgânica e inorgânica, como os espectrométricos, foram acoplados a técnicas multivariadas, permitindo a análise de grande quantidade de dados para fins qualitativos e quantitativos, tornando-os muito mais poderosos (Bruns & Faigle, 1985).

Em relação às análises qualitativas, os métodos multivariados geralmente envolvem problemas de classificação que são resolvidos pelo emprego de métodos de classificação não supervisionada e supervisionada. A Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamento Hierárquica (HCA- *Hierarchical Cluster Analysis*) são exemplos de métodos de classificação não supervisionada. Os métodos supervisionados podem ser subdivididos em métodos discriminantes e de *class-modelling*, sendo o *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) e o *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA), respectivamente, os representantes desses tipos de métodos supervisionados mais comumente utilizados em classificação de amostras (Milman, 2011; Rodionova, Titova & Pomerantsev, 2016).

3.4.1. Pré-processamento de dados espectrais

O pré-processamento de dados espectrais é uma etapa integrante e fundamental das análises quimiométricas. A aplicação de técnicas de pré-processamento tem por objetivos remover a variância relacionada a fenômenos físicos dos espectros que resulta em informação não relevante do ponto de vista químico, a fim de tornar mais eficiente a subsequente análise dos dados (análise exploratória, regressão multivariada ou estabelecimento de modelo de classificação) (Rinnan, Berg & Engelsen, 2009; Souza & Poppi, 2012).

As técnicas de pré-processamento podem ser empregadas, entre outros, para detectar e eliminar dados espectrais dispersos (*outliers*); compensar diferenças entre as variáveis, proporcionando matriz de dados com escala similar; remover frequências indesejadas dos sinais a serem analisados, remover tendência que

possam sobrepor-se, ou ocultar mudanças de interesse (Rinnan, Berg & Engelsen, 2009; Lasch, 2012).

O método de correção de espalhamento multiplicativo (MSC - *Multiplicative Scatter Correction*) é uma das técnicas de pré-processamento mais utilizadas em espectrometria de infravermelho, seguida da variação normal padrão (SNV - *Standard Normal Variate*) (Rinnan, Berg & Engelsen, 2009). Ambos os métodos são utilizados na correção de desvios de linha de base não-lineares causados por espalhamento multiplicativo ocasionados, por exemplo, pela falta de homogeneidade no tamanho das partículas da amostra.

No MSC, a transformação dos dados é dada pela seguinte equação (eq. 8):

$$x_i^{antes} = (x_{ik}^{depois} - a_i)b_i \quad (\text{eq. 8})$$

Sendo x_{ik}^{antes} e x_{ik}^{depois} os valores de absorbância, por exemplo, no comprimento de onda k para a amostra i , antes e após o tratamento; e a_i e b_i os coeficientes estimados por regressão linear (método dos mínimos quadrados) para um espectro individual em relação ao espectro médio do conjunto de treinamento (Maleki et al., 2007; Rinnan, Berg & Engelsen, 2009).

Combinações entre diferentes métodos são relatados na literatura para o pré-processamento de dados espectrais. Nesse contexto, alguns pontos devem ser observados. A correção da dispersão deve ser realizada antes do emprego de técnica de diferenciação. O efeito da normalização é mais facilmente avaliado quando realizado antes de qualquer outra operação de correção. A diferença básica entre SNV e MSC combinados com técnicas de normalização é que, no MSC, as correções são aplicadas simultaneamente, o que geralmente fornece uma correção da linha de base menor (Rinnan, Berg & Engelsen, 2009).

3.4.2. Métodos de classificação não-supervisionados

Em geral, um procedimento completo de análise de dados se inicia com uma análise exploratória. Os resultados da análise exploratória de dados são muitas vezes utilizados para dirigir uma análise mais aprofundada dos dados, como classificação de amostras e seleção de variáveis relevantes para a classificação. Os métodos de análise exploratória são denominados métodos não supervisionados, uma vez que, com esses métodos, a separação de classes pode acontecer sem a necessidade de informações iniciais sobre a natureza das amostras, identificando agrupamentos naturais entre as mesmas. Os métodos de classificação não supervisionados mais utilizados em análise exploratória são PCA e a HCA, classificados como método de projeção e de agrupamento divisivo, respectivamente (Souza & Poppi, 2012; Szymanska et al., 2015).

A PCA é um dos métodos mais importantes utilizados em quimiometria e é base para diferentes métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. Normalmente, a PCA é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados (Souza & Poppi, 2012).

Assim, PCA é uma técnica de combinação linear que permite condensar grandes quantidades de dados em alguns padrões de informação chamados componentes principais (PCs) (Souza & Poppi, 2012; Vigni, Durante e Cochi, 2013). A PCA decompõe as respostas multivariadas dispostas numa matriz X_{ij} , num produto de duas novas matrizes, como indicado na equação 9:

$$X_{ij} = T_k P_k^T + E \quad (\text{eq. 9})$$

Sendo i número de amostras; j número de variáveis, T_k a matriz de escores; P_k a matriz de pesos (*loadings*); e k o número de fatores considerados; e E a matriz dos resíduos, que contém a informação não incluída nos k fatores. Os pesos representam o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC e os escores, as relações de similaridade entre as amostras.

A técnica de HCA interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendograma na qual as amostras semelhantes são agrupadas entre si, ou seja, quanto menor a distância entre os pontos, maior é a semelhança entre as amostras. Várias medidas de similaridade podem ser empregadas na HCA, sendo que a maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos que estão mais próximos, usando a distância euclidiana, e substituí-los por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles. O dendograma é construído repetindo esse procedimento até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto. No dendograma, em um dos eixos são representadas as amostras e no segundo eixo, o índice de similaridade s_{ij} , entre os pontos i e j , que é calculado de acordo com a equação 10:

$$s_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{m\acute{a}x}} \quad (\text{eq. 10})$$

Sendo d_{ij} a distância entre os pontos i e j ; e $d_{m\acute{a}x}$ a distância máxima entre qualquer par de pontos. Nesses diagramas, a similaridade entre pares de amostras (ou grupos de amostras) varia de um (identidade) a zero (nenhuma similaridade) (Moita Neto & Moita, 1998).

Na **Figura 4**, são apresentados gráficos de PCA e HCA. No gráfico de escores de PCA (**Figura 4a**), nota-se um conjunto de amostras distante das demais. Essas amostras são identificadas como as amostras 1 a 3, no dendograma (**Figura 4b**). Pela análise do dendograma, além do agrupamento das amostras 1 e 3, observa-se também que as amostras demais amostras podem ser agrupadas de distintas maneiras dependendo da distância considerada.

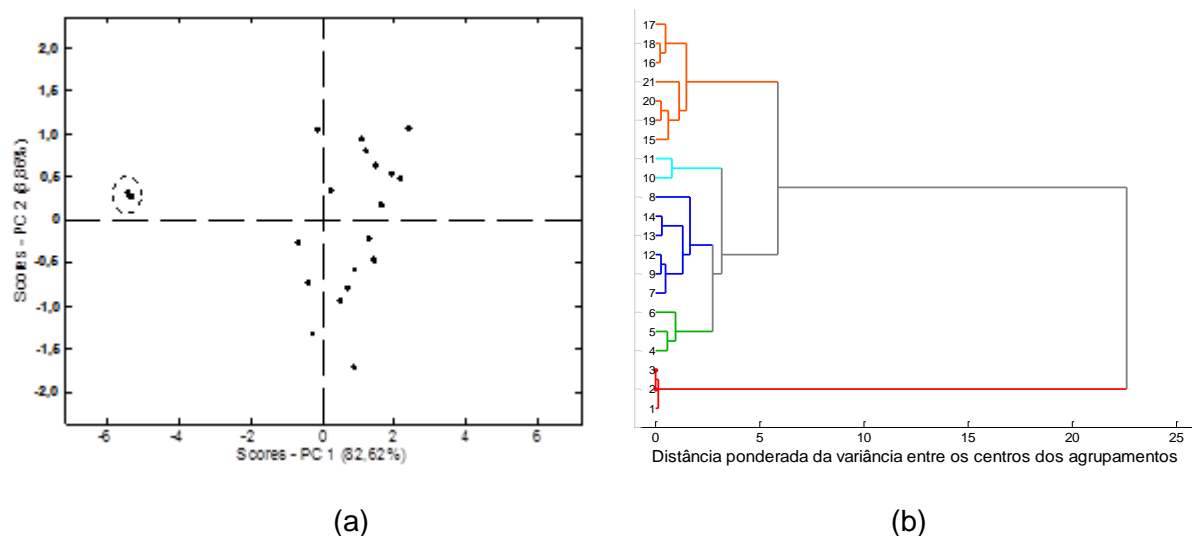


Figura 4. Métodos de classificação não supervisionados. (a) Exemplo de gráfico de análise de componentes principais (PCA), componente principal 1 (PC1) *versus* componente principal 2 (PC2). (b) Exemplo de dendrograma obtido por análise de agrupamento hierárquica (HCA).

Fonte: Elaborado pelo autor com auxílios do pacote PLS-Toolbox (Eigenvector Technologies, Manson, WA, USA).

3.4.3. Métodos de classificação supervisionados

Na classificação supervisionada, admite-se que a classe que gera o padrão das amostras é conhecida. Assim, métodos de classificação supervisionada são aqueles que atribuem objetos às classes pré-definidas. Nesse contexto, tanto métodos de análise discriminante quanto métodos *class modelling* são utilizados (Rodionova, Titova & Pomerantsev, 2016).

3.4.3.1. *Partial least squares discriminant analysis* (PLS-DA)

O PLS-DA pode ser considerado como um classificador linear de duas classes, ou seja, tem por objetivo encontrar uma linha reta que divide o espaço em duas regiões (Brereton & Lloyd, 2014).

O PLS-DA é derivado do método de regressão dos mínimos quadrados parciais (*Partial least squares* – PLS-R) e envolve a formação de um modelo de regressão entre as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , ou, quando se trata de um modelo de duas classes, entre a matriz \mathbf{X} e o vetor \mathbf{Y} . A matriz preditora \mathbf{X} é uma matriz $i \times j$ e contém os dados experimentais j referentes aos objetos i . \mathbf{Y} é a matriz resposta, $i \times k$, que compreende as variáveis categóricas k que descrevem as associações de classe. Após o desenvolvimento da regressão, o valor da resposta, \mathbf{Y}_{pred} , é previsto para uma nova amostra. A decisão é baseada na comparação entre \mathbf{Y}_{pred} e \mathbf{Y} . A amostra pode ser atribuída à classe que tem a distância mínima entre \mathbf{Y} e \mathbf{Y}_{pred} . No caso de utilização do teorema de Bayes, a atribuição dependerá do limite estabelecido para cada classe (Wise et al., 2006; Brereton & Lloyd, 2014; Botelho et al., 2015; Rodionova, Titova & Pomerantsev, 2016).

3.4.3.2. Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA)

De acordo com Bruns & Faigle (1985), SIMCA pode ser definido como “modelos independentes de similaridade utilizando componentes principais”. Conforme essa definição, o referido método consiste na atribuição de conjuntos de dados para determinadas classes e, em seguida, no estabelecimento individual de um modelo PCA para cada classe (**Figura 5**) (Wold, 1976; Bevilacqua et al., 2013).

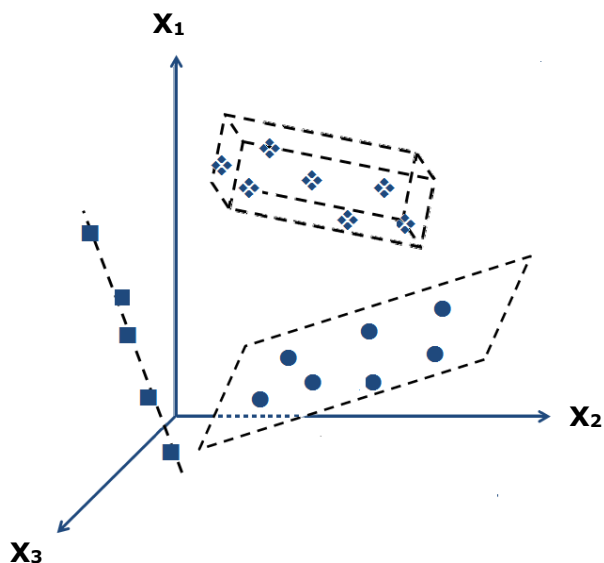


Figura 5 Representação esquemática dos modelos utilizados na classificação SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*), sendo a reta o modelo de uma componente principal (PC); o plano, o de duas PCs; e o cubo o modelo de três PCs.

Fonte: Durante, Bro & Cochi, 2011 (adaptado).

A regra de classificação original do SIMCA é baseada na comparação do quadrado da distância com a variância residual da classe por meio de um teste de F . Nessa regra, uma amostra pode ser atribuída a uma, várias ou a nenhuma classe. Após essa primeira formulação, o método foi aperfeiçoado e outras variações e regras de classificação foram introduzidas (Wold, 1976; Durante, Bro & Cochi, 2011).

O pacote PLS-Toolbox (Eigenvector Technologies, Manson, WA, USA) possui uma abordagem diferente para o modelo e regras de classificação. Nessa versão, a distância é definida de maneira semelhante a original, no entanto, as fronteiras das classes e, conseqüentemente, as regras de classificação são calculadas de modo distinto pelas estatísticas *Hotelling T^2* e *Q*. *Hotelling T^2* mede quão bem a amostra se adequa ao modelo, enquanto *Q* é a quantidade da informação original não incluída no modelo, ambas essas estatísticas podem ser calculadas de acordo com as equações 11 e 12 (Durante, Bro & Cochi, 2011; Bevilacqua et al., 2013).

$$T_i^2 = l \cdot (\mathbf{X}_i - \mathbf{X}_{media}) \mathbf{S}^{-1} \cdot (\mathbf{X}_i - \mathbf{X}_{media})^T \quad (\text{eq. 11})$$

$$Q_i = \mathbf{e}_i \cdot \mathbf{e}_i^T \quad (\text{eq. 12})$$

Sendo l o número de amostras no conjunto de treinamento; \mathbf{X}_i vetor de dados observados para a amostra i ; \mathbf{X}_{media} o vetor coluna de valor médio do conjunto de treinamento; \mathbf{S} o desvio padrão correspondente; e \mathbf{e}_i o vetor de resíduos da amostra após aplicação do modelo SIMCA.

De acordo com a formulação do pacote, uma amostra é atribuída a uma classe quando a sua distância reduzida d_{red} satisfaz a equação 13:

$$d_{red} = \sqrt{Q_{red}^2 + T_{red}^2} \leq \sqrt{2} \quad (\text{eq. 13})$$

Sendo Q_{red} e T_{red}^2 os valores reduzidos das estatísticas, ou seja, a razão entre o valor obtido para a amostra e os valores correspondentes a determinado limite de probabilidade, usualmente $\alpha = 0.05$ (Durante, Bro & Cochi, 2011; López et al., 2014).

Quando este critério é satisfeito para mais de uma classe, a amostra pode ser atribuída à classe para a qual o d_{red} é claramente menor (Durante, Bro & Cochi, 2011; López et al., 2014).

Apesar de apresentarem vantagens e desvantagens, tanto a abordagem original quanto a empregada pelo PLS-Toolbox apresentam fronteiras de classificação bastante próximas, que incluem amostras com valores de *Hotelling* T^2 e Q menores ou iguais a 1 (Durante, Bro & Cochi, 2011; López et al., 2014), como ilustrado na **Figura 6**.

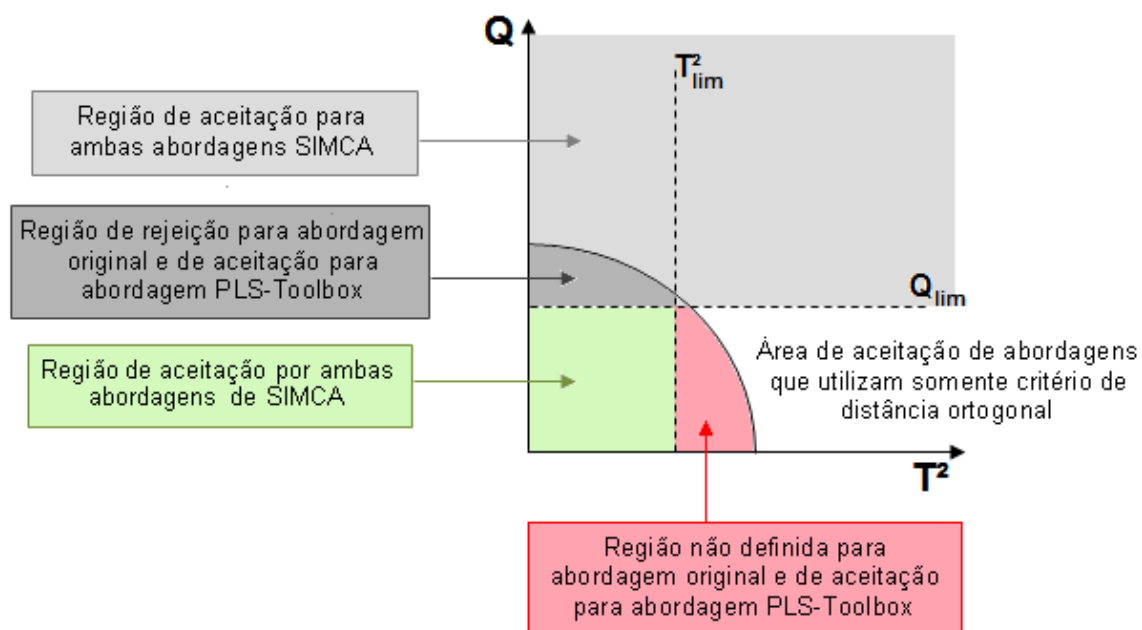


Figura 6 Representação esquemática das áreas de aceitação/rejeição para os modelos SIMCA original e formulado pelo pacote PLS-Toolbox.

Fonte: Durante, Bro & Cochi, 2011 (adaptado).

A estimativa da sensibilidade e da especificidade para cada classe é sugerida como parâmetro de avaliação da habilidade de classificação dos modelos SIMCA. Além desses parâmetros, o modelo pode ser avaliado em relação às amostras inconclusivas, ou seja, atribuídas a mais de uma classe ou a nenhuma classe, de acordo com a equação 14 (López, Callao & Ruisánchez, 2015):

$$\text{Taxa de inconclusivos}_j = (NA_j + MA) / T_j \quad (\text{eq. 14})$$

Sendo NA_j o número de amostras não atribuídas a nenhuma classe (amostras pertencentes a classe j não atribuídas a sua classe e a nenhuma outra); MA o número de amostras atribuídas a mais de uma classe; e T_j o total de amostras da classe j .

CAPÍTULO I - MÉTODOS QUALITATIVOS PARA DETECÇÃO DE RECONSTITUINTES DE DENSIDADE (AMIDO, CLORETO E SACAROSE) EM LEITE CRU: VALIDAÇÃO INTRA E INTERLABORATORIAL E MELHORIA DE DESEMPENHO¹

RESUMO

Apesar de o leite se destacar entre os alimentos sujeitos a fraude, poucos são os relatos na literatura sobre o desempenho analítico dos métodos qualitativos clássicos de detecção de adulterantes. Assim, foram validados métodos qualitativos para detecção de amido, cloretos e sacarose em leite cru, em versões oficiais e modificadas. Ambas as versões apresentaram resultados satisfatórios em relação ao propósito de uso, sendo estudados entre 21 e 12 níveis, em 30 replicatas nas faixas entre 0,01 e 1,20 g.L⁻¹ para amido, 0,92 e 2,24 g.L⁻¹ para cloretos, e 0,3 e 3,6 g.L⁻¹ para sacarose. Porém, as versões modificadas apresentaram menores frequências de falsos resultados e limites de detecção (LD) e faixas de incerteza mais estreitas, representando um aumento significativo na capacidade de detecção dos compostos. Os LD das versões modificadas foram estimados em 0,2; 1,42 e 0,19 g.L⁻¹ para os métodos de amido, cloretos e sacarose, respectivamente. Nos ensaios colaborativos, amostras de leite cru adulteradas com 150 g.L⁻¹ de água e 0; 0,3; 0,8 e 1,2 g.L⁻¹ de amido, 0; 1,5; 2,0 e 2,5 g.L⁻¹ de cloretos e 0; 2,4; 3,0 e 3,6 g.L⁻¹ de sacarose foram enviadas a 10 laboratórios de diferentes setores da cadeia produtiva de leite. Os resultados confirmaram o desempenho das versões propostas, bem como adequada precisão sob condições de reprodutibilidade.

Palavras-chave: métodos qualitativos, validação intralaboratorial, ensaio colaborativo, adulteração em leite, reconstituintes de densidade

¹ Artigos publicados em *Analytical Methods* (Gondim et al., 2015) e *Food Analytical Methods* (Gondim, Junqueira & Souza, 2016).

I.1 INTRODUÇÃO

A adulteração pela adição de água é o tipo de fraude mais comum em leite, sendo realizada para aumentar seu rendimento e, conseqüentemente, o lucro na sua comercialização. Com o objetivo de dificultar a detecção desta fraude, diversas substâncias são também adicionadas, visando principalmente o ajuste da densidade inicial da matéria-prima sendo, por isso, classificadas como reconstituintes de densidade. Dentre essas, as mais frequentemente empregadas são amido, cloreto de sódio e sacarose (Tronco, 2010, Kartheek et al., 2011; Liu et al., 2015).

A detecção de fraude por adição de reconstituintes de densidade vem sendo verificada por métodos qualitativos descritos em normas oficiais de diversos países, incluindo o Brasil (IPQ, 1979; Brasil, 1981; Índia, 2005; Brasil, 2006; Índia, 2012). Para a detecção de amido, esses têm como princípio a reação de complexação entre amido e iodo. A reação entre íons cloreto e nitrato de prata, tendo o cromato de prata como indicador, é a base dos métodos detecção de cloretos em leite. Os métodos de detecção de sacarose têm em comum sua reação com resorcinol (Brasil, 1981; Brasil, 2006; Tronco, 2010; Índia, 2012).

Mesmo quando métodos consolidados são adotados, aspectos importantes podem afetar a confiabilidade do controle analítico. Especificamente em relação ao leite, esses fatores estão associados tanto à complexidade, variabilidade e percibibilidade da matriz, quanto à falta de experiência em análise de produtos lácteos (De Noni, 2004).

No contexto do controle e monitoramento da qualidade do leite, o emprego de métodos adequados aos propósitos de uso tem papel fundamental na geração de informações sobre fraude. Independentemente da técnica analítica adotada, um processo totalmente validado, que inclui estudos intralaboratoriais e colaborativos, é necessário tanto para demonstrar a qualidade do trabalho realizado por um laboratório quanto para fornecer dados confiáveis que possam apoiar a indústria, agências reguladoras e de fiscalização (Ginn et al., 2006; López, Callao & Ruisánchez, 2015).

Este Capítulo apresenta a otimização e aplicação de uma nova abordagem de validação (Gondim et al, 2014; Gondim, Junqueira & Souza, 2016) na avaliação da adequação ao propósito de uso (*fitness for purpose*) de métodos qualitativos clássicos relacionados com a detecção de amido, cloretos e sacarose em leite cru, considerando duas versões: tal como descritos na legislação e com modificações propostas para melhoria do desempenho. As versões modificadas dos métodos foram ainda submetidas à validação interlaboratorial.

I.2 MATERIAIS E MÉTODOS

I.2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Todos os reagentes usados foram de grau analítico adequado. Carboximetilcelulose, cloreto de sódio e amido foram adquiridos da VETEC Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Sacarose e pectina foram fornecidas pela Synth (Diadema, SP, Brasil), enquanto a goma de xantana e a maltodextrina pela Sigma-Aldrich Co. Ltda. (Gillingham, Dorset, Reino Unido). Iodo, iodeto de potássio, nitrato de prata, cromato de potássio, resorcinol e ácido clorídrico foram adquiridos de FMaia (São Paulo, SP, Brasil), Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Synth (Diadema, SP, Brasil). Água ultrapura foi obtida utilizando o sistema Milli-Q Direct (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).

Os instrumentos de medição utilizados foram calibrados por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), de acordo com a norma ISO / IEC 17025. Tais equipamentos incluíram banho termostático (314-8DN, Nova Ética), balanças (AUX 220, Shimadzu; e BK 300, Gehaka), balões volumétricos, crioscópio, (PZL 900, PZL), densímetro de leite (5784, Incotherm), micropipetas (LM 10000, Soluções Lab HTL; Finnpiquette F3, Thermo Scientific; e Transferpette S, Bre) e termômetros (7665.02.0.00, Incotherm).

I.2.2 MÉTODOS

Os métodos qualitativos avaliados foram aqueles descritos na Portaria 01/1981 e Instrução Normativa (IN) 68/2006 do Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para detecção de amido, cloretos e sacarose (Brasil, 1981; Brasil, 2006). A presença de amido no leite foi determinada após aquecimento do leite e adição de solução de iodo/iodeto de potássio (solução de Lugol). O

aquecimento fez com que a estrutura helicoidal de amido se abrisse, permitindo a adsorção de iodo e o desenvolvimento de uma cor azul característica após resfriamento da amostra (Brasil, 2006). A identificação de cloretos baseou-se na reação do íon com nitrato de prata, na presença de cromato de potássio. O desenvolvimento da cor amarela indicou resultado positivo ou presença de cloreto em quantidades maiores do que a faixa considerada normal em leite (Brasil, 2006). A sacarose foi detectada pela observação de coloração rósea e/ou vermelha escura, resultante da condensação de aldoses e cetonas com resorcinol em meio ácido (Brasil, 1981; Nigam & Ayyagari, 2007).

I.2.3 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

I.2.3.1 Amostras

Amostras de leite cru (3 L) foram retiradas de tanque de armazenamento refrigerado após ordenha mecânica de, no mínimo, 20 vacas da Fazenda Experimental do MAPA / Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG). Tais amostras foram homogeneizadas, embaladas em galões de polipropileno e mantidas sob refrigeração (2 a 7 °C) até o início das análises, as quais foram realizadas dentro de um período máximo de 48 horas. Cada amostra foi analisada em relação aos parâmetros de densidade, crioscopia e acidez titulável, de acordo com métodos descritos na IN 68/2006 (Brasil, 2006), com o objetivo de verificar a sua conformidade com os limites regulamentados (Brasil, 2011).

Coletas de amostras foram realizadas para os oito lotes envolvidos nas etapas de otimização e validação de cada método (amido, cloretos e sacarose), considerando ambas as versões (oficial e modificada) (**Figura I.1**). Para cada método, um total de oito amostras foram coletadas para realização das etapas de otimização; testes preliminares; estudo de taxas, RPC, LD, ACO e CON (três baterias analíticas); seletividade na presença de interferentes; robustez; e avaliação da adequação ao propósito de uso.

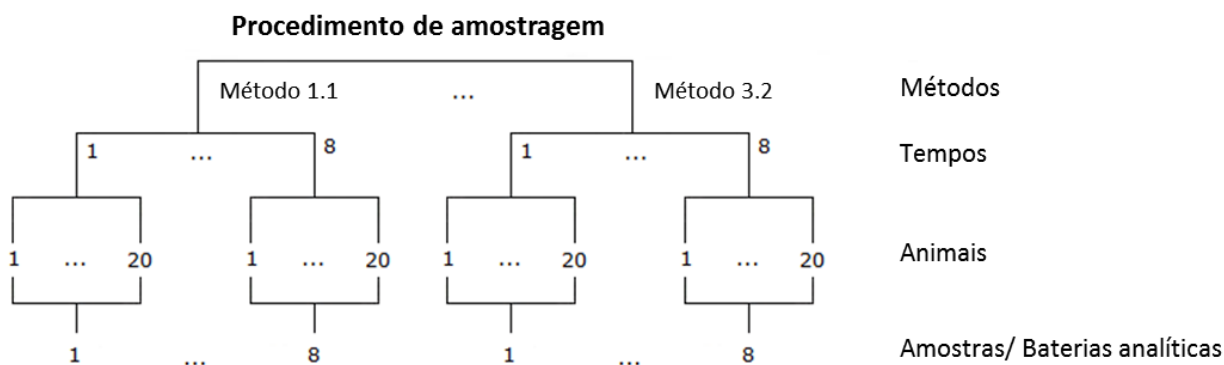


Figura I.1 Representação do procedimento de amostragem de leite cru utilizado para as etapas de otimização e validação dos métodos de detecção de amido, cloretos e sacarose.

Método 1.1 = método oficial de detecção de amido; método 1.2 = método modificado de detecção de amido; método 2.1 = método oficial de detecção de cloretos; método 2.2 = método modificado de detecção de cloretos; método 3.1 = método oficial de detecção de sacarose; e método 3.2 = método modificado de detecção de sacarose.

Baterias analíticas: 1= otimização; 2 = validação – testes preliminares; 3 = validação -estudo de taxas, região de perda de confiabilidade (RPC), limite de detecção (LD), acordância (ACO) e concordância (CON) – bateria analítica 1; 4 = validação - estudo de taxas, RPC, LD, ACO e CON – bateria analítica 2; 5 = validação -estudo de taxas, RPC, LD, ACO e CON – bateria analítica 3; 6 = validação - estudo de seletividade na presença de interferentes; 7 = validação - estudo de robustez; 8 = validação –avaliação complementar de adequação ao propósito de uso.

I.2.3.2 Otimização

As etapas de otimização foram conduzidas para testar modificações nos procedimentos de análise dos métodos descritos na legislação com o objetivo de reduzir falsos resultados e aumentar a sensibilidade e a seletividade dos mesmos.

Amostras de leite cru foram adicionadas de amido em concentrações entre 0,01 e 1,2 g.L⁻¹, de cloretos entre 0,92 e 2,27 g.L⁻¹ (considerando as concentrações nativas); e de sacarose entre 0,3 e 3,0 g.L⁻¹. Amostras brancas (não adulteradas) também foram analisadas. As amostras adulteradas e brancas foram preparadas e analisadas em 10 replicatas por nível.

Os resultados visualizados foram ainda comparados às cores apresentadas por Krause (2010) no sistema RGB (*Red*, *Green* e *Blue*) para estabelecimento de padrão de cor dos resultados. As cores foram comparadas por pelo menos três

analistas distintos, sendo considerados todos os índices identificados como padrões equivalentes.

I.2.3.3 Validação

O processo de validação intralaboratorial foi conduzido conforme procedimento descrito por Gondim et al. (2014).

Testes preliminares

Amostras adulteradas e não adulteradas foram preparadas e analisadas aleatoriamente em uma única bateria analítica, com 10 replicatas por nível, cegas para o analista. Estes experimentos foram realizados dentro do período de 48 horas após a coleta de amostras, como descrito anteriormente. Quando necessário, novas faixas de concentração foram testadas para se obter resultados positivos entre 0 e 100% (Gondim et al., 2014).

Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Amostras de leite cru foram adicionadas com os analitos em diferentes concentrações (níveis igualmente espaçados), sendo 30 replicatas independentes por nível, além das amostras não adulteradas. As amostras foram preparadas e analisadas de forma aleatória em três baterias analíticas, envolvendo três tempos e três analistas, com 10 repetições por nível, sempre cegas para os analistas. Estes experimentos incluíram condições de repetibilidade e precisão intermediária (Gondim et al., 2014).

O amido foi adicionado em 21 níveis entre 0,01 e 1,20 g.L⁻¹, cloreto de sódio foi adicionado em 15 níveis entre 0,92 e 2,24 g.L⁻¹ de cloretos, e a sacarose foi adicionada em 12 concentrações entre 0,3 e 3,6 g.L⁻¹.

As taxas de falsos resultados (falso-positivos – TFP; falso-negativos – TFN), de sensibilidade (TSB), de seletividade (TST) e de confiabilidade (TCF) foram calculadas usando tabelas de contingência. Os limites da região de perda de confiabilidade (RPC) foram estimados por meio de regressão não-linear, com base nas probabilidades de 0,05 e 0,95 para os resultados positivos, sendo testadas as premissas da regressão (Souza & Junqueira, 2005). O limite de detecção (LD) foi estabelecido como o limite superior da RPC. Para os valores de acordância (ACO) e concordância (CON), o critério de aceitação foi definido como um mínimo de 0,8, para níveis externos à RPC, dado que este valor corresponde à possibilidade de se obter um único resultado falso-negativo em cada bateria analítica (Gondim et al., 2014).

Seletividade – interferentes

Na avaliação da seletividade, foram utilizadas amostras não adulteradas e adicionadas em níveis correspondentes às menores concentrações nas quais foram obtidas 100% de TCF na etapa anterior do processo de validação, sendo 10 replicatas independentes por concentração. Essas concentrações foram 0,3 e 1,0 g.L⁻¹ de amido; 1,51 e 1,87 g.L⁻¹ de cloretos; e 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente para os métodos oficial e modificados. Amostras foram analisadas aleatoriamente sob condições de repetibilidade, sendo cegas para o analista (Gondim et al., 2014).

Carboximetilcelulose, goma xantana, maltodextrina e pectina foram investigadas como potenciais interferentes, por serem. Esses compostos são utilizados na produção de diversos alimentos, incluindo derivados do leite, com objetivo de aumentar a viscosidade dos produtos. Esses carboidratos foram adicionados em 0,12 g.L⁻¹, máxima concentração na qual não foi observada uma alteração na percepção visual da viscosidade do leite. Amido, cloretos e sacarose foram também testados como interferentes, sendo adicionados em concentração correspondentes ao menor nível nos quais foram obtidos 100% de TCF na etapa anterior da validação para os métodos oficiais, ou seja, 1,0; 1,87 e 3,6 g.L⁻¹, respectivamente.

Os compostos foram considerados interferentes se a TCF obtida era menor que 90%, o que correspondia à possibilidade de obtenção de um resultado falso-negativo (Gondim et al., 2014).

Robustez

Experimentos fatoriais completos foram realizados na avaliação da robustez. Em cada experimento, o analito em questão foi adicionado às amostras de leite cru em concentrações correspondentes aos menores níveis nos quais 100% de TCF foram obtidas para cada método, sendo 10 replicatas independentes por tratamento. As amostras foram analisadas aleatoriamente sob condições de repetibilidade, sendo cegas para o analista (Gondim et al., 2014).

Para o método de detecção de amido, os experimentos envolveram três fatores e dois níveis: marcas de iodo (A e B) e iodeto de potássio (C e D) utilizadas na preparação da solução de Lugol, e tempo de aquecimento da amostra (8 e 12 min), para um total de oito tratamentos.

Dois fatores e dois níveis foram considerados para os métodos de cloreto e sacarose, para um total de quatro tratamentos. Para o método de cloretos, as marcas de cromato de potássio (A e B) e nitrato de prata (A e B) foram variadas, e para o de sacarose, a marca de resorcinol (A e B) e tempo de aquecimento das amostras (3 e 7 min) foram os parâmetros variados.

Fatores e níveis foram considerados críticos para o desempenho do método quando a TCF observada foi menor que 90%, que correspondeu à possibilidade de se obter um resultado falso-negativo (Gondim et al., 2014).

Avaliação da adequação ao propósito de uso (fitness for purpose)

Amostras de leite foram adulteradas com 150 g.L⁻¹ de água (Santos, Wentzell & Pereira-Filho, 2012) e adicionadas de cada analito em três concentrações, em três replicatas, incluindo: amostras não adulteradas, amostras

adicionadas no LD dos métodos modificados, e amostras adicionadas no LD dos métodos oficiais. Para cada replicata, duas determinações da densidade foram realizadas e os resultados comparados com a faixa estabelecida pela legislação, ou seja, entre 1,028 e 1,034 g.L⁻¹ (Brasil, 2011).

O método foi considerado adequado ao propósito de uso quando a concentração de amido, cloreto de sódio ou sacarose necessária para restaurar a densidade da amostra adulterada com água foi maior ou igual ao LD do método.

I.2.4 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL

O processo de validação interlaboratorial consistiu em diversas etapas além da análise dos materiais de teste pelos laboratórios colaboradores e abrangeu a preparação dos materiais de teste, a avaliação da homogeneidade e estabilidade, a distribuição dos materiais, a análise de dados e, finalmente, a emissão do relatório de resultados (AOAC, 2002; Langton et al., 2002; Ellison & Fearn, 2005; Thompson, Ellison & Wood, 2006; Macarthur & Holst, 2012). Na **Figura I.2**, um esquema de um delineamento mínimo para a validação interlaboratorial de métodos qualitativos é proposto.

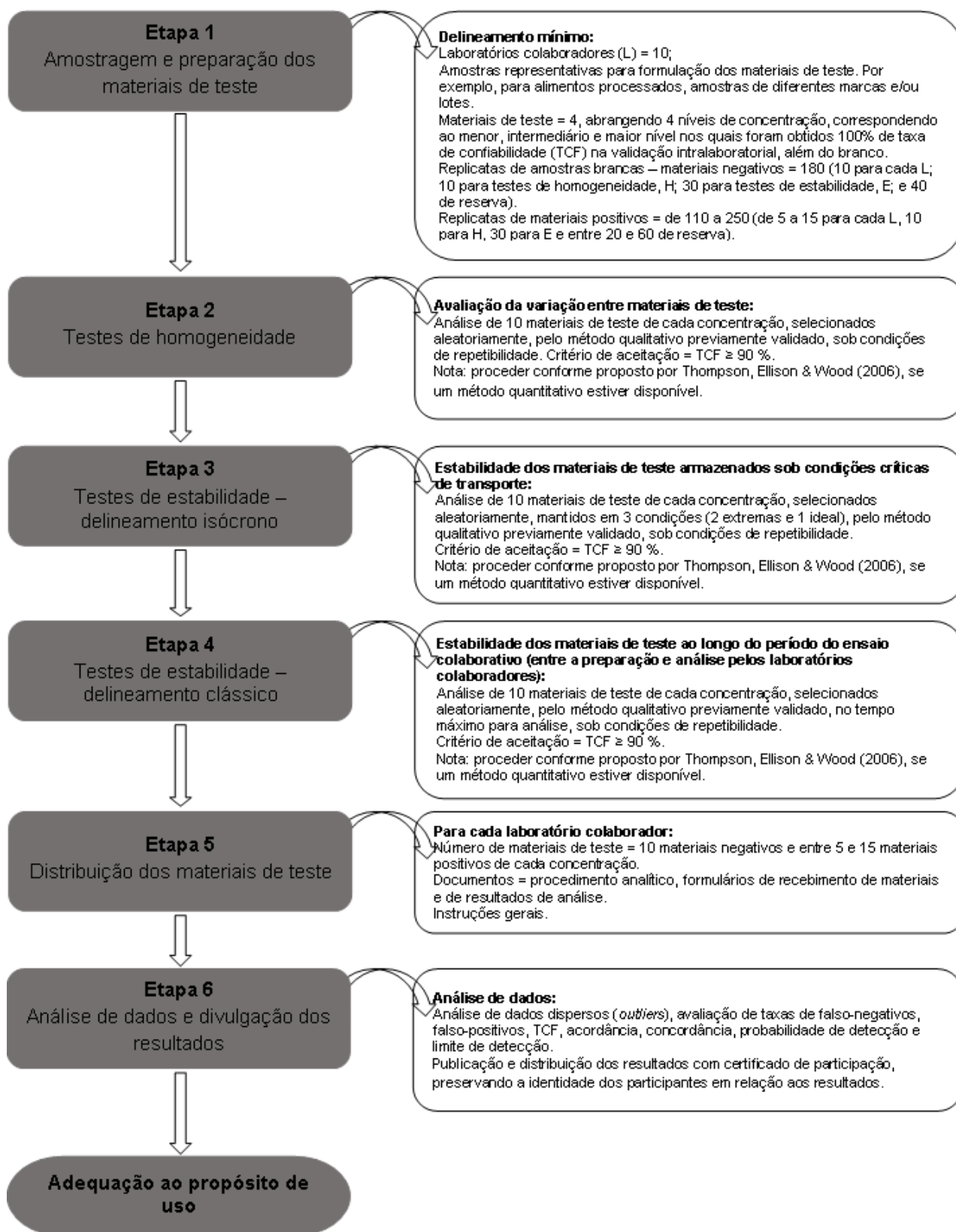


Figura I.2 Esquema proposto para validação interlaboratorial de métodos qualitativos: etapas principais, delineamento experimental mínimo, parâmetros de desempenho e critérios de aceitabilidade.

I.2.5.1 Materiais de teste

Amostras

Três amostras de leite cru produzidas por um rebanho de 50 animais foram retiradas de um tanque de armazenamento refrigerado (4-7 °C) da fazenda experimental Professor Hélio Barbosa, da EV/UFMG. Estas amostras, de 15, 15 e 22 L, foram coletadas para a validação interlaboratorial dos métodos de amido, cloretos e sacarose, respectivamente. As amostras foram mantidas refrigeradas (4-7 °C) em galões de polipropileno desde o transporte ao laboratório até o momento de preparação dos materiais de teste, que ocorreu imediatamente após a chegada das amostras no laboratório.

Preparação

A confiabilidade é a propriedade dos métodos qualitativos relacionada com a veracidade e pode ser definida como a percentagem de resultados corretos obtidos em testes independentes realizados para a classificação da amostra (Cárdenas & Valcárcel, 2005). As TCF obtidas no processo de validação intralaboratorial (Gondim et al., 2015) foram utilizadas para estabelecer a concentração de adulterantes a serem adicionadas às amostras para elaboração dos materiais de teste.

Cada amostra foi dividida em quatro lotes. Os lotes foram adicionados de água ultrapura e solução aquosa do reconstituente de densidade de modo a se obter uma concentração de 150 g.L⁻¹ de água e quatro concentrações para os reconstituintes. As concentrações corresponderam à maior e menor concentrações nas quais foram obtidas 100% de TCF no processo anterior de validação, além de zero de adição, como apresentado na **Tabela I.1**. Para o método do amido, uma alíquota de 20 mL da amostra de leite cru foi transferida para tubos cônicos de polipropileno de 50 mL utilizando uma macropipeta. Estas amostras não adulteradas foram reservadas como amostras brancas não-cegas para posterior distribuição aos colaboradores.

As soluções de reconstituintes foram preparadas com reagentes de grau analítico para concentrações finais de 15 g.L^{-1} de amido, 100 g.L^{-1} de cloreto de sódio e 140 g.L^{-1} de sacarose. O leite, água ultrapura e soluções de reconstituintes foram transferidos para um recipiente plástico de 10 L com auxílio de provetas (1000 e 2000 mL). Após cada adição, o material contido no recipiente foi homogeneizado por 10 minutos com auxílio de um agitador mecânico (Fisatom 713T) a $22.6 \times \text{g}$.

Cada lote adulterado foi envasado em tubos cônicos de polipropileno (50 mL), os quais foram preenchidos com 20 mL no caso do método do amido e 30 mL para os métodos de cloretos e sacarose. Os tubos foram tampados, selados com Parafilm® e identificados com códigos numéricos gerados aleatoriamente. Todos os materiais de teste foram armazenados sob refrigeração entre 4 e 7 °C. Além da quantidade de tubos de materiais de teste necessária para realização dos testes de homogeneidade e estabilidade e do ensaio de colaborativo, foi preparado número excedente para casos de necessidade de substituição de materiais.

Tabela I.1. Preparação dos materiais de teste

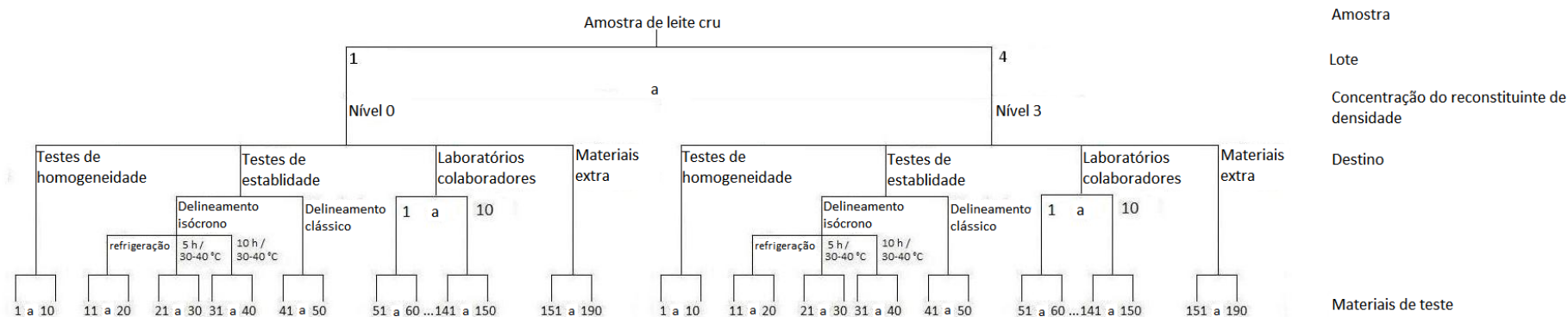
| Concentração final de reconstituente (g.L ⁻¹) | Volume (mL) | | | Total | Número de tubos preparados | Volume por tubo (mL) |
|---|-------------|------|---------------------------|-------|----------------------------|----------------------|
| | Leite cru | Água | Solução de reconstituente | | | |
| Amido | | | | | | |
| 0,0 | 3570 | 630 | 0 | 4200 | 190 | 20 |
| 0,3 | 3570 | 546 | 84 | 4200 | 190 | 20 |
| 0,8 | 3570 | 406 | 224 | 4200 | 190 | 20 |
| 1,2 | 3570 | 294 | 336 | 4200 | 190 | 20 |
| Cloretos | | | | | | |
| 0,0 | 4675 | 825 | 0 | 5500 | 260 | 20 |
| 1,5 | 3570 | 567 | 63 | 4200 | 190 | 20 |
| 2,0 | 3570 | 546 | 84 | 4200 | 190 | 20 |
| 2,5 | 2550 | 375 | 75 | 3000 | 120 | 20 |
| Sacarose | | | | | | |
| 0,0 | 5355 | 945 | 0 | 6300 | 190 | 30 |
| 2,4 | 5355 | 837 | 108 | 6300 | 190 | 30 |
| 3,0 | 5355 | 810 | 135 | 6300 | 190 | 30 |
| 3,6 | 5355 | 783 | 162 | 6300 | 190 | 30 |

Solução aquosa de reconstituente = amido 15 g.L⁻¹, cloreto de sódio 100 g.L⁻¹ e sacarose 140 g.L⁻¹: Concentração final de água = 150 g.L⁻¹. As concentrações de cloreto foram estimadas com base no teor de cloretos naturalmente presente na amostra de leite, previamente determinado em triplicata (Brasil 2011). As quantidades de leite, água e solução aquosa de reconstituintes foram ajustadas para obtenção de quantidades exatas para preparo dos materiais de testes, no entanto, o ajuste pode ter gerado volume extra de material de teste que não foi armazenado.

I.2.5.2 Testes de homogeneidade

A homogeneidade foi avaliada para cada lote de materiais utilizando métodos quantitativos e qualitativos sob condição de repetibilidade. Para cada teste interlaboratorial, vinte repetições de materiais de teste de cada nível de adulteração foram selecionadas aleatoriamente (**Figura I.3**). Desses, dez foram analisados, em duplicata, pelo método qualitativo modificado previamente validado. A obtenção de TCF maior ou igual a 90% confirmou a homogeneidade de cada lote de material. Este critério foi baseado na possibilidade de se obter um resultado falso para cada nível de adulteração (Gondim et al., 2014).

Delineamento para métodos de detecção de amido e sacarose



Delineamento para método de detecção de cloretos

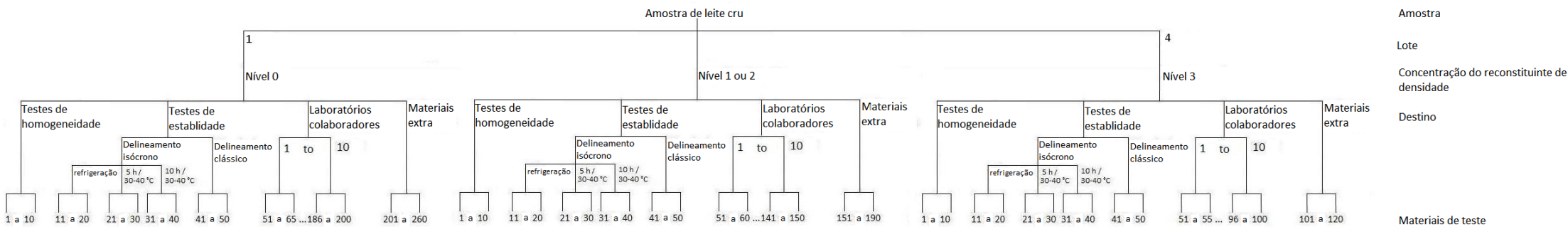


Figura I.3 Organização dos estudos interlaboratoriais, incluindo testes de homogeneidade, estabilidade, para validação dos métodos qualitativos modificados de detecção de adulterantes em leite: amido, cloretos e sacarose.

I.2.5.3 Testes de estabilidade

A estabilidade de curto prazo foi verificada para cada lote de materiais usando o método qualitativo e considerando duas abordagens.

Na primeira abordagem, foi utilizado um delineamento isócrono no qual foram simuladas falhas na manutenção das condições de temperatura durante o transporte dos materiais de teste. 30 replicatas de cada material de teste foram tomadas do lote, aleatoriamente, para cada nível de adulteração. Dez foram refrigeradas entre 4 e 7 °C e 20 foram incubadas entre 30 e 40 °C. Após 5 horas, 10 replicatas foram devolvidas à temperatura de refrigeração. Após 10 horas, o restante foi removido da condição de aquecimento para a condição ideal (**Figura I.3**). Todos os 30 materiais foram analisados em duplicata sob condições de repetibilidade. Os valores de TCF foram estimados para os três tratamentos e comparados, considerando a condição de refrigeração como referência.

Na segunda abordagem, um delineamento clássico foi conduzido, no qual a estabilidade foi investigada durante o tempo entre a preparação do material e o prazo para a análise dos materiais de teste no ensaio colaborativo. Dez materiais de teste de cada nível de adulteração mantidos refrigerados (4-7 °C) foram retirados aleatoriamente do lote no final do prazo definido para análise pelos colaboradores (48 horas após ordenha) (**Figura I.3**). Estes materiais foram analisados em duplicata sob condições de repetibilidade. TCFs foram estimadas e comparadas com os valores obtidos na avaliação homogeneidade (tempo zero). A estabilidade foi considerada quando as TCFs foram maiores ou iguais a 90%.

I.2.5.4 Organização dos ensaios interlaboratoriais

Dez laboratórios participaram nos ensaios interlaboratoriais, sendo três representantes de órgãos oficiais de fiscalização e regulamentação, independentes ou de terceira parte; três de laboratórios privados de análise de alimentos, de segunda parte; três de laboratórios de laticínios, de primeira parte; e um laboratório de universidade.

Na distribuição aos laboratórios colaboradores, materiais de teste de cada lote foram selecionados aleatoriamente e mantidos refrigerados durante o transporte e entregues em período de tempo que permitisse que sua análise fosse realizada em período de até 48 horas após a ordenha.

Para cada ensaio, os colaboradores receberam 40 materiais de teste codificados, totalizando 400 resultados por ensaio. Para o método de amido, foram fornecidos dez materiais de teste de cada concentração (0,0; 0,3; 0,8 e 1,2 g.L⁻¹). Para o método de cloretos, foram distribuídas, para cada laboratório colaborador, dez replicatas para as concentrações 1.5 e 2.0 g.L⁻¹; 15 replicatas de materiais contendo 2.5 g.L⁻¹ de cloretos e cinco replicatas de materiais de testes sem adição de cloreto de sódio. Para o método de sacarose, dez replicatas foram fornecidas para cada concentração de adulterante (0,0; 2,4; 3,0 e 3, 6 g.L⁻¹) (**Figura I.3**).

Além dos materiais de testes, cada laboratório recebeu: i) uma amostra branca (não adulterada), como referência para apresentação dos resultados para o método de detecção de amido; ii) uma cópia do procedimento analítico do método; iii) um formulário para relatório dos dados analíticos (data da análise, identificação do laboratório, marca e lote de reagentes, fabricante e modelo dos equipamentos, certificados de calibração dos instrumentos de medição, tais como vidraria volumétrica utilizadas na preparação de soluções), resultados (positivo ou negativo), observações (cor observada ou índice de cor), comentários e sugestões; e iv) formulário de recebimento dos materiais. Exemplos dos documentos enviados aos laboratórios colaboradores são apresentados no **Anexo A**.

No momento do recebimento, os seguintes parâmetros foram avaliados: i) temperatura dos materiais de teste; ii) integridade, vedação e identificação dos tubos; iii) presença da amostra branca (apenas para o método do amido); e iv) documentos (formulário para relatório de resultados e procedimento analítico).

Os colaboradores foram instruídos a: i) manter as amostras refrigeradas até o momento da análise; ii) realizar a análise de todas as amostras dentro do prazo estabelecido, sob condições de repetibilidade (análise em bateria analítica única); iii) seguir rigorosamente o procedimento analítico fornecido pelo organizador; iv) informar ao organizador qualquer anormalidade ou perda dos materiais de teste, para que uma

nova remessa de materiais pudessem ser enviados para substituição dentro do prazo para análise; e v) informar os resultados ao organizador até dois dias após análise dos materiais.

I.2.5.5 Análise estatística

Os dados brutos recebidos dos colaboradores foram avaliados em relação a erros grosseiros de transcrição ou digitação (Ellison & Fearn, 2005). Uma vez que o objetivo principal do estudo foi validar os métodos qualitativos, os dados brutos foram utilizados para analisar possíveis discrepâncias entre as classes de laboratórios representadas neste estudo por uma análise hierárquica de cluster (HCA) com o critério do método de Ward (Ward, 1963).

Os resultados apresentados pelos laboratórios foram avaliados com base nos parâmetros característicos dos métodos qualitativos: TFP, TFN, TCF, ACO e CON. As taxas estimadas foram designadas como satisfatórias quando TCF foi maior ou igual a 90%. ACO e CON foram determinadas como sendo aceitáveis quando os valores estimados foram maiores ou igual a 0,80 - para materiais distribuídos em pelo menos 10 replicatas - ou 0,60 - para materiais distribuídos em cinco replicatas. Estes critérios foram baseados na possibilidade de se obter um falso resultado para cada concentração de adulteração (Gondim et al., 2014).

Adicionalmente, os resultados foram utilizados para estimar os LD e os intervalos de predição para a probabilidade de detecção, de acordo com Gondim et al. (2014) e Macarthur & Holst (2012), respectivamente.

I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.3.1 OTIMIZAÇÃO

I.3.4.1 Amido

A observação de uma cor verde acinzentada para amostras contendo amido em baixas concentrações, que poderiam gerar resultados falso-negativos, levou à proposição de um novo critério para determinação de resultados positivos (**Figura I.4**). Essa cor era diferente da azul observada em amostras adicionadas de elevados níveis de amido e também da coloração amarela observada para amostras não adulteradas (**Figura I.5**). O critério de determinação de resultados positivos para o método modificado foi a observação de uma cor diferente da obtida para uma amostra branca (não adulterada) não cega (**Figura I.4b**).

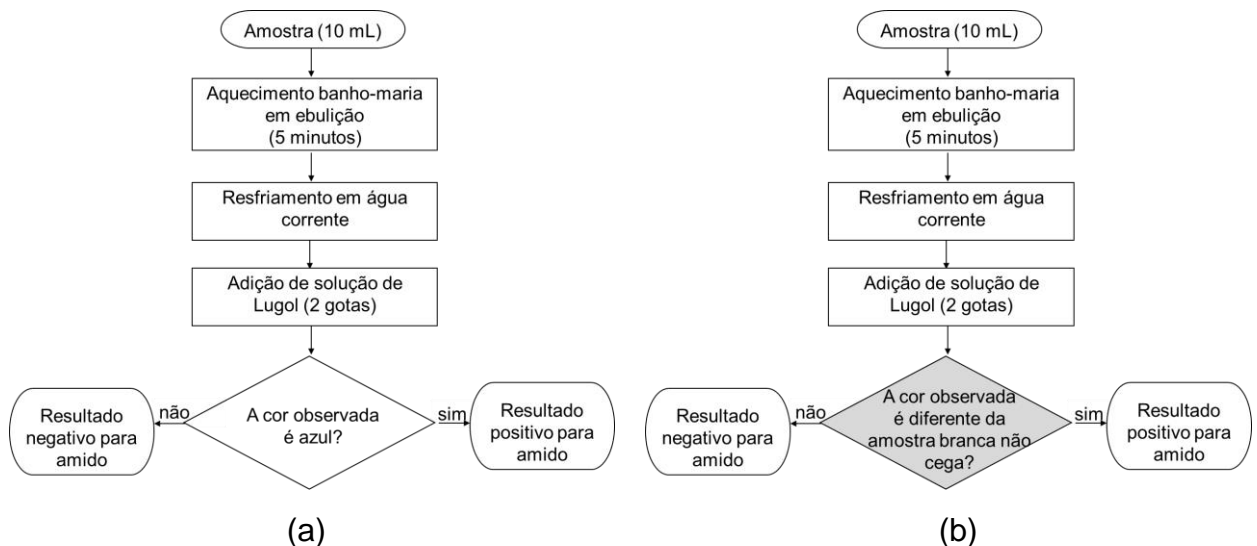


Figura I.4 Fluxogramas dos métodos qualitativos de detecção de amido, sendo (a) método oficial; e (b) método modificado (etapa modificada destacada em cinza).

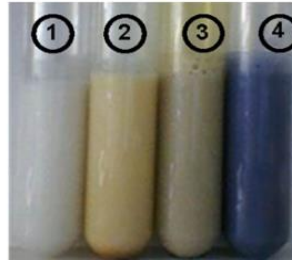


Figura I.5 Cores observadas na otimização do método de detecção de amido em leite.

1 = amostra de leite sem adição de solução de Lugol - observação de cor branca (índice de cor 255r 255g 255b); 2 = amostra de leite sem adulteração com adição de solução de Lugol - observação de cor amarela (índice de cor 255r 246g 133b); 3 = amostra adulterada com $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de amido - cores verdes acinzentadas (índices de cores 208r 197g 151b ou 230r 217g 165b); e 4 = amostra adulterada com $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ de amido - cor azul (índice de cor 107r 120g 164b), como estabelecido no método oficial.

I.3.4.2 Cloretos

No teste para de detecção de cloretos, quando o teor de cloretos na amostra de leite está dentro da faixa considerada normal para leite (entre $0,8$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$), parte do nitrato de prata reage, formando cloreto de prata, e o excesso de nitrato de prata reage com o cromato de potássio, formando cromato de prata de coloração vermelho tijolo. Quando o conteúdo de cloretos é alto, o consumo de nitrato de prata adicionado é maior. Consequentemente, a quantidade de cromato de prata formada é menor e a cor vermelho-tijolo observada menos intensa, podendo predominar a cor amarela do cromato de potássio (Tronco, 2010).

Nas primeiras análises empregando o método oficial, a cor vermelho-tijolo foi observada para amostras logo após adição de nitrato de prata. No entanto, essa coloração desaparecia dependendo da agitação a que o tubo de ensaio contendo a amostra era submetido, o que gerava resultados falso-positivos.

De fato, o cromato de prata possui um produto de solubilidade (Kps) menor que o cloreto de prata ($1,2 \times 10^{-12}$ e $1,8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente), mas possui uma solubilidade aproximadamente cinco vezes maior que o cloreto de prata ($6,5 \times 10^{-5}$ e $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente) (Haynes, 2012). Assim, pela adição de nitrato de prata em meio aquoso contendo cloreto em baixos teores, o cromato de prata pode se solubilizar após a agitação manual do tubo de ensaio, dificultando a visualização da sua cor característica e originando resultados falso-positivos.

De modo a padronizar a agitação manual e evitar a obtenção de resultados falso-positivos, um experimento fatorial completo foi realizado com dois fatores e três níveis cada: tipo de movimento (pendular, circular e inversão) e número de movimentos (10, 20 e 30), com três replicatas por tratamento. O experimento fatorial foi realizado com análise de amostras não adulteradas e adicionadas de 2,27 g.L⁻¹ de cloretos. O movimento pendular com 30 repetições foi considerado a melhor condição de agitação manual, uma vez que, nessas condições, não foram obtidos resultados falsos ou inconclusivos tanto para amostras não adulteradas quanto para amostras adicionadas de cloreto de sódio (**Tabela I.2**).

Tabela I.2 Avaliação de diferentes tipos e números de movimentos para a agitação manual dos tubos de ensaio contendo amostras não adulteradas e adicionadas de cloretos a 2,27 g.L⁻¹

| Tipo de movimento | Número de movimentos | Amostras não adulteradas | | | Amostra adicionadas de 2,27 g.L ⁻¹ de cloretos | | |
|-------------------|----------------------|--------------------------|-----|-----|---|-----|-----|
| | | R 1 | R 2 | R 3 | R 1 | R 2 | R 3 |
| Circular | 10 | I | I | I | P | P | P |
| | 20 | I | I | I | P | P | P |
| | 30 | I | P | I | P | P | P |
| Pendular | 10 | N | N | N | I | I | I |
| | 20 | N | N | N | P | P | I |
| | 30 | N | N | N | P | P | P |
| Inversão | 10 | P | P | P | P | P | P |
| | 20 | P | P | P | P | P | P |
| | 30 | P | P | P | P | P | P |

R = replicata; N = resultado negativo (cor vermelho tijolo característica de nitrato de prata – índice de cor 200r 80g 60b); I = resultado inconclusivo (índice de cor 250r 168g 95b ou 254r 207g 140b); P = resultado positivo (cor amarela – índice de cor 255r 246g 133b).

Ainda nas primeiras análises empregando o método oficial, resultados falso-negativos também foram obtidos para amostras adicionadas de cloreto de sódio, com a observação de cores intermediárias entre as descritas para resultados negativos (amarela) e positivo (vermelho-tijolo).

Para definição da cor esperada para amostras com teor de cloretos acima da faixa normal, amostras de leite contendo 0,9 g.L⁻¹ de íons cloretos foram adicionadas, em triplicata, de solução de cloreto de sódio de modo a se obter amostras com concentração final de íons cloretos entre 1,0 e 1,5 g.L⁻¹.

Para amostras não adulteradas, foi observada a coloração vermelho tijolo característica. A cor amarela foi observada em todas as amostras que continham cloretos acima de $1,2 \text{ g.L}^{-1}$, ou seja, acima da faixa normal. Entretanto, cores intermediárias foram observadas para amostras contendo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,1 \text{ g.L}^{-1}$ de cloretos, dentro e acima da faixa normal. Assim, não foi possível sugerir um novo critério para observação de resultados positivos (**Figura I.6**).

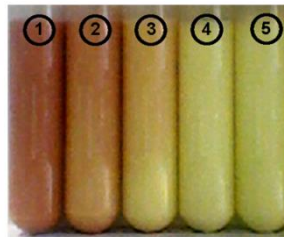


Figura I.6 Cores observadas na otimização dos métodos de detecção de cloretos em leite.

1 = amostra não adulterada contendo $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ de íons cloreto (concentração nativa) - cor vermelho-tijolo (índice de cor 200r 80g 60b); 2 e 3 = amostras adulteradas a $1,0$ e $1,1 \text{ g.L}^{-1}$ de cloretos - cores intermediárias (índices de cores 250r 168g 95b e 254r 207g 140b); 4 e 5 = amostras adulteradas a $1,2$ e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de cloretos - cor amarela (índice de cor 255r 246g 133b).

Outro ponto observado nas análises preliminares se refere à ordem de adição dos reagentes no teste. Na descrição do método oficial, o cromato de potássio é adicionado seguido de adição de nitrato de prata e agitação manual. Com isso, a precipitação de cromato de prata pode ocorrer mesmo em amostras contendo altos níveis de cloretos, gerando a coloração vermelho-tijolo e, em consequência, a resultados falso-negativos.

Nesse sentido, com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método e assegurar que todo o cloreto seja precipitado na forma de cloreto de prata antes da reação entre cromato e nitrato de prata, uma inversão na ordem de adição dos reagentes foi proposta, como descrito por Tronco (2010). Além disso, a agitação manual padronizada foi introduzida logo após a adição de cada reagente (**Figura I.7**).

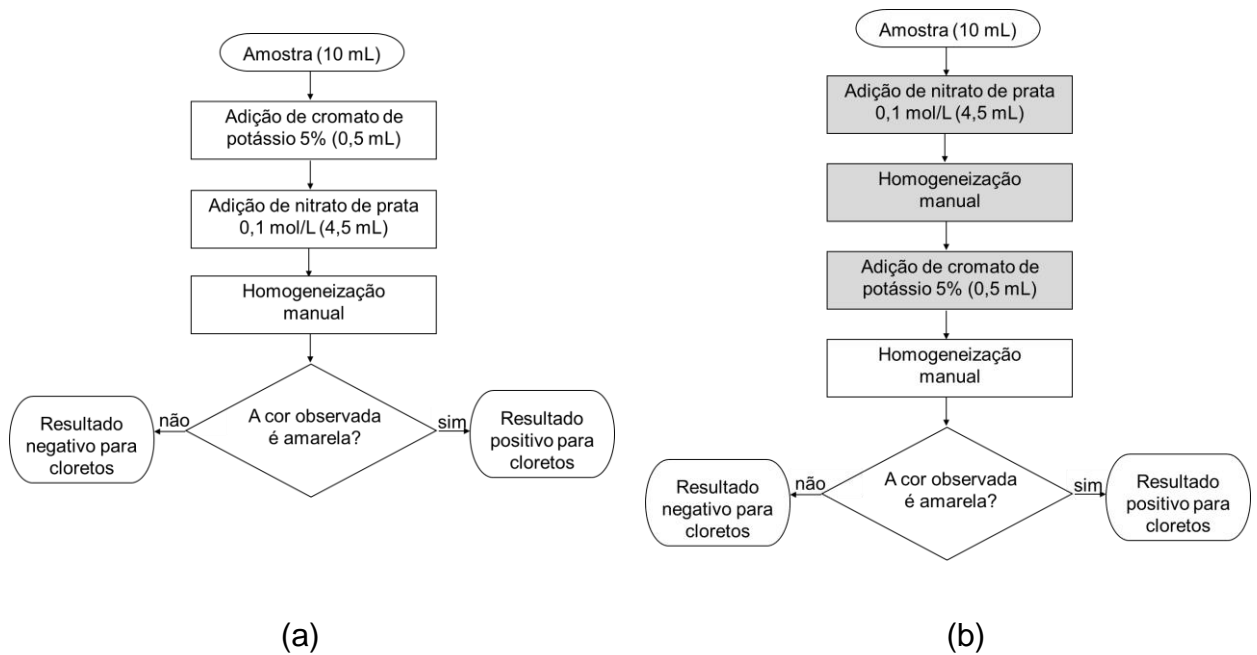


Figura I.7 Fluxogramas dos métodos qualitativos de detecção de cloretos, sendo (a) método oficial e (b) método modificado (etapas modificadas destacadas em cinza).

I.3.4.3 Sacarose

Os resultados obtidos para as amostras não adulteradas indicaram falta de seletividade do método, com uma TFP de 10%, além de TFN entre 100 e 50% nos níveis estudados.

Quando aquecidos em meio ácido, os polissacarídeos e oligossacarídeos são hidrolisados a açúcares simples e desidratados a furfural e derivados. Em geral, cetoses são mais rapidamente desidratadas. Essas reagem com resorcinol produzindo uma cor vermelha escura. Aldoses podem reagir com resorcinol, produzindo uma cor rosada. O método descrito na legislação brasileira (**Figura I.8a**) indica erroneamente como princípio do método a reação das aldoses com resorcinol e a formação de uma cor rosada como critério para resultado positivo. Esta falha poderia explicar a ocorrência de resultados falso-positivos nessa etapa de otimização, já que foram obedecidos os critérios descritos na legislação. A cor rósea foi observada provavelmente pela reação dos produtos da hidrólise da lactose (aldoses) com resorcinol.

Além disso, a ocorrência dos falsos resultados poderia estar relacionada a uma dificuldade na visualização das cores ao final do ensaio por parte do analista, devido à coagulação do leite, resultado da adição do ácido clorídrico concentrado às amostras.

Visando aumentar a seletividade e a sensibilidade do método, um método alternativo foi proposto com base no procedimento descrito por Índia (2005) (**Figura I.8b**). Nesse procedimento modificado, além da inclusão de uma etapa de filtração, a concentração final de resorcinol foi aumentada, com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método.

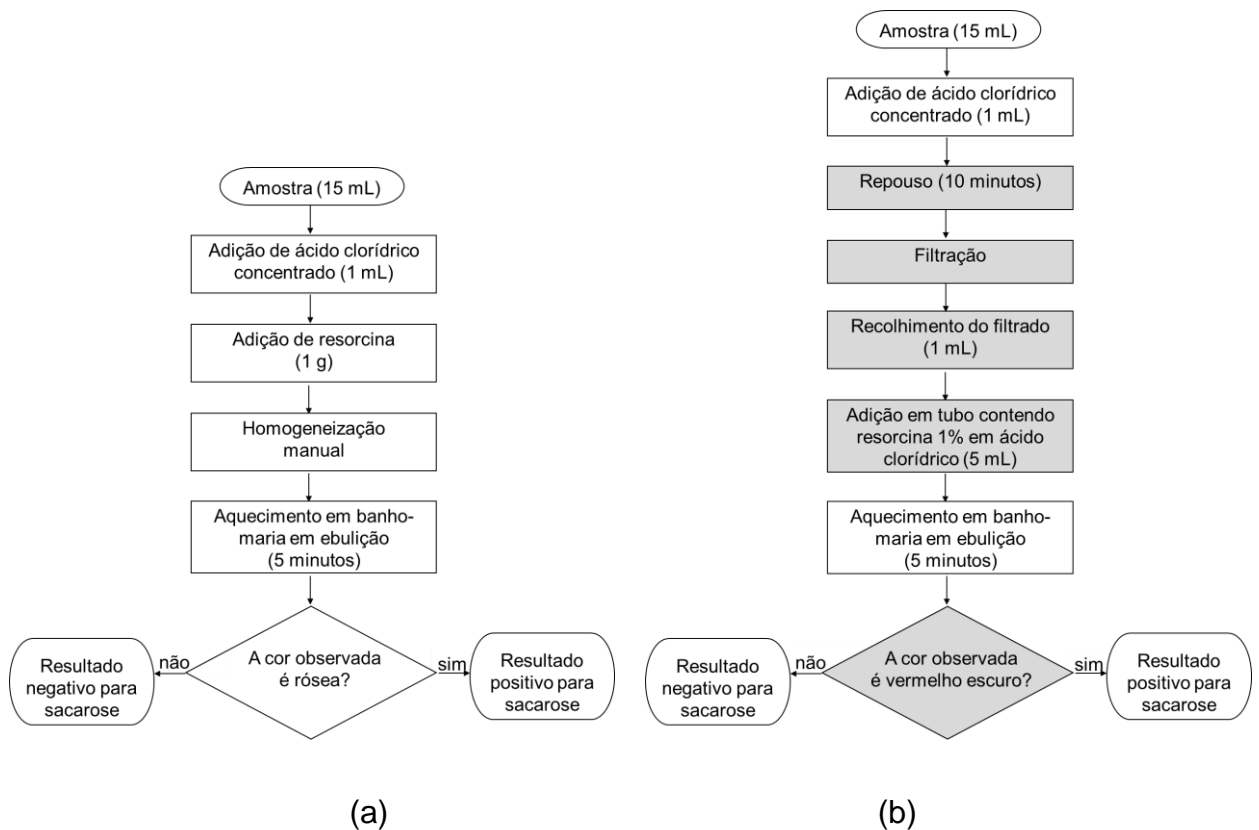


Figura I.8 Fluxogramas dos métodos qualitativos de detecção de sacarose, sendo (a) método oficial; e (b) método modificado (etapas modificadas destacadas em cinza).

Na **Figura I.9**, são apresentadas as cores observadas para amostras de leite adicionadas de 0,0 a 3,6 g.L⁻¹ de sacarose. No método oficial, há um ligeiro aumento na intensidade da cor rosa com o aumento da concentração de sacarose (**Figura I.9a**).

No método modificado, o resultado de amostras não adulteradas pode variar entre um líquido incolor e uma cor ligeiramente amarelada, que não caracteriza um resultado positivo. As cores laranja e vermelho escuro foram observadas em amostras contendo entre 1,2 e 3,6 g.L⁻¹ de sacarose e foram sugeridas como critério de observação de cor de resultado positivo, como mostrado na **Figura I.9b**.

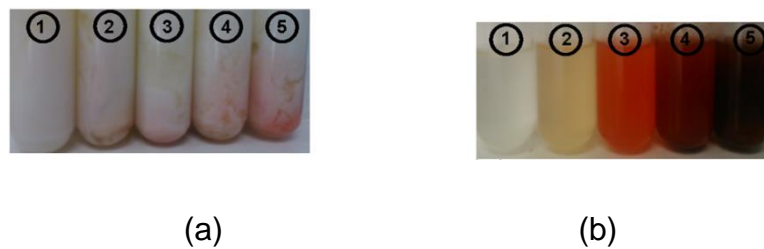


Figura I.9 Cores observadas na otimização dos métodos de detecção de sacarose em leite.

a) 1 = amostra não adulterada - cor branca (índice de cor 255r 255g 255b); 2, 3 e 4 = amostras adulteradas a 0,3; 1,2 e 2,1 g.L⁻¹ de sacarose - cores intermediárias (índice de cores 225r 163g 128b, 201r 116g 105b e 245r 132g 102b); e 5 = amostras adulteradas a 3,0 g.L⁻¹ de sacarose - cor rósea (índice de cor 220r 86g 66b).

b) 1 = amostra não adulterada - líquido incolor; 2 e 3 = amostras adulteradas a 0,3 e 1,2 g.L⁻¹ de sacarose - cores intermediárias (índices de cores 142r 107g 75b e 117r 73g 48b); e 4 e 5 = amostras adulteradas a 2,1 e 3,0 g.L⁻¹ de sacarose - vermelho escuro (índices de cores 95r 46g 32b e 100r 35g 17b).

I.3.2 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

I.3.2.1 Amido

Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Testes preliminares indicaram a faixa de concentração de amido 0,01 e 1,2 g.L⁻¹ para as etapas subsequentes do estudo de validação, ou seja, permitiram a obtenção de resultados positivos entre 0% e 100% para ambos os métodos.

Em ambos os critérios, a análise das amostras não adulteradas resultou em 100% de TST e 0% de TFP, indicando que os componentes da matriz não interferiram na TST. O método oficial apresentou 100% de TFN entre 0,01 e 0,2 g.L⁻¹. A partir de 1,0 g.L⁻¹ não foram observados resultados falso-negativos. Já para o método modificado, 100% de TFN foram obtidas somente em 0,01 g.L⁻¹ de amido e, a partir de 0,3 g.L⁻¹, resultados falso-negativos não foram observados (**Tabela I.3**). Esses resultados demonstraram que a modificação proposta reduziu significativamente a frequência de erros na detecção de amido, aumentando a sensibilidade do método.

As curvas de desempenho são apresentadas na **Figura I.10**, tendo sido confirmadas as premissas da regressão de normalidade, homoscedasticidade e independência ($p > 0,05$). Em relação ao critério de observação de cor azul (método oficial), a RPC foi estimada entre 0,2 e 0,8 g.L⁻¹ de amido. Uma menor RPC foi calculada para o método modificado, com limites entre 0,02 e 0,2 g.L⁻¹, com consequente redução no LD (aproximadamente quatro vezes menor que o LD estimado para o método oficial). Ainda, a modificação proposta no procedimento para observação de resultado positivo contribuiu significativamente para diminuição do intervalo de incerteza do método.

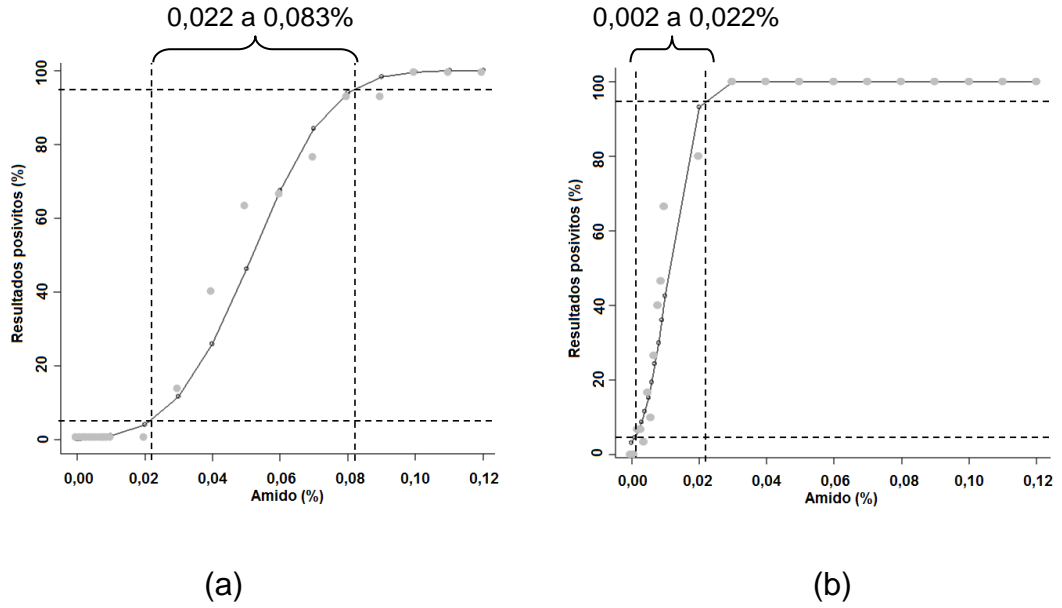


Figura 1.10 Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo de probito) com respectivas regiões de perda de confiabilidade (área delimitada pelas linhas pontilhadas) e pontos experimentais (●) para os métodos de detecção de amido em leite, sendo (a) método oficial e (b) método modificado.

Tabela I.3 Taxas de falso-negativos (TFN), de sensibilidade (TSB), de falso-positivos (TFP), de seletividade (TST), acordância (ACO) e concordância (CON) para amostras não adulteradas e adulteradas com amido

| Amido (g.L ⁻¹) | Método oficial | | | | | | Método modificado | | | | | |
|----------------------------|----------------|-------------|-------------------------|-----|-----|-----|-------------------|-------------|-------------------------|-----|-----|-----|
| | TFN ou TFP* | TSB ou TST* | ACO (bateria analítica) | | | CON | TFN ou TFP* | TSB ou TST* | ACO (bateria analítica) | | | CON |
| | | | 1 | 2 | 3 | | | | 1 | 2 | 3 | |
| 0,0* | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,01 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,02 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 93,3 | 6,7 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,03 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 93,3 | 6,7 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,04 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 96,7 | 3,3 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,05 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 83,3 | 16,7 | 0,5 | 1,0 | 0,8 | 0,7 |
| 0,06 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 90,0 | 10,0 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,8 |
| 0,07 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 73,3 | 26,7 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 0,6 |
| 0,08 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 60,0 | 40,0 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 0,4 |
| 0,09 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 53,3 | 46,7 | 0,6 | 0,5 | 1,0 | 0,4 |
| 0,1 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 33,3 | 66,7 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,3 |
| 0,2 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 20,0 | 80,0 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,6 |
| 0,3 | 86,7 | 13,3 | 1,0 | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,4 | 60,0 | 40,0 | 1,0 | 0,5 | 0,8 | 0,4 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,5 | 36,7 | 63,3 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,3 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,6 | 33,3 | 66,7 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,3 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,7 | 23,3 | 76,7 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,8 | 6,7 | 93,3 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,9 | 6,7 | 93,3 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 1,0 a 1,2 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

*TFP e TST para amostras não adulteradas; número de replicatas por concentração = 30; critério para avaliação de ACO e CON = maior ou igual a 0,8 para concentrações externas à região de perda de confiabilidade (região destacada em cinza).

Silva (2013) avaliou o método detecção de amido em leite pasteurizado em 27 ensaios, obtendo 100% de resultados negativos para amostras não adulteradas analisadas em três repetições. 100% de resultados positivos foram obtidos para amostra adicionada em oito níveis de concentração entre 0,1 e 25 g.L⁻¹, analisada em três repetições. Diferente dos resultados observados nesse estudo de validação, no qual resultados positivos não foram obtidos para 0,1 g.L⁻¹ de amido quando o método oficial foi aplicado. No entanto, quando o método modificado foi considerado, uma taxa de 53,3% de resultados positivos foi alcançada. É importante ressaltar, porém, que os conceitos de representatividade, número de amostras e replicatas, importantes em estudos considerados na validação de métodos qualitativos (Simonet, Rios & Valcárcel, 2004; Cárdenas & Valcárcel, 2005; Gondim et al., 2014), não foram totalmente considerados nos estudos de Silva (2013), haja vista o número restrito de repetições.

O método qualitativo para detecção de amido em leite descrito no *draft* do *Manual of Methods of Analysis of Foods – Milk and milk products* da *Food Safety e Standards Authority of Índia* (FSSAI) (Índia, 2012), semelhante ao oficial brasileiro, apresenta um LD de 0,2 g.L⁻¹, consistente com o estimado no presente estudo (0,2 g.L⁻¹) para o procedimento modificado.

Técnicas de espectroscopia no infravermelho associadas às análises quimiométricas foram empregadas na discriminação de amostras de leite adulteradas com amido em concentrações entre 1,5 e 5 g.L⁻¹ (Zang et al., 2014; Botelho et al., 2015), detectando adulterações em níveis significativamente superiores aos LD estimados para os métodos qualitativos clássicos. Ressalta-se a importância do uso de métodos com limites baixos para o monitoramento de adulterações, principalmente pelo fato que estas têm sido conduzidas de formas cada vez mais elaboradas, no sentido de impedir a detecção, podendo ser citado o uso de *blends* como uma estratégia de fraude (BRASIL, 2013).

Seletividade - interferentes

Os métodos foram considerados seletivos para os compostos carboximetilcelulose, goma xantana, pectina, cloreto de sódio e sacarose, com 100% de resultados negativos para amostras não adulteradas e 100% de positivos para aquelas que foram adicionadas de amido. Falta de seletividade foi observada para a maltodextrina, o que pode estar associado a uma hidrólise incompleta do amido na produção da maltodextrina (Kearsley & Dziedzic, 1995; Harnkarnsujarit, Charoenrein & Roos, 2012; Franceschinis et al., 2014) ou a uma capacidade do método em detectar produtos da hidrólise incompleta, além do amido. Essa segunda hipótese deve ser investigada para avaliação de uma expansão do escopo do método em questão. Estudos de seletividade na presença de interferentes para a prova do amido não foram reportados na literatura.

Robustez

A robustez foi demonstrada para as marcas dos reagentes e tempo de aquecimento das amostras, já que 100% de resultados positivos foram observados em cada tratamento, ou seja, não houve alteração nas TCF. Também não foram encontrados na literatura estudos referentes à avaliação da robustez da prova do amido.

I.3.2.2 Cloretos

Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

A faixa de concentração de cloretos entre 0,92 e 2,24 g.L⁻¹, avaliada nos testes preliminares, foi fixada para as etapas posteriores do processo de validação.

Nas análises de amostras não adulteradas, TST e TCF foram nulas para ambos os métodos. Em relação às amostras adulteradas, as TFN variaram entre 100 e 0%, resultando em TSB entre 0 e 100%. TFN de 0% foram observadas para o método oficial a partir de $1,87 \text{ g.L}^{-1}$ de cloretos, enquanto, para o método modificado, a partir de $1,51 \text{ g.L}^{-1}$, indicando que as modificações propostas contribuíram para um aumento da sensibilidade do método pela redução de resultados falso-negativos (**Tabela I.4**).

Tabela I.4 Taxas de falso-negativos (TFN), de sensibilidade (TSB), de falso-positivos (TFP), de seletividade (TST), acórdância (ACO) e concordância (CON) para amostras não adulteradas e adulteradas com cloreto de sódio

| Cloreto (g.L ⁻¹) | Método oficial | | | | | | Método modificado | | | | | |
|------------------------------|----------------|-------------|-------------------------|-----|-----|-----|-------------------|-------------|-------------------------|-----|-----|-----|
| | TFN ou TFP* | TSB ou TST* | ACO (bateria analítica) | | | CON | TFN ou TFP* | TSB ou TST* | ACO (bateria analítica) | | | CON |
| | | | 1 | 2 | 3 | | | | 1 | 2 | 3 | |
| 0,90 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,92 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,93 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 80,0 | 20,0 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,95 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,96 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 60,0 | 40,0 | 0,6 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 1,02 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 50,0 | 50,0 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,5 |
| 1,14 | 90,0 | 10,0 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 50,0 | 50,0 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,5 |
| 1,26 | 70,0 | 30,0 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 20,0 | 80,0 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 0,7 |
| 1,39 | 60,0 | 40,0 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 10,0 | 90,0 | 0,8 | 1,0 | 0,5 | 0,5 |
| 1,51 | 10,0 | 90,0 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,8 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 1,63 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 1,75 | 10,0 | 90,0 | 0,8 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 1,87 a 2,24 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

*TFP e TST para amostras não adulteradas; número de replicatas por concentração = 30; critério para avaliação de ACO e CON = maior ou igual a 0,8 para concentrações externas à região de perda de confiabilidade (regiões destacadas em cinza).

O perfil das curvas de desempenho demonstrou também que o procedimento modificado melhorou a eficiência do método em relação aos parâmetros de incerteza (RPC) e LD (**Figura I.11**). As premissas da regressão de foram confirmadas ($p > 0,05$). Para o método oficial, RPC foi estimada entre 1,08 e 1,65 g.L⁻¹, enquanto para o modificado, entre 0,8 e 1,42 g.L⁻¹ de cloretos. Limites de 1,65 e 1,42 g.L⁻¹ foram calculados para as versões oficial e modificada, respectivamente, valores próximos ao limite teórico de 1,6 g.L⁻¹, baseado na relação estequiométrica da reação.

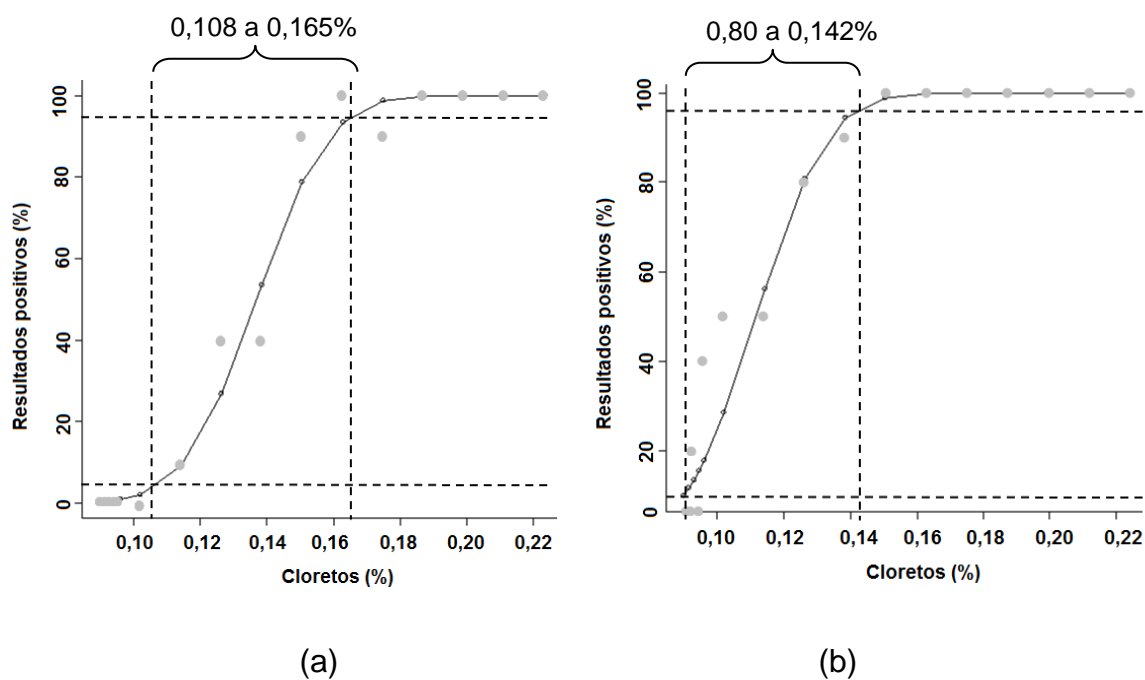


Figura I.11 Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo de probito) com respectivas regiões de perda de confiabilidade (área delimitada pelas linhas pontilhadas) e pontos experimentais (●) para os métodos de detecção de cloretos em leite, sendo (a) método oficial e (b) método modificado.

A padronização dos procedimentos de ambos os métodos foi evidenciada pelos valores satisfatórios de ACO e CON (**Tabela I.4**).

Silva (2103) avaliou a sensibilidade do método de oficial de detecção de cloretos em amostras de leite pasteurizado adicionadas de sal comum em nove níveis de concentração entre 0,1 e 1 g.L⁻¹, sendo três replicatas por nível. Os resultados demonstraram que o teste era capaz de detectar concentrações até 0,27 g.L⁻¹ de sal comum (aproximadamente 0,16 g.L⁻¹ de cloretos). Resultados positivos foram observados para 1,14 g.L⁻¹ de cloretos, quando o método oficial foi avaliado. No estudo de Silva (2003), a concentração nativa de cloretos não foi considerada e os níveis foram inferiores aqueles investigados no presente estudo. Como mencionado previamente, esse trabalho não considerou a importância da representatividade e número de replicatas para a avaliação de métodos qualitativos.

O método de detecção de cloreto descrito no *Manual of Methods of Analysis of Foods* (Índia, 2012) é similar ao método oficial brasileiro com um LD de 0,2 g.L⁻¹ de cloreto de sódio (0,12 g.L⁻¹ de cloretos), valor inferior ao estimado neste estudo de validação. No entanto, informações sobre experimentos ou critérios adotados para estimativa desse limite não são descritos no Manual.

Variações no teor de cloretos no leite podem ocorrer devido a diversos fatores como período de lactação, sazonalidade e enfermidades, sendo a mastite uma das principais causas relacionadas ao aumento do teor de cloretos. Alguns autores propõem o uso dos métodos de detecção e quantificação de cloretos descritos na IN 68/2006 para diagnóstico subclínico da mastite (Elias et al., 2005; Zafalon et al.; Tronco, 2010). Desse modo, investigações complementares devem ser consideradas para uma melhor definição da fraude em leite por adição de cloretos.

Seletividade – interferentes

A seletividade foi observada para carboximetilcelulose, goma de xantana, maltodextrina, pectina, amido e sacarose, em ambos os métodos de detecção de cloretos. TCFs de 100% foram obtidas quando foram consideradas amostras não

adulteradas e adicionadas de cloreto de sódio na presença destes potenciais interferentes. Estudos semelhantes para este teste não são descritos na literatura.

Robustez

Na avaliação da robustez do método oficial, a marca de nitrato de prata foi apontada como um fator que afetou o desempenho do método, uma vez que TCF de 80% foi obtida nos experimentos que envolveram a marca B. Considerando os experimentos realizados com a marca A, foram observadas TCF maiores ou iguais a 90%. Para o método modificado, a robustez foi demonstrada para todos os fatores e níveis estudados com TCFs maiores ou iguais a 90%. Não foram identificados trabalhos de natureza similar na literatura que permitissem a comparação com as evidências aqui reportadas.

I.3.2.3 Sacarose

Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Nos testes preliminares, as concentrações de sacarose entre 0,3 e 3,6 g.L⁻¹ forneceram entre 0 e 100% de resultados positivos para ambas as metodologias, sendo essa faixa de concentração selecionada para a próxima etapa do processo de validação.

Na análise de amostras brancas (sem adição de sacarose), TST de 93,3 e 100% e TFP de 6,7 e 0% foram obtidas para os métodos oficial e modificado, respectivamente. Para a versão oficial, estes resultados podem ser atribuídos à reação de aldoses com resorcinol, como discutido anteriormente. Nas amostras adulteradas, a porcentagem de resultados positivos foi aumentando de acordo com a concentração de sacarose. No método oficial, TSB e TFN variaram entre 93,3 e 0% e entre 6,7 e 100%. Considerando a versão modificada, essas taxas variaram

entre 100 e 0% (**Tabela I.5**). A frequência de resultados positivos foi maior no método modificado, indicando uma melhoria da sensibilidade.

Tabela I.5 Taxas de falso-negativos (TFN), de sensibilidade (TSB), de falso-positivos (TFP), de seletividade (TST), acordância (ACO) e concordância (CON) para amostras não adulteradas e adulteradas com sacarose

| Sacarose (g.L ⁻¹) | Método oficial | | | | | | Método modificado | | | | | |
|----------------------------------|----------------|----------------|-------------------------|-----|-----|-----|-------------------|----------------|-------------------------|-----|-----|-----|
| | TFN ou TFP* | TSB ou TST* | ACO (bateria analítica) | | | CON | TFN ou TFP* | TSB ou TST* | ACO (bateria analítica) | | | CON |
| | | | 1 | 2 | 3 | | | | 1 | 2 | 3 | |
| 0,0* | 6,7 | 93,3 | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 0,9 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,3 | 93,3 | 6,7 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,6 | 80,0 | 20 | 1,0 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 90,0 | 10,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,9 | 53,3 | 46,7 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 66,7 | 33,3 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,8 |
| 1,2 | 50,0 | 50,0 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 30,0 | 70,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,6 |
| 1,5 | 23,3 | 76,7 | 0,6 | 1,0 | 0,4 | 0,6 | 6,7 | 93,3 | 0,4 | 0,8 | 0,5 | 0,6 |
| 1,8 | 36,7 | 63,3 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 10,0 | 90,0 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 2,1 | 30,0 | 70,0 | 0,5 | 0,8 | 0,5 | 0,6 | 6,7 | 96,7 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 2,4 | 23,3 | 76,7 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 |
| 2,7 | 16,7 | 83,3 | 1,0 | 0,8 | 0,5 | 0,7 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 3,0 | 10,0 | 90,0 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,8 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 3,3 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | 0,0 | 100,0 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 3,6 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

*TFP e TST para amostras não adulteradas; número de replicatas por concentração = 30; critério para avaliação de ACO e CON = maior ou igual a 0,8 para concentrações externas à região de perda de confiabilidade (regiões destacadas em cinza).

As RPC foram estimadas entre 0 e 3,2 g.L⁻¹ e 0,3 to 1,9 g.L⁻¹ de sacarose para os métodos oficial e modificado, respectivamente (**Figura I.12**), após confirmação das premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos da regressão ($p > 0,05$). As modificações propostas no procedimento proporcionaram uma redução na faixa de incerteza, uma vez que a RPC do método modificado apresentou uma faixa de concentração mais baixa e estreita.

Os LD foram estabelecidos em 3,2 e 1,9 g.L⁻¹, respectivamente, para os métodos oficial e modificado. O *draft* do Manual indiano (Índia, 2012) descrevia um método similar de LD igual a 1 g.L⁻¹, inferior ao obtido para ambos os métodos validados nesse estudo. Por outro lado, Liu et al. (2015) desenvolveram um método baseado em espectroscopia no infravermelho que pôde detectar sacarose em leite em concentrações maiores ou iguais a 0,5% (m/v), aproximadamente, 5 g.L⁻¹.

Com a exceção de um valor de ACO obtido para amostras não adulteradas no método oficial e, apesar da dificuldade de interpretação dos resultados inerentes a este método devido à coagulação do leite, os valores apresentados na **Tabela I.4** para ACO e CON indicaram uma padronização satisfatória de ambos os métodos avaliados, em termos de repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente.

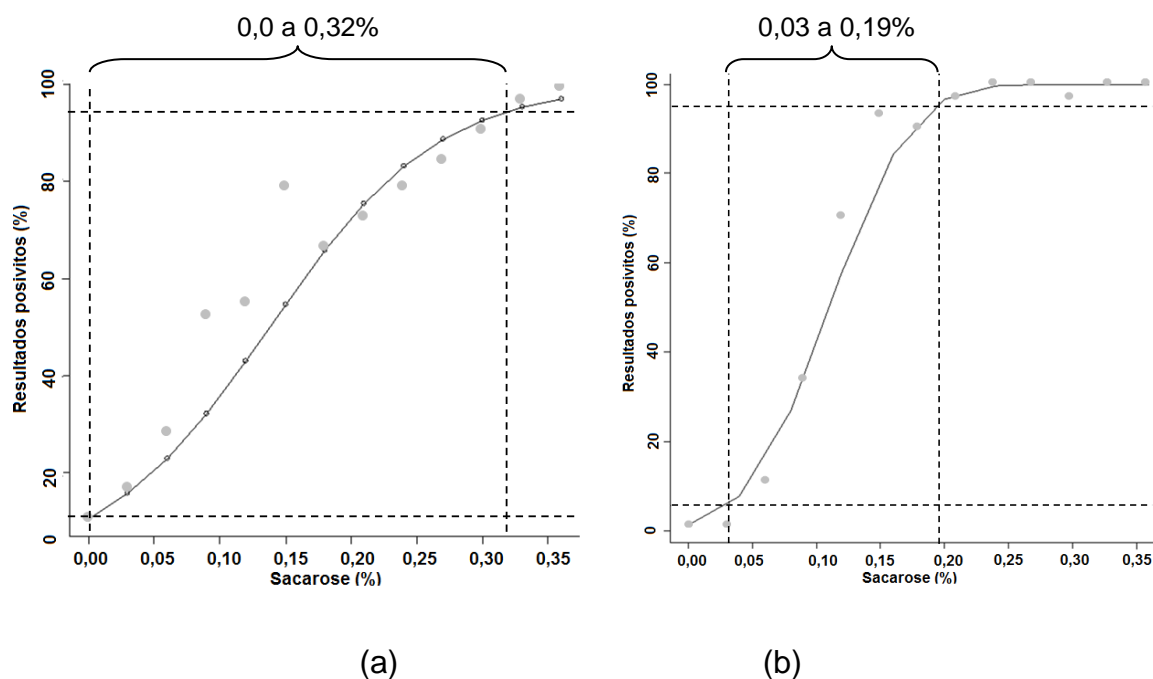


Figura I.12 Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo de probito) com respectivas regiões de perda de confiabilidade (área delimitada pelas linhas pontilhadas) e pontos experimentais (●) para os métodos de detecção de sacarose em leite, sendo (a) método oficial e (b) método modificado.

Seletividade - interferentes

Em ambos os métodos, a seletividade foi observada para os reconstituintes de densidade estudados (carboximetilcelulose, goma de xantana, maltodextrina, pectina, amido e cloreto de sódio), com TCF maiores ou iguais a 90%. Também para a sacarose, não foram identificados estudos similares na literatura.

Robustez

Robustez foi demonstrada para o método oficial para todos os fatores estudados e níveis (100% de TCF). Para o modificado, TCF de 60% foram obtidos em todos os tratamentos com 3 minutos de aquecimento de amostras. A robustez

deste método foi observada quando o tempo de aquecimento da amostra variou de 5 a 8 minutos. Uma comparação com outros trabalhos não foi possível, visto que não foram reportados estudos de robustez para a prova em questão.

I.3.3 AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ADEQUAÇÃO DO PROPÓSITO DE USO (FITNESS FOR PURPOSE)

Considerando o método modificado, observou-se que, após a fraude com 150 g.L⁻¹ de água, a adição de amido, cloreto de sódio e sacarose nos respectivos LD não foi suficiente para restaurar a densidade. Estes resultados indicaram que, para restaurar a densidade do leite até os níveis determinados pela legislação brasileira, maiores quantidades de adulterantes seriam necessárias e, portanto, detectáveis pelos respectivos métodos modificados.

Para os métodos oficiais, a densidade das amostras adulteradas com água foi restaurada com a adição de cloreto de sódio e sacarose em concentrações iguais ao LD de cada método, indicando que, em uma adulteração com 150 g.L⁻¹ de água não haveria necessidade de maiores quantidades destes restauradores. No entanto, ambos os analitos seriam detectados.

Estes resultados indicaram que os métodos modificados para a detecção de amido, cloretos e sacarose, e o método oficial para detecção amido foram capazes de detectar a fraude leite em concentrações abaixo dos níveis necessários para mascarar fraude por adição de 150 g.L⁻¹ de água.

Para todas as amostras adulteradas não foram obtidos falsos resultados, considerando as versões oficiais e modificadas, confirmando a aplicabilidade de cada método.

I.3.4 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL

I.3.4.1 Testes de homogeneidade e estabilidade

A homogeneidade foi observada para todos os materiais de teste preparados para a validação dos métodos de detecção de amido, cloretos e sacarose. Para os materiais sem adição dos reconstituintes, foram obtidos 100% de resultados negativos (ou 100% de TCF e 0% de TFP). Para os materiais que continham adulterantes, 100% de resultados positivos (ou 100% de TCF e 0% de TFN) foram alcançados. De acordo com Ellison & Fearn (2005), a falta de homogeneidade é difícil de determinar quando um método qualitativo é usado. No entanto, para amostras positivas, se a falta de homogeneidade não influenciar significativamente os resultados, a homogeneidade pode ser assumida.

A estabilidade em curto prazo dos materiais de teste foi demonstrada. Para o delineamento isócrono, os resultados indicaram que falhas na manutenção das condições de temperatura durante o transporte não afetariam os resultados. Foram observadas 100% de TCF para todos os materiais de teste submetidos aos três tratamentos - refrigeração, incubação de 30 até 40 °C, durante 5 e 10 h.

Os mesmos resultados foram obtidos para o delineamento clássico para avaliação da estabilidade, já que TCF de 100% foram obtidas para todos os materiais analisados no prazo máximo para a análise estabelecido para os colaboradores (48 horas após ordenha), como observado no momento da preparação dos materiais (tempo zero).

I.3.4.2 Análise de agrupamento hierárquica (HCA)

Os resultados da HCA são apresentados no dendrograma da **Figura I.13**. No primeiro agrupamento, representado por sete laboratórios (3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10), os quatro segmentos de laboratórios incluídos no estudo estavam presentes

(laboratórios de órgãos regulamentadores oficiais, de terceira parte; laboratórios de análise de alimentos, de segunda parte; laboratórios de laticínios, de primeira parte; e laboratório de universidade). Um segundo agrupamento, possuía dois laboratórios (2 e 7), representantes da indústria de alimentos e órgãos oficiais. Somente o laboratório 1, representante da indústria, apresentou o desempenho diferente em relação aos demais, sendo representado num terceiro agrupamento. Desta forma, a HCA indicou que o segmento ao qual o laboratório colaborador pertencia não influenciou os resultados obtidos e, conseqüentemente, o processo de validação dos métodos qualitativos.

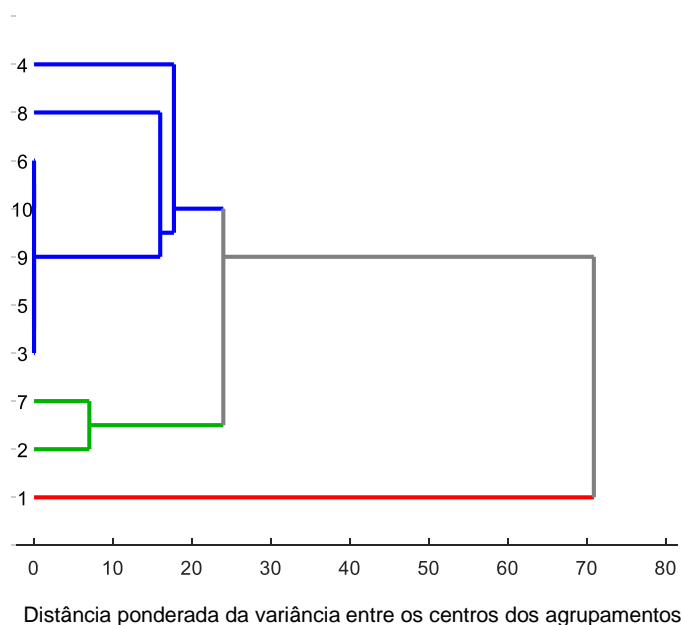


Figura I.13 Análise de agrupamentos hierárquica (HCA): dendrograma com as distâncias entre os laboratórios colaboradores.

I.3.4.3 Ensaio colaborativos

Amido

Considerando cada colaborador separadamente, para os materiais adulterados com os reconstituintes, a TFP variou de 0 a 10%, resultando em TCF de 100-90%. Três resultados falso-positivos foram observados para os laboratórios 1, 2 e 7. Resultados semelhantes de TCF foram obtidos para materiais contendo 0,3 g.L⁻¹ de amido para os laboratórios de 2 e 7, que reportaram um resultado negativo cada, implicando em TFN e TCF de 10 e 90%, respectivamente. No entanto, para o laboratório 1, TCF foi estimada em 40%. TFN e TCF de 0 e 100%, respectivamente, foram observadas, para todos os laboratórios, para os materiais contendo 0,8 e 1,2 g.L⁻¹ de amido. Considerando todos os dados dos colaboradores, TCF variou de 93 a 100% para os materiais adulterados pela adição de reconstituintes. Para os materiais adulterados sem adição de reconstituintes, TCF foi igual a 97%. Esses resultados indicaram a sensibilidade e seletividade do método modificado, respectivamente (**Tabela I.6**).

Valores satisfatórios de ACO e CON foram estimados para todos os laboratórios e concentrações de amido avaliados, indicando uma adequada padronização do processo analítico, sobre condições de repetibilidade e reprodutibilidade, com exceção do parâmetro ACO para o laboratório 1 e materiais de teste que continham 0,3 g.L⁻¹ de amido (**Tabela I.7**).

As estimativas dos parâmetros estatísticos utilizados para descrever os intervalos de predição para a probabilidade de detecção (Macarthur e Holst 2012) são apresentados na **Tabela I.8**. A probabilidade de detectar amido em materiais contendo de 0,3 a 1,2 g.L⁻¹ variou entre 0,92 e 1,00, enquanto a probabilidade de se obter um resultado falso-positivo foi de 0,03, reiterando as características de sensibilidade e seletividade do método proposto.

Tabela I.6 Taxas de falso-positivos (TFP), falso-negativos (TFN) e confiabilidade (TCF) obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos clássicos para detecção de amido, cloretos e sacarose em leite

| Número do laboratório | Amido (g.L ⁻¹) | | | | | | | | Cloretos (g.L ⁻¹) | | | | | | | | Sacarose (g.L ⁻¹) | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0,0 | | 0,3 | | 0,8 | | 1,2 | | 0,9 (nativo) | | 1,5 | | 2,0 | | 2,5 | | 0,0 | | 2,4 | | 3,0 | | 3,6 | |
| | TFP | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFP | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFP | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF |
| 1 | 10 | 90 | 60 | 40 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 2 | 10 | 90 | 10 | 90 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 3 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 4 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 13 | 87 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 5 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 6 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 7 | 10 | 90 | 10 | 90 | 0 | 100 | 0 | 100 | 7 | 93 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 8 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 10 | 90 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 9 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 10 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| Total | 3 | 97 | 7 | 93 | 0 | 100 | 0 | 100 | 2 | 98 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 1 | 99 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| N | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | | 150 | | 100 | | 100 | | 50 | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 | |

Valores de TCF destacados em cinza indicam valores menores que 90%, ou seja, insatisfatórios.

Tabela I.7 Valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos modificados para detecção de amido, cloretos e sacarose em leite

| Número de laboratório | ACO | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|------|------|------|-------------------------------|------|------|------|-------------------------------|------|------|------|
| | Amido (g.L ⁻¹) | | | | Cloretos (g.L ⁻¹) | | | | Sacarose (g.L ⁻¹) | | | |
| | 0,0 | 0,3 | 0,8 | 1,2 | 0,9 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 0,0 | 2,4 | 3,0 | 3,6 |
| 1 | 0,80 | 0,47 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 2 | 0,80 | 0,80 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 3 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 4 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,75 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 5 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 6 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 7 | 0,80 | 0,80 | 1,00 | 1,00 | 0,87 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 8 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,80 | 1,00 | 1,00 |
| 9 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 10 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| CON | 0,94 | 0,85 | 1,00 | 1,00 | 0,96 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,98 | 1,00 | 1,00 |

Valores de ACO e CON destacados em cinza indicam resultados menores que 0,80 (para materiais distribuídos em mínimo de 10 replicatas) ou 0,60 (para materiais distribuídos in cinco replicatas), ou seja, insatisfatórios.

Tabela I.8 Parâmetros estatísticos e limites inferiores (5%) e superiores (95%) estimados para probabilidade de detecção dos reconstituintes para os métodos qualitativos clássicos modificados de detecção de amido, cloretos e sacarose em leite

| Reconstituente (g.L ⁻¹) | N | X | P | s _R | Limite inferior | Limite superior |
|-------------------------------------|-----|-----|------|----------------|-----------------|-----------------|
| Amido | | | | | | |
| 0,0 | 100 | 3 | 0,03 | 0,005 | 0,022 | 0,038 |
| 0,3 | 100 | 92 | 0,92 | 0,019 | 0,887 | 0,950 |
| 0,8 | 100 | 100 | 1,00 | 0,00 | 0,971 | 1,00 |
| 1,2 | 100 | 100 | 1,00 | 0,00 | 0,971 | 1,00 |
| Cloretos | | | | | | |
| 0,0 | 150 | 3 | 0,03 | 0,007 | 0,007 | 0,046 |
| 1,5 | 100 | 99 | 0,99 | 0,003 | 0,984 | 0,998 |
| 2,0 | 100 | 100 | 1,00 | 0,00 | 0,971 | 1,00 |
| 2,5 | 50 | 50 | 1,00 | 0,00 | 0,942 | 1,00 |
| Sacarose | | | | | | |
| 0,0 | 100 | 1 | 0,01 | 0,003 | 0,002 | 0,038 |
| 2,4 | 100 | 99 | 0,99 | 0,003 | 0,962 | 0,998 |
| 3,0 | 100 | 99 | 0,99 | 0,003 | 0,971 | 0,998 |
| 3,6 | 100 | 100 | 1,00 | 0,00 | 0,971 | 1,00 |

N = total de análises; *X* = total de resultados positivos; *P* = probabilidade de detecção média estimada para o reconstituente; *s_R* = desvio padrão das estimativas de probabilidade de detecção individuais dos laboratórios (Macarthur & Holst, 2012).

Os limites das RPC e os LDs estimados através de regressão não-linear (Gondim et al., 2014), tanto para o único laboratório (Gondim et al., 2015) e processos interlaboratoriais são apresentados na **Tabela I.9**. O LD estimado para o amido no ensaio colaborativo foi de 0,32 g.L⁻¹, valor próximo ao obtido no processo de validação intralaboratorial (0,2 g.L⁻¹). O intervalo de predição estimado para LD, de acordo com o procedimento de Macarthur & Holst (2012), incluiu estes limites (**Figura I.14**).

Como mencionado, estudos de validação interlaboratoriais não são relatados na literatura para estes métodos. Processos de validação de métodos de detecção de amido incluem, em grande parte, a utilização de técnicas instrumentais como a espectroscopia no infravermelho (IV). Para essas metodologias, os limites de detecção relatados variaram entre 1,5 e 5 g.L⁻¹, os quais são significativamente superiores aos reportados no presente estudo, tanto no processo intralaboratorial quanto no estudo colaborativo do método modificado (Zang et al., 2014; Botelho et al., 2015). Leite em pó adulterado com amido, em níveis mais elevados do que os

aqui investigados, também foi analisado por espectroscopia no infravermelho (IR) e uma completa discriminação das amostras adulteradas com 2% (ou 20 g.L⁻¹) de amido foi relatada (Capuano et al., 2015). Numa avaliação do método oficial de detecção de amido em leite pasteurizado realizada por Silva (2013), a detecção de amido foi observada em 100% das amostras adulteradas com concentrações de amido entre 0,1 e 25 g.L⁻¹, corroborando com os resultados deste estudo interlaboratorial.

Tabela I.9 Limites das regiões de perda de confiabilidade e limites de detecção (LD) estimados para os métodos qualitativos clássicos modificados para detecção de amido, cloretos e sacarose em leite em processos intra e interlaboratoriais

| Método | Limites da região de perda de confiabilidade (g.L ⁻¹) | | | |
|----------|---|------------------|-----------------------------|------------------|
| | Validação intralaboratorial | | Validação interlaboratorial | |
| | Inferior | Superior (ou DL) | Inferior | Superior (ou DL) |
| Amido | 0,02 | 0,20 | 0,03 | 0,32 |
| Cloretos | 0,80 | 1,42 | 1,00 | 1,62 |
| Sacarose | 0,30 | 1,90 | 0,43 | 1,99 |

De um modo geral, os resultados obtidos no processo de validação interlaboratorial para o método qualitativo modificado para detecção de amido em leite foram influenciados pelos falsos resultados relatados pelo laboratório 1 para a concentração de 0,3 g.L⁻¹. A cor intermediária formada nesta concentração era diferente da cor amarela observada para as amostras brancas não-cegas e também da cor azul estabelecida nos testes clássicos como o critério para resultado positivo, que só foi observada para amostras adulteradas com altas concentrações de amido. Assim, uma possibilidade para a ocorrência destes resultados é o fato do procedimento modificado (critério de cor) não ter sido totalmente compreendido pelos analistas desse colaborador específico.

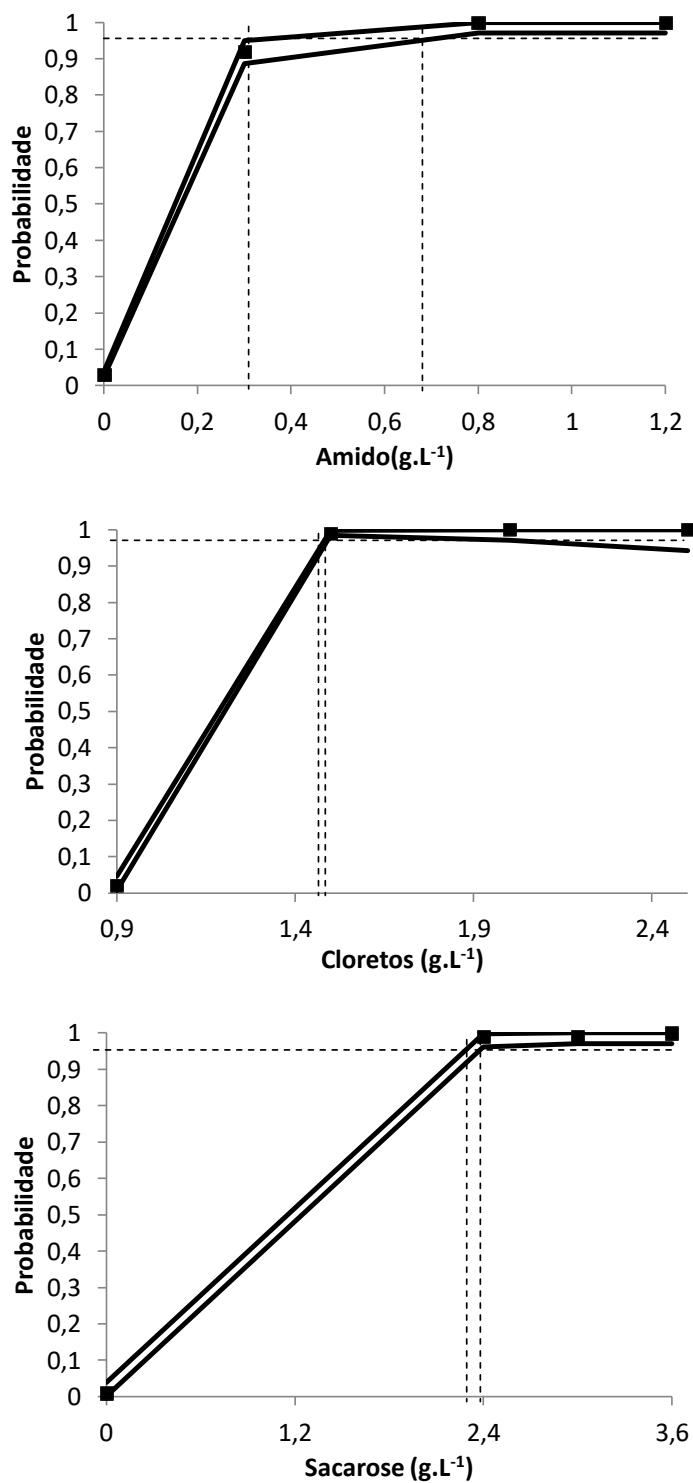


Figura I.14 Estimativa dos limites inferiores e superiores para as probabilidades de detecção e intervalos de predição para os limites de detecção para os métodos qualitativos modificados de detecção de amido, cloretos e sacarose.

--- projeção da probabilidade de detecção em 0,95 (Macarthur e Holst 2012).

Cloretos

Para os materiais adulterados não adicionados de cloreto de sódio, a TFP variou de 0 a 13%, resultando em TCF entre 100 e 87% para os dados de cada colaborador, indicando a seletividade do método. Os laboratórios 4 e 7 relataram resultados correspondentes a 13 e 7% de resultados falso-positivos, respectivamente. A sensibilidade foi demonstrada pela obtenção TFN igual a 0%, isto é, TCF de 100%, para todos os materiais de teste adulterados por adição de cloreto de sódio. Com base no total de resultados dos laboratórios colaboradores, TCF foi de 100% para os materiais adulterados por diluição com água seguida de adição de cloretos e de 98% para os materiais adulterados somente com água (**Tabela I.6**).

Um valor de 0,75 de ACO foi observado para o laboratório 4; 0,87 para o laboratório 7 e 1,00 para todos os demais laboratórios para os materiais de teste adulterados sem adição de cloreto de sódio. Apenas o primeiro representou um resultado fora dos critérios estabelecidos. No entanto, esse resultado não implicou em um valor de CON inferior a 0,80. Para os demais materiais adulterados com cloreto de sódio, os valores de ACO e CON estimados foram satisfatórios. Esses resultados indicaram precisão do método, ou seja, que o procedimento proposto e validado foi suficientemente padronizado (**Tabela I.7**).

O LD estimado por regressão não-linear para este ensaio interlaboratorial foi 1,38 g.L⁻¹, semelhante ao calculado no processo intralaboratorial (1,42 g.L⁻¹), **Tabela I.9**). O LD estimado foi próximo aos valores calculados considerando a probabilidade de detecção de 0,95 e os respectivos intervalos de predição (Macarthur e Holst 2012) (**Figura I.14**).

A probabilidade de obtenção de resultado falso-positivo para o método modificado para detecção de cloretos foi de 0,03. A probabilidade de detecção variou de 0,99 a 1,00 para os materiais de ensaio contendo 1,5 a 2,5 g.L⁻¹ de cloretos (**Tabela I.8**), comprovando a seletividade e sensibilidade do método.

Silva (2013) avaliou o método oficial para detecção de cloretos em leite pasteurizado obtendo 100% de resultados positivo em amostras adicionadas de sal comum comercial em concentrações entre 0,27 e 1 g.L⁻¹, inferiores aos LD estimados no presente estudo. Neste estudo colaborativo, foram avaliados concentrações superiores, embora 100% de resultados positivos também tenham sido observados.

Sacarose

Todos os parâmetros estimados para o método de sacarose foram satisfatórios. Para laboratório 8, para os materiais de teste que continham 2,4 g.L⁻¹ de sacarose, TFP, TCF, e ACO não apresentaram os valores máximos devido a um resultado falso. A probabilidade de detectar sacarose em materiais contendo entre 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ variou de 0,99 a 1,00; enquanto a probabilidade de resultados falso-positivos correspondeu a 0,01.

O LD calculado pelo modelo não-linear neste teste interlaboratorial foi semelhante ao relatado no estudo intralaboratorial (1,90 e 1,99 g.L⁻¹, respectivamente) (**Tabela I.9**). Um LD superior e respectivo intervalo foram alcançados quando aplicado o procedimento de Macarthur & Holst (2012) (**Figura I.14**).

O método de detecção de sacarose foi avaliado durante a fase final do estudo interlaboratorial. Assim, os melhores resultados obtidos podem ser justificados pela melhor compreensão do procedimento modificado adotado para o método da sacarose e também por uma maior familiarização pelos colaboradores do processo de validação interlaboratorial.

Todas as amostras de leite pasteurizado adulteradas com sacarose em concentrações entre 0,45 e 9 g.L⁻¹ foram detectadas como positivas na avaliação do método oficial realizada por Silva (2013), o que corrobora os resultados observados neste estudo de validação interlaboratorial. Estudos envolvendo a aplicação de IR e cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC), respectivamente,

na detecção e quantificação de sacarose em leite são relatados na literatura. Para o método qualitativo por IV, amostras foram detectadas como positivas em concentrações de até 5 g.L⁻¹. Em relação a esse estudo, o desempenho inferior ao da prova qualitativa era esperado, já que técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo e médio apresentam baixa sensibilidade. O limite de quantificação e LD do método de HPTLC foram calculados como 3,58 e 10 ng L⁻¹, respectivamente (Rani et al., 2012; Liu et al., 2015). O desempenho destas metodologias foi inferior e superior ao observado para o método modificado aqui validado. Esses resultados permitem evidenciar que técnicas instrumentais nem sempre têm melhor desempenho que técnicas qualitativas clássicas, que são simples e de baixo custo, como as empregadas nesse trabalho.

I.3.4.4 Comentários dos colaboradores

Amido

Laboratório 9 - A leitura foi realizada imediatamente após a adição da solução de Lugol, e o tempo total de leitura das 20 amostras foi de aproximadamente 6 min. Após a leitura das 20 amostras, a solução de Lugol foi adicionada novamente à amostra branca não cega para realização dos ensaios do restante dos materiais de teste. A realização dos ensaios dessa forma facilitou as análises porque a cor que se formou desapareceu após algum tempo. Mais tarde, todas as amostras que testaram positivo para o amido apresentaram um precipitado azul e algumas delas apresentaram um anel azulado na superfície.

I.4 CONCLUSÕES

Para o método de detecção de amido, foi sugerido um novo critério de resultados positivos. A padronização da etapa de homogeneização manual e uma inversão na sequência de adição de reagentes foram as modificações propostas para o método de cloretos. Considerando o método usado para a detecção de sacarose, uma etapa de filtração e o uso de uma solução de resorcinol foram incorporados, além de uma alteração no critério de resultado positivo.

A melhoria no desempenho foi observada para os métodos modificados propostos, especificamente com relação à redução de falsos resultados, faixa de incerteza e limites de detecção. A principal desvantagem dos métodos estudados está no fato de que os mesmos se baseiam na detecção sensorial, dependendo dos sentidos humanos para gravar e interpretar as respostas, de modo que a experiência e a formação dos analistas podem afetar os resultados.

O alto desempenho na detecção de adulterantes em leite foi demonstrado pelas técnicas clássicas validadas, o que pode ter um impacto significativo sobre a proteção da saúde e direitos dos consumidores.

O estudo interlaboratorial forneceu uma avaliação complementar sobre a adequação ao propósito de uso dos métodos modificados propostos para a detecção de reconstituintes da densidade em leite. Estes métodos podem ser uma importante e confiável ferramenta para pesquisadores, indústrias e agências de regulamentação na monitorização e controle da adulteração do leite. Um esquema detalhado e sistematizado para organização de estudo colaborativo visando à validação de métodos qualitativos foi desenvolvido e aplicado com êxito

CAPÍTULO II - DETECÇÃO DE CONSERVANTES EM LEITE CRU: VALIDAÇÃO INTRA E INTERLABORATORIAL DE MÉTODOS QUALITATIVOS OFICIAIS

RESUMO

Os métodos para detecção de cloro e hipoclorito e peróxido de hidrogênio foram validados por processos intra e interlaboratoriais em relação aos parâmetros de desempenho de métodos qualitativos: taxas (falso-positivo, falso-negativo, sensibilidade, seletividade e confiabilidade), região de perda de confiabilidade, limite de detecção (LD), acordância, concordância, seletividade na presença de interferentes e robustez. O método do cloro e hipoclorito foi avaliado considerando as duas etapas do procedimento analítico e apresentou taxas de seletividade e sensibilidade, padronização e robustez adequadas, com LD de 0,0036%, embora não tenha apresentado seletividade frente ao peróxido de hidrogênio, indicando sua aplicação também para este analito. O método do guaiacol para detecção de peróxido de hidrogênio, apesar do baixo LD estimado (0,0017%), apresentou limitações para aplicação em níveis superiores a 0,8%, com resultados falsos negativos devidos à inativação da enzima peroxidase. O método do óxido de vanádio apresentou LD superior (0,042%) para detecção de peróxido de hidrogênio, porém não foi evidenciada limitação de aplicação, visto que a taxa de confiabilidade foi de 100% entre 0,0055 e 0,8%. A adequação ao propósito de uso foi confirmada uma vez que a adição dos conservantes estudados ao leite, em concentrações iguais aos respectivos LD, não reduziu significativamente a contagem microbiana inicial de amostras de leite. Por fim, a validação interlaboratorial forneceu a comprovação final da aplicabilidade dos métodos na detecção de peróxido de hidrogênio (método do guaiacol) e hipoclorito de sódio em leite cru.

Palavras-chave: validação de métodos qualitativos, adulteração de leite, conservantes, cloro e hipoclorito, peróxido de hidrogênio.

II.1 INTRODUÇÃO

A não observação das boas práticas de fabricação na ordenha, armazenamento e durante o transporte pode ter como consequência a obtenção de leite com alta contaminação microbiana. Com o objetivo de reduzir essa contaminação, substâncias denominadas conservantes são adicionadas de modo fraudulento ao leite (Tronco, 2010), podendo provocar prejuízos econômicos e também danos à saúde do consumidor (Sharma & Paradakar, 2010).

A Instrução Normativa (IN) número 68 de 2006 da Secretaria de Defesa Animal (SDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) descreve Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, incluindo os métodos para detecção de cloro e hipoclorito e peróxido de hidrogênio. Além disso, o controle diário do leite previsto na IN 62 de 2011 do SDA/MAPA inclui a pesquisa de conservantes no leite cru por meio da realização de métodos qualitativos descritos na IN 68/2006 da SDA/MAPA (Brasil, 2006; Brasil, 2011).

Estudos publicados na literatura científica indicaram a presença dessas substâncias em amostras de leite produzidas no país. Além disso, nos últimos anos, fraudes envolvendo adição de substâncias conservantes vêm sendo objeto de investigação por parte de órgãos governamentais, podendo ser citadas as operações Ouro Branco e Leite Compensado deflagradas nos anos de 2007 e 2014. (Souza et al., 2011; UOL, 2012; VEJA, 2014; Botelho et al., 2015; G1, 2015).

Apesar da existência da legislação e fiscalização, poucos são os registros de estudos de adequação ao propósito de uso dos métodos qualitativos para detecção de conservantes em leite descritos na legislação brasileira. Além de não avaliarem parâmetros de desempenho característicos dos métodos qualitativos; como taxas de falsos resultados, região de perda de confiabilidade (RPC), acordância (ACO) e concordância (CON); esses estudos não abrangem parâmetros comuns a quaisquer métodos de ensaio, como limite de detecção, seletividade na presença de interferentes ou robustez (Silva, 2013; Silva et al., 2015).

A utilização de métodos adequados que possam fornecer resultados com confiabilidade é fundamental para garantia do controle da qualidade do leite (Santos, Pereira-Filho & Rodrigues-Saona, 2013). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi aplicar uma abordagem recente de validação de provas qualitativas, proposta por este grupo de pesquisa (Gondim et al., 2014; Gondim, Junqueira & Souza, 2016) no estudo dos métodos oficiais de detecção de cloro e hipoclorito e de peróxido de hidrogênio em leite cru.

II.2 MATERIAIS E MÉTODOS

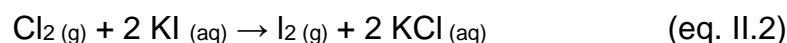
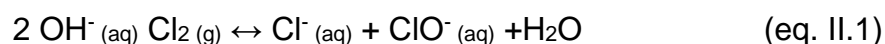
II.2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico. Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi responsável pelo fornecimento de álcool etílico, ácido sulfúrico, guaiacol, iodeto de potássio, solução de hipoclorito de sódio a 4-6% e óxido de vanádio. Amido, guaiacol e óxido de vanádio foram adquiridos de Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, SP, Brasil). Da empresa Synth (Diadema, SP, Brasil) foram obtidos amido, iodeto de potássio e solução de peróxido de hidrogênio a 30%. Ácido clorídrico a 37% foi adquirido de CRQ Produtos Químicos Industriais (Diadema, SP, Brasil) e Neon Comercial Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). Álcool etílico, ácido sulfúrico e solução de peróxido de hidrogênio a 30% foram adquiridos, respectivamente, de FMAIA (Belo Horizonte, MG, Brasil), Alphatec (São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e Isofar (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q Direct (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos).

Os instrumentos de medição utilizados foram balanças (AUX 220, Shimadzu; e BK 300, Gehaka), crioscópio, (PZL 900, PZL), balões volumétricos, banho termostático (314-8DN, Nova Ética), densímetro de leite (5784, Incotherm), micropipetas (LM 10000, Soluções Lab HTL; Finnpiquette F3, Thermo Scientific; e Transferpette S, Bre) e termômetros (7665.02.0.00, Incotherm). Todos os equipamentos eram calibrados por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), de acordo com a norma ISO / IEC 17025.

II.2.2 MÉTODOS

O método de detecção de cloro e hipoclorito fundamentou-se na formação do iodo livre a partir do iodeto de potássio, pela ação do cloro ou hipoclorito (Brasil, 2006), conforme as reações químicas a seguir nas equações 1 e 2:



A visualização de cor amarela, característica do iodo, indica o resultado positivo (**Figura II.1**). Na **Figura II.2**, encontra-se descrito o fluxograma do procedimento de análise e as cores observadas no método de detecção de cloro e hipoclorito descrito na IN 68/2006 (Brasil, 2006).

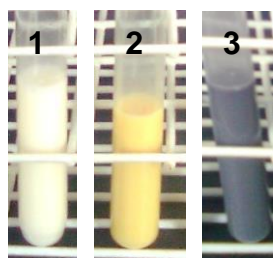


Figura II.1 Cores observadas no método qualitativo oficial estabelecido na Instrução Normativa (IN) 68/2006 para detecção de cloro e hipoclorito em leite (Brasil, 2006).

1 = amostra de leite sem adição de hipoclorito de sódio - observação de cor branca (índice de cor 255r 255g 255b); 2 = amostra de leite adulterada com hipoclorito de sódio - observação de cor amarela (índice de cor 255r 246g 133b); 3 = amostra de leite adulterada com hipoclorito de sódio, após confirmação com amido- cor azul (índice de cor 107r 120g 164b).

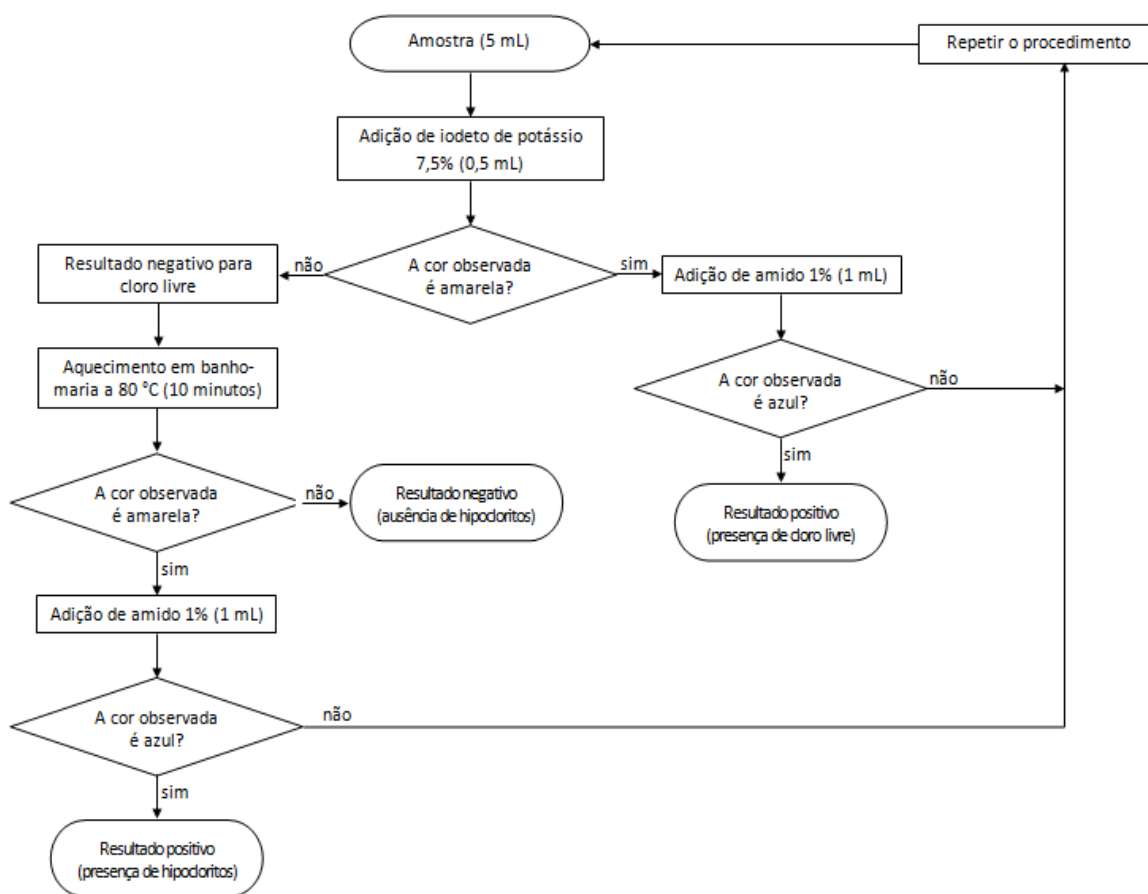


Figura II.2 Fluxograma do procedimento analítico do método qualitativo oficial estabelecido na Instrução Normativa (IN) 68/2006 para detecção de cloro e hipoclorito em leite (Brasil, 2006).

A detecção de peróxido de hidrogênio, pelo método do guaiacol, se deu pela formação de coloração salmão (**Figura II.3**). A enzima peroxidase, naturalmente presente no leite, degrada o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio que, ao reagir com o guaiacol, forma o tetraguaiacol, responsável pela coloração característica (Brasil, 2006), como apresentado na **Figura II.4**:

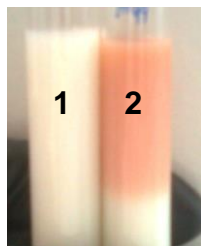


Figura II.3 Cores observadas para o método oficial do guaiacol estabelecido na Instrução Normativa (IN) 68/2006 para detecção de peróxido de hidrogênio em leite (Brasil, 2006)

1 = amostra de leite sem adição de peróxido de hidrogênio - observação de cor branca (índice de cor 255r 255g 255b); 2 = amostra de leite adulterada com peróxido de hidrogênio – observação de cor salmão (índices de cor: 224r 145g 121b e 245r 132g 102b).

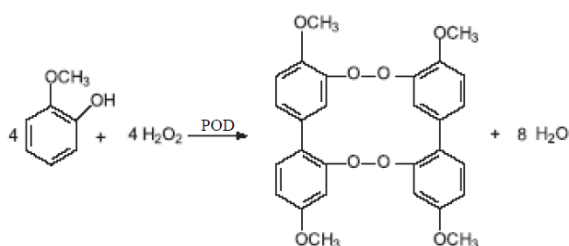
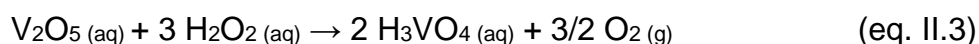


Figura II.4 Representação da reação química do método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio em leite cru estabelecido na Instrução Normativa (IN) 68/2006 (Brasil, 2006).

Fonte: Fatibello-Filho & Vieira, 2002.

Já no método de detecção com óxido de vanádio, o óxido reage com o peróxido de hidrogênio, em meio ácido, formando o ácido ortoperoxivanádico de coloração rósea ou vermelha (Brasil, 2006; IAL, 2008), como apresentado na **Figura II.5**. A reação envolvida no teste é apresentada na equação 3:



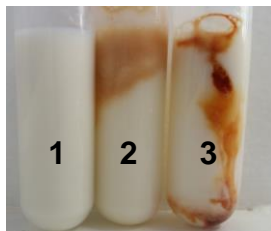


Figura II.5 Cores observadas para o método oficiais do óxido de vanádio estabelecido na Instrução Normativa (IN) 68/2006 para detecção de peróxido de hidrogênio em leite (Brasil, 2006).

1 = amostra de leite sem adição de peróxido de hidrogênio - observação de cor branca (índice de cor 255r 255g 255b); 2 = amostra de leite adulterada com peróxido de hidrogênio – observação de cor salmão/rósea (índice de cor: 252r 188g 134b); 3 = amostra de leite adulterada com peróxido de hidrogênio – observação de cor avermelhada (índices de cor: 200r 80g 60b e 185r 79g 38b).

Na **Figura II.6**, são apresentados os fluxogramas relacionados dos métodos de detecção de peróxido de hidrogênio da IN 68/2006 (Brasil, 2006).

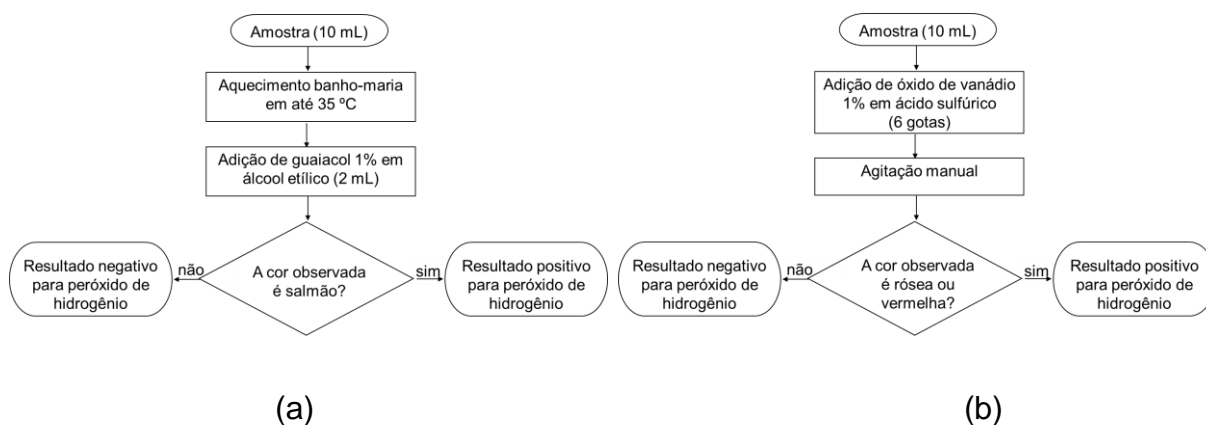


Figura II.6 Fluxogramas dos procedimentos analíticos dos métodos qualitativos oficiais estabelecidos na Instrução Normativa (IN) 68/2006 para detecção de peróxido de hidrogênio em leite, sendo a) método do guaiacol e (b) método do óxido de vanádio.

II.2.3 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

Para cada método, o processo de validação intralaboratorial envolveu quatro etapas experimentais: i) testes preliminares; ii) estimativa de taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância (em três baterias analíticas); iii) seletividade na presença de interferentes; iv) avaliação da robustez; e v) avaliação da adequação ao propósito de uso (**Figura II.7**). Os processos de validação foram realizados conforme procedimento descrito por Gondim et al. (2014).

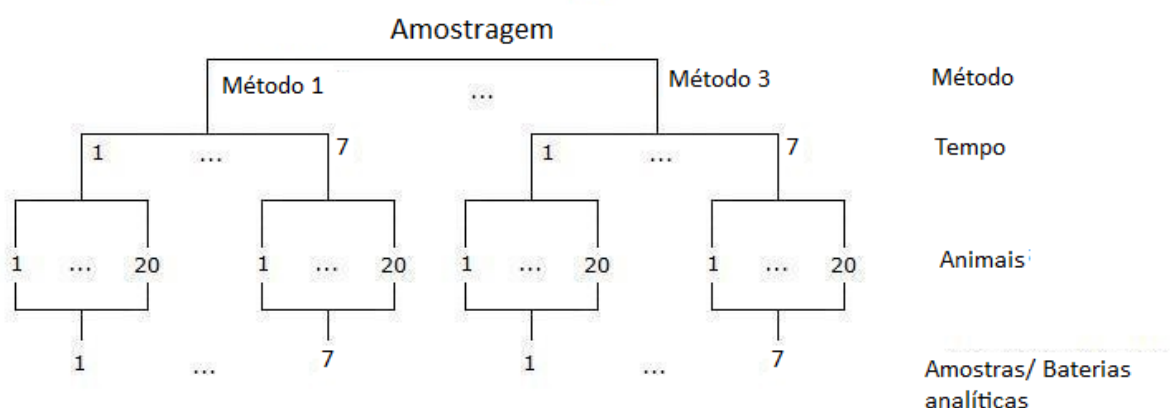


Figura II.7 Representação do procedimento de amostragem de leite cru utilizado para as etapas de otimização e validação métodos oficiais para detecção de conservantes em leite.

Método 1 = método oficial de detecção cloro e hipoclorito; Método 2 = método oficial do guaiacol de detecção peróxido de hidrogênio; Método 3 = método oficial do óxido de vanádio de detecção peróxido de hidrogênio.

Baterias analíticas: 1= validação – testes preliminares; 2 = validação -estudo de taxas, região de perda de confiabilidade (RPC), limite de detecção (LD), acordância (ACO) e concordância (CON) – bateria analítica 1; 3 = validação -estudo de taxas, RPC, LD, ACO e CON – bateria analítica 2; 4 = validação -estudo de taxas, RPC, LD, ACO e CON – bateria analítica 3; 5 = validação - estudo de seletividade na presença de interferentes; 6 = validação - estudo de robustez; 7 = validação –avaliação complementar de adequação ao propósito de uso.

II.2.3.1 Amostras

Em cada etapa experimental da validação de cada método, amostras de leite cru (3 L) foram retiradas de tanque de armazenamento refrigerado após ordenha mecânica de, no mínimo, 20 vacas da Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG). Tais amostras foram homogeneizadas, acondicionadas em galões de polipropileno devidamente fechados com tampa de rosca e identificados, e mantidas sob refrigeração (4-7 °C) para transporte imediato ao laboratório. Cada amostra foi analisada, em triplicata, em relação aos parâmetros densidade, crioscopia e acidez, conforme IN 68/2006 (Brasil, 2006), para verificação da conformidade em relação às faixas regulamentadas de 1,028 a 1,034 g/L, -0,531 a -0,512 °C e 0,14 a 0,18% (expresso como porcentagem de ácido láctico), respectivamente. As amostras foram mantidas nesta mesma faixa de temperatura até o início dos experimentos, os quais ocorreram no período máximo de 48 horas (Brasil, 2011).

A temperatura de 7°C e o tempo de 48 horas corresponderam aos máximos permitidos para recebimento de leite cru nas indústrias, conforme estabelecido na IN 62 do MAPA (BRASIL, 2011), o que assegurou a simulação das condições ideais de recebimento de leite pelos laticínios.

II.2.3.2 Testes preliminares

Na etapa dos testes preliminares, diversas baterias analíticas foram realizadas para obtenção de taxas de falso-negativos (TFN) entre 0 e 100% e determinação da faixa de concentração adequada para etapa posterior da validação.

II.2.3.3 Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Na segunda etapa da validação, amostras de leite cru foram adicionadas em diferentes níveis de concentração igualmente espaçados, sendo 30 replicatas independentes por nível, mais o branco (amostra sem adição). As amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente em três baterias analíticas distintas, que envolveram três diferentes tempos e analistas, sendo 10 replicatas por nível mais o branco, todas cegas (Gondim et al., 2014). Nessa etapa, as replicatas de cada bateria foram em divididas grupos, que foram analisados imediatamente após a adição do conservante e homogeneização das amostras. Essa divisão foi realizada visando minimizar o tempo entre a adição do analito às amostras de leite e a realização da análise, evitando a obtenção de resultados falso-negativos devido à degradação do conservante, e também como forma de controle para este tempo fosse o mesmo para todas as replicatas analisadas.

Na **Tabela II.1**, são relacionados os analitos, número de níveis e faixas de concentração avaliados em cada método nessa etapa da validação.

Os parâmetros taxas de falso-positivos (TFP), TFN, taxa de sensibilidade (TSB), taxa de seletividade (TST) e taxa de confiabilidade (TCF) foram calculados por equações provenientes de tabelas de contingência. A RPC e o limite de detecção (LD) foram estimados por regressão logística, com os limites fixados em 5 e 95% de resultados positivos e o LD correspondente ao limite superior da RPC, sendo verificadas previamente as premissas da regressão (Souza & Junqueira, 2005). ACO e CON foram determinadas por equações baseadas em cálculos de análise combinatória (Langton et al., 2002; Gondim et al., 2014).

Tabela II.1 Analitos, números de níveis e faixas de concentração avaliados na validação dos métodos qualitativos oficiais para detecção de conservantes em leite cru

| Método* | Analito | Número de níveis | Faixa de concentração (%) |
|--|---------------------------|-------------------------|--|
| Cloro e hipoclorito - 1ª Etapa do teste | Hipoclorito de sódio | 23 | 3×10^{-4} a 141×10^{-4} |
| Cloro e hipoclorito - 2ª Etapa do teste | | 21 | 3×10^{-4} a 128×10^{-4} |
| Método do guaiacol | Peróxido de hidrogênio | 22 (para cada faixa) | $0,1 \times 10^{-3}$ a $2,2 \times 10^{-3}$ (faixa inferior) 0,1 a 2,2 (faixa superior) |
| Método de óxido de vanádio | Peróxido de hidrogênio | 14 | 0,005 a 0,055 |

*Métodos e critérios oficiais, conforme Instrução Normativa (IN) 68/2006 (BRASIL, 2006).

II.2.3.4 Seletividade - interferentes

Na avaliação da seletividade na presença de interferentes, foram preparadas amostras adicionadas com os conservantes no menor nível de concentração os quais foram obtidos TCF de 100% na etapa anterior da validação. Para cada método validado, as amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente em baterias analíticas únicas por um analista, sendo 10 replicatas por nível mais o branco, todas cegas. A seletividade foi considerada quando para os interferentes testados as TCF fossem maior ou igual a 90% (Gondim et al., 2014). As concentrações de cada analito e interferentes utilizados para essa etapa do processo de validação de cada método são indicadas na **Tabela II.2**.

Tabela II.2 Concentrações dos analito e interferentes utilizados na etapa de avaliação da seletividade dos métodos qualitativos oficiais para detecção de conservantes em leite cru

| Método | Analito | Concentração do analito (%) | Interferente | Concentração do interferente (%) |
|---|------------------------|--|------------------------|----------------------------------|
| Cloro e hipoclorito | Hipoclorito de sódio | 0,01344 (Etapa 1*) e 0,00704 (Etapa 2) | Peróxido de hidrogênio | 0,0022 |
| Peróxido de hidrogênio - método do guaiacol | Peróxido de hidrogênio | 0,021 e 0,7 | Hipoclorito de sódio | 0,014 |
| Peróxido de hidrogênio - método do óxido de vanádio | Peróxido de hidrogênio | 0,045 | Hipoclorito de sódio | 0,014 |

* Etapa 1 – identificação de cloro livre e Etapa 2 – identificação de hipoclorito.

II.2.3.5 Robustez

Os estudos de robustez foram conduzidos procedimento descrito por Gondim et al. (2014). Para cada método validado, as amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente em baterias analíticas únicas por um analista, sendo 10 replicatas por nível mais o branco, todas cegas. Os métodos foram considerados robustos para os fatores e níveis testados quando a TCF era maior ou igual a 90%. Na **Tabela II.3**, são apresentadas as concentrações dos analitos, assim como os fatores e níveis avaliados nessa etapa da validação de cada método.

Tabela II.3 Concentrações dos analitos, fatores e níveis avaliados no estudo da robustez dos métodos qualitativos oficiais para detecção de conservantes em leite cru

| Método | Analito | Concentração do analito (%) | Fatores e níveis |
|---|------------------------|--|---|
| Cloro e hipoclorito | Hipoclorito de sódio | 0,01344 (Etapa 1*) e 0,00704 (Etapa 2) | Etapa 1: 1. Marcas reagente iodo a. A b. B 2. Marca reagente amido a. A b. B Etapa 2: 1. Tempo de aquecimento a. 8 minutos b. 12 minutos 2. Temperatura de aquecimento c. 75 °C d. 85 °C |
| Peróxido de hidrogênio - método do guaiacol | Peróxido de hidrogênio | 0,021 e 0,7 | 1. Temperatura de aquecimento a. 32 °C b. 38 °C 2. Marca reagente guaiacol a. A b. B 3. Marca reagente álcool etílico a. A b. B |
| Peróxido de hidrogênio - método do óxido de vanádio | Peróxido de hidrogênio | 0,045 | 1. Marca reagente óxido de vanádio a. A b. B 2. Marca reagente ácido sulfúrico a. A b. B |

* Etapa 1 – identificação de cloro livre e Etapa 2 – identificação de hipoclorito.

II.2.4 AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (*FITNESS FOR PURPOSE*)

Para avaliar a quantidade de conservante necessária para reduzir a contaminação microbiana, duas amostras de leite cru de aproximadamente 500 mL foram retiradas de tanque de armazenamento refrigerado da Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), após a primeira ordenha do dia. As amostras foram homogeneizadas e

acondicionadas em frascos de polipropileno esterilizados. Os frascos foram identificados e transportados ao laboratório sob refrigeração (4-7 °C). Desse modo, o processo de ordenha seria a fonte da contaminação apresentada pelas amostras.

Tais amostras foram adicionadas de cada conservante na concentração equivalente ao LD de cada método validado, mais o controle (sem adição de conservante). Tais amostras foram analisadas pelo respectivo método qualitativo (Brasil, 2006) e pela técnica de contagem padrão em placas (CPP), empregando a técnica de *pour plate* (Haynes, 1995; Brasil, 2003), utilizando quatro diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-4}). Para cada diluição, três replicatas foram analisadas. As placas foram incubadas por 48 horas a 35-37 °C.

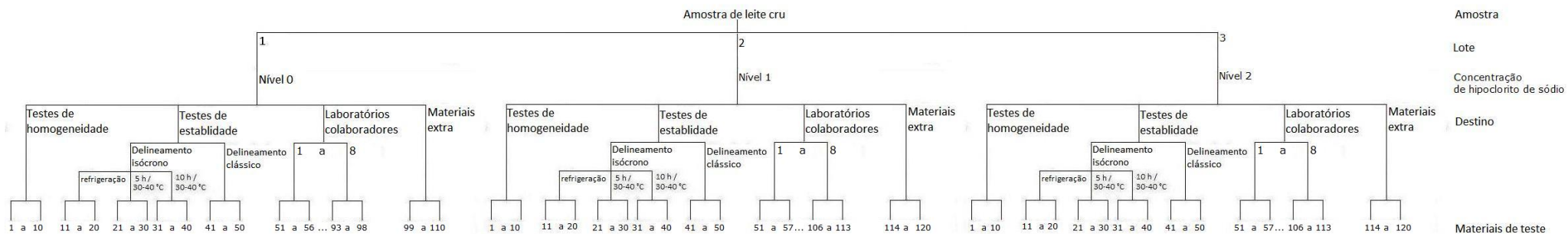
Na contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), foram consideradas as placas que apresentaram número de UFC entre 20 e 300. As médias das diluições foram calculadas, sendo os resultados expressos em UFC/mL (Haynes, 1995; Silva, 2002).

Para comparação dos resultados, foi realizado um teste de *t* para comparação de médias ($\alpha = 0,05$) para os logaritmos de UFC/mL obtidos para as médias de cada amostra.

II.2.5 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL

Os delineamentos experimentais dos ensaios colaborativos para validação interlaboratorial dos métodos de detecção de conservantes em leite são apresentados na **Figura II.8**. Os ensaios foram conduzidos conforme procedimento descrito no Capítulo I (Gondim, Junqueira & Souza, 2016). O método do guaiacol foi utilizado para detecção de peróxido de hidrogênio selecionado uma vez que o mesmo já havia sido previamente utilizado na avaliação da estabilidade do peróxido de hidrogênio em amostras de leite mantidas sob refrigeração por 20 dias (Santos, Gondim & Souza, 2014a).

Delineamento para método de detecção de cloro livre/hipoclorito em leite



Delineamento para método de detecção de peróxido de hidrogênio em leite (método do guaiaacol)

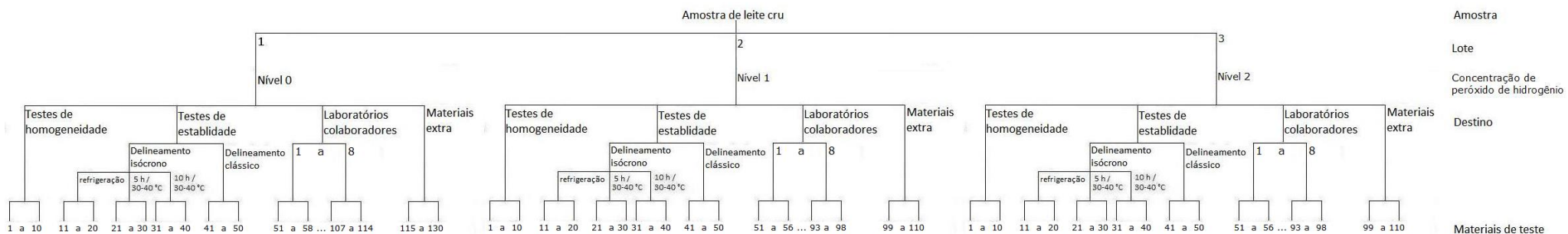


Figura II.8 Organização dos estudos interlaboratoriais, incluindo testes de homogeneidade, estabilidade, para validação dos métodos qualitativos de detecção de conservantes: cloro/ hipoclorito e peróxido de hidrogênio (método do guaiaacol).

II.2.4.1 Materiais de teste

Amostras

Duas amostras de leite cru produzidas por um rebanho de 50 animais foram retiradas de um tanque de armazenamento refrigerado (4-7 °C) da fazenda experimental Professor Hélio Barbosa, da EV/UFMG. Estas amostras, de aproximadamente 3 e 6 L, foram coletadas para a validação interlaboratorial dos métodos de cloro/hipoclorito e peróxido de hidrogênio (método do guaiacol), respectivamente. As amostras foram mantidas refrigeradas (4-7 °C) em galões de polipropileno desde o transporte ao laboratório até o momento de preparação dos materiais de teste, que ocorreu imediatamente após a chegada das mesmas no laboratório.

Preparação

As TCF obtidas nos processos anteriores de validação intralaboratorial foram utilizadas para estabelecer a concentração de adulterantes a serem adicionadas às amostras para elaboração dos materiais de teste.

Cada amostra foi dividida em três lotes que foram adicionados do conservante em concentrações que corresponderam à maior e menor concentrações nas quais foram obtidas 100% de TCF no processo de anterior de validação, além de zero de adição, como apresentado na **Tabela II.4**.

Para o preparo dos materiais, o leite e as soluções de conservantes (hipoclorito de sódio a 4-6% e peróxido de hidrogênio a 30%) foram transferidos para recipientes plásticos de 5 L, com auxílio de provetas (50, 100 e 500 mL) e micropipetas. Cada mistura foi homogeneizada por 10 minutos com auxílio de um agitador mecânico (Fisatom 713T) a 22.6 x g, após cada adição.

Cada lote adulterado foi envasado em tubos cônicos de polipropileno (15 mL), os quais foram preenchidos com 10 mL, no caso do método do cloro/hipoclorito, e

20 mL para o método de peróxido de hidrogênio. Os tubos foram tampados e identificados com códigos numéricos gerados aleatoriamente. Todos os materiais de teste foram armazenados sob refrigeração entre 4 e 7 °C. Os materiais de teste foram preparados em número excedente para casos de necessidade de substituição de materiais.

Tabela II.4 Preparação dos materiais de teste para validação interlaboratorial dos métodos de detecção de conservantes em leite

| Concentração final de conservante (%) | Volume (mL) | | | Número de tubos preparados | Volume por tubo (mL) |
|---------------------------------------|-------------|------------------------|-------|----------------------------|----------------------|
| | Leite cru | Solução de conservante | Total | | |
| Hipoclorito de sódio | | | | | |
| 0,0 | 1100 | - | 1100 | 110 | 10 |
| 0,004 | 1498 | 2 | 1500 | 120 | 10 |
| 0,013 | 1495 | 5 | 1500 | 120 | 10 |
| Peróxido de hidrogênio | | | | | |
| 0,0 | 2600 | - | 2600 | 130 | 20 |
| 0,0021 | 2400 | 0,170 | 2400 | 110 | 20 |
| 0,4 | 2368 | 32 | 2400 | 110 | 20 |

Solução aquosa de conservantes: hipoclorito de sódio – 4-6% e peróxido de hidrogênio - 30%. As quantidades de leite e soluções aquosas dos conservantes foram ajustadas para obter valores exatos para a preparação dos materiais de teste o que, em alguns casos, acarretou sobra de material que não foi acondicionado.

II.2.4.2 Testes de homogeneidade

A homogeneidade foi avaliada para cada lote de materiais utilizando os métodos qualitativos previamente validados sob condição de repetibilidade. Para cada ensaio colaborativo, 10 replicatas de cada material de teste de cada nível de adulteração foram selecionadas aleatoriamente (**Figura II.8**). A obtenção de TCF maior ou igual a 90% confirmou a homogeneidade de cada lote de material (Gondim et al., 2014; Gondim, Junqueira & Souza, 2016).

II.2.4.3 Testes de estabilidade

A estabilidade de curto prazo foi verificada para cada lote de material usando o método qualitativo e considerando duas abordagens descritas no Capítulo I (Gondim, Junqueira & Souza, 2016).

No delineamento isócrono, dez materiais de teste de cada nível de adulteração foram submetidos a três diferentes tratamentos: refrigeração (4-7 °C) do momento do preparo até o momento da análise, incubação entre 30-40 °C por quatro horas e incubação entre 30-40 °C por oito horas. No delineamento clássico, para cada nível de adulteração, dez materiais de teste mantidos refrigerados (4-7 °C) foram selecionados aleatoriamente no prazo final para análise pelos colaboradores (24 horas após preparo).

Em cada delineamento, TCFs obtidas foram comparadas com os valores obtidos na avaliação homogeneidade (tempo zero), sendo considerados estáveis os materiais que obtiveram TCF maior ou igual a 90%.

II.2.4.4 Organização dos ensaios interlaboratoriais

Oito laboratórios participaram dos ensaios interlaboratoriais, sendo três representantes de órgãos oficiais de fiscalização e regulamentação, de terceira parte; dois laboratórios privados de análise de alimentos, de segunda parte; dois laboratórios de indústrias de laticínios, de primeira parte; e um laboratório de Universidade.

Os materiais de teste de cada lote distribuídos aos laboratórios colaboradores foram selecionados aleatoriamente e mantidos refrigerados durante o transporte. A entrega dos materiais foi programada para que a análise dos mesmos ocorresse em, no máximo, 24 e 48 horas após seu o preparo. O menor intervalo de tempo foi estabelecido para o ensaio de colaborativo do método de detecção de peróxido, uma vez que, um teste preliminar de preparo das amostras apontou resultados negativos para amostras contendo 0,4% de peróxido de hidrogênio analisadas 48 horas após o preparo.

Para cada ensaio, os colaboradores receberam 20 materiais de teste codificados, totalizando 160 resultados por ensaio. Para o método de cloro e hipoclorito, cada laboratório colaborador recebeu sete materiais de teste adulterados com cada concentração de hipoclorito de sódio avaliada (0,005 e 0,013%) e seis materiais de testes sem adição de conservante (negativos). Para o método de peróxido de hidrogênio, foram enviadas, aos laboratórios, oito replicatas de materiais de teste sem adição do conservante (negativos) e seis replicatas de materiais de teste de cada concentração de adulterante (0,0021 e 0,4%) (**Figura II.8**). Para estabelecimento das concentrações a serem utilizadas nos ensaios, considerou-se os resultados da validação intralaboratorial, mas também concentrações nas quais foram obtidas 100% de resultados positivos na validação intralaboratorial e para amostras armazenadas sob refrigeração e analisadas 24 horas após seu preparo com base em estudos reportados por Santos, Gondim & Souza (2014a, 2014b).

No momento do recebimento, os colaboradores avaliaram os materiais de teste em relação à temperatura; integridade, vedação e identificação dos tubos; além dos documentos relacionados ao ensaio (formulário para relatório de resultados e procedimento analítico) (**Anexo A**).

Os colaboradores foram instruídos a manter as amostras refrigeradas até o momento da análise e a realizar a análise de todas as amostras dentro do prazo estabelecido, sob condições de repetibilidade (análise em bateria analítica única). Além de informar ao organizador qualquer anormalidade ou perda dos materiais de teste, para envio de nova remessa de materiais para substituição dentro do prazo para análise; e informar os resultados ao organizador até dois dias úteis após análise dos materiais.

Para o ensaio colaborativo do método de detecção de cloro e hipoclorito, o início do momento da análise foi fixado em 48 horas após o fim do preparo dos materiais de teste, enquanto que, para o ensaio colaborativo do método de detecção de peróxido, esse momento foi de 24 horas após a preparação dos materiais.

II.2.4.5 Análise estatística

Os dados brutos dos colaboradores foram avaliados em relação a erros grosseiros de transcrição ou digitação (Ellison & Fearn, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2016). Os dados brutos foram empregados na realização de análise de componentes principais (PCA) para avaliação de agrupamentos entre os laboratórios participantes que poderiam influenciar os resultados da validação interlaboratorial.

Os resultados apresentados por cada laboratório foram avaliados com base nos parâmetros: TFP, TFN, TCF, ACO e CON. As taxas estimadas foram designadas como satisfatórias quando TCF foi maior ou igual a 83; 85,7 ou 87,5% para materiais distribuídos em seis, sete ou oito replicatas, respectivamente. ACO e CON foram determinadas como sendo aceitáveis quando os valores estimados foram maiores ou iguais a 0,67; 0,71 ou 0,75, conforme o número de materiais distribuídos (seis, sete ou oito, respectivamente). Estes critérios foram baseados na possibilidade de se obter um falso resultado para cada concentração de adulteração (Gondim et al., 2014).

Além disso, foram estimados os intervalos de predição para a probabilidade de detecção de cada método (Macarthur & Holst, 2012; Gondim, Junqueira & Souza, 2016).

II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

II.3.1.1 Cloro e hipoclorito

Testes preliminares

A etapa dos testes preliminares foi realizada em três baterias analíticas para avaliação do ponto de perda de confiabilidade e definição da faixa de concentração a ser estudada nas etapas seguintes da validação. Na primeira bateria, foram analisadas amostras adicionadas de hipoclorito de sódio em níveis de concentração entre 0,24 e 0,024%, sendo obtidos 100% de resultados positivos na primeira etapa de identificação de cloro livre em todos os níveis. Na segunda bateria analítica, níveis entre 0,0168 e 0,0012% foram avaliados, fornecendo TFN entre 0 e 50% na primeira etapa do teste e de 0% na segunda etapa. Amostras adicionadas entre 0,0012 e 0,00024% foram avaliadas na terceira bateria analítica, na qual foram obtidas TFN entre 40 e 100% para na primeira etapa e entre 0 e 100%, na segunda etapa de identificação de hipoclorito.

Desse modo, a faixa de concentração foi definida como os menores níveis nos quais foram obtidos TFN entre 0 e 100% nas duas etapas do método, ao longo dos testes preliminares, ou seja, 0,0003 e 0,0141% de hipoclorito de sódio.

Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Na análise das amostras brancas (sem adição), o método apresentou TST e TCF de 100% e TFP nula, para as duas etapas do método de ensaio. Esses resultados indicaram que os componentes da matriz não interferiram na seletividade do método.

Os valores estimados para TFN, TSB e TCF em cada nível estudado são apresentados na **Tabela II.5**. Na etapa de identificação de cloro livre, os valores de TFN, TSB e TCF não apresentaram variação até o nível de concentração 0,007% de hipoclorito de sódio, sendo estimados em 100%, 0% e 0%, respectivamente. Entre os níveis 0,0077 e 0,0130%, os valores dessas taxas sofreram grande variação. Nos níveis 0,0134 e 0,0141%, os valores observados para TFN, TSB e TCF foram 0%, 100% e 100%, respectivamente. Assim, a etapa posterior de identificação de hipoclorito não foi realizada para as amostras adicionadas de hipoclorito de sódio nestas concentrações. Na etapa de identificação de hipoclorito, até o nível 0,0013%, foram obtidas TFN de 100%, resultando em TSB e TCF nulas. A partir do nível 0,0045, foram observadas TFN de 0%, resultando em TSB e TCF de 100%.

Silva (2013), em estudo para avaliação da sensibilidade dos métodos de detecção de conservantes e neutralizantes em leite, avaliou amostras de leite cru adicionadas de solução de hipoclorito de sódio 2,0 a 2,5%, solução de cloro a 750 ppm (ou 0,075%) e detergente alcalino clorado nos níveis de 0,5; 0,1 e 0,05% (v/v). Resultados positivos foram obtidos somente nas amostras adicionadas de 0,5% de solução de hipoclorito de sódio 2,0-2,5%, o que corresponderia à adição entre 0,010-0,013% de hipoclorito. No estudo de validação do método, 100% de resultados positivos foram observados em amostras adicionadas em concentrações inferiores, até 0,0045% de hipoclorito de sódio.

Tabela II.5 Taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB), de confiabilidade (TCF) e valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos para cada concentração de hipoclorito de sódio estudada

| Hipoclorito de sódio (%) | Etapa de identificação de cloro livre | | | | | | | Etapa de identificação de hipoclorito | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|---------------------------------------|-------------|--------------------|-------------------------|------|------|------|
| | N | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | ACO (bateria analítica) | | | CON | n | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | ACO (bateria analítica) | | | CON |
| | | | | 1 | 2 | 3 | | | | | 1 | 2 | 3 | |
| 0 | 30 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0003 a | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0013 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0019 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 96,7 | 3,3 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0026 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 53,3 | 46,7 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,5 |
| 0,0032 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 16,7 | 83,3 | 0,8 | 0,8 | 0,5 | 0,7 |
| 0,0038 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 6,7 | 93,3 | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0045 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0051 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0058 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0064 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0070 | 30 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 30 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0077 | 30 | 96,7 | 3,3 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | 29 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0083 | 30 | 90,0 | 10,0 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,8 | 27 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0090 | 30 | 80,0 | 20,0 | 1,0 | 0,8 | 0,4 | 0,6 | 24 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0096 | 30 | 70,0 | 30,0 | 1,0 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 21 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0102 | 30 | 86,7 | 13,3 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,7 | 26 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0109 | 30 | 36,7 | 63,3 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 11 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0115 | 30 | 16,7 | 83,3 | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 0,7 | 5 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0122 | 30 | 16,7 | 83,3 | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 0,7 | 5 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | n.a. |
| 0,0130 | 30 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | 1 | 0,0 | 100,0 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| 0,0134 e | 30 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| 0,0141 | 30 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |

*TFP e TST estimadas somente para amostras não adulteradas, ou seja, com 0% de hipoclorito de sódio; n = número de replicatas analisadas; n.a. = parâmetro não calculado. Valores de ACO e CON destacados em cinza são pertencentes à região de perda de confiabilidade (RPC).

Na **Figura II.9**, estão ilustrados as curvas de desempenho e os pontos observados para ambas as etapas do método de detecção de cloro e hipoclorito. Os resíduos da regressão seguiram a distribuição normal, foram homoscedásticos e independentes ($p > 0,05$). Na primeira etapa do método de identificação de cloro livre, a RPC foi observada entre os níveis de concentração 0,0082 e 0,0131%, enquanto na segunda etapa do método de identificação de hipoclorito, a RPC foi estimada entre 0,0019 e 0,0036%. Assim, o LD obtido para a etapa de identificação de cloro livre foi aproximadamente quatro vezes o LD determinado para a etapa de identificação de hipoclorito. Desse modo, o LD do método pode ser fixado em 0,0036%, uma vez que, a partir desse nível de concentração, 95% das amostras adulteradas serão corretamente identificadas com resultados positivos independente da etapa do método considerada.

O LD estimado demonstrou uma capacidade do método em detectar a presença de hipoclorito em baixas concentrações, que poderiam estar associadas tanto à adição fraudulenta de conservante, quanto à uma contaminação não intencional por produtos clorados empregados na sanitização de equipamentos e instalações de obtenção e processamento do leite.

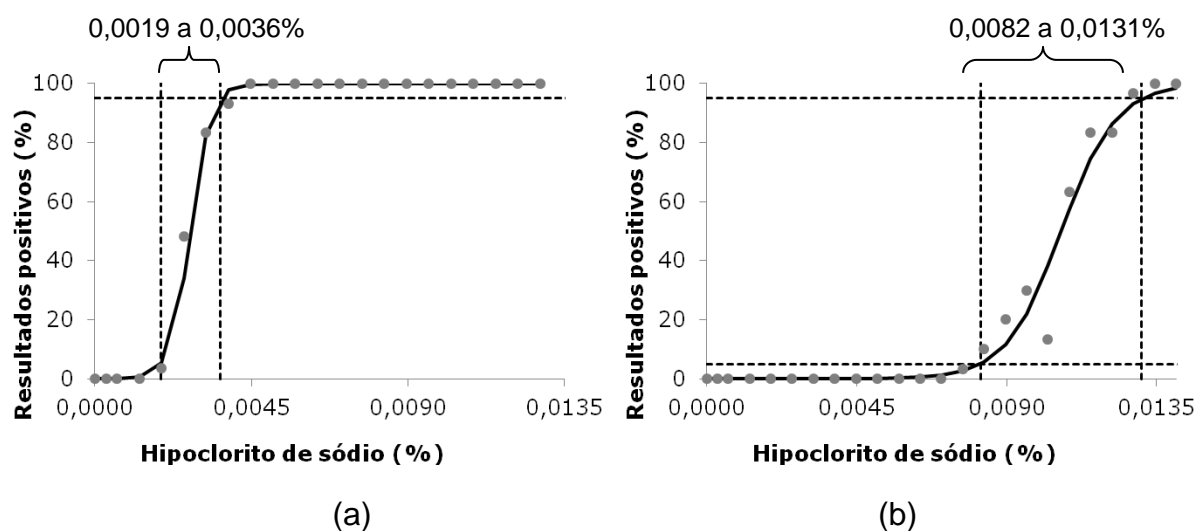


Figura II.9 Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo de logito) com respectivas regiões de perda de confiabilidade (área delimitada pelas linhas pontilhadas) e pontos experimentais (●) para o método de detecção de cloro e hipoclorito em leite, sendo (a) etapa de identificação de cloro livre e (b) etapa de identificação de hipoclorito.

Considerando as concentrações externas à RPC, na primeira etapa do método, foram obtidas ACO iguais a 1 nas três baterias analíticas, resultando em valores de CON também iguais a 1 e indicando a padronização do método em condições de repetibilidade e precisão intermediária. Na primeira bateria, o valor máximo de ACO (igual a 1) foi obtido até 0,0102% de hipoclorito de sódio. Na etapa da identificação de hipoclorito, valores de ACO e CON foram estimados em 1,0 fora da RPC. No entanto, para a etapa de identificação de hipoclorito, a CON só pôde ser avaliada entre os níveis 0,0003 e 0,0070%, para os quais o número de amostras analisadas foi o mesmo para as três baterias analíticas.

Seletividade – interferentes

Os resultados da avaliação da seletividade indicaram que o método não é seletivo para o peróxido, uma vez que foram obtidas TFP e TCF de 100 e 0%,

respectivamente, na análise das amostras brancas adicionadas somente de peróxido de hidrogênio. De fato, a publicação Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (IAL, 2008) indica a mesma metodologia de detecção de cloro e hipoclorito descrita na IN 68/2006 para detecção de peróxido de hidrogênio em leite. Assim, novos estudos de validação para esse método podem ser realizados para inclusão do peróxido de hidrogênio no escopo de aplicação do mesmo.

Robustez

Na avaliação da robustez, os fatores selecionados tanto para a primeira etapa do método (marca dos reagentes iodo e amido), quanto para a segunda (tempo e temperatura de aquecimento), não alteraram o desempenho do método, uma vez que foram obtidas TCF $\geq 90\%$ em todos os experimentos.

II.3.1.2 Peróxido de hidrogênio – método do guaiacol

Testes preliminares

Os testes preliminares envolveram em três baterias analíticas para definição das faixas de concentração a serem estudadas nas etapas seguintes da validação.

Na primeira bateria analítica, amostras adicionadas de peróxido de hidrogênio entre 0,00025 e 0,005% foram analisadas. Para o menor nível avaliado, foram obtidos 100% de resultados negativos, enquanto que para o maior nível de concentração 100% de resultados positivos foram observados. Os resultados dessa bateria analítica de testes preliminares indicaram que os ensaios para validação do método poderiam ser realizados com amostras adicionadas de peróxido de hidrogênio em concentrações entre 0,00025 e 0,005%.

Estudos demonstram que, em altas concentrações, o peróxido de hidrogênio pode inibir a formação do tetraguaiacol, responsável pela coloração salmão característica do resultado positivo do método (Koduri & Tien, 1995). Desse modo, uma segunda bateria analítica foi realizada com o intuito de se determinar a faixa de concentração na qual resultados negativos fossem novamente obtidos. Amostras contendo entre 0,05 e 0,3% de peróxido de hidrogênio foram analisadas. A obtenção de 100% de resultados positivos nos níveis analisados indicou a necessidade de realização de uma terceira bateria analítica. Para essa bateria, amostras adicionadas de peróxido entre 0,2 e 2,2% forneceram 100 e 0% de resultados positivos.

Assim, para as etapas posteriores da validação do método, foram definidas duas faixas de peróxido de hidrogênio, correspondentes às concentrações entre 0,0001 e 0,0022% (Faixa 1) e entre 0,1 e 2,2% (Faixa 2).

Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Os resultados obtidos para TFP, TFN, TST, TSB e TCF, para ambas as faixas de concentração, são apresentados na **Tabela II.6**. Na análise das amostras não adulteradas, foram obtidas TFP de 0%, o que indicou que a não interferência da matriz leite na TST do método. Para a Faixa 1, TFN de 100% foram obtidas entre os níveis 0,0001 e 0,0005%, enquanto 0% de TFN foram estimadas para os níveis 0,0021 e 0,0022%. Valores intermediários de TFN, entre 83,3 e 3,3%, foram observados entre os níveis 0,0006 e 0,0020%. Já para a Faixa 2, TFN de 0% foi obtida entre os níveis 0,1 e 0,8% e TFN de 100% para as concentrações 2,1 e 2,2% de peróxido. Os valores intermediários de TFN variaram entre 10 e 93,3%. Apesar de apresentar valores intermediários de TFN maiores, considerando os 22 níveis avaliados em cada Faixa, a Faixa 2 apresentou uma menor frequência de resultados falso-negativos que a Faixa 1.

No estudo conduzido por Silva (2013), amostras de leite foram adicionadas de 0,05; 0,1 e 0,5% (v/v) de solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Para essas amostras, não foram obtidos resultados positivos somente para as amostras contendo 0,05% de solução de peróxido. No estudo de validação aqui reportado, a análise das amostras adicionadas 0,0015% de peróxido (0,05% de solução de peróxido 3%) forneceram 83,3% de resultados positivos. Já para as amostras adicionadas de 0,1 e 0,5% de solução de peróxido 3% (que corresponderiam à adição de 0,003 e 0,015% de peróxido), foram obtidos, ainda nos testes preliminares, 100% de resultados positivos.

A aplicação da metodologia de *attenuated total reflectance mid-infrared microspectroscopy* (MIR-microspectroscopy) na detecção e quantificação de adulteração em leite foi avaliada por Santos, Pereira-Filho & Rodrigues-Saona (2013). Nesse trabalho, amostras de leite foram adulteradas com diversas substâncias em diferentes concentrações. Considerando as amostras adicionadas de peróxido de hidrogênio, o método permitiu a identificação de amostras adulteradas com concentrações maiores ou iguais a 0,0019%, resultado semelhante ao LD obtido para a Faixa 1 do método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio.

Em ambas as faixas de concentração analisadas, foram obtidos valores de ACO e CON iguais a 1, o que indicou uma adequada padronização do método em condições de repetibilidade e precisão intermediária (**Tabela II.6**).

RPC foram determinadas entre os níveis 0,0003 e 0,0017% e entre 0,8 e 1,9% para as Faixas 1 e 2, respectivamente (**Figura II.10**), com confirmação das premissas dos resíduos da regressão ($p > 0,05$). Assim, os níveis 0,0017 e 0,8% foram estimados como os LD de cada uma destas Faixas.

A obtenção de resultados falso-negativos em altas concentrações de peróxido de hidrogênio indicou uma falta de adequação do método ao seu propósito de uso. Estudos posteriores devem ser realizados de modo a investigar se a não formação do tetraguaiacol se deve à inibição ou à degradação da enzima peroxidase pelo peróxido de hidrogênio. Caso a inibição seja reversível, uma etapa de diluição pode ser avaliada em amostras de resultados negativos, afim de que o analito seja detectado caso esteja presente em níveis maiores que 0,8%. Além disso, o método do óxido de vanádio poderia ser utilizado na confirmação da presença de peróxido.

Tabela II.6 Taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB), de confiabilidade (TCF) e valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos para os níveis de concentração de peróxido de hidrogênio estudados

| Peróxido de hidrogênio (%) | TFP* ou TFN | TCF e TST* ou TSB | ACO (bateria analítica) | | | CON |
|----------------------------|-------------|-------------------|-------------------------|-----|-----|-----|
| | | | 1 | 2 | 3 | |
| 0,00 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Faixa 1 | | | | | | |
| 0,0001 a 0,0005 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0006 | 83,3 | 16,7 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 0,7 |
| 0,0007 | 66,7 | 33,3 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,5 |
| 0,0008 | 66,7 | 33,3 | 0,5 | 1,0 | 0,5 | 0,5 |
| 0,0009 | 66,7 | 33,3 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,6 |
| 0,0010 | 53,3 | 46,7 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 0,4 |
| 0,0011 | 46,7 | 53,3 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 0,0012 | 33,3 | 66,7 | 0,5 | 0,6 | 0,4 | 0,5 |
| 0,0013 | 20,0 | 80,0 | 0,6 | 0,8 | 0,5 | 0,7 |
| 0,0014 | 16,7 | 83,3 | 0,8 | 1,0 | 0,5 | 0,7 |
| 0,0015 | 16,7 | 83,3 | 0,8 | 0,6 | 0,6 | 0,7 |
| 0,0016 | 10,0 | 90,0 | 0,8 | 1,0 | 0,6 | 0,8 |
| 0,0017 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,0018 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,0019 | 6,7 | 93,3 | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 0,9 |
| 0,0020 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,0021 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0022 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Faixa 2 | | | | | | |
| 0,1 a 0,7 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,8 | 10,0 | 90,0 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,8 |
| 0,9 | 13,3 | 86,7 | 1,0 | 0,5 | 0,8 | 0,8 |
| 1,0 | 16,7 | 83,3 | 1,0 | 0,5 | 0,6 | 0,7 |
| 1,1 | 40,0 | 60,0 | 1,0 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |
| 1,2 | 40,0 | 60,0 | 1,0 | 0,5 | 0,6 | 0,4 |
| 1,3 | 53,3 | 46,7 | 0,8 | 0,8 | 0,5 | 0,4 |
| 1,4 | 56,7 | 43,3 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,4 |
| 1,5 | 66,7 | 33,3 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,5 |
| 1,6 | 73,3 | 26,7 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,6 |
| 1,7 | 83,3 | 16,7 | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 0,7 |
| 1,8 | 80,0 | 20,0 | 0,5 | 0,6 | 1,0 | 0,7 |
| 1,9 | 80,0 | 20,0 | 0,4 | 1,0 | 0,8 | 0,6 |
| 2,0 | 93,3 | 6,7 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 2,1 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 2,2 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

*TFP e TST estimadas somente para amostras não adulteradas, ou seja, com 0% de peróxido de hidrogênio. Valores de ACO e CON destacados em cinza indicam região de perda de confiabilidade (RPC).

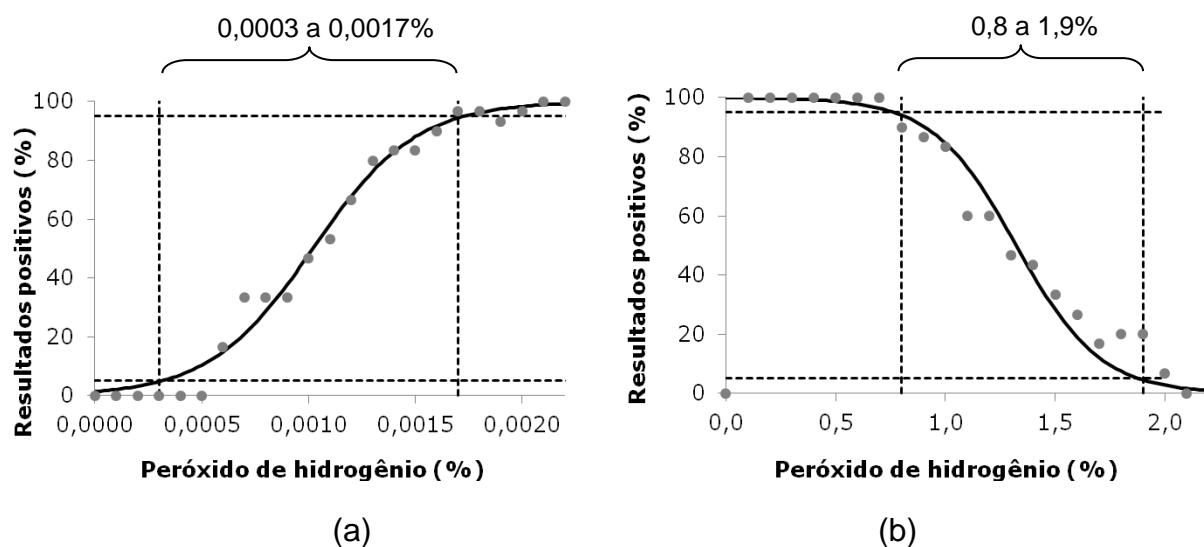


Figura II.10 Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo de Boltzman) com respectivas regiões de perda de confiabilidade (área delimitada pelas linhas pontilhadas) e pontos experimentais (●) para o método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio em leite, sendo (a) Faixa 1 - níveis de concentração entre 0,0001 e 0,0022%% e (b) Faixa 2 - níveis de concentração entre 0,1 e 2,2%%.

Seletividade - interferentes

O método foi considerado seletivo para o interferente hipoclorito de sódio, uma vez que não foram observadas alterações na TCF (100%), tanto na análise das amostras adicionadas quanto naquelas não adicionadas de peróxido de hidrogênio.

Robustez

A robustez foi demonstrada para os três fatores (tempo de aquecimento e marcas dos reagentes álcool etílico e guaiacol) e níveis testados, sendo obtidas TCF de 100% em todos os experimentos realizados.

II.3.1.3 Peróxido de hidrogênio – método do óxido de vanádio

Testes preliminares

Foram realizadas três baterias analíticas para definição da faixa de concentração de peróxido a ser avaliada nas etapas posteriores da validação. Na primeira bateria, foram analisadas amostras adicionadas de peróxido em níveis de concentração 0,0006; 0,0024 e 0,0036%, para os quais obteve-se TFN de 80, 100 e 100%, respectivamente. A segunda bateria envolveu amostras adicionadas em cinco entre 0,0006 e 0,0054%, sendo obtidas TFN de 100% em todos os níveis. Amostras adicionadas em cinco níveis de concentração entre 0,01 e 0,055% foram preparadas para a última bateria e obteve-se TFN entre 0 e 100%.

Buscando comparar a eficiência do método do óxido de vanádio com o método do guaiacol, uma quarta bateria analítica foi conduzida. Nessa etapa, amostras foram adicionadas de peróxido de hidrogênio em cinco níveis de concentração entre 0,1 e 2,0%. A obtenção de 100% de resultados positivos em todos os níveis estudados indicou a adequação do método para detecção em altas concentrações de peróxido, sendo a faixa de concentração entre 0,0050% e 0,055% selecionada para a etapa seguinte do processo de validação.

Taxas, acordância, concordância, região de perda de confiabilidade e limite de detecção

Na análise das amostras sem adição de peróxido de hidrogênio, foram obtidos TFP nula e TST de 100,0%, o que indicou a não interferência dos componentes da matriz na análise. Nas amostras adicionadas, TFN variaram de 86,7% a 0,0%, acarretando TSB de 13,3 a 100,0%, este último valor obtido para todos os níveis acima de 0,045% de peróxido (**Tabela II.7**).

Tabela II.7 Taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB), de confiabilidade (TCF) e valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos para os níveis de concentração de peróxido de hidrogênio estudados

| Peróxido de hidrogênio (%) | TFP* ou TFN | TST* ou TSB e TCF | ACO (bateria analítica) | | | CON |
|----------------------------|-------------|-------------------|-------------------------|-----|-----|-----|
| | | | 1 | 2 | 3 | |
| 0,00 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0050 | 86,7 | 13,3 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0075 | 80,0 | 20,0 | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,7 |
| 0,0100 | 66,7 | 33,3 | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,6 |
| 0,0125 | 73,3 | 26,7 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 0,4 |
| 0,0150 | 63,3 | 36,7 | 0,8 | 0,5 | 1,0 | 0,5 |
| 0,0175 | 60,0 | 40,0 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,5 |
| 0,020 | 50,0 | 50,0 | 0,8 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 0,025 | 30,0 | 70,0 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,4 |
| 0,030 | 13,3 | 86,7 | 0,5 | 1,0 | 0,4 | 0,5 |
| 0,035 | 20,0 | 80,0 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,7 |
| 0,040 | 6,7 | 93,3 | 0,6 | 1,0 | 0,5 | 0,6 |
| 0,045 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,050 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,055 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

*TFP e TST estimadas somente para amostras não adulteradas, ou seja, com 0% de peróxido de hidrogênio. Valores de ACO e CON destacados em cinza indicam região de perda de confiabilidade (RPC).

Após confirmação das premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos da regressão, a RPC foi estimada entre 0,0 e 0,042% de peróxido de hidrogênio, sendo LD estabelecido como o limite superior da RPC (0,042%), valor superior ao LD estimado para a Faixa 1 na validação do método do guaiacol para pesquisa de peróxido de hidrogênio (LD de 0,0017%) (**Figura II.11**). O método proposto por Santos, Pereira-Filho & Rodriguez-Saona (2013), discutido anteriormente, também apresentou melhor desempenho na detecção de peróxido de hidrogênio.

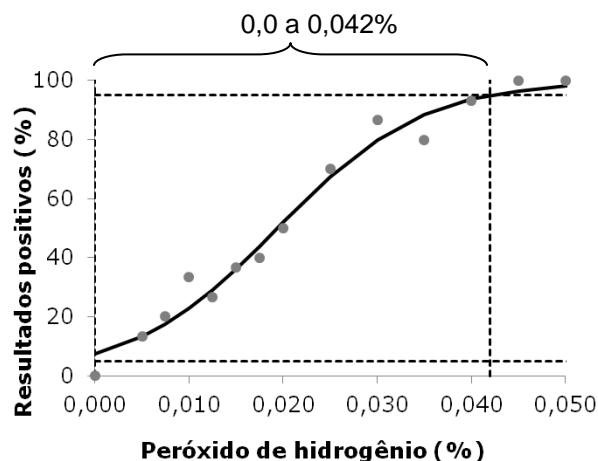


Figura II.11 Curva de desempenho obtida por regressão não linear (modelo probito) com respectiva região de perda de confiabilidade (área delimitada pelas linhas pontilhadas) e pontos experimentais (●) para o método do óxido de vanádio para pesquisa de peróxido de hidrogênio em leite

Em relação à ACO e CON, foram obtidos valores iguais a 1 para os níveis externos à RPC, demonstrando a padronização do método nas condições de repetibilidade e precisão intermediária avaliadas.

Seletividade - interferentes

O método de óxido de vanádio para pesquisa de peróxido de hidrogênio em leite apresentou seletividade para o hipoclorito de sódio, uma vez que a TCF foi de 100% para amostras não adulteradas e adicionadas de peróxido.

Robustez

A robustez do método também foi observada, com 100% de TCF para as amostras analisadas com as diferentes marcas de ácido sulfúrico e óxido de vanádio.

II.3.2 AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (FITNESS FOR PURPOSE)

Na **Tabela II.8**, são apresentados os valores médios para a contagem microbiana de amostras de leite cru não adulteradas e adicionadas de conservantes. Os valores foram transformados em valores logaritmos para melhor interpretação dos resultados. A variação observada nos valores de UFC.mL⁻¹ médios para os diferentes tratamentos não foi significativa ($p > 0,05$). A presença desses conservantes nas amostras de leite foi detectada pelos métodos qualitativos previamente validados quatro horas após o preparo das mesmas. Desse modo, os resultados indicaram que uma maior quantidade de conservante (hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogênio) deveria ser adicionada às amostras de leite para se obter uma redução significativa da contagem microbiana.

Tabela II.8 Valores médios (n=3) para contagem microbiana para amostras de leite cru não adulteradas e adulteradas com conservantes

| Tipo de amostra | Amostra 1 | | Amostra 2 | |
|--|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | UFC.mL ⁻¹ | log UFC.mL ⁻¹ | UFC.mL ⁻¹ | log UFC.mL ⁻¹ |
| Sem adição de conservante | 5,03x10 ³ | 3,70 ^a | 4,63 x10 ³ | 3,67 ^a |
| Adição de 0,004% de hipoclorito de sódio | 5,67x10 ³ | 3,75 ^a | 4,60 x10 ³ | 3,66 ^a |
| Adição de 0,04% de peróxido de hidrogênio* | 2,37x10 ³ | 3,37 ^a | 1,35 x10 ³ | 3,13 ^a |
| Adição de 0,002% de peróxido de hidrogênio** | 2,47x10 ³ | 3,39 ^a | 2,12 x10 ³ | 3,33 ^a |

* Concentração correspondente ao limite de detecção (LD) do método do óxido de vanádio de detecção de peróxido de hidrogênio; ** Concentração correspondente ao LD inferior do método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio.

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferiram entre si pelo teste t ($p > 0,05$).

Em estudo para avaliação do efeito inibidor do crescimento de aeróbios mesófilos promovido por substâncias conservantes em leite cru, Silva (2013) verificou uma redução significativa na contagem desses microrganismos em amostras de leite adicionadas de conservantes em concentrações bastante superiores aos LD estabelecidos para os métodos de detecção de conservantes. Naquele estudo, a contagem de microrganismos passou de 7,19 para 6,18 e 5,84 logUFC.mL⁻¹ para

amostras adulteradas com 0,1% de peróxido de hidrogênio e 0,5% de hipoclorito de sódio respectivamente, após 24 horas de refrigeração.

II.3.3 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL

II.3.3.1 Testes de homogeneidade e estabilidade

A homogeneidade foi observada para todos os materiais de teste preparados para a validação dos métodos de detecção de conservantes (cloro e hipoclorito e de peróxido de hidrogênio – método do guaiacol) com 100% de TCF o que correspondeu a 0% de TFP e 0% de TFN, respectivamente, tanto para materiais de teste não adulterados quanto para os adulterados. No método do cloro e hipoclorito, os materiais que continham 0,013% de hipoclorito de sódio forneceram resultados positivos na primeira etapa do procedimento analítico do método, indicando a presença de cloro livre.

A estabilidade em curto prazo dos materiais de teste foi demonstrada para os materiais preparados para o ensaio colaborativo do método de cloro e hipoclorito. Para o delineamento isócrono, os resultados indicaram que falhas na manutenção das condições de temperatura durante o transporte não afetariam os resultados. Foram observadas 100% de TCF para todos os materiais de teste submetidos aos três tratamentos com refrigeração, incubação de 30 até 40 °C, durante 4 e 8 horas. No delineamento clássico para avaliação da estabilidade, TCF de 100% foram obtidas para todos os materiais analisados no prazo máximo para a análise estabelecido para os colaboradores (48 horas após ordenha), como observado no momento da preparação dos materiais (tempo zero).

Vale ressaltar, no entanto, que nos estudos de estabilidade do método do cloro e hipoclorito, ao contrário do observado no teste de homogeneidade, os resultados positivos foram observados somente na segunda etapa do procedimento, indicando que apesar de ser possível a detecção da fraude por adição de hipoclorito de sódio, o tempo e temperatura de armazenamento dos materiais influenciam na detecção de cloro livre, ou seja, de concentrações mais altas de adulteração.

Considerando os materiais preparados para avaliação do método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio, a estabilidade não foi observada para os materiais adicionados de 0,4% do conservante em ambos os delineamentos isócrono e clássico, para os quais foram obtidos 0% de TCF. Já para os materiais não adulterados e adicionados de 0,0021% de peróxido de hidrogênio, TCF de 100% foram calculadas, indicando a estabilidade desses materiais mantidos em condições críticas e ideais de armazenamento e transporte.

II.3.3.2 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA não indicou agrupamentos que demonstrassem diferenças entre os grupos de laboratórios. Pela análise da **Figura II.12**, observou-se que os grupos estão alinhados em relação à primeira componente principal (PC1) que reteve mais de 94% da variabilidade dos dados.

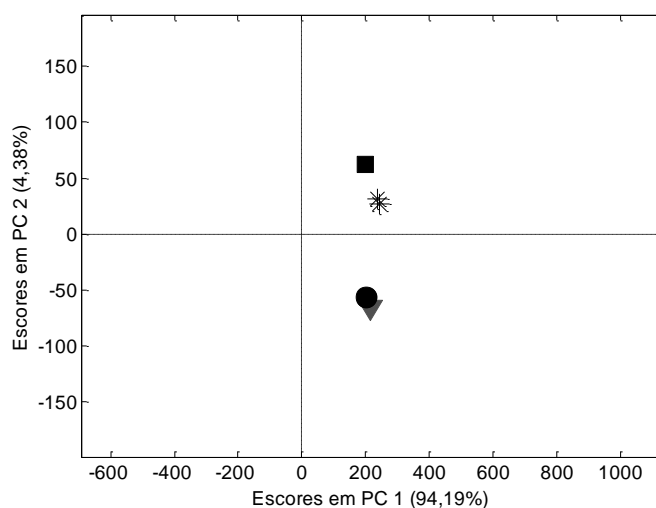


Figura II.12 Gráficos de escores da análise de componentes principais (PCA).

▼ = laboratórios de órgãos oficiais de fiscalização e regulamentação; ● = laboratório de Universidade; ■ = laboratórios de indústrias de laticínios; * = laboratórios privados de análise de alimentos

II.3.3.3 Ensaios colaborativos

Cloro e hipoclorito

Considerando os resultados individuais de cada colaborador, valores insatisfatórios de TCF foram observados somente para os laboratórios 5 e 7 na análise dos materiais que continham 0,005% de hipoclorito de sódio, tendo o laboratório 5 reportado resultados negativos para todos esses materiais, ou seja, ACO de 1,0 (**Tabela II.9**). Devido aos resultados obtidos nos testes de homogeneidade esses resultados não puderam ser atribuídos à preparação dos materiais. Uma vez que o método validado foi aquele descrito na IN 68/2006 (Brasil, 2006), não foi enviado aos laboratórios colaboradores um padrão de cor, assim os resultados apresentados pelo laboratório 5 podem ter sido uma consequência do padrão de visualização de cor estabelecido por esse Laboratório. De modo geral, para todos os materiais de teste, os resultados foram satisfatórios (TCF \geq 82% e CON \geq 0,68) confirmando a sensibilidade, seletividade e precisão do método de detecção de cloro e hipoclorito.

Tabela II.9 Valores de taxa de falso-positivos (TFP), taxa de falso-negativos (TFN), taxa de confiabilidade (TCF), acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos para detecção de cloro e hipoclorito em leite

| Número do laboratório | Hipoclorito de sódio (%) | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|
| | 0,0 | | | 0,005 | | | 0,013 | | |
| | TFP | TCF | ACO | TFN | TCF | ACO | TFN | TCF | ACO |
| 1 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 2 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 3 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 4 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 5 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 100,0 | 0,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 6 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 14,3 | 85,7 | 0,71 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 7 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 28,6 | 71,4 | 0,52 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 8 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| Total | 0,0 | 100,0 | - | 17,9 | 82,1 | - | 0,0 | 100,0 | - |
| CON | | 1,00 | | | 0,68 | | | 1,00 | |
| n | | 48 | | | 56 | | | 56 | |

Valores de TCF, ACO e CON destacados em cinza indicam resultados insatisfatórios.

n = total de materiais de teste analisados pelos laboratórios.

A literatura não dispõe de estudos de validação interlaboratorial para esse método. No entanto, a seletividade e sensibilidade do método foram confirmadas pelo cálculo dos intervalos predição para probabilidade de detecção, conforme proposto por Macarthur & Holst (2012), com probabilidade de obtenção de falso-positivo nula e probabilidade de detecção de 0,82 e 1,00 para os materiais contendo 0,004 e 0,0134% de hipoclorito de sódio (**Tabela II.10**). Além disso, as pequenas diferenças entre os limites de probabilidade ($\leq 0,17$), consequência da variação entre os resultados dos laboratórios, indicaram a precisão intermediária de método.

Tabela II.10 Parâmetros estatísticos e limites inferiores (5%) e superiores (95%) estimados para probabilidade de detecção do método qualitativo para detecção de cloro e hipoclorito em leite

| Hipoclorito de sódio (%) | <i>N</i> | <i>X</i> | <i>P</i> | <i>s_R</i> | Limite inferior | Limite superior |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 48 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,039 |
| 0,004 | 56 | 46 | 0,82 | 0,0435 | 0,726 | 0,893 |
| 0,0134 | 56 | 56 | 1,00 | 0,00 | 0,966 | 1,000 |

N = total de análises, *X* = total de resultados positivos; *P* = probabilidade de detecção média estimada para o reconstituente; *s_R* = desvio padrão das estimativas de probabilidade de detecção individuais dos laboratórios (Macarthur & Holst, 2012).

Peróxido de hidrogênio (método do guaiacol)

Na **Tabela II.11**, são apresentados os valores de TFP, TCF, TFN, ACO e CON estimados no ensaio colaborativo para validação interlaboratorial do método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio em leite. Para os materiais adicionados de 0 e 0,0021% de peróxido, todos os parâmetros de desempenho calculados foram satisfatórios. Para os materiais que continham 0,4% de peróxido de hidrogênio, três laboratórios relataram 100% de TFN, o que acarretou em TCF de 0%. Apesar desses resultados indicarem a ACO para os laboratórios em questão, a CON para os materiais com 0,4% de peróxido não foi satisfatória. A obtenção de resultados negativos para esse nível pode ter sido consequência de diferenças no padrão de visualização da cor salmão por parte desses laboratórios, já que, como no ensaio colaborativo do método de cloro e hipoclorito, um padrão de cor não foi enviado aos laboratórios colaboradores.

Contudo, de modo geral, os resultados do ensaio confirmam os indícios da validação intralaboratorial de que o método do guaiacol, apesar de ser apresentar seletividade e baixo LD, apresenta problemas de sensibilidade em altas concentrações de peróxido. Na validação intralaboratorial, no nível 0,4% foi obtido 100% de resultados positivos. No entanto, vale ressaltar que, nessa etapa de validação, o tempo entre o preparo das amostras e análise foi minimizado, enquanto no ensaio colaborativo, a análise se deu 24 horas após o preparo dos materiais.

Tabela II.11 Valores de taxa de falso-positivos (TFP), taxa de falso-negativos (TFN), taxa de confiabilidade (TCF), acórdância (ACO) e concordância (CON) obtidos na validação interlaboratorial dos métodos qualitativos para detecção de peróxido de hidrogênio (método do guaiacol) em leite

| Número do laboratório | Peróxido de hidrogênio (%) | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|-------|------|--------|-------|------|-------|-------|------|
| | 0,0 | | | 0,0021 | | | 0,4 | | |
| | TFP | TCF | ACO | TFN | TCF | ACO | TFN | TCF | ACO |
| 1 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 100,0 | 0,0 | 1,00 |
| 2 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 3 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 4 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 5 | 12,5 | 87,5 | 0,75 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 6 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 |
| 7 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 100,0 | 0,0 | 1,00 |
| 8 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 0,0 | 100,0 | 1,00 | 100,0 | 0,0 | 1,00 |
| Total | 1,6 | 98,4 | - | 0,0 | 100,0 | - | 37,5 | 62,5 | - |
| CON | | 0,97 | | | 1,00 | | | 0,46 | |
| n | | 64 | | | 48 | | | 48 | |

Valores de TCF, ACO e CON destacados em cinza indicam resultados insatisfatórios.

n = total de materiais de teste analisados pelos laboratórios.

Resultados similares foram observados quando os resultados foram analisados conforme Marcarthur & Holst (2012) (**Tabela II.12**). A probabilidade de obtenção de resultado falso-positivo foi de 0,016, enquanto a probabilidade de detecção variou de 1,00 a 0,50 para os materiais de ensaio contendo 0,0021 e 0,4% de peróxido de hidrogênio. Esses resultados confirmaram a seletividade do método e a sensibilidade em baixas concentrações do conservante. A precisão intermediária também foi observada pelos limites dos intervalos de probabilidade de detecção para os materiais contendo 0 e 0,0021% de peróxido. Para os materiais contendo 0,4% de peróxido, a

probabilidade de detecção teve um maior intervalo, ratificando a limitação do método nessa concentração.

Tabela II.12 Parâmetros estatísticos e limites inferiores (5%) e superiores (95%) estimados para probabilidade de detecção do método qualitativo do guaiacol para detecção de peróxido de hidrogênio em leite

| Peróxido de hidrogênio (%) | <i>N</i> | <i>X</i> | <i>P</i> | <i>s_R</i> | Limite inferior | Limite superior |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 64 | 1 | 0,016 | 0,0055 | 0,0028 | 0,0595 |
| 0,0021 | 48 | 48 | 1,000 | 0,0000 | 0,9610 | 1,0000 |
| 0,4 | 48 | 30 | 0,500 | 0,0668 | 0,3900 | 0,7324 |

N = total de análises, *X* = total de resultados positivos; *P* = probabilidade de detecção média estimada para o reconstituente; *s_R* = desvio padrão das estimativas de probabilidade de detecção individuais dos laboratórios (Macarthur & Holst, 2012).

II.3.3.4 Comentários dos colaboradores

Os laboratórios não enviaram comentários nos respectivos formulários de recebimento de amostras e de registro de resultados da análise.

II.4 CONCLUSÕES

No método de cloro e hipoclorito, os parâmetros de desempenho foram avaliados para as duas etapas de identificação descritas na legislação. A segunda etapa do método, de identificação de hipoclorito, estabelecido como o limite de detecção do método foi de 0,0036%. O método apresentou padronização e robustez satisfatórias. No entanto, foi observada a falta de seletividade em relação ao peróxido de hidrogênio.

No método do guaiacol para detecção de peróxido de hidrogênio, duas faixas de concentração foram avaliadas. Os limites de detecção estimados (0,0017 e 0,8%), demonstraram a limitação desse método na detecção de peróxido, em concentrações acima de 0,8%. Apesar de não apresentar falsos resultados em altas concentrações de peróxido, o método do óxido de vanádio apresentou limite de detecção superior (0,042%). Os métodos de detecção de peróxido foram considerados adequados em relação aos parâmetros de acordância, concordância, seletividade na presença de interferentes e robustez.

Como os níveis de adulterantes correspondentes aos limites de detecção determinados não foram capazes de reduzir significativamente a carga microbiana original do leite, foi confirmada a adequação dos métodos para a detecção de conservantes em leite cru.

Tanto para o método do cloro e hipoclorito quanto para o método do guaiacol de detecção de peróxido de hidrogênio, a validação interlaboratorial confirmou os resultados obtidos na etapa prévia de avaliação desses métodos, apesar de alguns laboratórios terem apresentado desempenho inferior aos demais, o que pode ter ocorrido em função de diferenças nos padrões de visualização de resultado positivos estabelecidos em cada laboratório.

CAPÍTULO III - VALIDAÇÃO DA PROVA DO ÁCIDO ROSÓLICO PARA DETECÇÃO DE FRAUDE EM LEITE POR NEUTRALIZANTES DE ACIDEZ

RESUMO

A neutralização com agentes alcalinos é uma das formas mais comuns de adulteração do leite, sendo empregada para ocultar a alteração do leite sofrida pelo excesso de acidez causado pelo crescimento microbiano. O método do ácido rosólico de pesquisa de neutralizantes de acidez em leite foi validado por processos intra e interlaboratoriais. Os parâmetros característicos de métodos qualitativos foram avaliados para versões oficial e modificada da prova. Foram pesquisados os neutralizantes: bicarbonato de sódio (BI), carbonato de sódio (CA), hidróxido de sódio (HI) e citrato de sódio (CI). Na validação intralaboratorial, para ambas as versões do método, sensibilidade, seletividade e padronização adequada foram observadas. Para os analitos testados, limites de detecção entre 0,0133 e 0,09% entre 0,0094 e 0,07% foram estimados para o método oficial e modificado, respectivamente. Na avaliação da adequação ao propósito de uso, o método apresentou-se adequado para a detecção de hidróxido de sódio, embora tenham sido observadas limitações na detecção dos demais neutralizantes em amostras de leite cru com níveis de acidez acima dos limites permitidos. O método modificado, que apresentou melhor desempenho em relação ao parâmetro de incerteza, foi selecionado para a validação interlaboratorial. Nesse processo, amostras de leite cru com acidez de 0,19% foram neutralizadas em diferentes concentrações de BI; CA; HI e CI. Tais amostras foram enviadas a oito laboratórios representantes de diferentes setores da cadeia produtiva de leite. Os resultados do estudo colaborativo confirmaram o desempenho do método em relação aos parâmetros de seletividade e acórdância. No entanto, em relação à sensibilidade e precisão intermediária, o desempenho do método foi inferior ao obtido na etapa de validação intralaboratorial.

Palavras-chave: validação de métodos, provas qualitativas, detecção de fraude em leite cru, neutralizantes de acidez

III.1 INTRODUÇÃO

A neutralização do leite com agentes alcalinos é a adulteração mais comum, depois da fraude por adição de água. Esse tipo de fraude é empregado para mascarar a alteração do leite sofrida pelo excesso de acidez. O aumento da acidez do leite, causado pelo crescimento de bactérias e produção de ácido láctico, está frequentemente associado às falhas nas boas práticas de produção que podem ocorrer ao longo da cadeia produtiva do leite, desde a ordenha até o recebimento nas plataformas das indústrias de laticínios (Tronco, 2010, Embrapa, 2016).

A adição de substâncias neutralizantes, no entanto, pode alterar a composição química do leite, modificando também sua qualidade e, conseqüentemente, dificultando o processamento do leite e seus derivados e trazendo riscos à saúde do consumidor (Sharma & Paradakar, 2010; Santos, Pereira-Filho & Rodrigues-Saona, 2013; Rodrigues, 2015).

A pesquisa de neutralizantes está prevista entre as provas do controle diário de qualidade do leite cru refrigerado a ser realizado pelo estabelecimento industrial (Brasil, 2011). De acordo com a Instrução Normativa (IN) número 68 de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária de Abastecimento (MAPA), duas provas qualitativas podem ser empregadas para detecção de neutralizantes de acidez em leite: a prova do ácido rosólico e da fenolftaleína (Brasil, 2006).

Em comum com as demais provas qualitativas para controle da qualidade do leite, estudos envolvendo avaliações de desempenho dessas provas qualitativas somente vêm sendo citados na literatura nos últimos anos (Silva et al., 2015), porém sem atendimento às recentes tendências sobre a validação de métodos qualitativos (Trullols et al., 2004; Macarthur & Holst, 2012, AOAC, 2013; Gondim et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a adequação da prova qualitativa do ácido rosólico para a detecção de neutralizantes de acidez em leite cru, propor modificações no procedimento analítico para melhoria do desempenho dessa prova e validar por processos interlaboratoriais a versão modificada desse método.

III.2 MATERIAIS E MÉTODOS

III.2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Equipamentos e instrumentos de medição empregados foram calibrados por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), de acordo com a norma ISO / IEC 17025 e incluíram: balanças (AUX 220, Shimadzu; e BK 300, Gehaka), balões volumétricos, banho termostático (314-8DN, Nova Ética), crioscópio, (PZL 900, PZL), densímetro de leite (5784, Incotherm), micropipetas (LM 10000, Soluções Lab HTL; Finnpiquette F3, Thermo Scientific; e Transferpette S, Bre) e termômetros (7665.02.0.00, Incotherm).

Todos os compostos utilizados no preparo das soluções reagentes e de analitos foram de grau analítico para análise. Os reagentes foram adquiridos de duas marcas distintas, enquanto os analitos de somente um fornecedor. Ácido rosólico, álcool etílico, carbonato de sódio e hidróxido de sódio foram fornecidos por Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, SP, Brasil) foi a fornecedora do ácido rosólico, citrato de sódio, fenolftaleína e hidróxido de sódio. Bicarbonato de sódio e fenolftaleína foram adquiridos de Alphatec (São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Álcool etílico também foi obtido de FMAIA (Belo Horizonte, MG, Brasil).

III.2.2 MÉTODO

No método do ácido rosólico descrito na IN 68/2006 (Brasil, 2006), a presença de neutralizantes na amostra de leite é revelada pela ação do indicador ácido rosólico, sendo a observação de coloração vermelho-carmim a indicação de resultado positivo para presença de neutralizantes (**Figura III.1**).

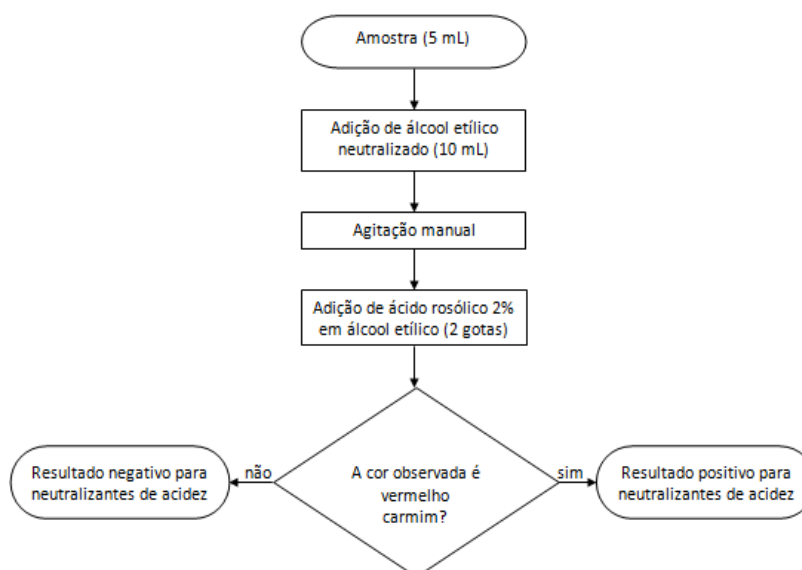


Figura III.1 Fluxograma do método qualitativo oficial do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite.

Diferentes faixas de viragem para o ácido rosólico são relatadas na literatura. Segundo Ritter (1956), o ácido rosólico possui coloração amarela em pH ácido e vermelha em pH básico com ponto de viragem próximo ao pH 7. De acordo com Tronco (2010), a faixa de viragem do ácido do rosólico se dá entre 6,8 e 8,9. Em relação ao leite, os componentes ionizados e ionizáveis se encontram em equilíbrio de grande importância em química de laticínios, no qual atuam diferentes substâncias tais como dióxido de carbono, proteínas, citratos, lactatos e fosfatos. Essas substâncias, principalmente em valores de pH entre 5 e 6, atuam como tampões (Silva, 1997; Sherbon, 1998), ou seja, têm a capacidade de resistir a variações no pH quando há adição de ácido ou base, ou diluição da solução.

Como dito anteriormente, o método do ácido rosólico está baseado em reações ácido-base, tendo o ácido rosólico como indicador. Assim, a adição de compostos neutralizantes poderia não ser identificada por essa prova, já que a quantidade de neutralizante adicionada ao leite poderia reagir com o ácido láctico em excesso, resultando em amostra com valores de pH e acidez dentro dos padrões (Milagres, 2008; Silva et al., 2015).

III.2.3 OTIMIZAÇÃO

As cores formadas para amostras brancas e adicionadas foram observadas em relação ao critério de resultado positivo estabelecido na legislação, ou seja, observação de cor vermelho-carmim. No caso obtenção de elevada frequência de resultados falso-negativos no intervalo de concentração estudado, uma modificação no critério de observação de resultado positivo foi proposta.

Além disso, nessa etapa, as cores visualizadas para resultados positivos e negativos foram comparadas com cores apresentados por Krause (2010), com o objetivo de se estabelecer um padrão de cor no sistema RGB (*Red*, *Green* e *Blue*) para os resultados para o método.

III.2.4 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

A validação dos métodos qualitativos, nas versões oficial e modificada, foi conduzida de acordo com o procedimento descrito por Gondim et al. (2014).

III.2.4.1. Amostras

Em cada etapa experimental, amostras de leite cru (5 L) foram retiradas de tanque de armazenamento refrigerado após ordenha mecânica de, no mínimo, 20 vacas da Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG). Tais amostras foram homogeneizadas, acondicionadas em galões de polipropileno devidamente fechados com tampa de rosca e identificados, e mantidas sob refrigeração (2 a 7°C) para transporte imediato ao laboratório. As amostras foram analisadas, em triplicata, em relação aos parâmetros densidade, crioscopia e acidez, conforme métodos descritos na IN 68/2006 (Brasil, 2006), para verificação da conformidade em relação aos valores regulamentados na IN 62/2011 (Brasil, 2011). As amostras foram mantidas nesta mesma faixa de temperatura até o início dos experimentos. A representação da amostragem realizada para as etapas de otimização e validação é apresentada na **Figura III.2.**

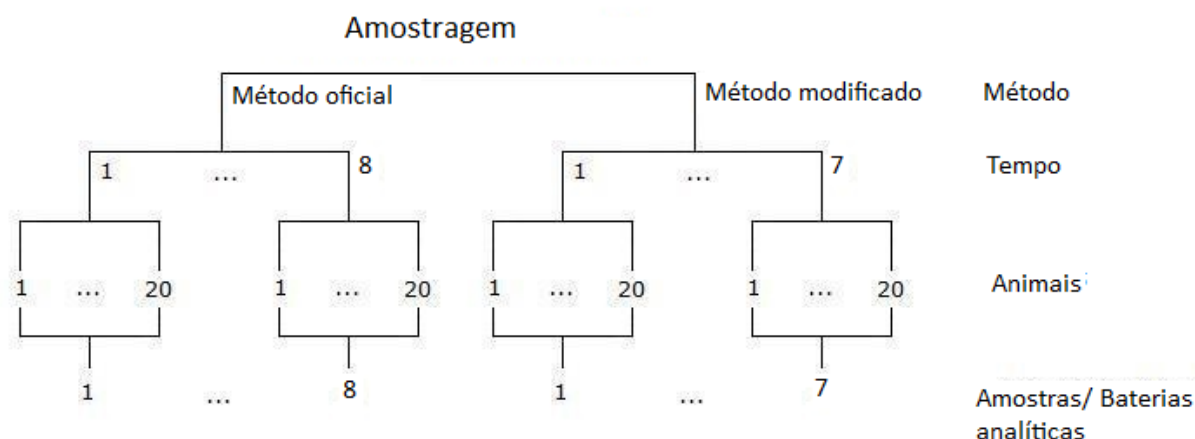


Figura III.2 Representação do procedimento de amostragem de leite cru utilizado para as etapas de otimização e validação dos métodos do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez.

Baterias analíticas: 1= otimização; 2 = validação – testes preliminares; 3 = validação -estudo de taxas, região de perda de confiabilidade (RPC), limite de detecção (LD), acórdância (ACO) e concordância (CON) – bateria analítica 1; 4 = validação -estudo de taxas, RPC, LD, ACO e CON – bateria analítica 2; 5 = validação -estudo de taxas, RPC, LD, ACO e CON – bateria analítica 3; 6 = validação - estudo de seletividade na presença de interferentes; 7 = validação - estudo de robustez; 8 = validação –avaliação complementar de adequação ao propósito de uso.

No caso dos experimentos de validação intralaboratorial, as análises das amostras ocorreram no intervalo máximo de 48 horas após a ordenha, máximo permitido para recebimento de leite cru nas indústrias, conforme estabelecido na IN 62 MAPA (Brasil, 2011), o que assegurou a simulação das condições ideais de recebimento de leite pelos laticínios.

III.2.4.2. Testes preliminares

A faixa de concentração a ser avaliada nas etapas seguintes da validação foi estabelecida após análise de amostras adicionadas em cinco níveis de concentração de cada analito, em dez replicatas por nível. A obtenção de taxa de falso-negativos (TFNs) entre 0 e 100% indicou adequação da faixa de concentração. Novas baterias

analíticas com níveis de concentração distintos foram realizadas, caso esses valores de TFN não fossem alcançados (Gondim et al., 2014).

III.2.4.3. Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Amostras de leite cru adicionadas em diferentes níveis de concentração igualmente espaçados, sendo 30 replicatas independentes por nível, mais o branco (amostra sem adição), foram analisadas de acordo com o descrito por Gondim et al. (2014) (**Tabela III.1**).

Taxa de falso-positivos (TFP), TFN, taxa de sensibilidade (TSB), taxa de seletividade (TST) e taxa de confiabilidade (TCF) foram calculadas por fórmulas baseadas em tabelas de contingência. A região de perda de confiabilidade (RPC) e o limite de detecção (LD) foram estimados por regressão logística, sendo os limites da RPC correspondentes às concentrações referentes a 0,05 e 0,95 de probabilidade de se obter resultados positivos e o LD correspondente ao limite superior da RP, sendo verificadas as premissas da regressão, conforme proposto por Souza & Junqueira (2005). Acordância (ACO) e concordância (CON) foram calculadas por equações baseadas em análise combinatória (Gondim et al., 2014).

Tabela III.1 Analitos, critérios para resultados positivos, números de níveis e faixas de concentração avaliados na validação dos métodos qualitativos oficiais para detecção de neutralizantes da acidez em leite cru

| Analito | Método* | Critério para resultado positivo* | Número de níveis | Faixa de concentração (%) |
|----------------------|------------------------------------|---|------------------|---------------------------|
| Bicarbonato de sódio | Oficial - método do ácido rosólico | Oficial – cor vermelho-carmim | 20 | 0,0025 a 0,0500 |
| | | Modificado – cor diferente de amostra branca não-cega | | |
| Carbonato de sódio | | Oficial – cor vermelho-carmim | 20 | 0,0025 a 0,0500 |
| | | Modificado – cor diferente de amostra branca não-cega | | |
| Hidróxido de sódio | Oficial - método do ácido rosólico | Oficial – cor vermelho-carmim | 11 | 0,0025 a 0,0275 |
| | | Modificado – cor diferente de amostra branca não-cega | | |
| Citrato de sódio | | Oficial – cor vermelho-carmim | 13 | 0,03 a 0,15 |
| | | Modificado – cor diferente de amostra branca não-cega | | |

*Métodos e critérios oficiais, conforme IN 68/2006 (Brasil, 2006).

III.2.4.4. Robustez

A influência das marcas dos reagentes (ácido rosólico e álcool etílico) na detecção de cada neutralizante foi avaliada nesse estudo de robustez, sendo empregadas duas marcas de cada reagente. As amostras foram adicionadas dos analitos nos menores níveis de concentração os quais foram obtidas TCF de 100% na segunda etapa da validação para ambos os métodos considerados (oficial e modificado), conforme apresentado na **Tabela III.2**. Para cada método validado, as amostras foram preparadas e analisadas aleatoriamente, sob condições de repetibilidade, sendo 10 replicatas por tratamento, todas cegas. Os métodos foram considerados robustos para os fatores e níveis testados quando a TCF era maior ou igual a 90% (Gondim et al., 2014).

Tabela III.2 Concentrações dos analitos, fatores e níveis avaliados no estudo da robustez dos métodos qualitativos oficiais para detecção de neutralizantes da acidez em leite cru

| Método | Analito | Concentração do analito (%) | Fatores e níveis |
|---|----------------------|-----------------------------|---|
| Neutralizantes de acidez - método do ácido rosólico | Bicarbonato de sódio | 0,0425 e 0,0275 | 1. Marca reagente |
| | Carbonato de sódio | 0,0250 | ácido rosólico |
| | Hidróxido de sódio | 0,0175 | a. A b. B |
| | Citrato de sódio | 0,08 e 0,09 | 2. Marca reagente álcool etílico a. A b. B |

III.2.5 AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (*FITNESS FOR PURPOSE*)

Um estudo foi realizado para verificação da faixa de viragem do ácido rosólico e também uma avaliação da relação entre acidez e o pH de amostras de leite. Para isso, amostras de leite cru com níveis de acidez dentro e acima do limite permitido pela legislação (Brasil, 2011) foram adicionadas de neutralizantes em dois níveis de concentração, sendo três replicatas por nível. Bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio foram adicionados em concentrações entre 0,01 e 0,05%. Citrato de sódio foi adicionado às amostras de leite cru em concentrações equivalentes a 0,10 e 0,15%. Antes e após adição do neutralizante, as amostras eram submetidas a análises para determinação de pH, acidez e ainda ao método qualitativo do ácido rosólico (Brasil, 2006).

III.2.6 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL

A validação interlaboratorial do método modificado do ácido rosólico foi conduzida de acordo com o processo descrito no Capítulo I, com adaptações em função de aspectos práticos, e incluiu as seguintes etapas: i) preparação dos materiais de teste, ii) avaliação da homogeneidade e estabilidade, iii) distribuição dos materiais,

iv) análise de dados e v) divulgação do relatório de resultados (AOAC, 2002; Langton et al., 2002; Ellison & Fearn, 2005; Thompson, Ellison & Wood, 2006; Macarthur & Holst, 2012; Gondim, Junqueira & Souza, 2016) (**Figura III.3**).

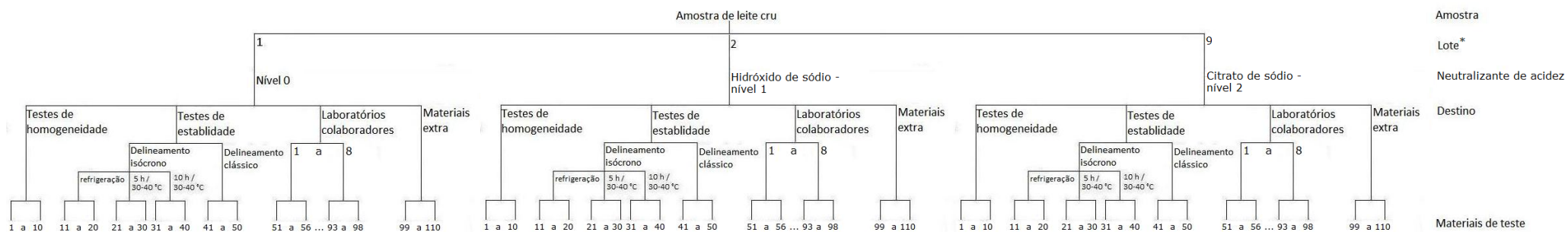


Figura III.3 Delineamento experimental do processo de validação interlaboratorial do método do ácido rosólico modificado para detecção de neutralizantes de acidez em leite.

*Lotes: 2 - hidróxido de sódio (nível 1); 3 - hidróxido de sódio (nível 2); 4- bicarbonato de sódio (nível 1); 5- bicarbonato de sódio (nível 2); 6- carbonato de sódio (nível 1); 7- carbonato de sódio (nível 2); 8- citrato de sódio (nível 1); e 9 - citrato de sódio (nível 2).

III.2.6.1 Preparação dos materiais de teste

Uma amostra de leite cru de aproximadamente 5 L foi retirada de tanque de armazenamento refrigerado da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária de Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG) foi transportada ao Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA) sob refrigeração (4-7 °C) em galão de polipropileno.

A preparação dos materiais de teste foi realizada quando a amostra de leite cru obtida atingiu nível de acidez de aproximadamente 0,19 mg/L, ou seja, acima do permitido pela legislação brasileira (Brasil, 2011), o que ocorreu em aproximadamente 24 horas após recolhimento da amostra.

Em seguida, a amostra foi dividida em nove lotes para preparação dos materiais de teste. O primeiro lote foi utilizado para preparo dos materiais de teste sem adição de neutralizante. Os demais lotes foram adicionados de solução aquosa de cada neutralizante para obtenção de dois níveis de concentração de cada composto, totalizando oito lotes de material de teste adulterado. Cada composto foi adicionado em níveis correspondentes às concentrações superiores e inferiores nas quais foram obtidas 100% TCF para os quatro compostos avaliados no processo de validação intralaboratorial.

Cada lote foi misturado continuamente num agitador mecânico (Fisatom 713T) a 22.6 x g. O leite foi transferido, com auxílio de provetas (100 e 500 mL), para recipientes plásticos de 1 L e homogeneizado durante 10 minutos. Em seguida, as soluções aquosas dos neutralizantes de acidez foram incorporadas com auxílio de macropipetas e os lotes homogeneizados por mais 10 minutos. Os volumes de leite e solução de neutralizantes adicionados para produção de cada lote de material de teste são apresentados na **Tabela III.3**.

Cada lote adulterado foi acondicionado em tubos cônicos de polipropileno de 15 mL, contendo 5 mL de material adulterado com neutralizantes de acidez, medidos com macropipeta. Os tubos foram fechados com tampas de rosca e rotulados com números de código que foram gerados aleatoriamente. Todos os materiais de teste foram mantidos sob refrigeração entre 4 e 7 °C. A quantidade de materiais de teste foi

suficiente para realização dos testes de homogeneidade, de estabilidade e dos ensaios colaborativos, além de um excedente, em caso de necessidade de materiais de substituição dos materiais.

Tabela III.3 Preparação dos materiais de teste para validação interlaboratorial do método do ácido rosólico modificado para detecção de neutralizantes de acidez em leite

| Concentração final do neutralizante (%) | Volume (mL) | | | Número de tubos | Volume por tubo (mL) |
|---|-------------|--------------------------|-------|-----------------|----------------------|
| | Leite cru | Solução do neutralizante | Total | | |
| 0,0 | 600 | - | 600 | 110 | 5 |
| Hidróxido de sódio | | | | | |
| 0,0175 | 593 | 7 | 600 | 110 | 5 |
| 0,0625 | 575 | 25 | 600 | 110 | 5 |
| Bicarbonato de sódio | | | | | |
| 0,0425 | 583 | 17 | 600 | 110 | 5 |
| 0,0625 | 575 | 25 | 600 | 110 | 5 |
| Carbonato de sódio | | | | | |
| 0,0275 | 589 | 11 | 600 | 110 | 5 |
| 0,0625 | 575 | 25 | 600 | 110 | 5 |
| Citrato de sódio | | | | | |
| 0,10 | 596 | 4 | 600 | 110 | 5 |
| 0,15 | 594 | 6 | 600 | 110 | 5 |

Solução aquosa de neutralizantes de acidez: 1,5%, exceto citrato de sódio: solução a 15%. As quantidades de leite e soluções aquosas dos reconstituintes foram ajustadas para obter valores exatos para a preparação dos materiais de teste o que, em alguns casos, acarretou sobra de material que não foi acondicionado.

III.2.6.2 Testes de homogeneidade e estabilidade

A homogeneidade e a estabilidade foram avaliadas para cada lote de material em condições de repetibilidade, conforme descrito no Capítulo I (Gondim, Junqueira & Souza, 2016), empregando o método qualitativo modificado previamente validado.

III.2.6.3 Organização do estudo interlaboratorial

Oito laboratórios participaram do Estudo Colaborativo, incluindo representantes de governo (três representantes), laboratórios de análises de alimentos (dois), de indústrias de laticínios (dois) e universidade (um).

Os materiais de teste, selecionados aleatoriamente a partir de cada lote de material, foram enviados aos laboratórios colaboradores em tubos cônicos de polipropileno de 15 mL contendo alíquotas correspondentes ao volume exato de

amostra necessário para realização das provas (5 mL). Os tubos foram fechados com tampas de rosca, rotulados com a codificação original e mantidos refrigerados durante o transporte para os colaboradores.

Os materiais foram entregues considerando o horário determinado para início da análise dos materiais. Cada laboratório colaborador recebeu 54 materiais de teste cegos e codificados, totalizando 486 resultados. Foram encaminhadas seis replicatas de material não adicionado de substância alcalina, seis replicatas de materiais contendo cada um dos quatro neutralizantes avaliados em dois níveis de concentração, totalizando 12 replicatas por substância alcalinizante.

Além dos materiais de teste, cada laboratório recebeu: i) uma amostra branca não cega, correspondente a uma replicata de amostra não adulterada como uma referência para observação de resultados; ii) cópia do método (procedimento analítico); iii) formulário para registro de dados analíticos (como data da análise, analista, identificação do laboratório, marcas e lotes dos reagentes, fabricantes e modelos dos equipamentos, certificados de calibração dos instrumentos de medição, tais como vidrarias utilizadas na preparação de soluções), os resultados (positivos ou negativos), observações (cor observada ou referência ao código de cor do Index Color), comentários e sugestões; e iv) formulário de recebimento de materiais. No **Anexo A**, são apresentados exemplos dos documentos enviados aos laboratórios.

No momento da recepção dos materiais de teste, os colaboradores avaliaram os seguintes parâmetros: i) temperatura dos materiais de teste; ii) integridade, fechamento e rotulagem (incluindo o código) dos tubos; iii) a presença da amostra branca; e iv) presença documentos (formulários e procedimento analítico).

Os colaboradores foram orientados a: i) manter as amostras refrigeradas até o momento das análises dos materiais; ii) realizar a análise de todas as amostras dentro do prazo, sob condições de repetibilidade (análise das amostras em uma única bateria analítica); iii) seguir rigorosamente o procedimento analítico fornecido; iv) informar ao organizador qualquer anormalidade ou perda de materiais de teste, de modo que uma nova remessa de materiais poderia ser enviada para substituição desde que dentro do prazo; e v) informar os resultados para o organizador no prazo máximo de dois dias após a data estabelecida para análise.

III.2.6.4 Análise estatística

Os dados brutos recebidos dos colaboradores foram previamente avaliados em relação a erros grosseiros de transcrição ou digitação (Ellison & Fearn, 2005; Gondim, Junqueira & Souza, 2106). A análise de agrupamentos hierárquica (HCA) com o critério do método de Ward (Ward, 1963) foi realizada com os dados brutos para avaliação de diferenças entre as classes de laboratórios participantes que pudessem influenciar os resultados da validação interlaboratorial dos métodos. Comentários e observações relatados pelos laboratórios colaboradores também foram avaliados.

A validação interlaboratorial dos métodos se deu através da avaliação dos parâmetros de desempenho TFP, TFN, TCF, ACO e CON, em cada concentração, e da estimativa dos intervalos de predição para a probabilidade de detecção (Macarthur & Holst, 2012; Gondim, Junqueira & Souza, 2016). As taxas estimadas foram consideradas satisfatórias quando as TCFs obtidas eram maiores ou iguais a 83.3%. Os valores de ACO e CON foram satisfatórios quando os valores estimados foram maiores ou iguais a 0,67 e 0,63, respectivamente. Estes critérios foram baseados na possibilidade de se obter um resultado falso para cada concentração de adulterante (Gondim et al., 2014).

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1 OTIMIZAÇÃO

O método oficial do ácido rosólico prevê a adição de álcool etílico neutralizado, sem especificação de concentração (Brasil, 2006). Nos estudos preliminares para avaliação da adequação do método, foi empregado álcool etílico absoluto (98%), o que acarretou em grande dificuldade na visualização dos resultados e alta taxa de falsos resultados (TFP e TFN \geq 50%).

A estabilidade térmica do leite pode ser testada pela prova do álcool, que tem por princípio a desestabilização das micelas de caseína pelo álcool e observação de coagulação por efeito da elevada acidez ou do desequilíbrio salino. Desse modo, amostras de leite com acidez elevada devem apresentar resultado positivo para esse teste. O teste consiste basicamente na adição de solução alcoólica ao leite em concentrações variáveis, dependendo do tratamento térmico a ser aplicado ao leite e da vida de prateleira esperada para o produto a ser obtido. A IN 68/2006 estabelece concentrações variáveis entre 68 e 80%, enquanto a IN 62/2011 prevê o uso de solução alcoólica a 72% para o controle diário de qualidade do leite cru refrigerado no estabelecimento industrial (Brasil, 2006; Brasil, 2011).

Amostras de leite com acidez em níveis normais (entre 0,14 e 0,18 mg/L) podem apresentar resultado positivo para a prova do álcool, sendo denominados leite instável não ácido (LINA). Estudos demonstram que sua coagulação pode ser afetada pelas concentrações dos sais disponíveis no meio, e que a adição de pequenas quantidades de cálcio e magnésio torna o leite positivo na prova do álcool, enquanto citrato e fosfato causam o efeito oposto. Dentre os fatores que também podem afetar a estabilidade do leite são citados: estação do ano, dieta e estágio da lactação (Zanela & Fischer, 2011; Embrapa, 2016). Para minimizar os efeitos da coagulação da amostra e facilitar a visualização dos resultados, optou-se por utilizar solução de álcool etílico a 68% neutralizada nas etapas posteriores.

Além disso, visando melhorar sua sensibilidade, um novo critério de observação de resultado positivo baseado na escala de cor previamente apresentada

foi sugerido: a observação de uma cor diferente da obtida para uma amostra branca (sem adulteração, com acidez dentro dos padrões) não cega. Na **Figura III.4**, são apresentadas as cores visualizadas para o método, assim como sua classificação no sistema RGB.

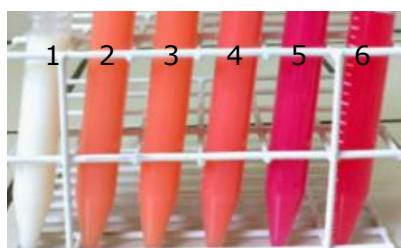


Figura III.4 Exemplos de cores observadas no método do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite.

1) amostra de leite cru sem adulteração: observação de cor branca (índice de cor: 255r 255g 255b); 2) amostra de leite cru sem adulteração, após adição de álcool etílico e ácido rosólico: observação de cor salmão (índice de cor: 247r 149g 91b) – RESULTADO NEGATIVO; 3) amostra de leite cru adulterada com neutralizante de acidez, após adição de álcool etílico e ácido rosólico: observação de cor salmão de **mesma** intensidade que amostra 2 (índice de cor: 247r 150g 91b) – RESULTADO NEGATIVO; 4) amostra de leite cru adulterada com neutralizante de acidez, após adição de álcool etílico e ácido rosólico: observação de cor rosa claro (índice de cor: 250r 128g 114b) ou salmão **mais intensa** que amostra 2 – RESULTADO POSITIVO; 5 e 6) amostras de leite cru adulteradas com neutralizante de acidez, após adição de álcool etílico e ácido rosólico: observação de cores rosa de tonalidades distintas (índices de cor: 220r 89g 92b e 220r 89g 103b) – RESULTADO POSITIVO.

A modificação da concentração da solução de álcool etílico e a inclusão do novo critério para observação de resultado positivo originaram um método modificado (**Figura III.5**), que foi também validado para avaliação de melhoria de desempenho do método do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite.

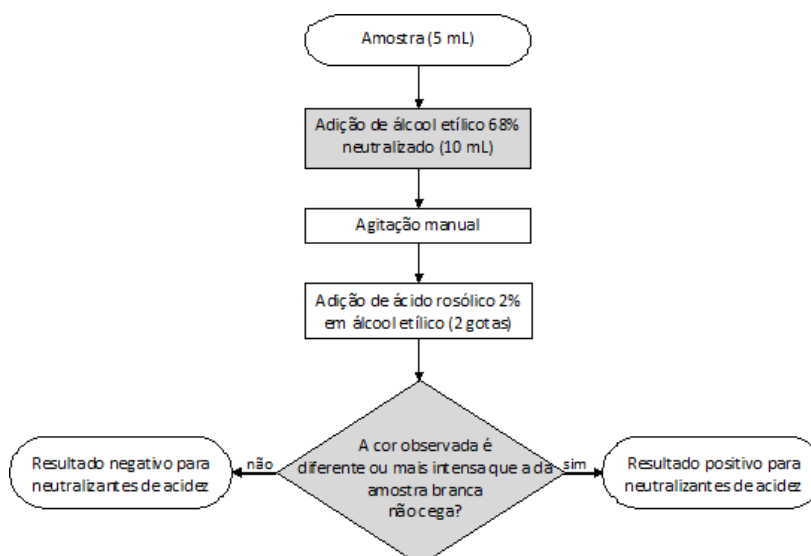


Figura III.5 Fluxograma do método qualitativo modificado do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite (etapas modificadas em cinza).

III.3.2 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

III.3.2.1 Testes preliminares

Os testes preliminares foram realizados em diferentes baterias analíticas para os quatro analitos envolvidos na validação. Para o bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, a faixa de concentração para a validação foi definida entre os níveis 0,0025 e 0,0500%. Faixa de concentração entre 0,0025 e 0,0275% foi estabelecida para o hidróxido de sódio. Já para o citrato de sódio, níveis entre 0,03 e 0,15% foram determinados para as etapas posteriores da validação.

III.3.2.2 Taxas, região de perda de confiabilidade, limite de detecção, acordância e concordância

Para os dois critérios de avaliação de resultados positivos, a análise das amostras brancas resultou em TST e TCF de 100% e TFP nula, indicando a seletividade do método de ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite cru em relação aos possíveis interferentes da matriz.

Nas amostras contendo bicarbonato de sódio, considerando o método oficial, foram obtidas TFN de 0% a partir do nível 0,0425%. Já no método modificado, 0% de TFN foi estimada a partir de 0,0275% de bicarbonato, apesar de TFN entre 10 e 3,3 terem sido observadas em níveis superiores (**Tabela III.4**). Na análise das amostras contendo carbonato de sódio, no método oficial, TFN de 0% foram obtidas a partir de 0,0225%. No entanto, para o método modificado, 0% de TFN foram estimadas a partir de 0,0250, sendo a exceção o nível 0,030%, no qual TFN foi calculada em 3,3% (**Tabela III.5**). Valores de TFN de 0% foram obtidos em níveis maiores ou iguais a 0,0175% para amostras adicionadas de hidróxido de sódio em ambos os métodos (**Tabela III.6**). Em relação ao citrato de sódio, no método oficial, TFN nula foi observada a partir das concentrações 0,09 e 0,08%, respectivamente, para os métodos oficial e modificado. No entanto, em níveis superiores, foram também obtidas TFN de 3,3% (**Tabela III.7**).

Amostras de leite adulteradas com hidróxido de sódio nas concentrações 0,01; 0,025 e 0,05% foram analisadas em triplicata pelo método do ácido rosólico. Nesse estudo de Silva (2013), somente para amostras adicionadas de 0,01% não foram obtidos resultados positivos. Resultados semelhantes foram obtidos na validação do método oficial, no qual para o nível 0,01 e acima de 0,02% foram observados 80 e 100% de resultados positivos, respectivamente. No método modificado, para o nível 0,01%, a taxa de resultados positivos foi ainda maior, 93,3%, indicando um melhor desempenho.

A metodologia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) foi utilizada na identificação de adulteração em leite cru pela adição de neutralizantes de acidez. Considerando as amostras adicionadas de bicarbonato de sódio com 0,05%, 100% das mesmas foram corretamente identificadas como adulteradas. Já para

amostras adicionadas de citrato de sódio, somente 93,9% das amostras contendo 0,075% de citrato foram corretamente identificadas como adulteradas (Cassoli, 2010). Resultados semelhantes foram observados no estudo de validação, tanto para o método oficial quanto para o modificado. Nas amostras contendo 0,05% de bicarbonato de sódio, ambos os métodos validados apresentaram 100% de resultados positivos, ou 100% de TCF. Já para amostras adulteradas com citrato de sódio nos níveis 0,07 e 0,08%, foram estimadas TCF de 86,7 e 100%, no método oficial, e de 93,3 e 100% no método modificado.

Considerando as amostras adicionadas de bicarbonato de sódio, valores de ACO e CON inferiores a 0,8 foram estimados para ambas as versões dos métodos (oficial e modificado), resultados que podem ser atribuídos principalmente ao desempenho da bateria analítica 1, na qual foram observados quase todos os resultados não satisfatórios. No entanto, para o método modificado, o desempenho da bateria analítica 1 somente afetou um valor de CON, podendo então o método ser considerado padronizado em condições de precisão intermediária (**Tabela III.4**).

Pela análise dos resultados de ACO e CON para o carbonato e citrato de sódio apresentados nas **Tabelas III.5 e III.7**, observa-se que, para os níveis externos à RPC, somente foram obtidos valores de ACO e CON maiores que 0,8, o que demonstrou a padronização, em condições de repetibilidade e precisão intermediária, de ambas as versões dos métodos considerando esses dois analitos.

Considerando as amostras adicionadas de hidróxido de sódio, não foram obtidos valores de ACO e CON inferiores a 0,8, exceto por uma ocorrência em cada método. Assim, a padronização dos métodos foi demonstrada em condições de repetibilidade e precisão intermediária (**Tabela III.6**).

Tabela III.4 Taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB), de confiabilidade (TCF) e valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos para bicarbonato de sódio

| Bicarbonato de sódio (%) | Método oficial | | | | | | Método modificado | | | | | |
|--------------------------|----------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-------------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|
| | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | ACO (bateria analítica) | | | CON | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | ACO (bateria analítica) | | | COM |
| 0,0000 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0025 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0050 | 90,0 | 10,0 | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 0,8 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0075 | 83,3 | 16,7 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 0,5 | 90,0 | 10,0 | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,8 |
| 0,0100 | 83,3 | 16,7 | 0,6 | 0,5 | 1,0 | 0,6 | 70,0 | 30,0 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,6 |
| 0,0125 | 73,3 | 26,7 | 0,5 | 0,4 | 1,0 | 0,5 | 63,3 | 36,7 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,5 |
| 0,0150 | 60,0 | 40,0 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 43,3 | 56,7 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| 0,0175 | 33,3 | 66,7 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 16,7 | 83,3 | 0,6 | 0,8 | 0,6 | 0,7 |
| 0,0200 | 16,7 | 83,3 | 1,0 | 0,8 | 0,5 | 1,0 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,0225 | 23,3 | 76,7 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 0,8 | 16,7 | 83,3 | 0,6 | 0,8 | 0,6 | 0,7 |
| 0,0250 | 20,0 | 80,0 | 1,0 | 0,8 | 0,4 | 1,0 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,0275 | 10,0 | 90,0 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0300 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0325 | 10,0 | 90,0 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 10,0 | 90,0 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,8 |
| 0,0350 | 10,0 | 90,0 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,6 | 6,7 | 93,3 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0375 | 10,0 | 90,0 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 6,7 | 93,3 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0400 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0425 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0450 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0475 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 3,3 | 96,7 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0500 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

*TFP e TST estimadas somente para amostras não adulteradas, ou seja, com 0% de neutralizante de acidez. Valores de ACO e CON sombreados pertencentes à região de perda de confiabilidade (RPC).

Tabela III.5 Taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB), de confiabilidade (TCF) e valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos para carbonato de sódio

| Carbonato de sódio (%) | Método oficial | | | | | | Método modificado | | | | | |
|------------------------|----------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-------------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|
| | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | ACO (bateria analítica) | | | CON | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | ACO (bateria analítica) | | | COM |
| | | | 1 | 2 | 3 | | | | 1 | 2 | 3 | |
| 0,0000 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0025 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0050 | 96,7 | 3,3 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0075 | 83,3 | 16,7 | 1,0 | 1,0 | 0,4 | 0,7 | 76,7 | 23,3 | 0,5 | 0,8 | 0,5 | 0,6 |
| 0,0100 | 80,0 | 20,0 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 0,7 | 56,7 | 43,3 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 0,0125 | 73,3 | 26,7 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 40,0 | 60,0 | 0,8 | 0,4 | 0,5 | 0,5 |
| 0,0150 | 40,0 | 60,0 | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 26,7 | 73,3 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,6 |
| 0,0175 | 16,7 | 83,3 | 0,8 | 0,8 | 0,5 | 0,7 | 6,7 | 93,3 | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 0,9 |
| 0,0200 | 10,0 | 90,0 | 0,8 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,0225 | 6,7 | 93,3 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | 3,3 | 96,7 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0250 | 6,7 | 93,3 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | 3,3 | 96,7 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,9 |
| 0,0275 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0300 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0325 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0350 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0375 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 |
| 0,0400 a | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 0,0500 | | | | | | | | | | | | |

*TFP e TST estimadas somente para amostras não adulteradas, ou seja, com 0% de neutralizante de acidez. Valores de ACO e CON sombreados pertencentes à região de perda de confiabilidade (RPC).

Tabela III.6 Taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB), de confiabilidade (TCF) e valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos para hidróxido de sódio

| Hidróxido de sódio | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | Método oficial | | | | CON | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | Método modificado | | | | CON |
|--------------------|-------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-------|-------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | | ACO (bateria analítica) | | | CON | | | | ACO (bateria analítica) | | | CON | |
| | | | 1 | 2 | 3 | | | | | 1 | 2 | 3 | | |
| 0,0000 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |
| 0,0025 | 100,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 96,7 | 3,3 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | | |
| 0,0050 | 80,0 | 20,0 | 0,4 | 1,0 | 0,8 | 0,6 | 70,0 | 30,0 | 0,5 | 0,6 | 1,0 | 0,5 | | |
| 0,0075 | 63,3 | 36,7 | 0,4 | 0,8 | 0,4 | 0,5 | 20,0 | 80,0 | 0,6 | 0,5 | 1,0 | 0,7 | | |
| 0,0100 | 20,0 | 80,0 | 0,8 | 0,5 | 0,8 | 0,7 | 6,7 | 93,3 | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 0,9 | | |
| 0,0125 | 10,0 | 90,0 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,8 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | | |
| 0,0150 | 10,0 | 90,0 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,8 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | | |
| 0,0175 a 0,0275 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |

*TFP e TST estimadas somente para amostras não adulteradas, ou seja, com 0% de neutralizante de acidez. Valores de ACO e CON sombreados pertencentes à região de perda de confiabilidade (RPC).

Tabela III.7 Taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de seletividade (TST), de sensibilidade (TSB), de confiabilidade (TCF) e valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos para citrato de sódio

| Citrato de sódio | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | Método oficial | | | | CON | TFP* ou TFN | TCF ou TST* ou TSB | Método modificado | | | | CON |
|------------------|-------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-------|-------------|--------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | | ACO (bateria analítica) | | | CON | | | | ACO (bateria analítica) | | | CON | |
| | | | 1 | 2 | 3 | | | | | 1 | 2 | 3 | | |
| 0 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 100,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |
| 0,03 | 80,0 | 20,0 | 1,0 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 70,0 | 30,0 | 0,8 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | | |
| 0,04 | 60,0 | 40,0 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 40,0 | 60,0 | 0,8 | 0,6 | 0,8 | 0,4 | | |
| 0,05 | 66,7 | 33,3 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,5 | 33,3 | 66,7 | 0,5 | 0,8 | 0,4 | 0,5 | | |
| 0,06 | 26,7 | 73,3 | 0,5 | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 6,7 | 93,3 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 0,9 | | |
| 0,07 | 13,3 | 86,7 | 0,5 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | 6,7 | 93,3 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | | |
| 0,08 | 13,3 | 86,7 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |
| 0,09 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |
| 0,10 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |
| 0,11 | 3,3 | 96,7 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |
| 0,12 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | 3,3 | 96,7 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | | |
| 0,13 e 0,15 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | | |

*TFP e TST estimadas somente para amostras não adulteradas, ou seja, com 0% de neutralizante de acidez. Valores de ACO e CON sombreados pertencentes à região de perda de confiabilidade (RPC).

Na **Figura III.6**, são apresentadas as curvas de desempenho e os pontos experimentais obtidos para os quatro neutralizantes de acidez e métodos oficial e modificado. As premissas da regressão foram confirmadas ($p > 0,05$). Para amostras adicionadas de bicarbonato de sódio, foram estimadas RPC entre 0,0036 e 0,0285% e entre 0,0050 e 0,0224%, para os métodos oficial e modificado, respectivamente. Em relação ao analito carbonato de sódio, o método oficial apresentou RPC entre 0,0064 e 0,0218%, enquanto o método modificado forneceu RPC entre 0,0033 e 0,0193%. Para os métodos oficial e modificado, foram calculadas RPC entre 0,0029 e 0,0133% e entre 0,0026 e 0,0094%, respectivamente, para amostras contendo hidróxido de sódio. Já para o citrato de sódio, RPC foram observadas entre os níveis 0,01 e 0,09% para o método oficial e entre 0,01 e 0,07% para o método modificado.

Observou-se, para os quatro analitos, redução nos LD (limites superiores das RPC) dos métodos modificados. No entanto, deve-se destacar que o método oficial foi validado com a concentração da solução alcoólica alterada, já que sem isso resultados confiáveis para o mesmo não foram obtidos. Além disso, a modificação proposta possibilitou uma redução da incerteza do método, o que pode ser observada pela diminuição da RPC.

Cassoli (2010) utilizou também a metodologia IVTF para desenvolvimento de método de detecção de adulterantes em leite cru, obtendo LD de 0,015 e 0,017% para o bicarbonato de sódio e citrato de sódio, respectivamente. Em relação aos LD obtidos nos estudos de validação do método do ácido rosólico, foram obtidos LD superiores tanto para o bicarbonato quanto para o citrato de sódio em ambas as versões (oficial e modificada) avaliadas. Contudo, vale ressaltar que o processo de validação realizado por Cassoli (2010), não foi conduzido de acordo com as premissas e orientações dos guias principais internacionais (EC, 2002; Thompson, Ellison & Wood, 2002; EURACHEM, 2014) e que, apesar da não existência de um guia específico para validação de métodos multivariados, metodologias de validação descritas para métodos univariados vem sendo adaptadas para adequada avaliação do desempenho desses métodos (Botelho, Mendes & Sena, 2013; Botelho et al., 2015).

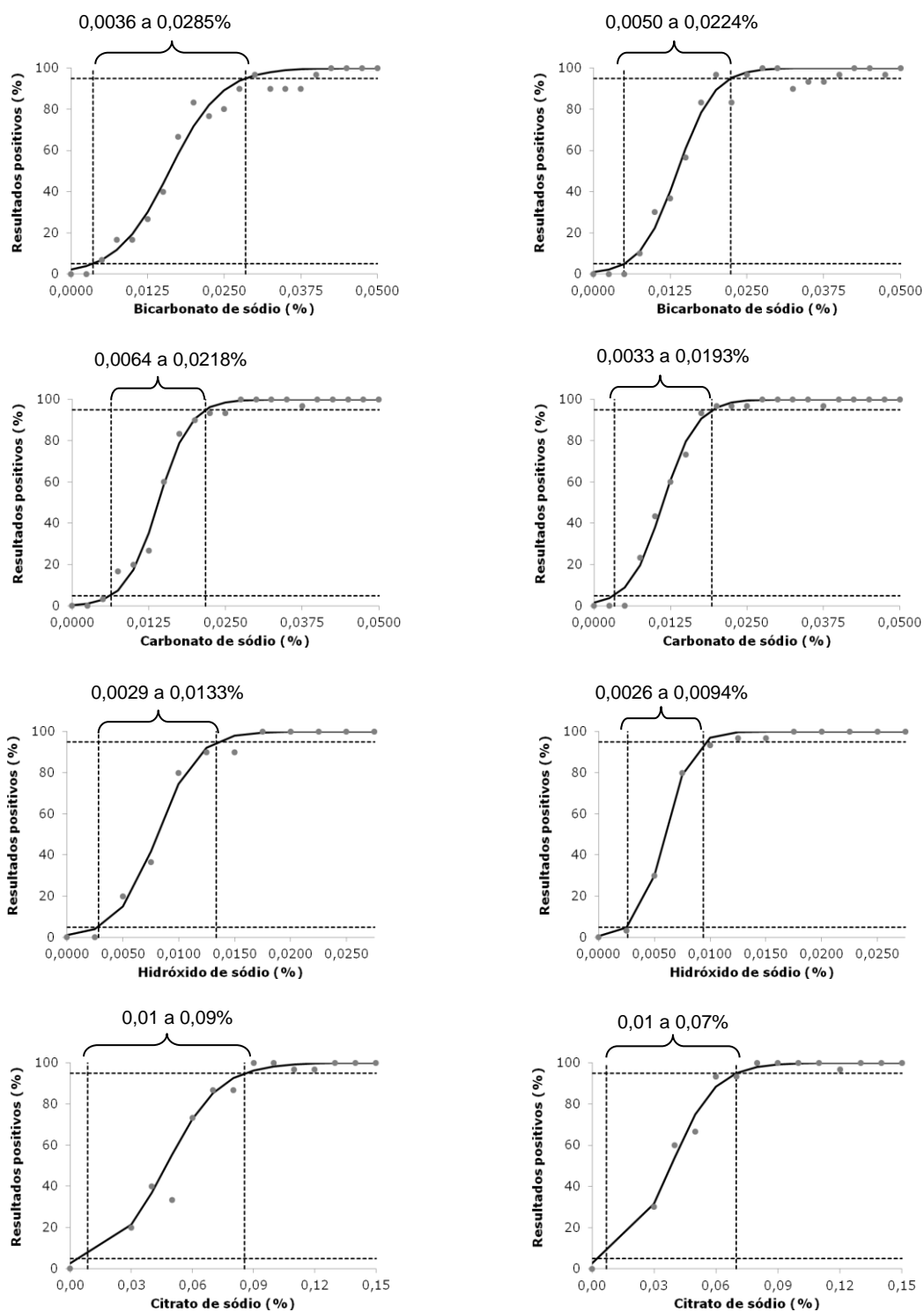


Figura III.6. Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear (modelo probito) com respectivas regiões de perda de confiabilidade (---) e pontos experimentais (●) para o método do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez.

Primeira coluna = método oficial; segunda coluna = método modificado.

III.3.2.3 Robustez

Na avaliação da robustez, a influência dos fatores marcas dos reagentes ácido rosólico e álcool etílico não foi observada, uma vez que foram obtidas TCF de 100% em todos os experimentos realizados, considerando os quatro neutralizantes de acidez avaliados e os métodos oficial e modificado.

III.3.3 AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO AO PROPÓSITO DE USO (FITNESS FOR PURPOSE)

Na **Figura III.7**, a escala de cor visualizada para as diferentes amostras analisadas pelo método do ácido rosólico é apresentada, assim como os valores de acidez (expressos em mg/L de ácido láctico) e pH associados às cores.

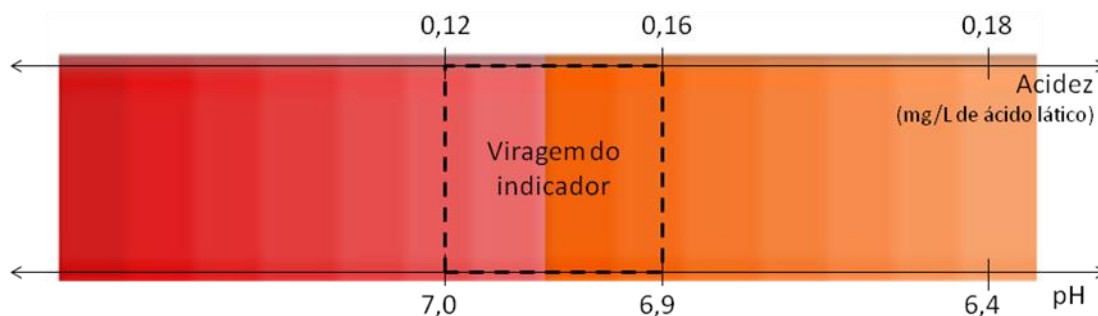


Figura III.7 Escala de cores para o método do ácido rosólico e valores de acidez e pH associados.

Antes da adição de neutralizantes, tanto as amostras com acidez dentro da faixa permitida (média de 0,15 mg/L), quanto aquelas com nível de acidez superior

(média 0,20 mg/L), apresentaram resultados negativos para o método de acidez, ou seja, coloração salmão. No entanto, aquelas com acidez acima do permitido pela legislação apresentaram uma coloração salmão menos intensa.

Após adição dos neutralizantes, as amostras de leite com acidez acima dos do limite estabelecido de 0,18 mg/L (média de 0,20 mg/L) apresentaram valores de acidez dentro dos limites da legislação. Os valores de pH dessas amostras variaram entre 6,2 e 6,9, sendo os maiores valores obtidos após adição dos neutralizantes. Para essas amostras, o método do ácido rosólico apresentou resultados positivos (rosa claro) para as amostras adicionadas de hidróxido de sódio e negativos para aquelas adicionadas dos demais neutralizantes.

Como esperado, amostras com acidez inicial satisfatória (entre 0,14 e 0,18 mg/L), apresentaram resultados positivos (entre rosa claro e escuro) após a adição dos compostos neutralizantes. Os novos valores de acidez obtidos variaram entre 0,14 e 0,07 mg/L, com maiores valores obtidos para amostras adulteradas com bicarbonato e citrato e menores valores para aquelas adicionadas de hidróxido de sódio. Em relação ao pH, uma maior variação foi observada para as amostras que continham hidróxido de sódio, com valores entre 6,8 e 7,4. Já aquelas adicionadas dos demais adulterantes sofreram uma pequena alteração no pH entre 6,8 e 7,0.

Os resultados obtidos indicaram a capacidade do método em detectar os neutralizantes estudados em amostras com pH próximo a 7,0 e 6,9, que apresentavam valores de acidez abaixo do limite de 0,14 mg/L. No entanto, para amostras que possuíam acidez acima de 0,18 mg/L (entre 0,18 e 0,20 mg/L), o método mostrou-se adequado para o adulterante hidróxido de sódio, mas limitado para os demais adulterantes testados. Em estudo similar de Silva et al. (2015), o método da fenolftaleína para detecção de substâncias neutralizantes (Brasil, 2006) também não foi capaz de detectar a presença de hidróxido de sódio em amostras de leite quando uma neutralização precisa das mesmas foi realizada. De acordo

com esses autores, isso se deveu à sensibilidade e seletividade do indicador utilizado. De fato, a fenolftaleína possui faixa de viragem superior à do ácido rosólico: entre 8,2 e 10,0 (Tronco, 2010).

III.3.4 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL

Apesar da pequena diferença obtida entre os LD das versões validadas, a versão modificada foi selecionada para a etapa da validação interlaboratorial, uma vez que a comparação dos resultados do material de teste com a amostra branca não cega contribuiu para a precisão do método no processo de validação intralaboratorial, o que poderia auxiliar na confiabilidade dos resultados do ensaio colaborativo.

III.3.4.1 Testes de homogeneidade e estabilidade

Na avaliação da homogeneidade dos materiais de teste preparados para a validação do método de neutralizantes de acidez, não foram observados falsos resultados resultando em 100% TCF para os nove diferentes materiais de teste preparados.

A estabilidade em curto prazo dos materiais de teste foi demonstrada. Para o delineamento isócrono, foram obtidas TFN de 90% para os materiais de teste contendo bicarbonato a 0,0425%, citrato a 0,10% e carbonato a 0,0275% mantidos em temperaturas entre 30 e 40 °C durante 10 horas. No entanto, de acordo com o critério estabelecido ($TCF \geq 90\%$), os resultados não podem ser associados às condições de temperatura a que os materiais foram submetidos.

III.3.4.2 Análise de agrupamento hierárquica (HCA)

Dois agrupamentos puderam ser observados no dendrograma apresentado na **Figura III.8**. Um dos agrupamentos foi composto pelos laboratórios 6 e 2, representantes de laboratórios oficiais e de indústrias de laticínios, respectivamente. O segundo agrupamento possuiu laboratórios de todos os segmentos envolvidos nos ensaios colaborativos. Desse modo, a HCA indicou que classes as quais pertenciam os laboratórios colaboradores não influenciaram os resultados obtidos na validação interlaboratorial do método modificado do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez.

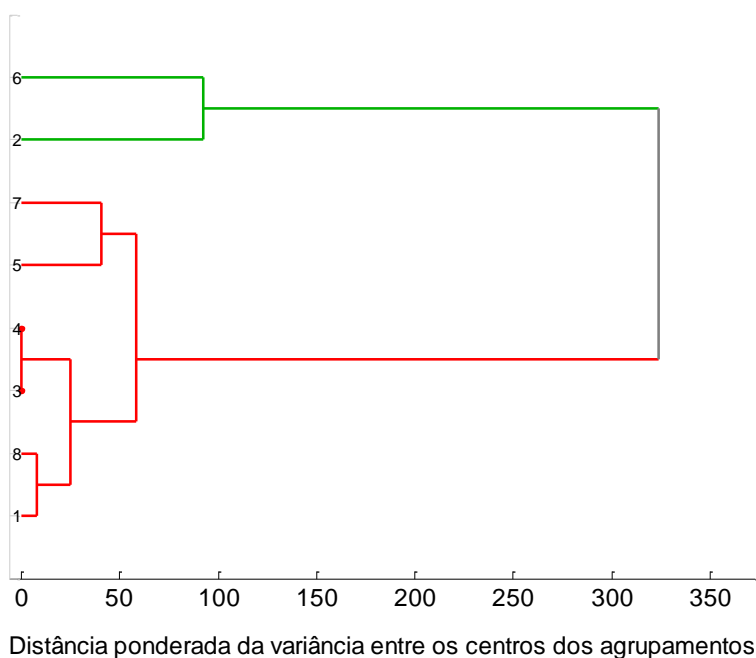


Figura III.8 Análise de agrupamentos hierárquica (HCA): dendrograma com as distâncias entre os laboratórios colaboradores.

III.3.4.3 Ensaio colaborativo

Resultados satisfatórios foram observados para os materiais não adulterados com substâncias neutralizantes, com TFP $\leq 16,7\%$ (ou TCF $\geq 83,3\%$) para todos os colaboradores, com exceção do Laboratório 7 que obteve 33,3% de TFP (ou 66,7% de TCF) (**Tabela III.8**). Considerando os resultados de todos os laboratórios, a TCF foi de 97,2%, indicando a seletividade do método.

Ainda analisando os resultados globais, para os materiais adulterados, TFN entre 2,1 e 29,8% foram observadas, sendo obtidos resultados satisfatórios de TCF ($\geq 83,3\%$) somente para o maior nível de concentração de cada neutralizante. Individualmente, os Laboratórios 2 e 6 apresentaram pior desempenho em relação a TFN (**Tabela III.8**). De fato, o Laboratório 2 reportou dificuldades na comparação das cores com a amostra branca não cega e consequente identificação de resultado positivo, como apresentado no item Comentário dos colaboradores (seção III.3.4.3). No entanto, mesma dificuldade não foi relatada pelo Laboratório 6.

Apesar da obtenção de resultados insatisfatórios de TCF, os valores obtidos ACO para o Laboratório 2, somente um valor de CON menor que 0,63 foi estimado, indicando a precisão do método (**Tabela III.9**).

Tabela III.8 Taxas de falso-negativos (TFN), taxas de falso-positivos (TFP) e taxas de confiabilidade (TCF) obtidas na validação interlaboratorial do método do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez em leite

| Laboratório | 0,0 | | Hidróxido de sódio (%) | | | | Bicarbonato de sódio (%) | | | | Carbonato de sódio (%) | | | | Citrato de sódio (%) | | | |
|--------------|------|-------------|------------------------|-------------|--------|-------|--------------------------|-------------|--------|-------------|------------------------|-------------|--------|-------------|----------------------|-------------|------|-------------|
| | | | 0,0175 | | 0,0625 | | 0,0425 | | 0,0625 | | 0,0275 | | 0,0625 | | 0,10 | | 0,15 | |
| | TFP | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF | TFN | TCF |
| 1 | 0,0 | 100,0 | 16,7 | 83,3 | 0,0 | 100,0 | 16,7 | 83,3 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 |
| 2 | 0,0 | 100,0 | 50,0 | 50,0 | 0,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 | 33,3 | 66,7 | 50,0 | 50,0 | 0,0 | 100,0 | 66,7 | 33,3 | 0,0 | 100,0 |
| 3 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 |
| 4 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 |
| 5 | 16,7 | 83,3 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 16,7 | 83,3 |
| 6 | 0,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0 | 16,7 | 83,3 | 100,0 | 0,0 | 66,7 | 33,3 | 83,3 | 16,7 | 83,3 | 16,7 | 83,3 | 83,3 | 83,3 | 16,7 |
| 7 | 33,3 | 66,7 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 16,7 | 83,3 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 83,3 | 0,0 | 100,0 |
| 8 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 16,7 | 83,3 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 |
| Total | 6,3 | 93,8 | 20,8 | 79,2 | 2,1 | 97,9 | 29,2 | 70,8 | 14,6 | 85,4 | 29,2 | 70,8 | 10,4 | 89,6 | 18,8 | 81,3 | 12,5 | 87,5 |

Valores de TCF destacados (em negrito e itálico) indicam resultados menores que 83,3%, ou seja, insatisfatórios.

Tabela III.9 Valores de acordância (ACO) e concordância (CON) obtidos na validação interlaboratorial do método do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez em leite

| Laboratório | 0,0 | Hidróxido de sódio (%) | | Bicarbonato de sódio (%) | | Carbonato de sódio (%) | | Citrato de sódio (%) | |
|-------------|-------------|------------------------|--------|--------------------------|-------------|------------------------|--------|----------------------|------|
| | | 0,0175 | 0,0625 | 0,0425 | 0,0625 | 0,0275 | 0,0625 | 0,10 | 0,15 |
| 1 | 1,00 | 0,67 | 1,00 | 0,67 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 2 | 1,00 | 0,40 | 1,00 | 1,00 | 0,47 | 0,40 | 1,00 | 0,47 | 1,00 |
| 3 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 4 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 5 | 0,67 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,67 |
| 6 | 1,00 | 1,00 | 0,67 | 1,00 | 0,47 | 0,67 | 0,67 | 0,67 | 0,67 |
| 7 | 0,47 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,67 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 8 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 0,67 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| CON | 0,88 | 0,64 | 0,96 | 0,54 | 0,74 | 0,54 | 0,79 | 0,66 | 0,76 |

Valores destacados (em negrito e itálico) indicam resultados insatisfatórios de acordância e concordância, ou seja, menores que 0,67 e 0,63 respectivamente.

Na **Tabela III.10**, são apresentados os intervalos de predição para probabilidade de detecção de cada neutralizante, assim como as estimativas dos parâmetros estatísticos utilizados no cálculo dos intervalos. Os cálculos estatísticos, realizados de acordo com protocolo proposto por Macarthur & Holst (2012), corroboram com os resultados apresentados pelos cálculos das taxas, ACO e CON. A probabilidade de obtenção de resultados falso-positivos foi calculada em 0,06, confirmando a seletividade do método. Para materiais adulterados com hidróxido e citrato de sódio, as probabilidades de detecção foram superiores a 0,80, enquanto para os materiais contendo carbonato e bicarbonato, as probabilidades de detecção foram estimadas entre 0,708 e 0,896. Esses valores de probabilidade indicaram uma maior sensibilidade do método para os maiores níveis de neutralizantes. Como reflexo da variabilidade dos resultados apresentados entre os laboratórios, ou seja, na precisão intermediária, nota-se uma variação significativa nos intervalos de predição para probabilidade de detecção dos neutralizantes.

Tabela III.10 Parâmetros estatísticos, limites inferior (5%) e superior (95%) estimados para a probabilidade de detecção de neutralizantes de acidez em leite

| Neutralizante | Concentração (%) | <i>N</i> | <i>X</i> | <i>p</i> | <i>s_R</i> | Limite inferior | Limite superior |
|----------------------|------------------|----------|----------|----------|----------------------|-----------------|-----------------|
| - | 0 | 48 | 3 | 0,063 | 0,0155 | 0,0392 | 0,1398 |
| Hidróxido de sódio | 0,0175 | 48 | 38 | 0,792 | 0,0456 | 0,6839 | 0,8742 |
| | 0,0625 | 48 | 47 | 0,979 | 0,0074 | 0,9214 | 0,9963 |
| Bicarbonato de sódio | 0,0425 | 48 | 34 | 0,708 | 0,0554 | 0,5932 | 0,8054 |
| | 0,0625 | 48 | 41 | 0,854 | 0,0304 | 0,7557 | 0,9220 |
| Carbonato de sódio | 0,0275 | 48 | 34 | 0,708 | 0,0531 | 0,5932 | 0,8054 |
| | 0,0625 | 48 | 43 | 0,896 | 0,0368 | 0,8063 | 0,9512 |
| Citrato de sódio | 0,1 | 48 | 39 | 0,813 | 0,0438 | 0,7074 | 0,8905 |
| | 0,7 | 48 | 42 | 0,875 | 0,0365 | 0,7807 | 0,9396 |

N = total de análises, *X* = total de resultados positivos; *p* = probabilidade de detecção média estimada; *s_R* = desvio padrão das estimativas de probabilidade de detecção de cada laboratório (Macarthur & Holst, 2012).

Estudos interlaboratoriais do método do ácido rosólico não estão disponíveis na literatura. Os resultados obtidos no ensaio interlaboratorial indicaram um desempenho inferior ao observado no processo prévio de validação intralaboratorial, com relação a taxas de falsos resultados, LDs e precisão para todos os analitos. No entanto, ao contrário do que ocorreu no processo de validação intralaboratorial, no ensaio colaborativo, foram empregadas amostras com acidez superior ao limite estabelecido pela legislação.

III.3.4.4 Comentários dos colaboradores

Laboratório 2 – Houve dificuldade na diferenciação das tonalidades da cor salmão.

III.4 CONCLUSÕES

A prova qualitativa do ácido rosólico para detecção de neutralizantes de acidez em leite foi validada de acordo com procedimento específico de validação de métodos qualitativos. Na etapa de otimização, um novo do critério para resultados positivos foi proposto, visando melhorar a sensibilidade do método. Assim, na validação intralaboratorial, os parâmetros de desempenho foram avaliados tanto para a versão oficial quanto para a versão modificada da prova.

A validação abrangeu ainda o estudo de quatro substâncias neutralizantes de acidez: bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio e citrato de sódio. As modificações propostas melhoraram o desempenho do método na detecção dos quatro analitos avaliados em relação aos limites de detecção e precisão. No entanto, a avaliação de adequação ao propósito de uso indicou uma limitação do método na detecção dos neutralizantes bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e citrato de sódio em amostras com níveis de acidez acima de 0,20 mg/L.

O ensaio interlaboratorial para a versão modificada do método, confirmaram o seu desempenho em relação aos parâmetros de seletividade e acordância. No entanto, em relação à sensibilidade e precisão intermediária (concordância), seu desempenho foi inferior ao obtido na etapa de validação intralaboratorial.

De modo geral, os processos de validação indicaram que o ácido rosólico é capaz de indicar a neutralização de amostras de leite com níveis de acidez ligeiramente superior ao limite da legislação.

CAPÍTULO IV - APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO NA DETECÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU: DIFERENTES ABORDAGENS PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO²

RESUMO

A espectroscopia no infravermelho vem se mostrando uma técnica promissora devido à rapidez, simplicidade, baixo ou nenhum consumo de reagentes e/ou geração de resíduos e à possibilidade de múltiplas determinações simultâneas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da espectroscopia no infravermelho médio na detecção de 11 adulterantes em leite cru, incluindo reconstituintes de densidade, conservantes e neutralizantes de acidez. Uma estratégia sequencial baseada na técnica quimiométrica de classificação *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) foi proposta. Na primeira etapa, o modelo de classe única apresentou 93,1% de sensibilidade, sendo os adulterantes hipoclorito de sódio, cloreto de sódio, água e bicarbonato de sódio descartados para a estratégia de modelagem multiclasse. Modelos SIMCA multiclasse foram avaliados em relação a dois critérios de classificação: estrito e mais provável. O modelo multiclasse estabelecido para classes não adulterada e adulteradas para cada um dos sete adulterantes (amido, formaldeído, peróxido de hidrogênio, citrato de sódio, carbonato de sódio) apresentou taxas de sensibilidade insatisfatórias, devido ao alto número de amostras inconclusivas e erros de classificação para os critérios estrito e mais provável, respectivamente. Modelos SIMCA de duas classes foram construídos para cada um dos sete adulterantes selecionados na primeira etapa, sendo os modelos estabelecidos para formaldeído, carbonato de sódio, citrato de sódio e peróxido de hidrogênio aqueles que apresentaram melhor desempenho em relação à sensibilidade e seletividade.

Palavras-chave: adulteração em leite, métodos de triagem, SIMCA multiclasse, abordagem *não-objetivada*, abordagem *objetivada*

²Resultados desse Capítulo foram submetidos à publicação nos periódicos *Food Chemistry* e *Talanta*.

IV.1 INTRODUÇÃO

A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) define a análise qualitativa como a análise em que as substâncias são identificadas ou classificadas com base na sua composição química e/ou propriedades físicas (Currie, 1995). Nos últimos anos, além da identificação de compostos, a análise qualitativa vem sendo utilizada também na classificação e autenticação de diferentes produtos e materiais, incluindo alimentos (Szymanska et al., 2015, Milman, 2011).

A associação de métodos quimiométricos com espectroscopia no infravermelho (IV) tornou-se uma poderosa ferramenta para a detecção de fraudes em leite, visando garantir sua qualidade e segurança (Araújo et al., 2011; Cassoli, Sartori & Machado, 2011; Rodriguez-Saona & Allendorf, 2011; Santos, Pereira-Filho & Rodriguez-Saona, 2013). Entre as vantagens apresentadas pelo emprego dessas metodologias estão: a capacidade de analisar amostras com pouca ou nenhuma preparação, a facilidade de utilização, a rápida obtenção de resultados e a capacidade de ser utilizado como uma técnica tipo "*fingerprint*" (Santos, Pereira-Filho & Rodriguez-Saona, 2013).

Diferentes abordagens (não-objetivada e objetivada) têm sido aplicadas para estabelecimento de modelos de classificação na pesquisa e detecção de fraudes alimentos (López et al, 2014a; López et al., 2014b; Capuano et al., 2015). A abordagem não-objetivada (*untargeted*) é comumente empregada quando há apenas uma classe de interesse, ou seja, quando o objetivo é somente verificar se uma amostra foi adulterada ou não. Nesse caso, os modelos de classificação são estabelecidos a partir de uma única classe de amostras não adulteradas. Já a estratégia conhecida como abordagem objetivada (*targeted*) é comumente utilizada em casos em que adulterantes específicos possam estar presentes na amostra. Desse modo, os modelos de classificação, denominados multiclasse, são construídos a partir de amostras adulteradas e não adulteradas (López et al., 2014a; López et al., 2014b).

A avaliação do desempenho é parte de um processo fundamental para a garantia de qualidade, uma vez que garante que o método é seguro e adequado para o propósito de uso, apesar de não haver um protocolo harmonizado para métodos qualitativos e que inclua a os métodos multivariados (Ellison & Fearn, 2005; Macarthur

& Holst, 2012; AOAC, 2014; Gondim et al., 2014; Botelho et al., 2015; López, Callao & Ruisánchez, 2015; Cuadros-Rodríguez, Pérez-Castaño & Ruiz-Samblás, 2016).

Neste Capítulo uma estratégia sequencial com base em ambas abordagens foi proposta para detecção de adulterantes comuns em leite, incluindo a água, espessantes, conservantes e agentes neutralizantes, pela técnica de classificação *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) aplicada à espectroscopia no infravermelho médio (MIR), utilizando o método de validação cruzada para a construção dos modelos, com estimativa dos principais parâmetros de desempenho de métodos qualitativos.

IV.2 MATERIAIS E MÉTODOS

IV.2.1 AMOSTRAS

Um conjunto de 30 amostras de leite cru foi obtido da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG). Em três dias de semanas distintas, aproximadamente um litro de leite foi recolhido por ordenha manual de dez animais, sendo três pertencentes a um lote de alta produtividade e sete, a um lote de média produção. As amostras foram mantidas refrigeradas (4 a 7 °C), em frascos de polipropileno, desde o transporte ao laboratório até o preparo das mesmas.

As amostras de leite cru foram utilizadas como amostras não adulteradas. Amostras adulteradas foram preparadas pela adição de solução aquosa de adulterante a dada alíquota do leite cru não adulterado. As concentrações de cada adulterante nas amostras foram baseadas em quantidades relatadas em processos autênticos de adulteração e em níveis de detectáveis por métodos qualitativos oficiais (Cerdán et al., 1992; Souza et al., 2011; Borin et al., 2006; Kartheek, Smith & Manavalan, 2011; Silva, 2013; Silva et al., 2015; Gondim et al., 2015). Para cada um dos 11 adulterantes, 30 amostras de cinco a seis níveis de concentração foram preparadas por adulterante (**Figura V.1**). Os adulterantes, número de níveis e respectivas faixas de concentração são apresentados na **Tabela IV.1**.

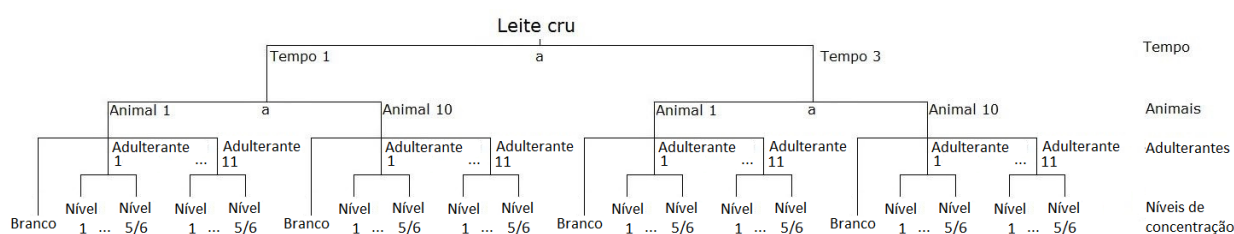


Figura IV.1 Representação esquemática do delineamento experimental para amostragem e preparação de amostras brancas e adulteradas.

Tabela IV.1 Lista de adulterantes avaliados e respectivas faixas de concentração

| Classe do adulterante | Adulterante | Número de níveis | Faixa de concentração (% m/v) |
|-----------------------------|------------------------|------------------|-------------------------------|
| Reconstituente de densidade | Amido | 5 | 0,05 a 0,5 |
| | Cloreto de sódio | 6 | 0,1 a 0,5 |
| | Sacarose | 6 | 0,24 a 0,54 |
| Neutralizante de acidez | Bicarbonato de sódio | 5 | 0,05 a 0,4 |
| | Carbonato de sódio | 5 | 0,05 a 0,4 |
| | Citrato de sódio | 6 | 0,15 a 0,65 |
| | Hidróxido de sódio | 5 | 0,025 a 0,4 |
| Conservante | Formaldeído | 5 | 0,00074 a 0,0074 |
| | Hipoclorito de sódio | 5 | 0,004 a 0,02 |
| | Peróxido de hidrogênio | 6 | 0,1 a 2,1 |
| - | Água | 5 | 9,0 a 15,0 |

Após cada etapa de preparação das amostras, os microtubos foram selados, homogeneizados manualmente por inversão e mantidos refrigerados (4 a 7 °C) até que a análise no espectrofotômetro fosse realizada. As amostras foram analisadas de forma aleatória, sem qualquer pré-tratamento. Os espectros recolhidos foram o resultado da média de quatro leituras, na região do infravermelho médio entre 650 a 4000 cm⁻¹. Entre cada análise, uma limpeza do acessório de refletância total atenuada (ATR) com acetona (grau analítico) era realizada e um novo *background* obtido.

IV.2.2 REAGENTES, EQUIPAMENTOS E SOFTWARES

Os reagentes utilizados foram de grau analítico adequado. Formaldeído, peróxido de hidrogênio e amido foram fornecidos pela Synth (Diadema, SP, Brasil). Citrato de sódio, hidróxido de sódio e sacarose foram adquiridos de Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, SP, Brasil). Bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e cloreto de sódio foram obtidos de Alphatec (São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Solução de hipoclorito de sódio 4-6% foi fornecida por Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A água utilizada para o preparo de soluções e adulteração de amostras foi obtida a partir do Sistema Direct Milli-Q (Billerica, MA, EUA).

Os materiais e equipamentos utilizados eram calibrados por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), de acordo com a norma

ISO / IEC 17025. Amostras foram analisadas no espectrofotômetro Spectrum One - FTIR Spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) no modo ATR, equipado com cristal de ZnSe.

A análise de dados espectrais foi realizada no pacote MATLAB, versão R2010a (7.10.0.499) (The MathWorks, Natick, MA, EUA) juntamente com o pacote PLS Toolbox, versão 7.0.2 (Eigenvector Technologies, Manson, WA, EUA). Para análises de regressão não-linear e de resíduos, foram empregados os pacotes MATLAB e Action (Estatcamp, Campinas, Brasil).

IV.2.3 ANÁLISE DE DADOS

A etapa de análise de dados foi realizada em parceria com o *Chemometrics, Qualimetrics and Nanosensors Group, Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Universitat Rovira i Virgili*, Tarragona, Espanha.

Pré-processamento de dados e análise exploratória

A aplicação de métodos de pré-processamento de dados tem como objetivo eliminar informações não relevantes do ponto de vista químico, tornando as matrizes de dados mais adequadas para as análises de dados e construção de modelos subsequentes (Rinnan, Berg & Engelsen, 2009; Souza & Poppi, 2012).

Os espectros das amostras não adulteradas e adulteradas foram submetidos a diversas técnicas de pré-processamento de dados para correção da linha de base e tendências dos espectros, como correção de linha de base, primeira derivada com alisamento de Savitzky-Golay, correção de espalhamento multiplicativo (*multiplicative scatter correction* - MSC) e variação normal padrão (*standard normal variate* - SNV), todas seguidas por centralização na média.

A técnica selecionada foi aquela que forneceu menores valores para a raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (*root mean square error of calibration*

- RMSEC) e a raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (*root mean square error of cross validation* - RMSECV) (Maleki et al., 2007; Rinnan, Berg & Engelsen, 2009).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada como ferramenta de análise exploratória não supervisionada para visualização da distribuição das amostras no espaço multivariado, verificação de agrupamentos entre as amostras que poderiam influenciar as análises multivariadas subsequentes ou ainda identificar possíveis valores atípicos (*outliers*).

Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA)

O método de classificação supervisionada SIMCA foi a técnica empregada para a construção de modelos de classe única (*one-class*) e multiclases (Wold, 1976; Bevilacqua et al., 2013), associado ao método de validação cruzada *leave-one-out*, empregado devido ao número reduzido de amostras utilizado na construção dos mesmos.

De acordo com Foca et al. (2009), apesar da possibilidade de a validação cruzada produzir estimativas altamente otimistas do desempenho do modelo final, quando um pequeno número de amostras está disponível, a divisão dos dados em conjunto treinamento e conjunto teste pode implicar em conjunto treinamento com número insuficiente de dados e conjunto teste que não contém amostras suficientes para fornecer uma estimativa suficientemente representativa da capacidade de previsão.

As fronteiras das classes foram estabelecidas por meio da análise das estatísticas *Hotelling T²* e *Q*, sendo ambos os valores considerados para atribuição de determinada amostra a uma classe. Para que uma amostra fosse considerada pertencente a uma classe, a mesma deveria ter valores abaixo de 1 para ambas as estatísticas (Rius, Callao e Rius, 1997).

Estratégias de classificação e avaliação

Uma estratégia sequencial de classificação para análise de dados multivariados foi elaborada com base no método SIMCA, conforme representado na **Figura IV.2**.

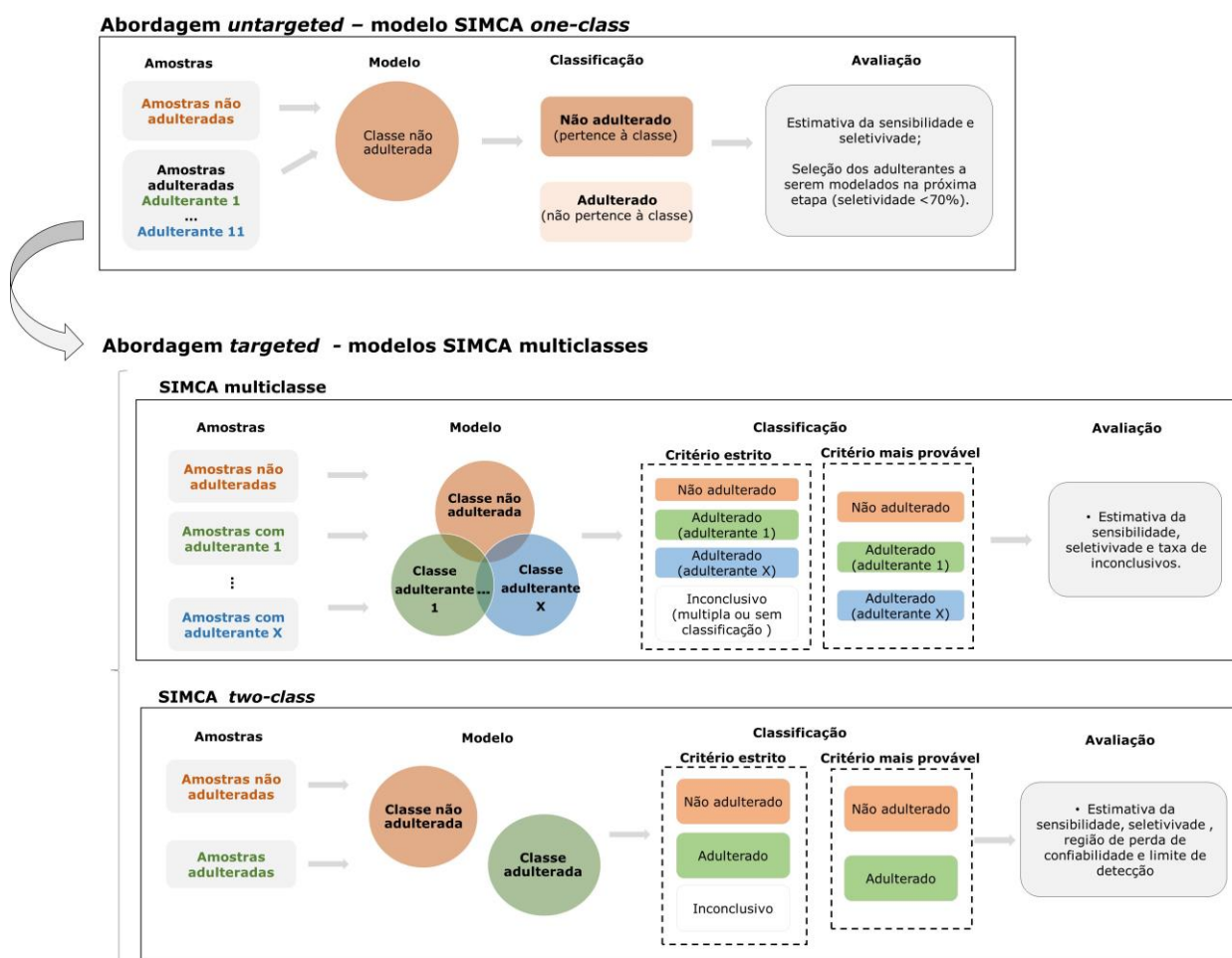


Figura IV.2 Representação esquemática para a estratégia de classificação para análise de dados multivariados.

A primeira etapa, baseada numa abordagem denominada não-objetivada, consistiu na construção de um modelo SIMCA *one-class*, no qual somente as amostras não adulteradas foram modeladas. Essa etapa teve por objetivo verificar se a combinação entre espectroscopia MIR e a técnica de classificação multivariada poderia determinar se uma amostra era adulterada ou não, e quais adulterantes seriam capazes de ser diferenciados (López et al., 2014a; López et al., 2014b; Capuano et al.,

2015). O modelo SIMCA foi construído com os dados espectrais pré-processados das 29 amostras não adulteradas por validação cruzada (*leave-one-out*). Os adulterantes que apresentaram seletividade menor que 70% foram excluídos para o próximo passo.

A segunda etapa foi a de construção de modelos multiclasse, abordagem objetivada, na qual os modelos sejam constituídos de classes de amostras adulteradas e sem adulteração. O objetivo dessa etapa foi construir modelos que, além de detectar a adulteração, pudessem identificar o adulterante envolvido (López et al., 2014a; López et al., 2014b).

Dois tipos de modelos multiclasse foram construídos. No primeiro tipo de modelo, foram construídas classes para cada tipo de amostra adulterada selecionada na etapa anterior de estabelecimento de modelo SIMCA *one-class*. Modelos SIMCA de duas classes (*two-classes*) foram estabelecidos para cada adulterante selecionado na etapa anterior, sendo, portanto, modeladas duas classes: uma não adulterada e outra adulterada. Os modelos multiclasse foram construídos com os dados espectrais das amostras não adulteradas (29 amostras) e das amostras adicionadas no nível máximo de adulteração de cada composto indicado na **Tabela IV.1**, sendo cerca de 30 amostras por composto adulterante.

Os modelos SIMCA multiclasse foram avaliados em relação a dois critérios de classificação. O primeiro critério, denominado critério estrito, é utilizado quando não se tem conhecimento sobre incerteza na classificação das amostras (Eigenvector, 2016) ou quando a classificação em diferentes classes possui sentido prático, como no caso de adulterações com mais de um composto. Nesse cenário, três resultados poderiam ser obtidos para cada amostra: i) atribuição a uma única classe; ii) atribuição a mais de uma classe (classificação múltipla), ou iii) não atribuição a nenhuma classe. Nos dois últimos casos, as amostras foram classificadas como inconclusivas.

Amostras com múltipla classificação e que apresentavam distância para determinada classe maior que 0,6 foram submetidas a outro critério de avaliação. Quando a razão entre as distâncias era maior que 1,5, a amostra era atribuída à classe de menor distância. Do contrário, a múltipla classificação era mantida, ou seja, com resultado inconclusivo, $I(x)$.

O segundo critério de classificação, mais provável, é indicado para modelos construídos com pequeno número de amostras, quando as amostras foram pré-

selecionadas como sendo uma das classes modeladas, ou quando não pertencerem a nenhuma classe não tem nenhum significado (Eigenvector, 2016). De acordo com esse critério, a amostra era atribuída à classe à qual apresentava maior probabilidade.

Todos os modelos foram avaliados em relação às taxas de sensibilidade (TSB), de seletividade (TST) e inconclusivos, quando aplicável. Nos modelos SIMCA de duas classes (*two-class*), as amostras adulteradas em concentrações intermediárias foram classificadas em positivas - $P(x)$, quando atribuídas à classe adulterada ou negativas - $N(x)$, de acordo com os critérios estrito e mais provável. Tais classificações foram utilizadas para tentativa de estabelecimento de curvas de desempenho para estimativa das regiões de perda de confiabilidade (RPC) e limites de detecção (LD) para cada modelo (Gondim et al., 2014).

Quando possível, as curvas de desempenho foram estimadas por regressão não linear, considerando os valores de $P(x)$ obtidos em cada nível de concentração avaliado. Na estimativa das curvas de desempenho, diversas funções foram testadas, sendo os resíduos verificados em relação à (normalidade, homoscedasticidade e independência (Durbin & Watson, 1951; Levene, 1960; Shapiro-Wilk, 1965; Brown & Forsythe 1974; Shoemaker, 2003; Souza & Junqueira, 2005). As equações selecionadas foram aquelas que, além de apresentarem melhor ajuste visual (avaliação qualitativa), apresentaram os menores e maiores valores para a raiz quadrada do erro médio quadrático (RMSE – *Root mean square error*) e o coeficiente de correlação ajustado (R^2_{adj}) respectivamente.

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1 Pré-processamento de dados e análise exploratória

Na **Figura IV.3a**, são apresentados espectros de amostras sem adulteração e adulteradas com os diferentes compostos utilizados. Em todos eles, observam-se valores altos de absorvância para números de onda inferiores a aproximadamente 950 cm^{-1} , o que implicaria em valores de transmitância próximo de zero, assim esta região não foi considerada nas análises de dados posteriores. Dois picos são facilmente observados. O primeiro, localizado aproximadamente entre 3700 e 2800 cm^{-1} , corresponde à região de estiramento das ligações entre átomos de hidrogênio e átomos de oxigênio e carbono, ou seja, grupos OH e CH, respectivamente. A região onde se observa o segundo pico, entre 1700 e 1500 cm^{-1} , é atribuída a ligações duplas, como ligações entre átomos de carbono e oxigênio e também a interações de proteínas e lipídios. Esses dois picos estão associados aos componentes naturais do leite, incluindo a água (Walstra, 1999; Kohler et al., 2010; Botelho et al., 2015). Compostos adulterantes como peróxido, formaldeído, amido e sacarose também poderiam influenciar os valores de absorvância nessas regiões. A variabilidade na linha de base confirmou a necessidade de pré-processamento dos dados.

Tanto MSC quanto SNV podem ser utilizados para compensar efeitos aditivos e/ou multiplicativos em dados espectrais resultantes de efeitos físicos que não trazem informações químicas sobre as amostras e introduzem variações espectrais, como o deslocamento da linha de base (Souza & Poppi, 2012). Apesar de o SNV ser considerado mais robusto que o MSC em relação à influência de dados dispersos (*outliers*), uma vez que utiliza a informação de cada espectro na sua própria correção, esses dois métodos fornecem resultados bastante similares para a maioria das aplicações práticas (Rinnan, Berg & Engelsen, 2009). Para ambos os tratamentos, nota-se uma diminuição da dispersão dos espectros no eixo Y. E, embora, quando submetidos ao SNV, os espectros também apresentem uma maior amplitude de variação em Y, diferenças significativas entre os espectros submetidos a esses processamentos não são observadas através de uma simples análise visual, tanto antes quanto após a centralização dos dados (**Figuras IV.3b a IV.3e**).

A primeira derivada dos dados espectrais também é empregada em correções de desvios de linha de base. Para eliminar possível amplificação de ruído e consequente redução da razão sinal/ruído causado por esse procedimento, o pré-processamento pela primeira derivada juntamente com alisamento Savitzky-Golay é recomendado (Rinnan, Berg & Engelsen, 2009). Assim como nos tratamentos anteriores, com esse método não foi observada tendência de aumento dos valores em Y (Absorbância) ao longo de X (número de onda) (**Figura IV.3f**).

Após a avaliação visual dos espectros para pré-processamentos testados, o MSC seguido de centralização dos dados na média foi o selecionado por fornecer os menores valores de RMSEC e RMSECV para todos os modelos construídos.

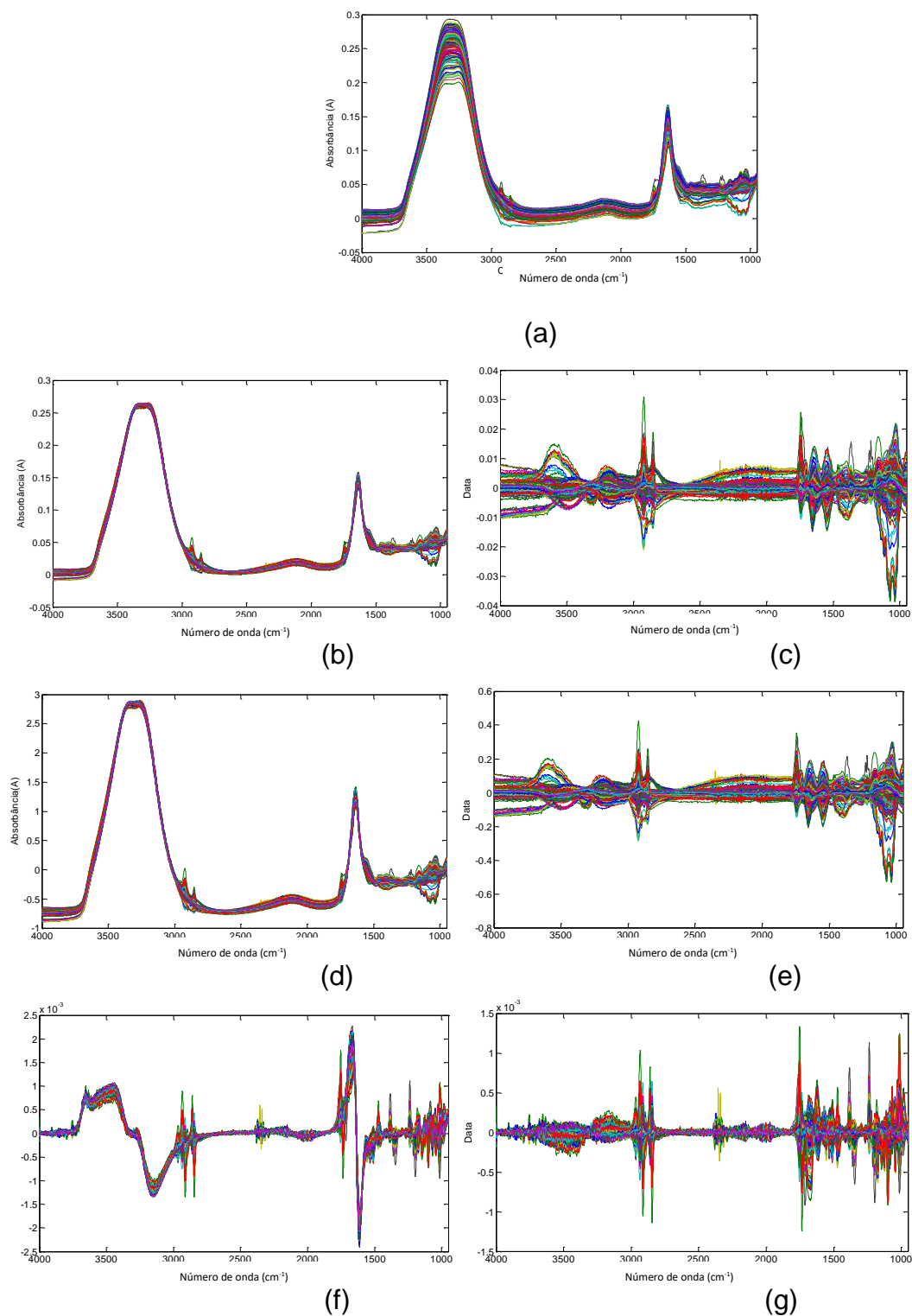


Figura IV.3 Espectros de amostras não adulteradas e adulteradas de leite cru submetidos a diferentes técnicas de pré-processamentos de dados.

a) dados brutos; b) correção de espalhamento multiplicativo (MSC); c) MSC e centralizados na média; d) variação normal padrão (SNV); e) SNV e centralizados na média; f) primeira derivada juntamente com alisamento Savitzky-Golay; g) primeira derivada juntamente com alisamento Savitzky-Golay e centralizados na média.

Em relação à PCA realizada para cada classe de amostras, em todas elas, as duas primeiras componentes principais explicaram uma variabilidade entre 70 e 91%, aproximadamente. Para cada conjunto de amostras, aquelas claramente distanciadas do resto do grupo foram removidas do conjunto de dados nas análises de classificação posteriores, uma vez que nenhum fator associado a amostragem, tais como tempo de coleta da amostra, animal ou nível de adulteração, puderam ser relacionados a sua dispersão em relação às demais. Na **Figura IV.4**, são apresentados alguns gráficos de escores de PCA de distintas classes, sendo destacadas as amostras excluídas do conjunto de dados.

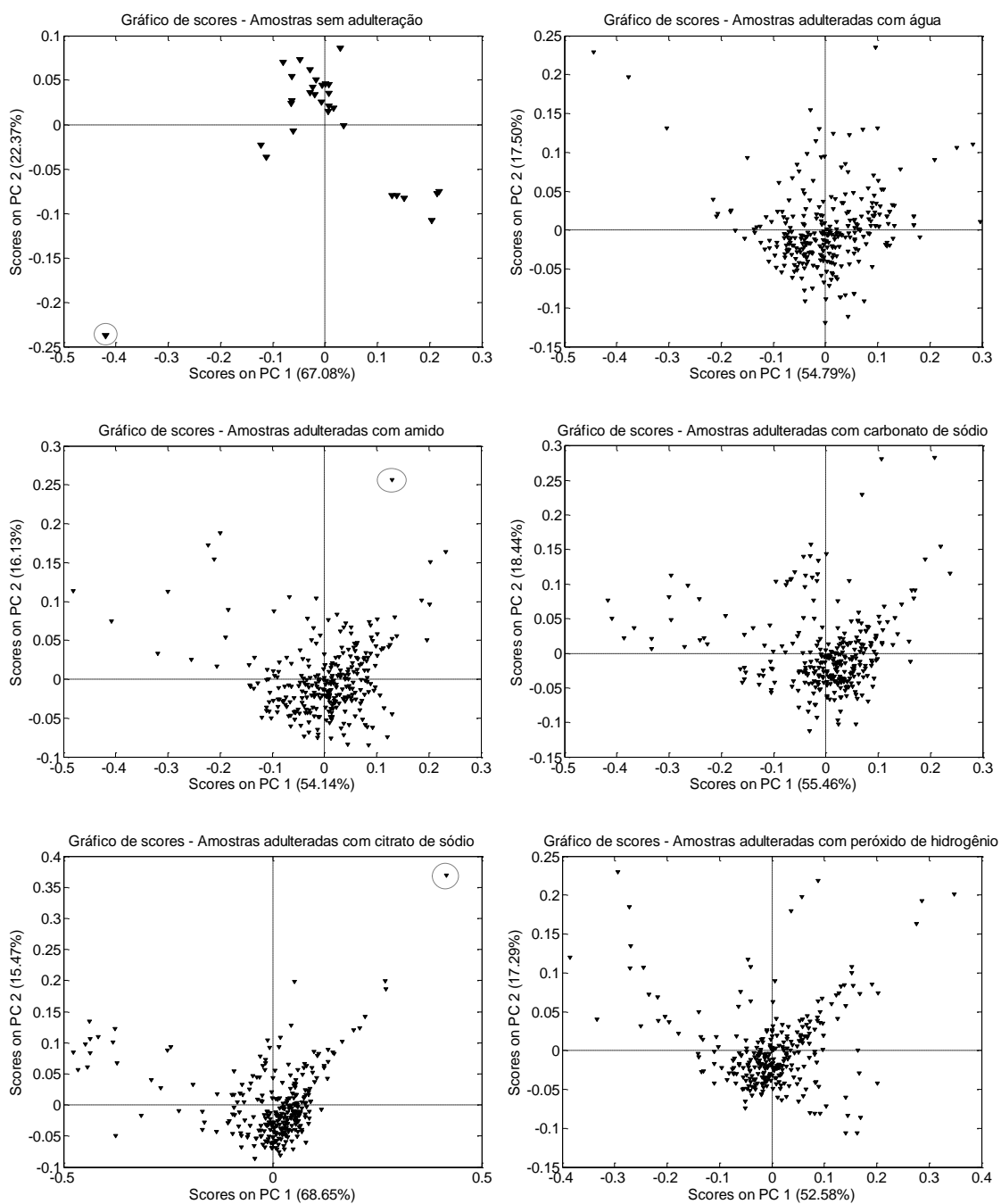


Figura IV.4 Análise de componentes principais (PCA) para amostras não adulteradas e adulteradas - Gráficos de escores.

IV.3.2 SIMCA *one-class*

Na primeira etapa, foi selecionado um modelo SIMCA *one-class* com seis componentes principais (PC) que explicavam 98,3% do total da variância. A TSB do modelo foi estimada em 93,1%, indicando que o mesmo foi capaz de reconhecer as próprias amostras. Os valores de seletividade para cada adulterante são apresentados na **Tabela IV.2**. Valores de TST superiores a 90% foram obtidos para as amostras adulteradas com formaldeído, peróxido de hidrogênio e citrato de sódio. Para amostras adicionadas de amido, carbonato de sódio, hidróxido de sódio e sacarose, os valores de seletividade variaram entre 70 e 90%. Já para aquelas adulteradas com cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, hipoclorito de sódio e água, a seletividade não foi satisfatória, ou seja, foram estimadas em porcentagens menores que 70%. Desse modo, esses quatro adulterantes foram excluídos da etapa posterior, sendo essa considerada inadequada para a investigação de amostras adulteradas com essas substâncias.

A baixa capacidade de detecção de água apresentada pode estar relacionada aos altos teores de água naturalmente presentes no leite (entre 85 e 90%, m/v). Esse resultado corrobora aqueles obtidos por Botelho et al. (2015) na avaliação de método MIR.

Tabela IV.2 Taxas de seletividade do modelo SIMCA de classe única para cada tipo de amostra de leite adulterada

| Adulterante | Concentração* (% m/v) | Taxa de seletividade (%) |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Água | 15 | 43,3 |
| Amido | 0,5 | 75,9 |
| Bicarbonato de sódio | 0,4 | 69,0 |
| Carbonato de sódio | 0,4 | 80,0 |
| Citrato de sódio | 0,65 | 90,0 |
| Cloreto de sódio | 0,4 | 69,0 |
| Formaldeído | 0,0074 | 96,7 |
| Hidróxido de sódio | 0,4 | 73,3 |
| Hipoclorito de sódio | 0,02 | 56,7 |
| Peróxido de hidrogênio | 2,1 | 100,0 |
| Sacarose | 0,54 | 80,0 |

Valores de seletividade destacados em cinza indicam valores insatisfatórios, ou seja, menores que 70%.

* Concentração do analito nas amostras adulteradas

IV.3.3 Modelos SIMCA *multiclasses*

O modelo SIMCA multiclasse selecionado apresentou números de PC para as classes entre três e seis, com um mínimo de 90% de variância explicada.

Na **Tabela IV.3**, são apresentadas as classificações das amostras de acordo com o critério estrito para o modelo SIMCA multiclasse selecionado. Com exceção das classes de hidróxido de sódio e sacarose, as amostras foram em sua maioria corretamente atribuídas à sua própria classe. Para aquelas amostras, a maioria apresentou alto índice de dupla classificação. Poucas amostras foram erroneamente atribuídas a classes de adulterantes distintas à sua própria classe.

Os parâmetros de desempenho calculados para o modelo SIMCA de oito classes são apresentados na **Tabela IV.4**. Para ambos os critérios de classificação, as classes de formaldeído e peróxido de hidrogênio apresentaram TSB satisfatórias. As classes de citrato de sódio e não adulterada apresentaram TSB satisfatória, respectivamente, para os critérios de classificação estrito e mais provável. Em consequência, as taxas de inconclusivos foram maiores que 30% para as classes não adulteradas e adulteradas com carbonato de sódio, amido, hidróxido de sódio e sacarose. Com relação à TST, em ambos os critérios, observou-se que valores inferiores a 70% estavam associados à adulteração com sacarose. Vale considerar que, mesmo para os adulterantes que apresentaram taxas inferiores a 70%, as atribuições errôneas às classes não foram superiores a 3% do total de amostras analisadas (**Tabela IV.3**), indicando potencial do modelo multiclasse.

Tabela IV.3 Classificação das amostras para o modelo SIMCA multiclasse (oito classes)

| Amostras | Concentração (%, m/v) | Número de amostras | Classificação | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|---------------------|
| | | | Própria classe | Outra classe | Múltipla classificação | Não classificada |
| Não adulterada | - | 29 | 19 | 1 | 9 | 0 |
| Amido | 0,5 | 29 | 20 | 0 | 7 | 2 |
| Carbonato de sódio | 0,4 | 30 | 16 | 2 | 9 | 3 |
| Citrato de sódio | 0,65 | 30 | 24 | 1 | 2 | 3 |
| Formaldeído | 0,0074 | 30 | 26 | 0 | 0 | 4 |
| Hidróxido de sódio | 0,4 | 30 | 11 | 0 | 17 | 2 |
| Peróxido de hidrogênio | 2,1 | 28 | 23 | 0 | 0 | 5 |
| Sacarose | 0,54 | 30 | 11 | 3 | 15 | 1 |

Tabela IV.4 Taxas de sensibilidade*, seletividade e inconclusivos para o modelo SIMCA multiclasse

| Classe | Taxas de sensibilidade e seletividade (%) | | | | | | | | Inconclusivos (%) |
|--|---|-------------|------------------------|--------------------|------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------------|
| | Não adulterada | Formaldeído | Peróxido de hidrogênio | Carbonato de sódio | Citrato de sódio | Amido | Hidróxido de sódio | Sacarose | |
| Critério de classificação estrito | | | | | | | | | |
| Não adulterada | 65,5 | 96,7 | 100,0 | 80,0 | 90,0 | 73,3 | 75,9 | 80,0 | 31,0 |
| Formaldeído (0,0074% ^{**}) | 96,6 | 86,7 | 100,0 | 93,3 | 100,0 | 90,0 | 93,1 | 96,7 | 13,3 |
| Peróxido de hidrogênio (2,1%) | 100,0 | 100,0 | 82,1 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 17,9 |
| Carbonato de sódio (0,4%) | 96,6 | 100,0 | 100,0 | 53,3 | 100,0 | 96,7 | 100,0 | 93,3 | 40,0 |
| Citrato de sódio (0,65%) | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 83,3 | 80,0 | 80,0 | 96,6 | 80,0 | 16,7 |
| Amido (0,5%) | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 90,0 | 69,0 | 96,6 | 100,0 | 31,0 |
| Hidróxido de sódio (0,4%) | 86,2 | 100,0 | 100,0 | 80,0 | 90,0 | 80,0 | 36,7 | 56,7 | 63,3 |
| Sacarose (0,54%) | 86,2 | 100,0 | 100,0 | 56,7 | 80,0 | 60,0 | 79,3 | 36,7 | 53,3 |
| Critério de classificação mais provável | | | | | | | | | |
| Não adulterada | 82,8 | 96,6 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 96,6 | 100,0 | 89,7 | - |
| Formaldeído (0,0074%) | 90,0 | 80,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 98,3 | 91,7 | - |
| Peróxido de hidrogênio (2,1%) | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | - |
| Carbonato de sódio (0,4%) | 83,3 | 98,3 | 100,0 | 26,7 | 95,0 | 91,7 | 96,7 | 61,7 | - |
| Citrato de sódio (0,65%) | 96,6 | 100,0 | 98,3 | 98,3 | 47,5 | 98,3 | 94,9 | 61,0 | - |
| Amido (0,5%) | 72,9 | 100,0 | 100,0 | 98,3 | 98,3 | 37,3 | 98,3 | 69,5 | - |
| Hidróxido de sódio (0,4%) | 81,0 | 100,0 | 100,0 | 96,6 | 96,6 | 96,6 | 19,0 | 48,3 | - |
| Sacarose (0,54%) | 73,3 | 98,3 | 98,3 | 100,0 | 98,3 | 93,3 | 100,0 | 61,7 | - |

*Taxas de sensibilidade: valores destacados em negrito na diagonal principal da Tabela.

** Concentração do analito nas amostras adulteradas

Valores de seletividade e sensibilidade destacados em cinza indicam valores insatisfatórios, ou seja, menores que 70%.

Assim como para o primeiro modelo SIMCA multiclasse, os modelos *two-class* foram construídos com números de PC entre três e seis para as classes adulteradas e seis PCs para a classe não adulterada, com um mínimo de 90% de variância explicada.

Na **Tabela IV.5**, são apresentados os parâmetros de desempenho estimados para os modelos SIMCA *two-class* para ambos os critérios de classificação. Considerando o critério de classificação mais provável, com exceção dos modelos de amido e sacarose, os demais modelos apresentaram parâmetros adequados, com TST e TSB superiores a 86,2 e 81,7% respectivamente.

Para o critério estrito, os modelos apresentaram valores inferiores de TST e TSB, o que era esperado já que esse critério inclui resultados inconclusivos, tendo os modelos de carbonato de sódio, citrato de sódio e peróxido de hidrogênio apresentado ambos parâmetros com valores acima de 70%. Como observado no modelo SIMCA multiclasse anterior, o método teve pior desempenho na detecção de amostras adulteradas com amido, hidróxido de sódio e sacarose.

Tabela IV.5 Parâmetros de desempenho para os modelos SIMCA *two-class*

| Modelo | Concentração* (%, m/v) | Critério de classificação estrito | | | Critério de classificação mais provável | |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------|---------------|---|------|
| | | TST | TSB | Inconclusivos | TST | TSB |
| Amido | 0,5 | 65,5 | 62,7 | 31,8 | 89,7 | 69,5 |
| Carbonato de sódio | 0,4 | 86,2 | 73,3 | 21,3 | 96,6 | 81,7 |
| Citrato de sódio | 0,65 | 72,4 | 83,1 | 19,3 | 96,6 | 96,6 |
| Formaldeído | 0,0074 | 62,1 | 85,0 | 21,3 | 86,2 | 93,3 |
| Hidróxido de sódio | 0,4 | 51,7 | 55,2 | 37,9 | 89,7 | 79,3 |
| Peróxido de hidrogênio | 2,1 | 89,6 | 87,7 | 11,6 | 100,0 | 98,2 |
| Sacarose | 0,54 | 34,5 | 70,0 | 25,8 | 48,3 | 95,0 |

Valores destacados em cinza indicam valores de taxa de seletividade (TST) ou taxa de sensibilidade (TSB) insatisfatórios, ou seja, inferiores a 70%

*Concentração do analito nas amostras adulteradas

As TST e TSB obtidas para os modelos SIMCA *two-class*, segundo o critério de classificação mais provável, concordam com os resultados relatados em trabalhos anteriores de avaliação da aplicação da espectroscopia MIR associada a diferentes técnicas quimiométricas de classificação (Santos, Pereira-Filho & Rodrigues-Saona, 2013; Zang et al., 2014; Botelho et al., 2015; Liu et al., 2015). Santos & Pereira-Filho

(2013) avaliaram também a aplicação da análise de imagens digitais associadas ao SIMCA como ferramenta quimiométrica, obtendo uma média de 82% de classificação correta de amostras de leite adulteradas com peróxido de hidrogênio.

Na **Figura IV.5**, são apresentados os gráficos dos dados experimentais $P(x)$ em função dos níveis de concentração para modelos SIMCA *two-class* para cada critério de classificação e as curvas de desempenho ajustadas para o critério mais estrito.

Somente para os resultados de peróxido de hidrogênio segundo o critério de classificação estrito pode-se observar uma distribuição similar ao perfil sigmoide característico dos métodos qualitativos, como descrito na literatura (Song et al., 2001; Rios et al., 2003; Ellison & Fearn, 2005; Gondim et al., 2014; López, Callao & Ruisánchez, 2015). Para os demais resultados, a inspeção visual das séries $P(x)$ indicou perfis semelhantes a distribuições lineares e exponenciais. Desse modo, a curva de desempenho foi estimada somente para o modelo de peróxido de hidrogênio, obtendo-se os limites da RPC entre os níveis 0,37 e 1,13%, correspondentes às probabilidades 0,05 e 0,85.

Apesar da importância da incerteza em análises qualitativas, a dificuldade na estimativa das RPC pode ser explicar a falta de relatos sobre esse parâmetro em estudos similares de validação de métodos multivariados e de aplicação da espectroscopia MIR associada a métodos multivariados de análise de dados (Cassoli, 2011; Santos & Pereira-Filho, 2013; Santos, Pereira-Filho & Rodrigues-Saona, 2013; Zang et al., 2014; Botelho et al 2015, Liu et al., 2015, López, Callao, Ruizánchez, 2015).

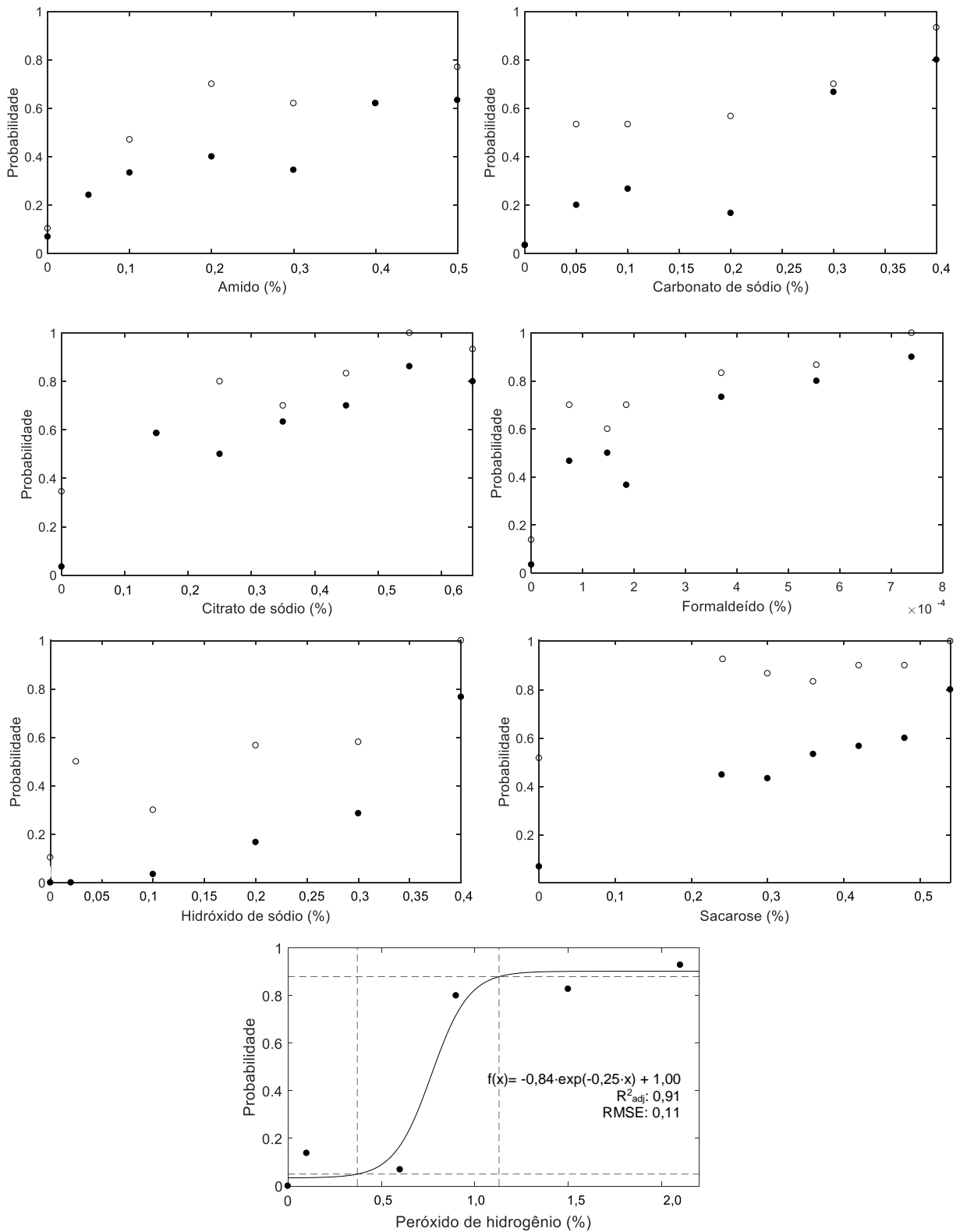


Figura IV.5 Resultados de classificação de modelos SIMCA two-class.

○ Resultados positivos, $P(x)$, para critério mais provável; ● $P(x)$ para critério estrito; – curva de desempenho para critério estrito; - - limites da região de perda de confiabilidade (RPC)

IV.4 CONCLUSÕES

Uma estratégia baseada em diferentes abordagens de classificação foi desenvolvida para verificar a capacidade de um método espectroscópico MIR em detectar adulterações em amostras de leite cru com onze adulterantes: água, amido, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de sódio, citrato de sódio, formaldeído, hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e sacarose.

A abordagem não-objetivada, baseada em modelo SIMCA de classe única, foi considerada adequada como uma primeira etapa de triagem, para avaliar se o método distinguia satisfatoriamente amostras não adulteradas de adulteradas, e também para avaliar quais substâncias não eram adequadas para a etapa seguinte de construção de modelos SIMCA multiclasse. Nessa primeira etapa, foram classificados como adequados para a etapa baseada em abordagem objetivada os adulterantes: amido, carbonato de sódio, citrato de sódio, formaldeído, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e sacarose.

A segunda etapa envolveu a construção dos modelos SIMCA multiclasse, baseados em uma abordagem objetivada, sendo avaliados dois critérios de classificação: estrito e mais provável.

O primeiro modelo SIMCA multiclasse foi estabelecido para oito classes (classe não adulterada e classes de peróxido de hidrogênio, citrato de sódio, carbonato de sódio, formaldeído, amido, hidróxido de sódio e sacarose). Ambos os critérios de classificação avaliados apresentaram desempenho semelhante na classificação das amostras com os valores de TSB satisfatórios para formaldeído e peróxido de hidrogênio. Em relação às TST, os valores insatisfatórios estavam relacionados principalmente à adulteração com sacarose. O critério estrito permitiu estimar as amostras inconclusivas, importante quando não se tem conhecimento sobre as amostras analisadas.

Ainda considerando a abordagem objetivada, modelos SIMCA com duas classes foram estabelecidos para os adulterantes selecionados na primeira etapa. Para os sete modelos de duas classes, foram estimados os parâmetros de desempenho sensibilidade, seletividade e taxa de inconclusivos. Para os resultados obtidos, os

parâmetros RPC e LD não puderam ser estabelecidos por meio de curvas de desempenho características dos métodos qualitativos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os processos de validação intralaboratoriais evidenciaram a adequação ao propósito de uso dos métodos clássicos, nas versões oficiais e modificadas, com ressalvas na seletividade dos métodos para detecção de amido e cloro/hipoclorito e na sensibilidade do método do ácido rosólico de detecção de neutralizantes de acidez em determinadas faixas de pH e acidez para os analitos: bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e citrato de sódio. Além disso, pequenas modificações nos procedimentos analíticos de métodos clássicos para reconstituintes e neutralizantes proporcionaram melhoria no desempenho dos mesmos.

Um processo sistematizado para validação de métodos qualitativos foi proposto e aplicado com sucesso na validação de provas clássicas para detecção de reconstituintes de densidade, neutralizantes de acidez e conservantes em leite cru. Os estudos colaborativos ratificaram o perfil de desempenho obtido nas validações intralaboratoriais das versões modificadas dos métodos de detecção amido, cloretos, sacarose, neutralizantes de acidez (método do ácido rosólico). No caso dos métodos de detecção de conservantes (método do cloro e hipoclorito e do guaiacol para detecção de peróxido de hidrogênio), a definição de um padrão de cor foi apontada como um requisito fundamental para o adequado desempenho dos métodos.

A estratégia proposta baseada em diferentes abordagens de classificação possibilitou a detecção de diferentes compostos pelo método instrumental. O modelo SIMCA *one-class* apresentou baixo desempenho obtido na detecção de amostras adulteradas com cloreto de sódio, hipoclorito de sódio, bicarbonato de sódio e água. O modelo SIMCA estabelecido para diferenciar amostras não adulteradas de amostras adulteradas com amido, carbonato de sódio, citrato de sódio, formaldeído, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio e sacarose não apresentou taxas de sensibilidade satisfatórias, sendo o modelo considerado inadequado. Já os modelos SIMCA *two-class* foram considerados adequados para detecção desses adulterantes, apesar de somente ter sido possível a estimativa da RPC e LD do método para o adulterante peróxido de hidrogênio.

Apesar de não haver estudos aprofundados sobre o desempenho dos métodos avaliados, estas metodologias vêm sendo amplamente utilizadas por diferentes setores da cadeia produtiva de produtos lácteos. Desse modo, o estudo dos parâmetros de desempenho, com indicação das potencialidades e limitações dos métodos, se mostrou primordial no contexto de controle e monitoramento de adulterações em leite e, conseqüentemente, na proteção da saúde e dos direitos do consumidor.

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.
- AFZAL, A.; MAHMOOD, M.S.; HUSSAIN, I.; AKHTAR, M. Adulteration and microbiological quality of milk (a review). *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 10, p. 1195-1202, 2011.
- AGUILERA, E.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M.; TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I. Robustness in qualitative analysis: a practical approach. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, p. 621-627, 2006.
- ALMEIDA, M.R.; OLIVEIRA, K.S.; STEPHANI, R. & OLIVEIRA, L.F.C. Application of FT-Raman spectroscopy and chemometric analysis for determination of adulteration in milk powder. *Analytical Letters*, v. 45, p. 2589-2602, 2012.
- ALVES, F.S.F. *Análise de Pontos Críticos (PC) durante a ordenha manual e mecânica na qualidade do leite de cabra in natura*. EMBRAPA, Sobral, 2001. 4 p. (Comunicado Técnico n. 58). Disponível em <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/528420>. Acesso em agosto 2012.
- ANIBAL, C.V.; RUISÁNCHEZ, I.; CALLAO, M.P. High-resolution ¹H Nuclear Magnetic Resonance spectrometry combined with chemometric treatment to identify adulteration of culinary spices with Sudan dyes. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1139-1145, 2011.
- AOAC (AOAC INTERNATIONAL) AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.
- AOAC (AOAC INTERNATIONAL). AOAC International guidelines for validation of qualitative binary chemistry methods. *Journal of AOAC International*, v. 97, p. 1492-1495, 2014.
- ARAÚJO, V.M.; CASSOLI, L.D.; ZAMPAR, A.; SILVA, A.C.L.; DIAS, C.T.S.; MACHADO, P.F. Comparação de metodologias para a determinação do pH e do ponto de congelamento do leite bovino cru sob diferentes características de conservação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.1619-1624, 2011.

- ASTM (ASTM International) Annual Book of ASTM Standard, sStandards practices for infrared, multivariate, quantitative analysis, E1655, vol 03.06, ASTM International: West Conshohocken, 2000.
- BALABIN, R.M.; SMIRNOV, S.V. Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. *Talanta*, v. 85, p. 562-568, 2011.
- BEVILACQUA, M.; BUCCI, R.; MAGRI, A.D.; MAGRI, A.L.; NESCATELLI, R.; MARINI, F. *Classification and Class-Modelling*. In F. Marini (Ed.), *Data Handling in Science and Technology: Chemometrics in Food Chemistry 28*, (pp. 171-233). Amsterdam: Elsevier B.V., 2013.
- BEZERRA, J.R.M.V.; RIGO, M.; RAYMUNDO, M.S.; BASTOS, R.G. *Introdução à tecnologia de leite e derivados*, Guarapuava: Editora Unicentro, 2010.
- BORIN, A.; FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; MARETTO, D.D.; POPPI, R.J. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. *Analytica Chimica Acta*, v. 579, p. 25-32, 2006.
- BOTELHO, B.G.; MENDES, B.A.P; SENA, M.M. Implementação de um método robusto para controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. Abordagem metrológica multivariada. *Química Nova*, v. 36, p 1416-1422, 2013.
- BOTELHO, B.G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L.R. & SENA, M.M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food Chemistry*, v. 181, p. 31-37, 2015.
- BRASIL, Poder Executivo. Decreto número 30.691, de 29 de março de 1952. *Diário Oficial da União*. Rio de Janeiro, 07 jul. 1952.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria número 1, de 7 de outubro de 1981. *Diário Oficial da União*. Brasília, 13 out. 1981.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 62, de 26 de agosto de 2003. *Diário Oficial da União*. Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p.14.

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006. *Diário Oficial da União*. Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8-30.
- BRASIL, Ministério da Justiça; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria conjunta número 46, de 17 de junho de 2008. *Diário Oficial da União*. Brasília, 19 jun. 2008. Seção 1, p.66.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 62, de 29 de dezembro de 2011. *Diário Oficial da União*. Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p.6-11.
- BRASIL, CQuali-Leite. *Monitoramento da qualidade do leite. O que é o CQuali-Leite?* Disponível em <http://www.cquali.gov.br/data/Pages/MJ6368FB74ITEMID93F359BA4EAB4B37AB55378AF60C18E4PTBRNN.htm>. Acesso em agosto de 2012.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Avisos – maio 2013. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/dipoa/dipoa-geral/avisos>. Acesso em novembro de 2016.
- BRERETON, R.G.; LLOYD, G.R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, v. 28, p. 213-225, 2014.
- BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variance, *Journal of the American Statistical Association*, v. 69, p. 364-367, 1974.
- BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G. Quimiometria. *Química Nova*, v. 8, p. 84-99, 1985.
- CAPUANO, E.; BOERRIGTER-EENLING, R.; KOOT, A.; RUTH, S. Targeted and untargeted detection of skim milk powder adulteration by near-infrared spectroscopy. *Food Analytical Methods*, v. 8, p. 2125-2134, 2015.
- CARDENAS, S.; VALCARCEL, M. Analytical features in qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, p. 477-87, 2005.
- CARVALHO, G.R. *A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro*. (Circular técnica 102). Juiz de Fora: EMBRAPA, 2010. 12 p.
- CASSOLI, L.D. *Validação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier para identificação de adulteração em leite cru*. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

- CASSOLI, L.D.; SARTORI, B.; MACHADO, P.F. The use of the Fourier Transform Infrared spectroscopy to determine adulterants in raw milk, *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, p. 2591-2596, 2011.
- CERDÁN, J.F.; PERIS-TORTAJADA, M.; PUCHADES, R.; A. MAQUIEIRA. Automation of the determination of hydrogen peroxide, dichromate, formaldehyde and bicarbonate in milk by flow injection analysis. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 344, p. 123-127, 1992.
- CHINA - State Council of the People's Republic of China. *Regulation on the supervision and administration of the quality and safety of dairy products - Order of the State Council of the People's Republic of China* (n. 536), 9 out. 2008.
- CIFUENTES, A. Food Analysis: Present, Future, and Foodomics. *Analytical Chemistry*, v. 2012, p. 1-16, 2012.
- COELHO, O.A.M. Ractopamina em carne suína: validação de método por ensaio de imunoadsorção enzimática e estudo de ocorrência. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.
- CORDELLA, C.; MOUSSA, I.; MARTEL, A.C.; SBIRRAZZUOLI, N.; LIZZANI-CUVELIER, L. Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p.1751-1764, 2002.
- CEPEA (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada) / CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil). PIB do Agronegócio Brasil – Setembro 2016. Disponível em http://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Relatorio%20PIBAGRO%20Brasil_SETEMBRO.pdf. Acesso em dezembro de 2016
- CUADROS-RODRÍGUEZ, E. PÉREZ-CASTAÑO, C. RUIZ-SAMBLÁS. Quality performance metrics in multivariate classification methods for qualitative analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 612-624, 2016.
- CURRIE, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995), *Pure Applied Chemistry*, v. 67, p. 1699-1723, 1995.
- DAS, S.; SIVARAMAKRISHNA, M.; BISWAS, K.; GOSWAM, B. Performance study of a 'constant phase angle based' impedance sensor to detect milk adulteration. *Sensors e Actuators A*, v. 167, p. 273-278, 2011.

- DE LA FUENTE, M.A.; JUAREZ, M. Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, n. 7, p. 563–585, 2005.
- DE NONI, I. Reference material needs for quality assessment of milk and dairy products. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 9, p. 226-231, 2004.
- DOWN TO EARTH, *Most Indians drinking adulterated milk, finds FSSAI survey*, Disponível em <http://www.downtoearth.org.in/news/most-indians-drinking-adulterated-milk-finds-fssai-survey--35646>. Acesso em março de 2016, 2012.
- DURANTE, C.; BRO, R.; COCCHI, M. A classification tool for N-way array based on SIMCA methodology. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 106, p. 73-85, 2011.
- DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression, *Biometrika*, v. 38, p. 159-71, 1951.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.
- EC (European Commission). Commission regulation (EC) 273/2008 of 5 March 2008. Laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Union*, 2008, L 88/1.
- EIGENVECTOR (Eigenvector Research, Inc.). Sample Classification Predictions. Disponível em http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Sample_Classification_Predictions. Acesso em janeiro de 2016.
- ELIAS, A.O.; VICTORIA, C.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Características físico-químicas e contagem de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp., *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 8, p. 165-170, 2005.
- ELLIS, D.I.; BREWSTER, V.L.; DUNN, W.B.; ALLWOOD, J.W.; GOLOVANOV, A.P.; GOODACRE, R. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews*, v. 41, p. 5706-5727, 2012.
- ELLIS, D.I.; GOODACRE, R. Detecting food authenticity and integrity. *Analytical Methods*, v. 8, p. 3281-3283, 2016.

- ELLISON, S.L.R. & FEARN, T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, p. 468-476, 2005.
- ELLISON, S.R.L. Uncertainties in qualitative testing and analysis. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 5, p. 346-348, 2000.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Estabilidade ao alizarol - Agência de Informação Embrapa. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_195_21720039246.html. Acesso em dezembro de 2016.
- ETZION, Y., LINKER, R., COGAN, U., SHMULEVICH, I. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared/ attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 2779–2788, 2004.
- EURACHEM, The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics, 2ª ed, Teddington: LGC, 2014.
- EWING, G.W. *Métodos instrumentais de análise química*. São Paulo: Edgard Blucher, 1972, 11ª reimpressão, 2009.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistics Division). Disponível em <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em abril de 2016.
- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, p. 455-464, 2002.
- FERREIRA, M.M.C. *Quimiometria*. Editora UNICAMP, 1ª ed., Campinas, 2015, p. 496.
- FIRMINO, F.C.; TALMA, S.V.; MARTINS, M.L.; LEITE, M.O. MARTINS, A.D.O. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, n. 376, p. 65: 5-11, 2010.
- FOCA, G.; COCHI, M.; VIGNI, M.L.; CARAMANICO, R.; CORBELLINI, M.; ULRICI, A. Different feature selection strategies in the wavelet domain applied to NIR-based quality classification models of bread wheat flours, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 99, p. 91-100, 2009.
- FOX, P.F. & MCSWEENEY, P.L.H. *Dairy chemistry and biochemistry*. Springer Science & Business Media, 1998.
- FRANCESCHINIS, E.; SANTOMASO, A.C.; TROTTER, A. & REALDON, N. High shear mixer granulation using food grade binders with different thickening power. *Food Research International*, v. 64, p. 711-717, 2014.

- G1. *Nova etapa da Leite Compensado no RS combate adulteração de produtos.*
Disponível em: <http://g1.globo.com/rs/rio-gree-do-sul/noticia/2015/10/10-etapa-da-leite-compensado-no-rs-combate-adulteracao-de-produtos.html>. Acesso em abril de 2016.
- GINN, R.; WILSON, L.; SOUZA, S.V.C.; CALLE, M.B.; BARBOSA, J.; BERENDSEN, B.; BOCKBORN, I.; BRETNER, M.; DELAHAUT, P.; DOERING, T.; FUERST, P.; GRIFFIN, C.; GUDE, T.; JANOSI, A.; JAUS, A.; KENNEDY, G.; MEIX, M.; HILLA, E.M.; PLONEVEZ, S.; POSYNIK, A.; SAARI, L.; BRUIJNSVOORT, M.; VERDON, E. & WOHLFARTH, R. Determination of semicarbazide in baby food by liquid chromatography/teem mass spectrometry: interlaboratory validation study. *Journal of AOAC International*, v. 89, p. 728-734, 2006.
- GONDIM, C.S. *Validação de métodos qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- GONDIM, C.S.; COELHO, O.A.M.; ALVARENGA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SOUZA, S.V.C. An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: Its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk. *Analytica Chimica Acta*, v. 830, p. 11-22, 2014.
- GONDIM, C.S.; JUNQUEIRA, R.G.; SOUZA, S.V.C. Interlaboratory validation of modified classical qualitative methods for detection of adulterants in milk: starch, chloride, and sucrose. *Food Analytical Methods*, v. 9. p. 2509-2520, 2016.
- GONDIM, C.S.; JUNQUEIRA, R.G.; SOUZA, S.V.C. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 7. p. 433-447, 2011.
- GONDIM, C.S.; SOUZA, R.C.S.; PALHARES, M.P.P.; JUNQUEIRA, R.G. & SOUZA, S.V.C. Performance improvement and single laboratory validation of classical qualitative methods for the detection of adulterants in milk: starch, chlorides and sucrose. *Analytical Methods*, v. 7, p. 9692-9701, 2015.
- GOWIK, P. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8051-8058, 2009.
- GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

- HARNKARNSUJARIT, N.; CHAROENREIN, S. & ROOS, E. Y.H. Microstructure formation of maltodextrin and sugar matrices in freeze-dried systems. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 734-742, 2012.
- HAYNES, P.R. *Food microbiology and hygiene*. 2 ed. New York: Chapman and Hall, 1995. 516p.
- HAYNES, W.M. *CRC Handbook of chemistry and physics: a ready reference book of chemical and physical data*, 93a ed., Boca Raton: CRC Press, 2012.
- HOLLER, F.J. *Princípios de análise instrumental*/ F.J. HOLLER, DOUGLAS A. SKOOG, STANLEY R. CROUCH, 6ª Ed., Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056 p.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Applied Chemistry*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC International*, Feb., p. 96-105, 1998.
- IAL (Instituto Adolfo Lutz). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) *Pesquisa Trimestral do Leite*; Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_2.shtm). Acesso em janeiro de 2016.
- INDIA - Ministry of Health and Family Welfare of India, Food Safety and Standards Authority of India - *Manual of Methods of Analysis of Foods – Milk and milk Products*, 2015. Disponível em http://www.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/Draft_Manuals/LEITE_E_LEITE_PRODUCTS.pdf. Acesso em abril de 2016.
- INDIA - Ministry of Law and Justice - Legislative Department. Food Safety and Standards Act – 2006, n. 34, 23 ago 2006.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.
- IPQ (Instituto Português da Qualidade) - *Leite: ensaios preliminares de análise - exame prévio* (NP 467), 1979.
- JAWAID, S.; TALPUR, F.N.; AFRIDI, H.I.; NIZAMANI, S.M.; KHASKHELI, A.A. & NAZ, S. Quick determination of melamine in infant powder and liquid milk by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Methods*, v. 6, p. 5269-5273, 2014.

- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 19, p. 719-736, 1996.
- KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, v. 102, p. 621-640, 2007.
- KARTHEEK, M.; SMITH, A.A.; MUTHU, A.K. & MANAVALAN, R. Determination of adulterants in food: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 3, p. 629-636, 2011.
- KAWASAKI, M.; KAWAMURA, S.; TSUKAHARA, M.; MORITA, S.; KOMIYA, M.; NATSUGA, M. Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 63, p. 22-27, 2008.
- KEARSLEZ, W. & DZIEDZIC, S.Z. *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*, Chapman & Hall, London & New York, 1995. p. 275.
- KODURI, R.S.; TIEN, M. Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase: role of veratryl alcohol, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 22254–22258, 1995.
- KOHLER, A.; AFSETH, N.K.; JØRGENSEN, K.; REBY, Å.; MARTENS, H. Quality analysis of milk by vibrational spectroscopy. In: E. Li-Chan, J.M. Chalmers & P.R. Griffiths (Eds), *Applications of vibrational spectroscopy in food Science*, Chichester: John Wiley e Sons Ltd., 2010.
- KRAUSE, J. *Color Index revised edition*. Rev. ed, of Color index, 2002. Cincinnati: How Book, 2010.
- LANGTON, S.D.; CHEVENNEMENT, R.; NAGELKEKE, N. & LOMBARD, B. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. *International Journal of Food Microbiology*, v.79, p. 171-181, 2002.
- LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 117, p. 100-114, 2012.
- LEVENE, H. *Contributions to probability and statistics*, Stanford: Stanford University Press, 1960, 278-292.
- LIMA, R.M.J.; FERNEES, S.M.V. & RANGEL, A.O.S.S. Enzymatic determination of urea in milk by sequential injection with spectrophotometric and conductometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 6887-6890, 2004.

- LIU, J.; REN, J.; LIU, Z.M. & GUO, B.H. A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food Chemistry*, v. 172, p. 251-256, 2015.
- LÓPEZ, M.I.; CALLAO, M.P & RUISÁNCHEZ, I. A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach. *Analytica Chimica Acta*, v. 891, p. 62-72, 2015.
- LÓPEZ, M.I.; COLOMER, N.; RUISÁNCHEZ, I.; CALLAO, M.P. Validation of multivariate screening methodology. Case study: detection of food fraud. *Analytica Chimica Acta*, v. 827, p. 28-33, 2014 (a).
- LÓPEZ, M.I.; TRULLOLS, E.; CALLAO, M.P.; RUISÁNCHEZ, I. Multivariate screening in food adulteration: untargeted versus targeted modelling. *Food Chemistry*, v. 147, p. 177-181, 2014 (b).
- MACARTHUR, R. & HOLST, C. A protocol for the validation of qualitative methods of detection. *Analytical Methods*, v. 4, p. 2744-2754, 2012.
- MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics, 2^a ed., 2014.
- MALEKI, M.R.; MOUAZEN, A.M.; RAMON, H.; DE BAERDEMAEKER, J. Multiplicative scatter correction during on-line measurement com near infrared spectroscopy. *Biosystems Engineering*, v. 96, p. 427-433, 2007.
- MARSHALL, R.T. *Standard methods for the examination of dairy products*. 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 546 p.
- MASSART, D., et al., *Handbook of chemometrics and qualimetrics, Parts A and B*. Amsterdam: Elsevier, 1997.
- MATHWORKS, Evaluating goodness of fit. Disponível em <http://es.mathworks.com/help/curvefit/evaluating-goodness-of-fit.html>. Acesso em março de 2016.
- MAZUCHELI, J.; ACHCAR, J.A. Algumas considerações em regressão não linear, *Acta Scientiarum*, v. 6, p. 1761-1770, 2002.
- MENDES, C.G.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA J.B.A.; JÁCOME, C.G.M.; LEITE, A.I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró – RN. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, p. 349-356, 2010.
- MIAW, C.S.W.; AMÂNCIO, G.C.S.; ROCHA, V.N.; MADEIRA, J.E.G.C.; SOUZA, S.V.C. In-house validation of a qualitative method for detection of Roundup Ready soy in soybeans: application of new strategies for qualitative validation. *Quality Assurance*

- and Safety of Crops & Foods*. Aceito para publicação 24.03.2016. DOI 10.3920/QAS2015.0739.
- MILAGRES, M.P. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por cromatografia líquida de alta eficiência – exclusão de íons. 2008. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- MILINSKI, C.C.; VENTURA, C.A.A. Os impactos do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade Do Leite – PNMQL na região de Franca-SP. *Revista Internacional Interdisciplinar - Interthesis*, v.7, p. 170-198, 2010.
- MILMAN, B.L. Chemical Qualitative Analysis II. In B.L. Milman (Ed), *Chemical Identificação e Its Quality Assurance*, (pp. 235-253). Springer, 2011.
- MOITA NETO, J.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química nova*, v. 21, p. 467-469, 1998.
- MOORE, J.C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development e application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010, *Journal of Food Science*, v. 77, p. R118-R126, 2012.
- MOTULSKY H.J.; CHRISTOPOULUS, A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting*. GraphPad Software Inc., San Diego, California, www.graphpad.com, 2003.
- NATA (National Association of Testing Authorities – Australia) (2003) Technical Note 17 – October 2013 - Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Disponível em http://www.nata.com.au/nata/phocadownload/publications/Guidance_information/technical-notes-information-papers/technical_note_17.pdf. Acesso em janeiro de 2016.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 191-195, 2005.
- NIGAM, A & AYYAGARI, A. *Laboratory manual in biochemistry: immunology and biotechnology*, Tata McGraw-Hill, New Delhi, 2007. p. 370.
- OLIVIERI, A.C.; FABER, N.M.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; KALIVAS, J.H.; MARKS, H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry*, v. 78, p. 633–661, 2006.

- OMS (Organização Mundial da Saúde). Questions and Answers on melamine. Disponível em <http://www.who.int/csr/media/faq/QAmelamine/en/>. Acesso em abril 2016.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.A.; VYVYAN, J.R. *Introduction to spectroscopy*. 4 ed. Belmont: Cengage Learning, 2009.
- PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, v. 165, p. 216-224, 2007.
- PINA, M.S.L.; REIS FILHO, A.F.; XAVIER, C.M.O.; FREITAS NETO, J.R.; RODRIGUES, J.M.B.B.; LIMA, V.A.M.; FREITAS FILHO, J.R. Técnicas experimentais para identificação de substâncias estranhas presentes no leite de vaca comercializado em Garanhuns. I Congresso Norte-Nordeste de Química, Anais, Natal, 2007.
- PULIDO, A.; RUISÁCHEZ, I.; BOQUÉ, R.; RIUS, F.X. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p 647-654, 2003.
- RANI, R.; MEDHE, S.; RAJ, K.R. & SRIVASTAVA, M.M. High performance thin layer chromatography for routine monitoring of adulterants in milk. *National Academy Science Letters*, v. 35, p. 309-313, 2012.
- RENNY, E.F.; DANIEL, D.K.; KRASTANOV, A.I.; ZACHARIAH, C.A. & ELIZABETH, R. Enzyme based sensor for detection of urea in milk. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 19, p. 198-201, 2005.
- RINNAN, A.; BERG, F.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, p. 1201-1222, 2009.
- RIOS, A.; BARCELÓ, D; BUYDENS, L.; CÁRDENAS, S.; HEYDORN, K. KARLBERG, B.; KLEMM, K.; LENDL, B.; MILMAN, B.; NEIDHART, B.; STEPHANY, R.W.; TOWNSHEND, A.; ZSCHUNKE, A.; VALCÁRCEL, M. Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN', *Accreditation Quality Assurance*, v. 8, p. 68-77, 2003.
- RIOS, A.; TÉLLEZ, H. Reliability of binary analytical responses, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, p. 509-515, 2005.
- RIOS, E.A.; SILVA, L.C.C.; SILVA, F.A.; PEREIRA, J.R.; TAMANINI, R.; SEIXAS, F.N. ; VERRI, G.L.; BELOTI, V. Avaliação da sensibilidade da prova do amido em leite pasteurizado. In: 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011, Florianópolis - SC. Anais do 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011.

- RITTER, H.L. *Introducción a la Química*. Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1956.
- RIUS, A.; CALLAO, M.P.; RIUS, F.X. Multivariate statistical process-control applied to sulfate determination by sequential injection-analysis. *Analyst*, 122, 737-741, 1997.
- RODIONOVA, O.Y.; TITOVA, A.V.; POMERANTSEV, A.L. Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 78, p. 17-22, 2016.
- RODRIGUES, F. *Manual de bancada para laboratórios (BPL)*. Disponível em: <http://www.queijosnobrasil.com.br/downloads/manualbancada.pdf>. Acesso em março de 2015.
- RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; ALLENDORF, M.E. Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 2, p. 467-483, 2011.
- ROSA-CAMPOS, A.A.; ROCHA, J.E.S.; BORGIO, L.A.; MENDONÇA, M.A. avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. *Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 66, p. 30-34, 2011.
- SANTOS, A.L.S. *β -lactoglobulina em biscoitos semidoces: estudo de degradação no processamento e potencial antigênico, validação de método e avaliação da rotulagem*. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.
- SANTOS, L.G.C.; FERNANDES, E.A.N.; SANTOS, S.S.N.S.C.; BACCHI, M.A.; SARRIÉS, G.A.; BARBOSA JÚNIOR, F. Macro, minor and trace elements in bovine milk from two Brazilian dairy regions. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 291, p. 207–211, 2012.
- SANTOS, M.V. *Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite*. In: J. W. Durr; M. P. Carvalho; M. V. Santos (Org). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo, 2004, p. 269-283.
- SANTOS, P.M.; PEREIRA-FILHO E.R.; RODRIGUEZ-SAONA, L.E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, v. 138, p. 19-24, 2013.
- SANTOS, P.M.; PEREIRA-FILHO, E.R. Digital image analysis – an alternative tool for monitoring milk authenticity. *Analytical Methods*, v. 5, p. 3669-3674, 2013.

- SANTOS, P.M.; WENTZELL, P.D.; PEREIRA-FILHO E.R. Scanner Digital Images combined with color parameters: a case study to detect adulterations in liquid Cow's milk. *Food Analytical Methods*, v. 5, p. 89-95, 2012.
- SANTOS, P.P.B.; GONDIM, C.S.; SOUZA, S.V.C. Avaliação da estabilidade do composto adulterante peróxido de hidrogênio em leite. *XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXIV CBCTA)*, 2014a.
- SANTOS, P.P.B.; GONDIM, C.S.; SOUZA, S.V.C. Avaliação da estabilidade dos adulterantes cloro e hipoclorito de sódio em leite. *XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXIV CBCTA)*, 2014b.
- SCAMPICCHIO, M.; EISENSTECKEN, D.; BENEDICTIS, L.; CAPICI, C.; BALLABIO, D.; MIMMO, T.; ROBATSCHER, R.; KERSCHBAUMER, L.; OBERHUBER, M.; KASER, A.; HUCK, C.W.; CESCO, S. Multi-method approach to trace the geographical origin of alpine milk: a case study of tyrol region. *Food Analytical Methods*, v. 9, p. 1262-1273, 2016.
- SENA, M.M.; POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, v. 23, p. 547-556, 2000.
- SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples), *Biometrika*, v. 52, p. 591-611, 1965.
- SHARMA, K.; PARADAKAR, M. The melamine adulteration scandal. *Food Security*, v. 2, p. 97-107, 2010.
- SHERBON, J.S. Physical properties of Milk – 8, em *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Noble P. Wong (ed.), 3ª ed, Aspen Publishers, 1998.
- SHOEMAKER, L.H. Fixing the F test for equal variances, *The American Statistician*, v. 57, p. 105-114, 2003.
- SILVA, C.A.O.; VALLADÃO, S.A.; GODDARD, C.L.; COIMBRA, F.S.P.; GOMIDES, M.F.; CUNHA, M.R.R.; LABANCA, R.A. Leite UHT: qualidade físico-química e ocorrência de adulterações em amostras coletadas no Estado de Minas Gerais. *Revista de Fundação Ezequiel Dias*, v. 5, p. 99-103, 2009.
- SILVA, L.C.C.; RIOS, E.A.; RIBEIRO JUNIOR, J.C.; TAMANINI, R.; PEREIRA, J.R.; SILVA, F.A.; BELOTI, V. Sensibilidade da prova para a pesquisa de cloretos em leite pasteurizado. In: 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011, Florianópolis - SC. Anais do 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011.

- SILVA, L.C.C.D. Capacidade de detecção de adulteração e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado. 2013. (Tese de doutorado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- SILVA, L.C.C.D.; PEREIRA, T.J.R.; RIOS, E.A.; RIBEIRO JUNIOR, J.C.; BELOTI, V. Preservatives and neutralizing substances in milk: analytical sensitivity of official specific and nonspecific tests, microbial inhibition effect, and residue persistence in milk. *Ciência Rural*, v.45, p. 1613-1618, 2015.
- SILVA, M.C. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema Simplate. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.
- SILVA, P.H.F. Leite – Aspectos de composição e propriedades. *Química Nova na Escola*, n.3, p. 3-5, 1997
- SILVA, R.A.B.; MONTES, R.H.O.; RICHTER, E.M.; MUNOZ, R.A.A. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. *Food Chemistry*, v. 133, p. 200-204, 2012.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- SIMONET, B.M.; RIOS A.; VALCÁRCEL, M. Unreliability of screening methods, *Analytica Chimica Acta*, v. 516, p. 67-74, 2004.
- SKOOG, D.A. *Princípios de análise instrumental* - DOUGLAS A. SKOOG, F.J. HOLLER, Timothy A. NIEMAN, 5ª Ed., Porto Alegre: Bookman, 2002, 836 p.
- SONG, R.; SCHLECHT, P.C.; ASHLEY, K. Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics. *Journal of Hazardous Materials*, v. 83, p. 29-39, 2001.
- SOUZA, R.M. ATR: avanço da espectroscopia de infravermelho na análise de materiais plásticos. Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), v. 21, 2009.
- SOUZA, A.M; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, Parte I. *Química Nova*, v. 35, p. 223-229, 2012.
- SOUZA, S.S.; CRUZ, A.G.; WALTER, E.H.M.; FARIA, J.J.F.; CELEGHINI, R.M.S.; FERREIRA, M.M.C.; GRANATO, D.; SANTANA, A.S. Monitoring the authenticity of

- brazilian UHT milk: A chemometric approach. *Food Chemistry*, v. 124, p. 692-695, 2011.
- SOUZA, S.V.C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. (Tese de doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SPINK, J.; MOYER, D.C. Understanding and Combating Food Fraud [Cover Story], *Food Technology magazine*, v. 7, p. 30-35, 2013.
- STEFFEN, C.A. Introdução ao sensoriamento remoto. Disponível em: <http://www.inpe.br/unidades/cep/atividadescep/educasere/apostila.htm>. Acesso em dezembro de 2016.
- SZYMANSKA, E.; GERRETZEN, J.; ENGEL, J.; GEURTS, B.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L.M.C. Chemometrics and qualitative analysis have a vibrant relationship, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 69, p. 34-51, 2015.
- TAMANINI R.; RIOS, E.A.; PEREIRA, J.R.; RIBEIRO JÚNIOR, J.C.; YAMADA, A.K.; BELOTI, V. Neutralizantes da acidez, conservantes, antibióticos e reconstituintes da densidade em leite UHT produzidos no sul do Brasil. *Veterinária e Zootecnia*; v. 20, p. 149-150, 2013.
- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, p. 535-552, 2004.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry*, v. 74, p. 835-855, 2002.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Applied Chemistry*, v. 78, p. 145-196, 2006.
- TRONCO, M.V. Manual para inspeção da qualidade do leite. UFSM, 4a ed., Santa Maria, 2010. p. 192.
- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I. & RIUS, F.X. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, p. 137-145, 2004.

- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F.X.; HUGUET, J. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, p. 516-524, 2005.
- TUOMELA, M.; STANESCU, I.; KROHN, K. Validation overview of bioanalytical methods. *Gene Therapy*, v.12, p s131-s138, 2005.
- UOL, Operação desmonta esquema de empresas que adulteravam leite no Sul. Disponível em <http://noticias.uol.com.br/cotidiano/ultimas-noticias/2013/05/08/operacao-desmonta-esquema-de-empresas-que-fraudavam-leite-no-sul.htm>. Acesso em março de 2016.
- VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A. & VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 159-171, 1999.
- VEJA, Leite com formol, soda cáustica e água oxigenada foi vendido em SP. Disponível em <http://veja.abril.com.br/economia/leite-com-formol-soda-caustica-e-agua-oxigenada-foi-vendido-em-sp/>. Acesso em novembro de 2016.
- VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. & FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova*, v. 25, p. 609-615, 2002.
- VIGNI, M.L, DURANTE, C.; COCCHI, M. Exploratory Data Analysis. F. MARINI (Ed.), *Data Handling in Science and Technology: Chemometrics in Food Chemistry 28*, (pp. 55-126). Amsterdam: Elsevier B.V, 2013.
- VILELA, D.; LEITE, J.L.B.; RESENDE, J.C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: SANTOS, G.T.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. *Anais...* Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.
- WALSTRA, P. *Food science and technology*. In: P. Walstra (Ed.) Dairy technology, Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
- WARD, J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, v. 58, p. 236-244, 1963.
- WISE, B. W., GALLAGHER, N. B., BRO, R., SHAVER, J. M., WINDIG, W., & KOCH, R. S. *PLS-Toolbox 4.0 for use with Matlab™ (Manual)*. Manson: EigenVector Research Inc., 2006.
- WOLD, S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models, *Pattern Recognition*, v. 8, p. 127-139, 1976.

- WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, p. 624-632, 1999.
- YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. *Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists. Statistical techniques for collaborative tests*. Arlington: AOAC, 1975. 88 p.
- ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, p. 159-163, 2005.
- ZANELA, M.B.; FISCHER, V. *Fatores que afetam a estabilidade do leite ao álcool*. In: GONZÁLEZ, F.D.; PINTO, A.T.; ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. (Org.). *Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico*. 1 ed. Passo Fundo, v. 1, p. 139-164, 2011.
- ZANG, L.G.; ZANG, X.; NI, L.J.; XUE, Z.B.; GU, X. & HUANG, S.X. Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 145, p. 342-348, 2014.
- ZOCCAL, R.; GOMES, A.T. Zoneamento da produção de leite. In: ZOCCAL, R.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, P.C.; ARCURI, P.B.; MOREIRA, M.S.P. (Ed.). *A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. p. 163-180.
- ZOCHE, F.; BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.C.; PARANHOS, J.K.; ROSA, S.T.M.; RAYMUNDO, N.K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. *Archives of Veterinary Science* v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

**6. ANEXOS – EXEMPLOS DE DOCUMENTOS ELABORADOS
PARA OS ENSAIOS COLABORATIVOS DE VALIDAÇÃO
INTERLABORATORIAL**

Prezados Senhores,

Gostaríamos consultá-los a respeito do interesse e possibilidade de colaboração técnica deste laboratório em projeto de doutorado da aluna Carina de Souza Gondim, do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, intitulado "Validação intra e interlaboratorial de métodos qualitativos para controle da qualidade do leite", desenvolvido sob coordenação da Profa. Scheilla Vitorino C. Ferreira de Souza.

Entre os objetivos deste projeto estão: otimizar e validar as provas qualitativas para controle da qualidade do leite descritas na legislação nacional; avaliar suas respectivas adequações aos propósitos de uso, propondo melhorias necessárias a um melhor desempenho; e realizar um estudo colaborativo para validação interlaboratorial das provas qualitativas.

Sendo assim, gostaríamos de convidá-los para participarem do estudo colaborativo para validação interlaboratorial dos métodos já otimizados e validados no Laboratório de Bromatologia da FAFAR/UFMG. Nos meses de maio e junho de 2015, realizaremos o estudo interlaboratorial para validação de provas qualitativas para determinação de amido, cloretos e sacarose em leite cru, conforme cronograma descrito a seguir.

Informamos que os nomes dos laboratórios participantes poderão ser publicados nas seções de agradecimentos e material e métodos da tese, bem como nos agradecimentos da publicação relacionada. No entanto, não serão divulgados resultados individuais que possam possibilitar a identificação dos participantes.

CRONOGRAMA

| Data | Atividades | |
|---------------|---|--|
| | Organizador | Participante |
| 26.03 a 22.05 | <ul style="list-style-type: none"> •Envio para laboratórios, por e-mail, de convite para participação no estudo colaborativo. | <ul style="list-style-type: none"> •Envio para o organizador, por e-mail, da resposta ao convite para participação no estudo. |
| 25.05 a 27.05 | <ul style="list-style-type: none"> •Envio para os laboratórios que responderam ao primeiro e-mail, por e-mail, do termo de adesão ao estudo colaborativo. | <ul style="list-style-type: none"> Envio para o organizador, por e-mail, do termo de adesão devidamente assinado pelos responsáveis técnicos pelos laboratórios participantes. |
| 19.05 | <ul style="list-style-type: none"> •Envio aos participantes, por e-mail, dos procedimentos e respectivos formulários referentes aos métodos que serão validados (para que os laboratórios preparem soluções e infraestrutura para realização das análises, conforme cronograma). | |
| 25.05 | <ul style="list-style-type: none"> •Preparo das amostras para o método de detecção de amido. •Realização de teste homogeneidade do lote preparado. | |
| 26.05 | <ul style="list-style-type: none"> •Entrega de 40 tubos contendo amostras para análise de amido, devidamente identificadas e refrigeradas, do procedimento para análise de amido e do formulário para registro dos resultados. | |
| 27 a 29.05 | <ul style="list-style-type: none"> •Realização de teste de estabilidade. •Recebimento dos formulários contendo os resultados das análises de amido dos participantes. | <ul style="list-style-type: none"> •Realização das análises das 40 amostras para detecção de amido, conforme procedimento descrito pelo organizador. •Registro dos resultados de amido em formulário próprio. •Envio dos resultados de amido por e-mail para o organizador. |

| Data | Atividades | |
|---------------|--|--|
| | Organizador | Participante |
| 06.06 | <ul style="list-style-type: none"> • Preparo das amostras para o método de detecção de cloretos. • Realização de teste homogeneidade do lote preparado. | |
| 07.06 | <ul style="list-style-type: none"> • Entrega de 40 tubos contendo amostras para análise de cloretos, devidamente identificadas e refrigeradas, do procedimento para análise de cloretos e do formulário para registro dos resultados. | |
| 08.06 a 10.06 | <ul style="list-style-type: none"> • Realização de teste de estabilidade. • Recebimento dos formulários contendo os resultados das análises de cloretos dos participantes. | <ul style="list-style-type: none"> • Realização das análises das 40 amostras para detecção de cloretos, conforme procedimento descrito pelo organizador. • Registro dos resultados de cloretos em formulário próprio. • Envio dos resultados de cloretos por e-mail para o organizador. |
| 20.06 | <ul style="list-style-type: none"> • Preparo das amostras para o método de detecção de sacarose. • Realização de teste homogeneidade do lote preparado. | |
| 21.06 | <ul style="list-style-type: none"> • Entrega de 40 tubos contendo amostras para análise de sacarose, devidamente identificadas e refrigeradas, do procedimento para análise de sacarose e do formulário para registro dos resultados. | |
| 22.06 a 24.06 | <ul style="list-style-type: none"> • Realização de teste de estabilidade. • Recebimento dos formulários contendo os resultados das análises de sacarose dos participantes. | <ul style="list-style-type: none"> • Realização das análises das 40 amostras para detecção de sacarose, conforme procedimento descrito pelo organizador. • Registro dos resultados de sacarose em formulário próprio. • Envio dos resultados de sacarose por e-mail para o organizador. |

ADESÃO AO ESTUDO COLABORATIVO – PROJETO D GONDIM

Temos interesse em participar do Estudo Colaborativo para “Validação interlaboratorial de provas qualitativas para detecção de neutralizantes de acidez e conservantes em leite cru (métodos do ácido rosólico - versão modificada, do cloro livre/hipoclorito e do peróxido de hidrogênio), conforme cronograma em anexo. Confirmamos estar cientes e de acordo com as condições descritas a seguir e asseguramos nosso compromisso no cumprimento de todas as etapas estabelecidas.

IMPORTANTE: Informamos que os nomes dos laboratórios colaboradores poderão ser publicados nas seções de agradecimentos e material e métodos do relatório e da tese, bem como nos agradecimentos da publicação relacionada. No entanto, **não serão divulgados resultados individuais de forma a possibilitar a identificação dos respectivos participantes.** Para divulgação dos resultados, os laboratórios serão identificados por números 1 a N, atribuídos aleatoriamente, sendo N o número total de colaboradores.

| | | | |
|---|------------|------|-----|
| Laboratório/Empresa/Instituição | | | |
| Identificação: | | | |
| CNPJ: | | | |
| Inscrição: | | | |
| Tipo | | | |
| <input type="checkbox"/> Universitário | | | |
| <input type="checkbox"/> Órgão Regulador | | | |
| <input type="checkbox"/> Privado – Laboratório de Primeira Parte (Laboratório de Fábrica) | | | |
| <input type="checkbox"/> Privado – Laboratório de Segunda Parte | | | |
| <input type="checkbox"/> Outro: | | | |
| Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) | | | |
| Acreditado na ISO 17025 para o ensaio realizado neste Estudo: | | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | | | |
| <input type="checkbox"/> Não | | | |
| <input type="checkbox"/> Em fase de acreditação | | | |
| <input type="checkbox"/> Acreditado para outros escopos | | | |
| <input type="checkbox"/> SGQ em implantação | | | |
| Responsável: | | | |
| Pessoa para contato: | | | |
| Telefone (contato): | | | |
| E-mail (contato): | | | |
| Endereço completo do local para entrega das amostras (rua, número e complemento): | | | |
| Bairro: | Município: | CEP: | UF: |
| Assinatura: | | | |
| , de de | | | |

CRONOGRAMA

| Data | Atividades | |
|------|--|---|
| | Organizador | Participante |
| | <ul style="list-style-type: none"> Envio para laboratórios, por e-mail, de convite para participação no estudo colaborativo. | <ul style="list-style-type: none"> Envio para o organizador, por e-mail, da resposta ao convite para participação no estudo e necessidade de fornecimento de reagentes. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Envio aos participantes, por e-mail, de procedimento e respectivo formulário referente ao método do ácido rosólico (para que os laboratórios preparem soluções e infraestrutura para realização das análises, conforme cronograma). | - |
| | <ul style="list-style-type: none"> Preparo de soluções reagentes para o método do ácido rosólico. Preparo dos materiais de teste para o método do ácido rosólico. Realização de teste homogeneidade do lote preparado. | - |
| | <ul style="list-style-type: none"> Entrega de do termo de adesão ao estudo colaborativo para assinatura; Entrega de 54 tubos de ensaio contendo materiais de teste, do procedimento de análise do método do ácido rosólico e do formulário para registro dos resultados. | - |
| | <ul style="list-style-type: none"> Realização de testes de estabilidade. | <ul style="list-style-type: none"> Realização da análise dos 54 materiais de teste, conforme procedimento descrito pelo organizador. Registro dos resultados no formulário próprio. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Recebimento dos formulários contendo os resultados dos participantes referentes às análises do método do ácido rosólico. | <ul style="list-style-type: none"> Envio dos resultados do método do ácido rosólico, por e-mail, para o organizador. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Envio aos participantes, por e-mail, dos procedimentos e respectivos formulários referente aos métodos de detecção de cloro livre/hipoclorito e de detecção de peróxido de hidrogênio (para que os laboratórios preparem soluções e infraestrutura para realização das análises, conforme cronograma). | - |
| | <ul style="list-style-type: none"> Preparo de soluções reagentes para os métodos de detecção de cloro livre/hipoclorito e de detecção de peróxido de hidrogênio (óxido de vanádio ou guaiacol). Preparo dos materiais de teste para os métodos de detecção de cloro livre/hipoclorito e de detecção de peróxido de hidrogênio (óxido de vanádio ou guaiacol). Realização de testes homogeneidade dos lotes preparados. | - |
| | <ul style="list-style-type: none"> Entrega de 20 tubos de ensaio contendo materiais de teste, do procedimento de análise do método de detecção de cloro livre/hipoclorito e do formulário para registro dos resultados. Entrega de 20 tubos de ensaio contendo materiais de teste, devidamente identificados e refrigerados, do procedimento de análise do método de peróxido de hidrogênio (óxido de vanádio ou guaiacol) e do formulário para registro dos resultados. | - |
| | <ul style="list-style-type: none"> Realização de testes de estabilidade. | <ul style="list-style-type: none"> Realização da análise dos 40 materiais de teste, conforme procedimentos descritos pelo organizador. Registro dos resultados nos formulários próprios. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Recebimento dos formulários contendo os resultados dos participantes referentes às análises dos os métodos de detecção de cloro livre/hipoclorito e de detecção de peróxido de hidrogênio (óxido de vanádio ou guaiacol). | <ul style="list-style-type: none"> Envio dos resultados métodos de detecção de cloro livre/hipoclorito e de detecção de peróxido de hidrogênio (óxido de vanádio ou guaiacol), por e-mail, para o organizador. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Elaboração de relatório de resultados. Envio aos participantes dos relatórios e certificados de participação. | - |

