



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LYCIO SHINJI WATANABE

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO INSTRUMENTAL E
METODOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM
LEITE EMPREGANDO UV-VIS, HPLC E IMAGENS DIGITAIS
POR *SCANNER***

LYCIO SHINJI WATANABE

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO INSTRUMENTAL E
METODOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM
LEITE EMPREGANDO UV-VIS, HPLC E IMAGENS DIGITAIS
POR *SCANNER***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf.

Londrina
2016

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

Watanabe, Lycio Shinji.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO INSTRUMENTAL E METODOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE EMPREGANDO UV-VIS, HPLC E IMAGENS DIGITAIS POR SCANNER / Lycio Shinji Watanabe. - Londrina, 2016.
110 f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Adulteração em leite - Tese. 2. Desenvolvimento e validação de métodos - Tese. 3. Espectrofotometria UV-VIS e HPLC - Tese. 4. Análise por imagem digital via scanner (AID-scanner) - Tese. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

LYCIO SHINJI WATANABE

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO INSTRUMENTAL E
METODOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE
EMPREGANDO UV-VIS, HPLC E IMAGENS DIGITAIS POR *SCANNER***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 09 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pela orientação durante este trabalho, pelos conhecimentos e experiências que me transmitiu, pelas oportunidades de serviço extra trabalho científico, pela compreensão, paciência, conselhos e apoio, e, sobretudo, por sua amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, pelo apoio moral, amizade, e, sobretudo pelos ensinamentos e dedicação para a realização dos tratamentos das imagens digitais.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelas bolsas de estudo.

À Universidade Estadual de Londrina, à todos os professores e funcionários do Departamento de Química e Medicina Veterinária Preventiva, em especial ao Laboratório de Inspeção de Produto de Origem Animal (LIPOA). Agradeço pela competência e dedicação devotada aos alunos.

À todos os amigos e colegas do Laboratório DIA, pela contribuição direta e indireta na realização deste trabalho, em especial ao Tiago, Vinícius, Leandro, Alan, Helder, Gilberto, Leonel, Agerdânio, Mariana, Letícia, Denise e Drielle.

Aos meus pais, Massao e Teruko, pelo apoio moral, conselhos e por sempre acreditarem em mim. Aos meus irmãos, Massami e Mayumi, ao meu cunhado Almerito e minha sobrinha Fernanda. À todos meus familiares, que sempre me incentivaram a estudar e me deram condições e força para chegar até aqui.

Aos meus amigos de longa data, Yuri Bovolenta, Yves, Pardal, Carol, Devanir, Ilton, Marlon, Cláudia, Alice, Toninho, Taubaté e Gabriel, pela amizade, companheirismo em todas as horas e momentos de descontração e alegria.

À Deus pela concessão da sabedoria, paciência e força para realização de mais um trabalho de minha jornada. Muito Obrigado!

*“Nunca tenha certeza de nada, porque a
sabedoria começa com a dúvida.”*

Sigmund Freud

WATANABE, Lycio Shinji. **Desenvolvimento e validação instrumental e metodológico para determinação de formol em leite empregando UV-Vis, HPLC e imagens digitais por scanner**. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A autenticidade do leite bovino tornou-se um problema corriqueiro. Em 2013, o Ministério Público do Rio Grande do Sul e a ANVISA denunciaram marcas famosas de leites comerciais, por fraudes, envolvendo ureia agrícola e formol. A ureia agrícola foi usada como reconstituente de densidade proteico para mascarar a água, adicionada para aumentar o volume do produto. O formol, por sua vez, teria sido encontrado incidentalmente como resíduo dessa ureia. No entanto, a adição direta e proposital de formol constitui uma prática comum, visando mascarar ou controlar a proliferação bacteriana, proveniente da falta de higiene e/ou refrigeração, que confere o mau cheiro e a cor amarelada ao leite. Considerando sua importância nutricional, seu valor econômico e sua perecibilidade, métodos rápidos e confiáveis são necessários para monitorar a qualidade do leite e detectar fraudes, especialmente as que comprometem à segurança alimentar, como a de formol - agente mutagênico, carcinogênico, tumorigênico e teratogênico. Desta forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema instrumental simples e um método rápido quantitativo para determinação de formol em leite. O sistema denominado *AID-scanner* utiliza a análise por imagem digital capturada de microplaca, por um *scanner* de mesa convencional empregado como detector, após derivatização imediata do leite com o cromógeno floroglucina. A quantificação baseia-se em regressões uni ou multivariadas, a partir do modelo de cores primárias *RGB*, geradas pelo *software* “lab-made” QuantColor. Ressalta-se que os teores de formol são mensurados rapidamente pelo sistema proposto, por não exigir pré-tratamento da amostra e por sua capacidade de detecção simultânea de até 68 amostras com 4 curvas analíticas. A reação de derivatização mostrou-se seletiva para o formol em meio básico, após sua concentração ter sido estudada cineticamente em função do teor de gordura do leite. O sistema instrumental criado em conjunto com o método proposto foi validado para o leite bovino cru “in natura” e industrializado (UHT e pasteurizado, dos tipos integral e desnatado), cumprindo os requisitos da RDC 899/2003 da ANVISA. O desempenho do sistema *AID-scanner* foi comparado à métodos oficiais - espectrofotométrico UV-Vis (legislado no Brasil IN 68/2006 e internacional NIOSH-3500/2003) e cromatográfico (HPLC-PDA, NIOSH-2016, 2003). Entretanto, pelo fato da prova determinada pela IN 68/2006 ser apenas qualitativa e demandar demasiado tempo no preparo por destilação (~2 h); e ainda, pela detecção de formol nos métodos NIOSH 3500 e 2016 ser aplicada a diferentes matrizes que não o leite, recomendando derivatizantes diversos, foram necessários desenvolvimentos e validações prévios nos 2 métodos oficiais, exigindo modificações especialmente no preparo da amostra, para torná-los métodos de referência precisos e aplicáveis. O *AID-scanner* foi avaliado como adequado por ser preciso ($DPR_{\text{máx}}=5,22\%$); apresentar linearidade considerando-se sua complexidade pelas regressões múltiplas para o leite desnatado (UHT e pasteurizado) superiores a 0,99 e, para o leite integral (UHT e pasteurizado) > 0,96; exato com as respectivas recuperações de 98,7% e 97,6%; e seu limite de quantificação de 0,63 mg L⁻¹,

suficientemente sensível para os níveis descritos na literatura como utilizados pelos fraudadores para adulteração. Desta forma, o *AID-scanner* mostrou ser uma ferramenta analítica versátil e ágil, aplicável para quantificação de formol no controle de qualidade do processo nos 5 tipos de leite mais consumidos, levando-se em conta que os resultados foram compatíveis e equivalentes aos dos métodos oficiais UV-Vis e HPLC-PDA.

Palavras-chave: Instrumentação. Conservante. Formaldeído. Adulteração no leite. Derivatização.

WATANABE, Shinji Lycio. **Development and validation of Instrument and methods for formaldehyde determination in milk using UV-Vis, HPLC and digital images by scanner.** 2016. 110 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Bovine milk authenticity has become a commonplace problem. In 2013, the public ministry of Rio Grande do Sul and ANVISA denounced commercial milk famous brands for counterfeit involving agricultural urea and formaldehyde. Agricultural urea was used as protein density reconstitute to mask water, added to increase product's volume. Formaldehyde, in turn, has been found incidentally as urea residue. However, the direct, deliberate formaldehyde addition is a common practice, aiming at masking or control bacterial proliferation due to hygiene lack or cooling absence, which provides yellowing milk with bad odor. Considering their nutritional importance, its economic value and its perishable, fast and reliable methods are needed to monitor milk quality and detect fraud, particularly those involving food safety, such as formaldehyde - mutagenic, carcinogenic, tumorigenic and teratogenic. Thus, this study aimed to develop a simple instrument system and a quantitative rapid method for determination of formaldehyde in milk. The so called AID-scanner system analyzes microplate digital images, captured by a conventional desk scanner employed as detector, immediately after milk with phloroglucin chromogenic derivatization. Quantification is based on single or multivariate regressions established by RGB primary color model, generated by the "lab-made" software QuantColor. It is noteworthy that formaldehyde levels are measured quickly by the proposed system, by not requiring sample pretreatment, leading to simultaneous detection of up to 68 samples with 4 analytical curves. The derivatization reaction was shown to be selective for formaldehyde in basic medium, after its concentration has been studied kinetically upon milk fat content. The instrumental system created in conjunction with the proposed method has been validated for "in natura" raw cow's milk and industrialized (whole and skimmed types of UHT and pasteurized), achieving ANVISA's RDC 899/2003 requirements. The AID-scanner system performance was compared with the official methods - UV-VIS spectrophotometer (legislated in Brazil by IN 68/2006 and the international NIOSH-3500/2003) and chromatographic (HPLC-PDA, NIOSH 2016/2003). However, because of IN 68 be merely qualitative and require too long time to prepare for distillation (~ 2 h); and further, formaldehyde detection by NIOSH's 3500 and 2016 methods be applied to other matrices but non-milk, recommending various derivatizing, it were necessary prior developments and validations in the 2 official methods requiring changes, especially in sample preparation, to apply them as accurate reference methods. The AID-scanner has been assessed as suitable considering its complexity to be accurate (STD DEV_{max} = 5.22%); present linearity greater than 0.99 by multiple regressions for skimmed milk (UHT and pasteurized) and of > 0.96 for whole milk (UHT and pasteurized); accurate with their recoveries of 98.7% and 97.6%; and its quantitation limit of 0.63 mg L⁻¹, be sufficiently sensitive to described literature levels used to tampering by fraudsters. Thus, the AID-scanner shown to be a versatile and flexible analytical tool applicable for formaldehyde quantification in process quality control in the 5 types of the most consumed milk, taking into account that results were consistent and equivalent to the official UV-VIS and HPLC-PDA methods.

Keywords: Instrumentation. Additive. Formaldehyde. Milk's tampering. Derivatization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos maiores produtores de leite do mundo em 2011-2013	26
Tabela 2. Produção regional de leite bovino no Brasil em 2013-2014	26
Tabela 3. Principais estados brasileiros produtores de leite em 2013-2014	27
Tabela 4. Requisitos mínimos de CBT e CCS do leite cru pela IN 62/2011	29
Tabela 5. Substâncias estranhas adicionadas ao leite e motivo de utilização	33
Tabela 6. Possíveis efeitos da exposição de formol em seres humanos	38
Tabela 7. Porcentagem de recuperação, faixa dinâmica de trabalho, limites de detecção e quantificação do método espectrofotométrico por UV-Vis proposto para determinação de formol no leite utilizando acetonitrila na fase do preparo de amostra e derivatização com ácido cromotrópico, conforme condições analíticas descritas na Figura 6	51
Tabela 8. Porcentagem de recuperação, faixa dinâmica de trabalho, limites de detecção e quantificação do método para detecção de formol em leite por HPLC-PDA proposto para determinação de formol no leite utilizando acetonitrila na fase do preparo de amostra e derivatização com 2-4-dinitrofenilhidrazina, conforme condições analíticas descritas na Figura 8	59
Tabela 9. Resultados das regressões lineares univariadas (<i>R</i> , <i>G</i> e <i>B</i>) e multivariadas (<i>RGB</i>) para as curvas de calibração empregando leite desnatado e integral	91
Tabela 10. Regressões lineares univariadas (<i>R</i> , <i>G</i> e <i>B</i>) e seus respectivos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os leites desnatado e integral	93
Tabela 11. Precisão do método proposto para detecção de formol em amostras de leite desnatado e integral, adicionadas de formol, analisadas pelo sistema proposto por imagens digitais capturadas via <i>scanner</i> aplicando regressão linear múltipla (<i>RGB</i>)	93
Tabela 12. Exatidão do método proposto para detecção de formol em leite desnatado e integral, adicionadas de formol em três níveis de concentração, analisadas pelo sistema proposto de imagens	

digitais capturadas via *scanner* (AID-*scanner*), aplicando regressão linear múltipla (*RGB*), expressas pelas taxas de recuperação94

Tabela 13.Comparativo de teores de formol determinados pelos 3 métodos - AID-*scanner* proposto adotando a regressão multivariada *RGB* e métodos oficiais de referência NIOSH – UV-Vis e HPLC-PDA em 10 amostras de leite bovino – 2 de cada tipo de leite adicionadas de formol (185 mg mL^{-1}) (n=3)96

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma dos procedimentos executados no Capítulo 245
- Figura 2.** Sistema de destilação simples e a resultado da prova com ácido cromotrópico utilizado pelo método IN 68/200647
- Figura 3.** Um das replicatas dos pontos diluídos da curva analítica, após destilação simples e derivatização com ácido cromotrópico IN 68/200647
- Figura 4.** Método UV-Vis empregando a destilação na etapa do preparo da amostra e derivatização com ácido cromotrópico. (a) Varredura do ácido cromotrópico (ACT - branco) e do complexo formol-ácido cromotrópico (HCHO-ACT). (b) Curva analítica triplicata (n=3) empregando a destilação de leite para a extração do formol (IN 68/2006) derivatizado com ácido cromotrópico* (NIOSH-3500(2):2003)(Figura 3)48
- Figura 5.** Pontos da curva analítica diluídos com água nas concentrações de formol (0,62; 1,85; 3,08; 6,17; 9,25; 12,34 mg L⁻¹) após *clean-up* do leite e extração por solvente orgânico na proporção 1:1 (v/v) com acetonitrila, segundo Acquaro Jr (2013) e Soman, Qiu e Chan Li (2008), alternativamente a destilação da IN 68/2006, seguida da derivatização com ácido cromotrópico segundo NIOSH-3500(2):200350
- Figura 6.** Método UV-Vis empregando extração por solvente orgânico (acetonitrila) baseado em Acquaro (2013) e Soman, Qiu e Chan Li (2008) para a etapa do preparo da amostra e derivatização com ácido cromotrópico seguindo a NIOSH-3500(2):2003. (a) Varredura espectrofotométrica de 400 a 700 nm do ácido cromotrópico (ACT - branco) e do complexo formol-ácido cromotrópico (HCHO-ACT). (b) Curva analítica em triplicata (n=3) empregando o método proposto** com acetonitrila para a *clean-up*/extração do formol no leite derivatizado com ácido cromotrópico (Figura 5)52
- Figura 7.** (a) Varredura espectrofotométrica de 200 a 800 nm do cromogênico derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)

	diluído. (b) Varredura do complexo formol-dinitrofenilhidrazina (HCHO-DNPH). (c) Cromatograma de formol 46,25 mg L ⁻¹ adicionado ao leite, extraído por solvente e derivatizado por DNPH, mostrando a especificidade e seletividade do método empregando HPLC-PDA proposto***, fixados em λ_{\max} de 350 nm55
Figura 8.	(a) Linearidade para o método de detecção de formol em leite por HPLC-PDA proposto*** a partir das curvas analíticas do complexo HCHO-DNPH feitas em triplicatas (n=3) nas concentrações de 3,08 a 61,67 mg L ⁻¹ e (b)Resíduo aleatorizado. (c) Sobreposição dos cromatogramas cujas áreas do pico (2) do complexo HCHO-DNPH foram empregadas no levantamento das 3 curvas analíticas.....57
Figura 9.	Matriz representando a imagem digital captada65
Figura 10.	Diferentes resoluções da mesma imagem considerando o tamanho real66
Figura 11.	Fenômenos que podem ocorrer com a luz incidente e a forma com que a cor pode ser vista dependendo do material.....68
Figura 12.	Espectro eletromagnético com destaque para a faixa da região visível68
Figura 13.	Cubo de cores RGB e representação da escala de cinza, que parte da coloração preta (0,0,0) até a coloração branca (1,1,1)70
Figura 14.	Um ponto luminoso é convertido em uma linha pela ação de um <i>scanner</i>72
Figura 15.	Estrutura molecular da 1,3,5-trihidroxibenzeno ou floroglicinol ou floroglucina.....74
Figura 16.	Sistema instrumental proposto neste trabalho para determinação do formol em leite. Captura via <i>scanner</i> de mesa convencional imagens digitais, provenientes da reflectância colorimétrica de amostras contidas em microplaca de 96 poços, tratadas na sequencia pelo <i>software</i> “lab-made” desenvolvido QuantColor, baseado no sistema RGB.76
Figura 17.	Parte interna do sistema instrumental para determinação de formol em leite, em que o <i>scanner</i> invertido está sob o suporte de polietileno ao redor da microplaca que contém as amostras77

Figura 18. (a) Áreas selecionadas pelo programa QuantColor para aquisição da imagem digital das amostras. (b) Zoom da área selecionada de cada poço da placa	79
Figura 19. Recursos do software “lab-made” QuantColor. (a) Planilha de planejamento experimental contendo curvas analíticas e amostras de leite adulteradas. (b) Imagem digitalizada para um dos tipos de leite analisado. (c) Exemplo do tratamento dos dados utilizando o programa.....	80
Figura 20. Imagens digitais das microplacas contendo amostras adicionadas de formol dos 5 tipos de leite: cru; longa vida UHT de caixinha (integral e desnatado); e pasteurizado de saquinho (integral de desnatado) nas mesmas condições de preparo, capturadas por <i>scanner</i> de mesa e tratadas pelo <i>software</i> desenvolvido QuantColor.....	82
Figura 21. (a) Análise de agrupamento feito entre diferentes tipos de leites adulterados com 185 mg L^{-1} de formol, derivatizados com floroglucina em meio básico. (b) Distância euclidiana da análise de agrupamento, indicando a separação em 2 grupos – integral e desnatado	83
Figura 22. Esboço do mecanismo de reação da floroglucina com o formol em meio básico de NaOH.....	84
Figura 23. Influência da concentração de NaOH sobre a reação entre o formol e a floroglucina para a formação do composto intermediário A de interesse para os: (a) leites desnatados – UHT e pasteurizado, (b) leites integrais –cru, UHT e pasteurizado.....	85
Figura 24. Imagens digitais das microplacas contendo amostras em diferentes condições de preparo, capturadas por <i>scanner</i> de mesa convencional comercial, após tratadas pelo <i>software</i> desenvolvido QuantColor.....	88
Figura 25. Planejamento de distribuição dos experimentos e imagens digitais do composto intermediário A (HCHO-floroglucina) de cor salmão, formado a partir do leite adicionado de formol em diferentes concentrações derivatizado com floroglucina 1%(m/v) e NaOH 2,5 e 5%(v/v), utilizados para avaliação da linearidade (4 curvas	

analíticas com 7 pontos), precisão (p , $n=4$) e recuperação (3 níveis – $R1$, $R2$, $R3$, $n=4$) para: (a) leite desnatado e (b) leite integral	89
Figura 26. Gráficos das regressões univariadas independentes R , G e B de cada tipo de leite desnatado (a, b, c) e integral (e, f, g)	90
Figura 27. Cores complementares para as imagens digitais do composto A (formol-floroglucina), formado a partir do leite com formol, floroglucina 1,0%(m/v) e NaOH 2,5 e 5,0%(v/v) das placas da Figura 25 (a) e (b) para os leites: (a) desnatado e (b) integral. (c) Varredura do composto intermediário A (formol-floroglucina)	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
ABLV	Associação Brasileira de Leite Longa Vida
ACN	Acetonitrila
AID	Análise de Imagem Digital
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
BITMAP	Mapa de <i>bits</i>
BMP	Windows <i>Bitmap</i>
CCS	Contagem das células somáticas
CTB	Contagem total bacteriana
DNPH	2,4 - dinitrofenilhidrazina
DPC	Pontos por centímetro
DPI	<i>Dots per inch</i> (pontos por polegadas)
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EP	Erro padrão de estimativa
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSV	<i>Hue, Saturation, Value</i> (matiz, saturação, valor)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
PIXEL	<i>Pictures elements</i> (elemento de imagem)
RGB	<i>Red, Green, Blue</i> (vermelho, verde, azul)
RL	Regressão Linear
RLM	Regressão Linear Múltipla
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mL de leite
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA.....	18
CAPÍTULO 1 – ASPECTOS GERAIS DO LEITE	21
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. HISTÓRIA	22
1.2. DEFINIÇÃO	24
1.3. PRODUÇÃO LEITEIRA	25
1.4. QUALIDADE E PARÂMETROS	27
1.5. CLASSIFICAÇÃO DO LEITE BOVINO	29
1.6. ADULTERAÇÕES E FRAUDES.....	31
2. OBJETIVO GERAL	34
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS RECOMENDADOS COMO OFICIAIS PARA ANÁLISE DE FORMOL EM LEITE	35
1. INTRODUÇÃO	36
1.1. FORMOL.....	38
1.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE FORMOL.....	39
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	41
3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	42
3.3 PROCEDIMENTO DOS MÉTODOS	42
3.3.1. PREPARO DA CURVA ANALÍTICA	42
3.3.2. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS LEGISLADO (IN 68/2006).....	43
3.3.3. MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA ALTERNATIVO PROPOSTO POR SOLVENTE ORGÂNICO.....	44
3.3.4. ESQUEMA DOS PROCEDIMENTOS RECOMENDADOS COMO OFICIAIS PARA ANÁLISE DE FORMOL	45
3.4 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 AVALIAÇÕES PRELIMINARES.....	46

4.1.1.	MÉTODO LEGISLADO (IN 68/2006)	46
4.1.2.	MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PROPOSTO PARA EXTRAÇÃO DO FORMOL EM LEITE POR SOLVENTE ORGÂNICO	50
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS	51
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC- PDA).....	54
5.	CONCLUSÃO PARCIAL.....	59

**CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO USO DE INSTRUMENTAL E MÉTODO
PROPOSTO POR IMAGENS DIGITAIS (AID-SCANNER)
PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
ADULTERAÇÃO EM LEITE BOVINO**

1.	INTRODUÇÃO	63
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	65
2.1	IMAGEM DIGITAL	65
2.1.1	RESOLUÇÃO	66
2.1.2	COR.....	67
2.1.2.1	Modelo RGB	69
2.1.2.2	Modelo HSV	70
2.2	DISPOSIÇÃO AQUISITOR DE IMAGEM DIGITAL: SCANNER.....	71
2.3	CONVERSORES E PROCESSADORES: COMPUTADOR	72
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
4.	METODOLOGIA	73
4.1	REGENTES E MATERIAIS.....	73
4.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES	74
4.2.1	SOLUÇÃO DE FLOROGLUCINA 1,0 % (M/V)	74
4.2.2	SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 5% (V/V).....	75
4.3	PREPARO DAS CURVAS ANALÍTICAS	75
4.4	PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA	75
4.5	SISTEMA INSTRUMENTAL PARA ANÁLISE DE FORMOL EM LEITE POR IMAGENS DIGITAIS VIA SCANNER DE MESA	76
4.5.1	HARDWARES E EQUIPAMENTOS.....	76
4.5.2	SOFTWARES DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DAS IMAGENS DIGITAIS	78

4.5.3	PREPARO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÃO ANALÍTICAS INSTRUMENTAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DO FORMOL EM LEITE POR AID-SCANNER	81
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
5.1	AVALIAÇÕES PRELIMINARES QUANTO À REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO FORMOL COM FLOROGLUCINA EM MEIO BÁSICO PARA DETECÇÃO POR AID-SCANNER	81
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO DE DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL (AID-SCANNER)	86
5.3	COMPARATIVO DE EFICIÊNCIA DO MÉTODO PROPOSTO POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL (AID-SCANNER) NA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE CRU, UHT E PASTEURIZADO – INTEGRAL E DESNATADO, FRENTE À APLICAÇÃO DOS MÉTODOS OFICIAIS - ESPECTROFOTOMETRIA (UV-VIS) E CROMATOGRAFIA (HPLC-PDA)	95
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
	REFERÊNCIAS.....	100

JUSTIFICATIVA

O leite bovino é um fluido branco proveniente da secreção das glândulas mamárias das vacas, composto de uma variada combinação de nutrientes essenciais para o organismo, como a água, carboidratos, lipídios, proteínas, complexos biativos, vitaminas e minerais (CAVALETTI, 2008). Além de sua importância nutricional, contribui ainda com parcela representativa na economia brasileira, por sua alta comercialização e consumo (GARRIDO, 2001). O Brasil está entre os cinco maiores produtores de leite do planeta, contribuindo com cerca de 6% da produção mundial. Por outro lado, ainda, cerca de 30% do produto comercializado vem de produção não inspecionada, o que pode representar um dos problemas frente a qualidade do leite (SIQUEIRA et al., 2013; IBGE, 2014).

Quando este produto fica exposto em ambientes abertos, mal higienizados e mal refrigerados, a riqueza nutricional de seu meio torna-se um excelente substrato para o desenvolvimento e multiplicação de diversos microrganismos, inclusive os patogênicos, que provocam alterações físico-químicas no produto, limitando sua durabilidade e qualidade (LEITE, TORRANO, GELLI, 2000; TIMM, 2003). Algumas pesquisas de universidades norte-americanas, classificaram o leite como sétimo (7º) alimento susceptível às adulterações (MOORE; SPINK; LIPP, 2012; SANTOS, 2013).

No Brasil, as adulterações ocorrem de forma criminosas. Geralmente, donos de laticínios aliciam economicamente, os caminhoneiros, fiscais da vigilância e pequenos produtores, para adicionarem substâncias ilegais, como a água, urina, soro de leite e outros, objetivando aumentar o volume do leite produzido e, conseqüentemente, os lucros da empresa (SILVA, 2013; SBRISSA, 2005). Normalmente, estas substâncias são neutralizantes ou conservantes, que tem com função principal o controle físico-químico e microbiológico do leite (KARTHEEK et al., 2011; MAZERE et al., 2015; TAMANINI, 2012).

Em maio de 2013, o Ministério Público do Rio Grande do Sul, juntamente com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), denunciaram a fraude do leite em três marcas conhecidas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) emitiu uma nota técnica confirmando que a fraude foi caracterizada pela adição de ureia agrícola, detectada incidentalmente pela análise de formaldeído (G1, 2013). A ureia é classificada em dois tipos, agrícola e pecuária (MAPA). A ureia agrícola (fertilizante) recebe adição de formol e polivinilacetato,

enquanto a ureia pecuária possui um grau de pureza elevada (PETROBRAS, 1998). Esta ureia agrícola não deveria ser utilizada na alimentação bovina, uma vez que pode ser prejudicial ao animal, gerando resíduos de formol na secreção do leite (BUCKLEY; FISHER; MACKAY; 1988). Nessa fraude da região Sul, a ureia agiu como reconstituente proteico no mascaramento da adição de água e também, no controle do índice crioscópico normal do leite cru (ANVISA, 2013).

No Brasil, há também relatos da adição direta de formol ao leite bovino tendo ação de conservar o leite (FIRMINO, 2010; SOUZA, 2011; ANVISA, 2013). Apesar do formol apresentar diversos sinônimos, como: formalina, formaldeído, metil aldeído, aldeído fórmico, metanal, morbicida, formalite, lisofórmio, entre outros; neste trabalho será denominado, apenas como formol (IARC, 2006). Segundo Silva (2013), o formol é capaz de controlar o crescimento microbiano do leite, ocultando as más práticas de higienização e falta de refrigeração, prolongando a durabilidade do produto (SOUZA, 2014; TRONCO, 2008). Entretanto, estudos indicam que o formol é um agente mutagênico, com potencial carcinogênico (Grupo 1) por suas propriedades toxicológicas, testadas em animais de laboratório (ATSDR, 1999; IARC, 2006). Por este motivo, o uso do formol é vedado como aditivo alimentar no Brasil (ANVISA, 2013).

Além disso, a prova oficial de formol no leite bovino, legislada pela Instrução Normativa nº 68 de 2006, considera que essa análise é apenas qualitativa, ou seja, somente uma prova do positivo-negativo detectável a olho nú, não considerando a sensibilidade do método descrito, superestimando a presença ou não desse adulterante nesse produto com elevada demanda comercial.

Neste panorama, este trabalho teve como principal objetivo desenvolver um sistema instrumental simples e um método rápido quantitativo (*AID-scanner*) para análise de formol em amostras de leite bovino comerciais, sem nenhum tipo de preparo de amostra como limpeza (*clean-up*), utilizando a técnica de análise por imagens digitais via *scanner* de mesa convencional como sistema de detecção, após derivatização imediata com floroglucina, empregada como cromógeno. Os resultados do sistema & método propostos para o leite cru “in natura”, industrializado - UHT e pasteurizado, dos tipos integral e desnatado, foram comparados à dois outros métodos oficiais empregando técnicas já estabelecidas, tomados como métodos de referência, após adaptações a matriz leite, desenvolvimento e validação empregando espectrofotometria UV-Vis (IN 68/2006 e NIOSH-3500,2003) e

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – do inglês HPLC) (NIOSH-2016, 2003).

Para uma melhor apresentação e compressão deste trabalho, esta dissertação foi dividida em três capítulos. No Capítulo 1 será apresentada uma breve introdução sobre o leite, sua importância e os tipos de fraudes frequentes. No Capítulo 2 serão apresentados os métodos adaptados, desenvolvidos e validados a partir de métodos recomendados como oficial, cujo método para formol em leite legislado no Brasil (IN 68/2006) é apenas qualitativo e utiliza a destilação na etapa de extração; em conjunto com um segundo método recomendado internacionalmente (NIOSH-3500, 2003) para formaldeído, utilizando a espectrofotometria UV-Vis, após derivatização com ácido cromotrópico; e um terceiro (NIOSH-2016, 2003) baseado na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), juntamente com suas avaliações de desempenho. E, no Capítulo 3 será abordada uma prévia introdução sobre a análise de imagem digital via *scanner* de mesa, juntamente com o desenvolvimento e validação do sistema instrumental e método propostos denominado de *AID-scanner*. Ao final será feita a avaliação de desempenho do *AID-scanner*, mostrando sua eficiência quando comparado aos 2 métodos oficiais desenvolvidos, validados e utilizados como métodos de referência.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS DO LEITE

ASPECTOS GERAIS SOBRE LEITE

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRIA

Atualmente, o leite de origem animal é considerado como alimento básico presente na dieta dos seres humanos, principalmente de recém-nascidos e crianças. Seus derivados, como queijo, coalhada, manteiga, iogurte e outros, são consumidos mais entre os adultos e idosos, sendo uma ótima fonte de proteínas, carboidrato, vitamina D e cálcio (SILVA, 1997; MUNIZ, MADRUGA, ARAÚJO, 2013; LICHTENSTEIN et al., 2013).

No entanto, nem sempre o leite foi visto dessa maneira. As primeiras hipóteses da utilização do leite de origem animal como alimento humano, surgiram no período pré-histórico, mais especificamente durante a Revolução Neolítica, também conhecida como Revolução Agrícola, há cerca de 11.000 a.C., na região do Oriente Médio (MIDDLETON, 1993; CASTILHO, BARROS FILHO, COCETTI, 2010). O pressuposto parte dos objetos arqueológico utilizados na domesticação dos animais, como vacas, cabras e ovelhas, que levam a ideia que o homem tinha acesso ao leite e a carne dos animais como fonte de alimento (FLANDRIN, MONTANARI, 1998).

O primeiro documento histórico concreto foi encontrado na região do Iraque, a 3.100 a.C., denominado de “Friso dos ordenadores”, constatando o modo de ordenha e a filtragem do leite (DIAS, 2006; CASTILHO, BARROS FILHO, 2010). A partir desta data, vários outros povos como os egípcios, gregos e etruscos tiveram seus documentos relatando a utilização do leite como alimento, esses ordenhavam o leite de cabras e ovelhas para o consumo próprio e para fabricação do queijo, seu primeiro derivado (DIAS, 2006).

Porém, no século V, após a queda da Roma Ocidental, invadida pelos bárbaros, o leite tornou-se escasso em algumas regiões europeias, pois às frequentes guerras levaram à falta de alimentos para o homem e animais, diminuindo o consumo e a qualidade do mesmo (FILDES, 1986; MORFORD, 2003; DIAS, 2006). Nesta época, o leite era consumido em locais de péssima higiene, favorecendo o surgimento de doenças infecciosas entre homens e animais

(CASTILHO, BARROS FILHO, 2010; CASTILHO, BARROS FILHO, COCETTI, 2010).

Uma das primeiras observações que relacionam a saúde animal com a qualidade e o volume de leite ordenhado foi feita no século XII nos mosteiros franceses, em que os camponeses perceberam que alguns cuidados durante a criação de gado leiteiro, a manutenção da limpeza dos estábulos, o clima do local e até mesmo, o volume de produção, melhoravam a durabilidade do produto e diminuía as doenças da época, fazendo com que a atividade comercial do leite e derivados começasse a intensificar-se pela Europa (CASTILHO, BARROS FILHO, COCETTI, 2010; DIAS, 2006).

O primeiro documento sobre o leite no Brasil data de 1552, da região de Salvador (BA), foi descrito em uma carta dirigida ao padre Manuel da Nóbrega em que informava: “doze vaquinhas para criação, é para os meninos terem leite, que é grande mantimento”. Os meninos eram cerca de trinta crianças indígenas, que foram tratadas como primeiros clientes do leite produzido no Brasil, pois era uma forma de mantê-los nas escolas jesuítas (DIAS, 2006).

Um grande passo para maior durabilidade do leite foi dado durante a Revolução Industrial, por volta de 1830, em que o leite fresco foi armazenado e higienizado adequadamente, possibilitando seu transporte para às grandes cidades sem que o mesmo estragasse (JELLIFFE, JELLIFFE, 1978; BEM-NUN, 2006). Outro grande feito ocorreu em 1864, com a instalação de instrumentos industriais, que possibilitaram o processamento do leite com choques térmicos, denominado de pasteurização, que eliminavam certos microrganismos que degradavam o produto (SCHUMAN, 2003; LEITE et al., 2006). Com estas inovações, surgiram os primeiros parâmetros da qualidade do leite, tendo em vista a criação de um conjunto de normas e regulamentos durante a produção, até as análises básicas que as grandes indústrias alimentares, surgidas no século XIX, poderiam realizar antes da venda desses produtos (LEITE et al., 2006; DIAS, 2006).

Pode-se dizer que o leite, após estabilizar-se como alimento básico para os europeus, passou a utilizado em diversos testes culinários, como um importante ingrediente na cozinha, principalmente, na famosa culinária francesa. E, além disso, ele tornou-se veículo de divulgação comercial de outros produtos (DIAS, 2006; CASTILHO & BARROS FILHOS, 2010). Com a introdução do café na Europa no século XVI, o leite passou a ser misturado com o café (cappuccino), sendo uma

bebida da burguesia italiana, enquanto, as classes mais abastadas preferiam o café puro. No século XVII, com a volta dos espanhóis à Europa e, a introdução do chocolate com pimenta, que a princípio foi pouco consumido, porém teve grande repercussão popular após ser adoçado, fato que marcou o surgimento das grandes chocolaterias, como a Nestlé (1870) (DIAS, 2006).

Anos mais tarde, em 1930, as primeiras ordenhadeiras mecânicas e equipamentos de pasteurização foram introduzidos no Brasil, com isso as produções leiteiras fortaleceram-se ao ponto das autoridades preocuparem com a autenticidade e qualidade do produto, considerando o valor econômico da matéria-prima. Até então os regulamentos, não tão claros, variavam regionalmente, tendo influências de seus colonizadores. Com intuito de promoverem uma padronização surgiram vários Regulamentos e Instruções Normativas. Uma das primeiras foi a de 1952 com a definição do leite bovino. E, uma das mais importantes foi a IN 51/2002 que descreve os regulamentos básicos para a produção, autenticidade e qualidade do leite para o consumo humano (DIAS, 2006, BRASIL, 1997; BRASIL, 2002).

1.2. DEFINIÇÃO

O leite é definido legalmente como produto oriundo da ordenha contínua e completa, em condições de higiene, de animais sadios, descansados e bem alimentados (BRASIL, 2002). Cientificamente, o leite é uma emulsão natural, produto da secreção das glândulas mamárias, com uma fase aquosa, onde estão solubilizados sais minerais (cálcio, sódio), lactose e outros compostos hidrossolúveis; e na outra parte branca, estão suspensas as gorduras, micelas proteicas (caseína) e alguns compostos bioativos (FARIA, 1998; SILVA, 1997; CAVALETTI, 2008).

Este produto é considerado como um dos alimentos mais completos na dieta humana, especialmente para grupos mais vulneráveis como crianças e idosos. Seus derivados representam a principal fonte de cálcio na alimentação, nutriente de fundamental importância para formação e manutenção da massa óssea de indivíduos recém-nascidos (CAVALETTI, 2008; SILVA, 1997; BRASIL, 2005a). Além do seu valor nutricional, o leite exerce ainda um papel importante na economia brasileira, por sua alta comercialização e consumo (GARRIDO, 2001).

Segundo Felipe (2012) existe uma supervalorização com relação ao leite, que levam ao consumo excessivo, podendo causar diversas alergias e doenças gastrointestinais, pela presença de compostos, como lactose, colesterol, gordura, proteína e cálcio, principalmente em pessoas intolerantes. A razão dessa discórdia pode estar na consequência dessa riqueza nutricional, pois o leite é propenso ao desenvolvimento de inúmeras classes de vírus e bactérias, que ao se multiplicarem, provocam alterações nos parâmetros físico-químicas e biológicos do produto. Por este motivo, autoridades e técnicos ligados à área da saúde estão cada vez mais preocupados com a qualidade do leite, principalmente pelo risco de surtos de doenças de origem alimentar, através da veiculação de microrganismos (LEITE, TORRANO, GELLI, 2000; TIMM, 2003).

1.3. PRODUÇÃO LEITEIRA

O Brasil é um tradicional produtor de leite bovino. Essa atividade começou efetivamente no século XVI após a chegada da burguesia portuguesa, com características extrativistas (DIAS, 2006). Muitos estados adotaram esta prática como fonte de renda, gerando vários empregos para o setor lácteo. Uma vez que este produto e seus derivados tiveram papel de destaque no agronegócio mundial, sendo a 4° *commodity* agropecuária produzida, perdendo apenas para soja, cana-de-açúcar e milho (SIQUEIRA, 2013), entre 2011 a 2013, o Brasil foi considerado o 4° maior produtor de leite bovino do planeta, ficando atrás dos Estados Unidos, Índia, China (Tabela 1). E em 2014, o Brasil produziu 35,17 bilhões de litros, correspondente a 5,3 % da produção mundial, mantendo-se entre os cinco maiores produtores do mundo. Deste volume total produzido, somente 24,75 bilhões de litros foram inspecionados por instituições sanitárias (municipal, estadual ou federal), ou seja, a produção informal do leite foi de aproximadamente 29,6 %, ficando pela primeira vez abaixo dos 30% (FAO, 2014; IBGE, 2014).

Tabela 1. Classificação dos maiores produtores de leite do mundo em 2011-2013

País	Produção de Leite (Toneladas)		
	2011	2012	2013
Estados Unidos	89.015.235	90.865.000	91.271.058
Índia	57.770.000	59.805.250	60.600.000
China	36.928.896	37.784.491	35.670.002
Brasil	32.096.214	32.304.421	34.255.236
Alemanha	30.323.465	30.506.929	31.122.000
Rússia	31.385.732	31.500.978	30.285.969
França	24.361.095	23.998.422	23.714.357
Nova Zelândia	17.339.000	19.129.000	18.883.000
Turquia	13.802.428	15.977.837	16.655.009
Reino Unido	13.849.000	13.843.000	13.941.000
Mundo	616.956.092	630.183.853	635.575.895

Fonte: FAO (2011- 2013).

Nacionalmente, a região Sul, pela primeira vez no levantamento anual do IBGE de 2014, foi a região com maior produção do país, responsável por 34,7% da produção nacional, seguida da região Sudeste, com 34,6% da produção nacional. As regiões Sudeste e Centro-Oeste apresentaram diminuição de 0,5% em suas produções e a região Nordeste foi a que apresentou maior crescimento na produção com 0,6% referente ao ano de 2013 (Tabela 2).

Tabela 2. Produção regional de leite bovino no Brasil em 2013-2014

Região	Produção de leite (%)	
	2013	2014
Sul	34,4	34,7
Sudeste	35,1	34,6
Centro-Oeste	14,6	14,1
Nordeste	10,5	11,1
Norte	5,4	5,5

Fonte: IBGE (2013; 2014).

Apesar desse aumento na produção sulista, o estado de Minas Gerais permaneceu como o principal produtor de leite em 2014, com 9,37 bilhões de litros, correspondente a 77,0% do total produzido na Região Sudeste e mais de 25 % do total da produção nacional, seguido do Rio Grande do Sul e Paraná. A Região Centro-Oeste participou com 14,1%, estando o Estado de Goiás na 4ª posição nacional (Tabela 3). Em termos municipais, a primeira posição continuou com Castro (PR), seguida pelos Municípios de Piracanjuba (GO) e Patos de Minas (MG) (IBGE, 2014).

Tabela 3. Principais estados brasileiros produtores de leite em 2013-2014

Estado	Produção de leite (%)	
	2013	2014
Minas Gerais	26,20	26,60
Rio Grande do Sul	14,70	14,02
Paraná	11,97	11,95
Goiás	10,75	10,84
São Paulo	10,74	10,11
Santa Catarina	9,00	9,43
Outros	17,00	17,05

Fonte: IBGE (2013, 2014).

Quanto à produtividade, que é a média do volume de leite produzido por animal no ano, o Brasil obteve em média 1.525 litros/vaca/ano, sendo em 2014, 2,2% maior em relação ao ano de 2013 (1.492 litros/vaca/ano). A Região Sul liderou a produtividade nacional com 2.789 litros/vaca/ano, um aumento de 4,3% em 2014, referente a 2013. As maiores produtividades ocorreram no Sul do País, destacando-se o Estado do Rio Grande do Sul com a maior produtividade nacional de 3.034 litros/vaca/ano, seguido por Santa Catarina e Paraná, respectivamente, com 2.694 e 2.629 litros/vaca/ano (IBGE, 2014).

A Região Sudoeste do Paraná está entre os maiores produtores leiteiros do país, pois, além das condições naturais favoráveis à produção do leite, a prática em ministrar diversos negócios agropecuários e socioeconômicos, já vem de heranças familiar e cultural. Outros fatores contribuíram para essa expansão regional, como os avanços tecnológicos na pecuária leiteira, associados aos fatores técnicos e organizacionais, como manejo do rebanho, mão de obra especializada e estrutura cooperativista (PARRÉ; BÁNKUTI; ZANMARIA, 2011; LOPES et al., 2009).

1.4. QUALIDADE E PARÂMETROS

A qualidade inicia-se nas propriedades onde é produzido o leite (GUIDO et al., 2010). Uma produção de leite de excelente qualidade é o objetivo comum entre empreendedores brasileiros e estrangeiros. A qualidade de um leite bovino pode ser definida pelas suas características organolépticas, como boa aparência, textura, sabor e odor agradáveis, e também, pode ser determinada por sua segurança alimentar para quem o consome, pois não veiculando doenças ou bactérias

patogênicas, garante a credibilidade na compra ou venda do produto (FONSECA, SANTOS, 2007; GUIDO et al., 2010; SILVA, 2013).

A qualidade não deve se ater somente aos ganhos econômicos, na produtividade ou na rentabilidade da produção de leite, mas também, na garantia de sua qualidade e segurança à saúde dos consumidores (SILVA, 2013). Como o leite e seus derivados têm grande importância no cardápio dos humanos, carregando princípios de nutrição e saúde, a segurança e a qualidade na fabricação desses produtos são essenciais para as indústrias lácteas (ZAFALOM, BERGAMASCHI, OLIVEIRA, 2011). Os cuidados com o leite devem estar presentes desde o início, ou seja, desde o trato dos animais, passando pela ordenha, até que chegue à indústria e, posteriormente à mesa do consumidor (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2016). O principal manejo encontra-se nas propriedades, pois depois que o leite é ordenhado, dificilmente existirá melhora na sua qualidade. Por isso, o foco tem sido direcionado para o produtor de leite, que é responsável pelo início do processo da qualidade (FONSECA, SANTOS, 2000; MARTINS et al., 2007).

Para estimular os programas de melhoria da qualidade do leite brasileiro, a Instrução Normativa nº 51 de 2002 (BRASIL, 2002) e, posteriormente, com a IN nº 62 (BRASIL, 2011) foram estabelecidas algumas normas e regras pelo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002), com o objetivo de estabelecer padrões de qualidade do leite cru refrigerado.

As análises das propriedades organolépticas e físico-químicas visam avaliar o valor alimentar ou rendimento industrial e, também detectar possíveis fraudes. A maioria das análises do controle de qualidade baseia-se nestas características e em alterações destas. Assim, é importante conhecer a composição média normal do leite: 3,2% de proteína, 3,5% de gordura, em torno de 4,6% de lactose e 0,7% de sais, totalizando, aproximadamente, 12% de sólidos totais. Lembrando que em alguns desses compostos como a proteína, a legislação limita um teor mínimo no produto, como por exemplo, a proteína que é de 3,0% (SILVA, 2013).

As avaliações das propriedades físico-químicas do leite são essenciais, pois são consideradas, juntamente com as análises microbiológicas, parâmetro de qualidade, possibilitando assim estabelecer um critério de pagamento ao produtor (FAGUNDES, 1997; TEIXEIRA, 1998).

Já os parâmetros biológicos da qualidade do leite, limitados pela IN 62/2011, são: a contagem total bacteriana (CTB) com limite de 750.000 UFC/mL e, a

contagem de células somáticas (CCS) com até 750.000 células/mL. Essa normativa prevê a diminuição progressiva dos limites de CCS e CTB, com objetivo de que o produto brasileiro alcance padrões internacionais até julho de 2017 (BRASIL, 2002) (Tabela 4).

Tabela 4. Requisitos mínimos de CBT e CCS do leite cru pela IN 62/2011

Região	Mudança em			
	Jul/2008	Jul/2011	Jul/2014	Jul/2016
Sul, Sudeste e Centro Oeste	Jul/2008	Jul/2011	Jul/2014	Jul/2016
Norte e Nordeste	Jul/2010	Jul/2013	Jul/2015	Jul/2017
CCS (1000 células/mL)	750	600	500	400
CBT (1000 UFC/mL)	750	600	300	100

Fonte: Adaptado de BRASIL (2011) e MILKPOINT (2014).

No final de 2011, a IN 51/2002 foi revogada pela Instrução Normativa Nº 62/2011, porém ela só alterou o cronograma da implementação imposta pela IN 51, uma vez que, somente 40% dos produtores brasileiros conseguiram produzir leite com qualidades abaixo dos limites de CCS e CBT propostos (BRASIL, 2011). Por enquanto, as autoridades seguem esses parâmetros, porém o problema está na ausência de penalizações para produtores e laticínios com médias superiores aos limites de CCS ou CBT. Sem penalizações previstas pela lei, talvez seja pouco provável que haja, independentemente dos limites padronizados, uma melhoria na qualidade do produto (MILKPOINT, 2014).

1.5. CLASSIFICAÇÃO DO LEITE BOVINO

Para um melhor conhecimento é preciso entender as mudanças nas nomenclaturas ocorridas para cada tipo de leite. Antes de 2002, haviam os leites pasteurizados dos tipos A, B ou C. Porém com a implementação da Instrução Normativa 51/2002 houve mudanças na nomenclatura. O “leite do tipo C” passou a ser chamado de “leite cru refrigerado” até o ano de 2007, extinguindo o leite do tipo C. Entretanto, isso gerou confusão entre os produtores, já que os outros tipos de leite também eram pasteurizados. Na tentativa de minimizar esta confusão, no ano de 2011, com a IN 62/2011, extinguiu-se o leite tipo B, passando a ser classificado como “leite cru refrigerado” e, após a pasteurização, chamado de “leite pasteurizado”. Porém, só aumentou mais a confusão dos nomes e tipos de leite. Em

suma, a ideia fundamental da lei era aumentar a qualidade do leite tipo C para B, tendo somente os leites do tipo A e B, elevando dessa forma os parâmetros de qualidade exigidos para o leite cru produzido no país. Porém, não foi o que ocorreu (BRASIL, 2002, 2011; MILKPOINT, 2014).

Atualmente, a legislação brasileira classifica o leite cru em: leite cru refrigerado tipo A e leite cru refrigerado. O leite cru refrigerado tipo A origina o leite pasteurizado tipo A e derivados lácteos, sendo produzido em granjas leiteiras que respeitam várias exigências, como: a ordenha é obrigatoriamente mecânica, realizada em sala própria, com canalização em circuito fechado; não recebendo leite de outros locais; e não havendo transporte do mesmo; com armazenamento em tanques refrigeração (máximo 4 °C); obedecendo parâmetros microbiológicos e de CCS (contagem de células somáticas). O resultado dessas exigências pode ser constatado em sua qualidade, pois quanto menos contato do leite com o meio externo menos contaminação ele está sujeito, resultando em um prazo maior de validade para o leite tipo A (BRASIL, 2002, 2011).

Já o leite cru refrigerado, após tratamento térmico adequado, pode originar: o leite pasteurizado, o leite UHT e derivados lácteos. Não há nenhuma exigência quanto ao tipo de ordenha para o leite cru refrigerado, podendo ser manual ou mecânica, circuito fechado ou semiaberto. Seu transporte aos laticínios deve ser feito por caminhões isotérmicos em um prazo máximo de 48 horas, no qual o leite deve permanecer obrigatoriamente refrigerado em tanques de expansão a no máximo 4°C ou tanques de imersão a no máximo 7°C, ou ser entregue em até 2 horas após a ordenha, em temperatura ambiente (BRASIL, 2002).

O leite pasteurizado, termo em homenagem ao bacteriologista Louis de Pasteur, é todo leite cru que passa por um tratamento térmico nas temperaturas entre 72 a 75 °C, inferior ao ponto de ebulição, durante 15 segundos, com imediato esfriamento a 4 °C (PAULILO, 2001).

O leite UHT (*Ultra High Temperature*), também chamado de longa vida ou ultrapasteurizado, é o leite que passa por um aquecimento entre 130 a 150 °C, por 2 a 4 segundos, seguido de resfriamento inferior a 32 °C. Durante este processo pelo rápido aquecimento e resfriamento, pode ocorrer leve sedimentação e gelatinização. Para evitar isso, o Regulamento do leite UHT (BRASIL, 1997) permite a adição de até 0,1% de estabilizantes proteicos (citratos e/ou fosfatos sódico). Este tipo de leite

tem sido responsável pelo crescimento do mercado de leite no Brasil, desde 1972, pelo fato de ter durabilidade de 6 meses (SILVA, 2004; TAMANINI, 2012).

Nos mercados brasileiros existem somente três tipos de leite fluido sendo ofertados: o leite pasteurizado do tipo A; o leite pasteurizado e o leite UHT; todos podem ser encontrados nos mercados brasileiros variando-se no seu teor de gordura: integral (mínimo 3,0%), semidesnatado (entre 0,6-2,9%) e desnatado (máximo 0,5%). O leite pasteurizado é armazenado em sacos plásticos; e o leite UHT, encaixotados em caixas de papelão laminadas; ambos recipientes esterilizados e lavados, popularmente chamados de “leite de saquinho” e “leite de caixinha” ou leite longa vida, respectivamente (SOUZA, 2014; BRASIL, 2002).

1.6. ADULTERAÇÕES E FRAUDES

Nesses últimos anos, o leite é um dos alimentos mais envolvidos em notícias sobre fraudes (MOORE; SPINK; LIPP, 2012). Os motivos das fraudes são diversos, desde uma simples adulteração feita por pequenos produtores pela falta de infraestrutura na refrigeração ou armazenamento do produto, até a um esquema de empreendedores que objetivam aumentar os lucros, fornecendo produtos de qualidade inferior ao recomendado legalmente, não só enganam aos consumidores economicamente, mas também, expondo-os à elevados riscos de saúde, dependendo do tipo da fraude. Como é o caso que ocorreu na China em 2008, onde seis crianças entraram em óbito e mais de 300 mil pessoas adoeceram, após terem consumido leite adulterado com melamina, uma substância tóxica usada na produção de plásticos e fertilizantes que visavam simular um aumento no teor proteico do leite após adição de água (SHARMA; PARADAKAR, 2010).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o leite é considerado fraudado, adulterado ou falsificado, quando: for adicionado qualquer volume de água, conservante, neutralizante ou qualquer substância estranha à sua composição; estiver fora de seus parâmetros de qualidade; sofrer qualquer tipo de extração de sua composição; e for exposto ao consumo como leite cru ou fora de suas garantias rotuladas e verdadeiras. Se o leite for constatado com qualquer destas características, o produto será considerado como tal e imediatamente, todos os lotes serão recolhidos dos mercados e

indústrias, sendo encaminhados para: fabricação de sabão, caseína industrial, fertilizante ou utilizado como ração animal, quando for apropriado (BRASIL, 1997; SILVA, 2013).

A adulteração no leite bovino pode ocorrer em diversas formas. A principal delas é a fraude por adição de água, não sofisticada, mas é a mais comum. Dificilmente ela ocorre de forma isolada, pois pode ser facilmente detectada pela prova de densidade e/ou crioscopia. Por este motivo, os criminosos, conhecendo as análises de rotina, sofisticam e inovam, em adulterações com substâncias que agem como reconstituintes, neutralizantes e conservantes, visando dificultar a detecção dos mesmos no leite (FIRMINO et al., 2010; GIOMBELLI et al., 2011; MENDES et al., 2010; SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2011; TRONCO, 2008).

Reconstituintes são substâncias que mascaram a adição de água no leite, simulando aparentemente uma reconstituição da densidade do produto. Como por exemplo, sal, açúcar, farinha, amido, soro de leite, uréia agrícola, melamina e outros. (TRONCO, 2008; SHARMA; PARADAKAR, 2010; ANVISA, 2013).

Neutralizantes são substâncias que regulam, controlam ou tamponam o pH do leite em estado de deteriorização. Ou seja, quando o leite encontra-se em péssimas condições de higiene, por falta de refrigeração após a ordenha ou outro motivo, apresenta um excesso de microrganismos no meio, que metaboliza a lactose em ácido láctico e, conseqüentemente, eleva a acidez titulável do produto. E essas substâncias, como a soda cáustica e o bicarbonato sódico, conseguem neutralizar a acidez do meio (SANTOS; FONSECA, 2007; BRASIL, 2011a).

Os conservantes são substâncias que agem diretamente no meio microbiológico do leite, com objetivo de reduzir, controlar ou eliminar a multiplicação dos meios bacterianos, virais e fúngicos, que têm por função a degradação da matéria orgânica do leite, aumentando assim, a durabilidade do produto (SILVA, 2013). Os conservantes mais utilizados são o cloro, hipoclorito sódico, água oxigenada e formol (TRONCO, 2008).

No Brasil, diversos esquemas de adulteração em leite foram descobertos, dentre as fraudes todos tiveram relação com o aumento de volume de leite. Na Tabela 5 estão apresentadas algumas substâncias utilizadas nas fraudes do leite bovino brasileiro desde 1997 (KARTHEEK et al., 2011; TRONCO, 2008).

Tabela 5. Substâncias estranhas adicionadas ao leite e motivo de utilização

Substância	Motivo de utilização
Amido Sacarose Cloreto de sódio Uréia	Disfarçar a concentração inadequada de água, mantendo a densidade normal
Bicarbonato de sódio Hidróxido de sódio	Neutralizar o aumento da acidez do leite quando em estado de deteriorização
Peróxido de hidrogênio Formol Antibiótico Ácido bórico Ácido salicílico	Conservar o leite, evitando a ação de microrganismos

Fonte: Adaptado de Lisboa, Bossolani (1997).

Entretanto, a adulteração que têm preocupado e movimentado mais às autoridades fiscais, como a ANVISA, é a fraude por adição de formol no leite. Existem vários trabalhos científicos e notícias que indicam a presença de formol e outras substâncias fraudulentas do leite.

No trabalho de Firmino et al. (2010), das sessenta amostras de leite cru coletadas em laticínios de Minas Gerais, 13% dessas amostras estavam com formol e 40% com nitrato sódico. Já na trabalho de Souza et al. (2011) 86 % das amostras de leite UHT, coletadas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, estavam adulteradas com pelos menos um tipo de adulterante: formol, peróxido de hidrogênio ou cloro; sendo que 44 % do total de amostras continha formol.

Conforme descrito no início deste trabalho em 2013 ocorreu uma denúncia por parte do Ministério Público do Rio Grande do Sul (MP-RS) juntamente com a ANVISA da fraude do leite com água, uréia e formol em três marcas conhecidas (G1, 2013). E no início de 2014, uma das últimas notícias, com a Operação Leite Compensado 4, o MP-RS realizou mandados de busca e apreensão em oito cooperativas e transportadoras do estado, que fraudavam o leite com soda cáustica, formol e água oxigenada de duas marcas de empresas famosas. Segundo o MP-RS, a escala do volume de leite adulterado esta na ordem de milhões de litros, considerando as operações anteriores iniciadas desde 2009, sendo que neste último cerca de 300 mil litros do produto foram comercializadas nas várias cidades do Paraná e de São Paulo. Segundo a notícia, uma das empresas afirmou em nota que os lotes ditos pelo MP, passaram nos testes previstos pela legislação e, que só após

denúncia sobre a possível contaminação do leite, decidiram, como medida preventiva, recolher os lotes de leite UHT do mercado (VEJA, 2014; ANVISA 2013).

Em síntese, este cenário retrata os motivos dessas fraudes em leite. Além da motivação financeira, a dificuldade de fiscalização dos órgãos responsáveis (municipal, estadual e federal), e também, a falta da existência de punibilidade mais severa, fazem com que estes tipos de casos só aumentem, levando a prejuízos, não só financeiros aos consumidores, mas também à prejuízos quanto à sua saúde (KARTHEEK et al., 2011).

Mesmo com as normativas relacionadas com a normalidade do leite, mas especificamente com a IN 62/2011, que determina a pesquisa de reconstituintes, neutralizantes e conservantes, inclusive com a determinação de formol tendo que ser feita em todos os tanques dos caminhões transportadores de leite que chegam à indústria, ocorre que algumas provas são de difícil execução, dentre elas, a prova oficial para detecção de formol que é demorada e elaborada, inviabilizando testes na escala demandada.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um sistema instrumental & um método para determinação quantitativa de formol em leite (cru, UHT, pasteurizado-integral e desnatado) que seja rápido, confiável, simples, comparável aos métodos oficiais e aplicável à rotina do controle de qualidade de processo e produtos, utilizando como detector um *scanner* de mesa convencional para capturar imagens digitais, analisando-as por modelo *RGB* via *software* “lab-made”. Para isso, primeiramente os métodos espectrofotométrico UV-Vis legislados no Brasil IN 68/2006 e NIOSH-3500(2):2003, em conjunto com o cromatográfico HPLC-PDA internacional NIOSH-2016(2):2003, deverão ser avaliados e, após proposição de alternativas de execução mais rápidas, serem validados para servirem como métodos de referência, para comparativo de desempenho e eficiência do sistema & método proposto no uso laboratorial.

CAPÍTULO 2
AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS
RECOMENDADOS COMO
OFICIAIS PARA ANÁLISE DE
FORMOL EM LEITE

AValiação DOS MÉTODOS RECOMENDADOS COMO OFICIAIS PARA ANÁLISE DE FORMOL EM LEITE

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a análise de formol em leite legislada no Brasil encontra-se especificada na Instrução Normativa N° 68/2006, no tópico Métodos Analíticos Físico-Químicos Oficiais para Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006). A norma classifica o método como qualitativo, o qual indicará se há ou não a presença do conservante no produto. Se houver formol o leite é destinado à fabricação de sabão e caseína industrial (SILVA, 2013).

O método legislado IN 68/2006 pode ser dividido em duas etapas: a primeira consiste na preparação da amostra por separação de formol por destilação simples; e a segunda, trata-se da reação de derivatização do formol com ácido cromotrópico para detecção por UV-Vis (BRASIL, 2006). Apesar da IN 68/2006 considerá-lo apenas como método qualitativo, muitos trabalhos e livros que classificam a etapa de derivatização como quantitativa para métodos espectrofotométricos (FAGNANI et al., 2002, 2003; DAR et al., 2012; NIOSH-3500, 2003c). A consideração sobre classificar a IN 68/2006 como qualitativa, baseia-se na sensibilidade obtida pela reação entre o ácido cromotrópico e o formol, uma vez que esta reação é utilizada na química desde 1937, tendo sido comprovada por Georghiou e Ho em 1989 (GASPARINI et al., 2008; GEORGHIOU, HO, 1989).

Na versão original do método de Georghiou e Ho (1989) esses recomendavam a utilização de água destilada nos captadores ou recolhedores de formaldeído. As alíquotas com formol misturadas ao ácido cromotrópico e ácido sulfúrico concentrado, gerariam assim, um produto p-quinoidal de coloração violácea, quantificável por espectrofotômetro (NIOSH, 2003c; SILVA, 2013). Todavia, o método original exibia problemas com a estabilidade do formaldeído ao longo do tempo e variava de acordo com o tipo de frasco utilizado para o armazenamento (MACFADYEN, 1945). Segundo MacFadyen (1945), o método foi refinado com o uso de uma solução de bissulfito sódico a 1% em banho-maria, o qual garantiria a completa formação do complexo p-quinoidal, aumentando sua eficiência de 80% para 95%. Essas mudanças foram incorporadas na versão mais recente do método,

publicado pelo NIOSH-3500(2) (2003c). É importante ressaltar que o manual internacional NIOSH trás apenas recomendações do uso do derivatizante frente o formaldeído em diferentes equipamentos/detectores, como: o 2541(2)(NIOSH, 2003a) que analisa o complexo formado entre o formaldeído e a oxazolidina via cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-FID); o 2016(2) (NIOSH, 2003b), em que o formaldeído é derivatizado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), analisado via HPLC-DAD; e o 3500(2) (NIOSH, 2003c) que analisa o complexo formaldeído-ácido cromotrópico, detectado via UV-Vis.

Com o decorrer dos anos, ainda são encontrados trabalhos que relatam problemas com este método de derivatização. No trabalho de Georghiou e Ho (1989), os autores esboçaram possíveis etapas da reação de derivatização, para explicitação da variação de cor em uma mesma amostra, mais bem explicado por Fagnani (2003) que percebeu pelo mecanismo reacional de formação do complexo, que este dependia apenas da concentração de H^+ , não necessariamente do ácido sulfúrico. Fagnani (2003) e Gasparini et al. (2008) relataram problemas com o uso do ácido sulfúrico na reação, pois, além de elevada periculosidade ao analista e ao meio ambiente, o mesmo era influenciado por diferentes ambientes atmosféricos (Ar, N_2 ou O_2). Assim testaram ácidos menos corrosivos e outras substâncias não tóxicas mantendo ambientes fixos, concluindo assim, que o ácido sulfúrico poderia ser substituído sem diferenças significativas.

Além disso, têm-se noticiado que o método IN 68/2006 demanda elevado tempo de análise. Recentemente, nas Operações Leite Compensado, o farmacêutico Fabiano Barreto, um dos supervisores técnicos do Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS), afirmou que utilizando este método oficial em 60 amostras de leite, demorou cerca de 15 dias para avaliar a presença ou não de formol, ou seja, aproximadamente 4 amostras/dia. Devido ao elevado tempo, os técnicos desenvolverem uma metodologia, não descrita, porém que garante eficácia de análise, multidetectividade e quantificação de formol e outros interferentes em até 24 horas (ZH, 2013; G1,2014).

Com intuito de validar o método oficial legislado IN 68/2006, este capítulo irá avaliar o pré-tratamento da amostra segundo a IN 68/2006, incorporando a derivatização do método recomendado como oficial NIOSH-3500(2):2003, encontrado no manual NIOSH, com detecção UV-Vis, na tentativa de torná-lo mais rápido e quantitativo. Em outra etapa, será avaliado o NIOSH-2016(2):2003, que se

baseia em um método que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD, ou em inglês HPLC-PDA), objetivando conseguir um método que gere resultados confiáveis para serem utilizados como referência frente ao método proposto do *AID-Scanner*. Nessa avaliação serão consideradas algumas possibilidades de adaptações e melhorias visando minimizar o tempo para o preparo de amostra e a capacidade de quantificação.

1.1. FORMOL

O formol, também popularmente chamado de formalina, é uma solução aquosa de formaldeído na concentração de 35 a 50% (m/m), estabilizado em álcool de 6-15%. O formaldeído ou metanal é uma molécula simples apresentando a função carbonila ($H_2C=O$). Devido a essa simplicidade, é altamente volátil a temperatura ambiente, polimerizar-se em meio aquoso e, também se oxida em metanol (IARC, 2006; IPCS, 2002). Esta elevada reatividade, faz com que o formol seja altamente tóxico ao ser ingerido, inalado ou em contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea, pois reage mutagenicamente com as células sadias transformando-as em células carcinogênicas (INCA, 2015). Por este motivo, esta substância foi proibida de ser usada em vários setores, como o de beleza, cosmético e alimentício. E, nos setores em que é ainda utilizada, existe um limite legal de exposição do formol ao homem, o qual se não obedecido pode levar a efeitos prejudiciais à saúde, além de multas às empresas (ANVISA, 2005b; 2013) (Tabela 6).

Tabela 6. Possíveis efeitos da exposição de formol em seres humanos

Concentração média de formol (ppm)	Tempo médio de exposição	Efeitos à saúde
0,8 a 1,0	Seguidas Exposições	Percepção olfativa
Até 2,0	Única vez ou exposições repetidas	Irritante aos olhos, nariz e garganta
3,0 a 5,0	30 minutos	Lacrimação e intolerância por algumas pessoas
10,0 a 20,0	Tempo não especificado	Dificuldade na respiração e forte lacrimação
25,0 a 50,0	Tempo não especificado	Edema pulmonar, pneumonia, perigo de vida
50,0 a 100,0	Tempo não especificado	Pode causar a morte

Fonte: adaptado do INCA(2015).

1.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE FORMOL

Segundo o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional - “National Institute for Occupational Safety and Health” (NIOSH), o formol pode ser analisado oficialmente por três métodos: espectrofotometria UV-Visível empregando ácido cromotrópico (NIOSH-3500(2), NIOSH, 2003c); cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD, ou do inglês HPLC-PDA) usando 2,4 – difenilhidrazina (DNPH) (NIOSH-2016(2), NIOSH, 2003b); e com derivatizante oxazolidina por cromatografia gasosa com ionização de chama (CG-IC, ou do inglês GC-FID)(NIOSH-2541(2), NIOSH, 2003a). Estes métodos recomendados como oficiais podem ser encontrados em diversos trabalhos da literatura aplicados á diferentes tipos de ambientes e matrizes, que vão desde uma simples detecção de formol em ar ou água, até uma análise complexa em produtos cosméticos, de limpeza e alimentos. Como nos trabalhos de Pierotti (1990), que detectaram o formol via GC-FID no ar atmosférico; ou como proposto por Velikonja et al. (1995) que analisaram o formol em água, fazendo uma comparação entre os métodos citados. Gryllaki-Berger et al. (1992) trazem uma comparação entre os métodos UV-Vis utilizando ácido cromotrópico como derivatizante, UV-Vis aplicando acetilacetona (Reagente de Nash) e HPLC com DNPH para análise de formol em produtos cosméticos e de limpeza geral. Já na área alimentícia Liu et al. (2005) analisaram formol em cogumelos (*shiitake*) por HPLC-PDA. Também podem ser encontrados trabalhos com outros métodos não oficiais, como a fluorimetria (WANG et al., 2010; ZHEN et al., 2007), a polarografia (ZHANG, ZHANG, HE, 2002) e os sensores eletroquímicos (ZHAO, LI, JIAO, 2006), porém para matrizes mais simples, como ar e água.

Para uma matriz mais complexa, como o leite, composta por suspensões insolúveis de macromoléculas (gorduras, proteínas e outras partículas), é necessário um preparo de amostra com etapa de limpeza (*clean-up*) (BANDEIRA et al., 2014; KOLBERG et al., 2009). Esta etapa de *clean-up* é fundamental, pois reduz as interferências e o efeito de matriz nos diversos tipos de detectores, como nos espectrofotômetros UV-Vis, que realizam a quantificação pela transmitância (passagem) de luz. As grandes partículas, se não retiradas, tornam-se interferentes que dispersam a luz (chamado de efeito Tyndall), impossibilitando uma quantificação

confiável e real (SMITH, 2005; PIVELI, 2014). Para que as análises de formol sejam bem sucedidas, é importante prestar atenção ao preparo da amostra/matriz em que o formol pode estar; a forma de detecção; e ao uso de agente derivatizante (BANDEIRA et al., 2014). O formol pode ser determinado por diversos métodos, entretanto a sua análise dependerá diretamente da necessidade ou não do preparo de amostra.

Nos métodos cromatográficos, o preparo de amostra, além da eliminação de interferentes no *clean-up*, é fundamental para a manutenção do sistema cromatográfico, principalmente para preservar a vida útil das colunas cromatográficas - gasosa ou líquida, uma vez que as macromoléculas podem ocasionar seu entupimento (BANDEIRA et al., 2014; PRESTES et al., 2013). E, para os métodos eletroquímicos, quanto menor o número de partículas interferentes melhores os sinais de oxidação ou redução, e menor possibilidade de degradação do eletrodo. Portanto, a escolha do preparo de amostra adequado, que separe ou isole o analito de interesse sem prejudicar a análise é crucial (PRESTES et al., 2013).

Existem diversos trabalhos sobre extração de formol, mas em matrizes distintas, mais simples e purificadas, que o leite. A maioria dos trabalhos utiliza a extração de formol por algum solvente orgânico, uma extração do tipo líquido-líquido (ELL, ou do inglês LLE), ou uma extração em cartuchos de fase sólida (SPE). Neste caso a extração dependerá sempre do tipo de matriz do agente derivatizante e do detector utilizado (BARRIONUEVO, LANCAS, 2001; MARTINS et al., 2013; COTSARIS, NICHOLSON, 1993; KOLBERG et al., 2009; MARTINS et al., 2012; SABIN et al., 2009).

A técnica utilizada na separação do formol do leite bovino na IN 68/2006 baseia-se na destilação simples. A destilação simples é um processo de separação de uma mistura com duas ou mais substâncias de volatilidades diferentes entre si, em que uma destas fases será condensada em outro compartimento. Este processo é baseado no equilíbrio líquido-vapor de misturas, normalmente, usado com o objetivo de separar um dado volume de produto presente, em uma mistura de produtos com maior valor agregado.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este capítulo tem como objetivo avaliar e validar os métodos espectrofotométrico UV-Vis legislado IN 68/2006 para determinação de formol em leite bovino, frente ao método HPLC/PDA (NIOSH-2016(2):2003, também oficial), propondo modificações para torná-los mais simples, seguros e rápidos, para servirem como métodos de referência, para avaliar o desempenho de novos sistemas & métodos propostos, como o baseado em imagens digitais (AID-scanner – Capítulo 3), e aplicáveis a rotina industriais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E MATERIAIS

Para a realização do experimento foi utilizado formol p.a. (Dinâmica, Diadema, Brasil) com teor de 37,0 % (m/m), mantido em geladeira de 6 a 10 °C. E os reagentes p.a. utilizados foram: ácido sulfúrico 97% (Merck, Darmstadt, Alemanha); ácido cromotrópico (C₁₀H₈O₈S₂) (Merck, Darmstadt, Alemanha); ácido fosfórico 85,0% (Merck, Darmstadt, Alemanha); 2,4 – Dinitrofenilhidrazina ou DNPH (Merck, Darmstadt, Alemanha); Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker®; Philipsburg, NJ, EUA); água ultrapura Milli-Q® (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Os materiais utilizados foram: balões volumétricos de 25, 50 e 100 mL (Vidrolabor, Poá, SP, Brasil); balão de fundo redondo de 250 mL (Vidrolabor, Poá, São Paulo, Brasil); manta aquecedora 500 mL (Fisatom, São Paulo, Brasil); funil de vidro (Vidrolabor, Poá, SP, Brasil); frascos *ependorf* 2 mL (Bioplast, Porto Alegre, RS, Brasil); pipetas volumétricas de 2, 5 e 10 mL (Pyrex, Nova Iorque, EUA); balança analítica Shimadzu 200AX (Shimadzu, Quioto, Japão), micropipetas (LABMATE, St. Albans, Inglaterra); Agitador de tubo tipo vórtex 3800 RPM(VX-38 Warmnest, EUA); Purificador de água ultrapura MILLI-Q® (18,2 MΩ cm⁻¹ a 25 °C, Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA, USA); Sonicador Ultrassônico Elmasonic P (Elma, Singen, Alemanha); membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE)

descartáveis com diâmetro de 13 mm (0,45 µm, Millipore[®], Darmstadt, Alemanha) e frascos (*vials*) âmbar 2,0 mL (Agilent, Walsdorf, Alemanha).

3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Para realização da análise espectrofotométrica de formol utilizou-se o espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu, Quioto, Japão) que realiza varreduras contínuas na faixa de 190 nm até 1100 nm. Os espectros podem ser projetados dentro de poucos segundos no próprio painel, podendo ser impressos ou então enviados para um microcomputador pela porta serial RS232.

No desenvolvimento e validação utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) empregou-se o cromatógrafo Waters Alliance e2695 (Milford, MA, EUA), composto por cinco frascos para armazenagem da fase móvel; bomba com gerenciador de solvente quaternário e desgaseificador; autoamostrador; uma coluna C18 (X-Terra, Waters[®], 4,6 mm d.i. x 25 cm, 5 µm, Milford, MA, EUA); conectado com um detector UV-VIS Waters 2487; controlado pelo *software* Empower 2.0, para aquisição e tratamento de dados pelo computador.

3.3 PROCEDIMENTO DOS MÉTODOS

3.3.1. PREPARO DA CURVA ANALÍTICA

As amostras utilizadas para validação dos métodos deste capítulo (método UV-Vis baseado na IN 68/2006 e o método HPLC-PDA baseado na NIOSH-2016(2):2003) utilizaram cinco tipos de leite bovino: cru, UHT integral e desnatado; e pasteurizado integral e desnatado. As amostras de leite cru foram fornecidas pelo Laboratório de Inspeção de Produto de Origem Animal (LIPOA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil) e as demais amostras foram compradas em estabelecimentos comerciais de Londrina. Para cada tipo de leite, construíram-se curvas analíticas, com adição de

formol (37,0% m/m), nas concentrações de 0,005; 0,015; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100% (v/v), equivalendo a 18,5; 55,5; 92,5; 185,0; 277,5; e 370,0 mg L⁻¹ ou ppm.

Essa faixa de concentração para adulteração com formol foi escolhida para este estudo, baseando-se no trabalho realizado por Silva (2013), que teve como objetivo avaliar a eficiência de agentes ou substâncias inibidoras, como o formol, quanto à capacidade em controlar o crescimento microbiano no leite cru, averiguado por provas inespecíficas qualitativas do tipo positivo-negativo. Por estes ensaios o formol já demonstrou-se efetivo na concentração de 0,005 % (18,5 ppm) deste adulterante.

3.3.2. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-Vis LEGISLADO (IN 68/2006)

No preparo de amostra pela IN 68/2006, utilizou-se a cada 100 mL de leite homogeneizado de 100 a 150 mL de água adicionados juntamente com 2,0 mL de ácido fosfórico p.a. em um balão de fundo redondo de 250 mL. Posteriormente, o balão é acoplado á uma manta aquecedora e á um sistema de destilação simples, onde é recolhido um volume final de aproximadamente 50 mL do produto destilado. As coletas das amostras destiladas foram feitas em frascos com tampas, armazenados em geladeira, para posterior derivatização.

Após a etapa de separação do formol, aplicou-se o procedimento de derivatização com ácido cromotrópico, descrito em detalhes nos trabalhos de Georghiou e Ho (1989) e Fagnani et al. (2003), em que um mililitro do destilado ou extrato filtrado é adicionado em tubo de ensaio, juntamente com 5 mL de ácido cromotrópico a 0,5% (m/v, dissolvido em ácido sulfúrico a 72% e conservado em frasco âmbar). As soluções foram agitadas e colocadas em banho-maria a 80 °C por 20 minutos. Após a aparição da coloração violácea, as amostras foram diluídas em água, na proporção de 1:10 (v/v) e analisadas no espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de 570 nm (NIOSH-3500(2):2003).

3.3.3. MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA ALTERNATIVO PROPOSTO POR SOLVENTE ORGÂNICO

Outro método alternativo à destilação proposto para separação de formol do leite foi à extração por solvente orgânico. Este procedimento baseou-se nos trabalhos de Acquaro Junior et al. (2013) e Soman, Qiu e Chan Li (2008). O trabalho de Acquaro Junior et. al (2013) empregou para extração de lactose do leite em diferentes solventes orgânicos (metanol, água, acetona e etanol) e no trabalho de Soman, Qiu e Chan Li (2008) utilizou acetonitrila para extrair formol de drogas. Em ambos os casos os solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona e acetonitrila) serviram para a realização a limpeza (*clean-up*) da amostra, facilitando a extração do analito desejado. Neste trabalho, a acetonitrila (ACN) foi utilizada com intuito de minimizar o meio proteico do leite, facilitando a etapa de extração do formol necessária no caso dos métodos espectrofotométricos (UV-Vis) pela dispersão da radiação incidente e transmitida e, no cromatográfico (HPLC-PDA) por causar entupimento da coluna e falta de resolução.

O método parte de uma mistura de um mililitro de leite com volume equivalente de acetonitrila em um recipiente vedado de 3,0 mL. Posteriormente, esta mistura é agitada em vórtex (VX-38, Warmnest, EUA) a 3.800 rpm por 1 minuto e separada em centrifuga de *ependorf* (MiniSpin[®] C1008, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 6000 rpm por 5 minutos. Finalmente, o sobrenadante é filtrado em membrana filtrante de PTFE descartáveis com diâmetro de 13,0 mm (0,45 µm, Millipore[®]). Os extratos foram armazenados em geladeira em frascos com tampas, para posteriores análises no UV-Vis e HPLC.

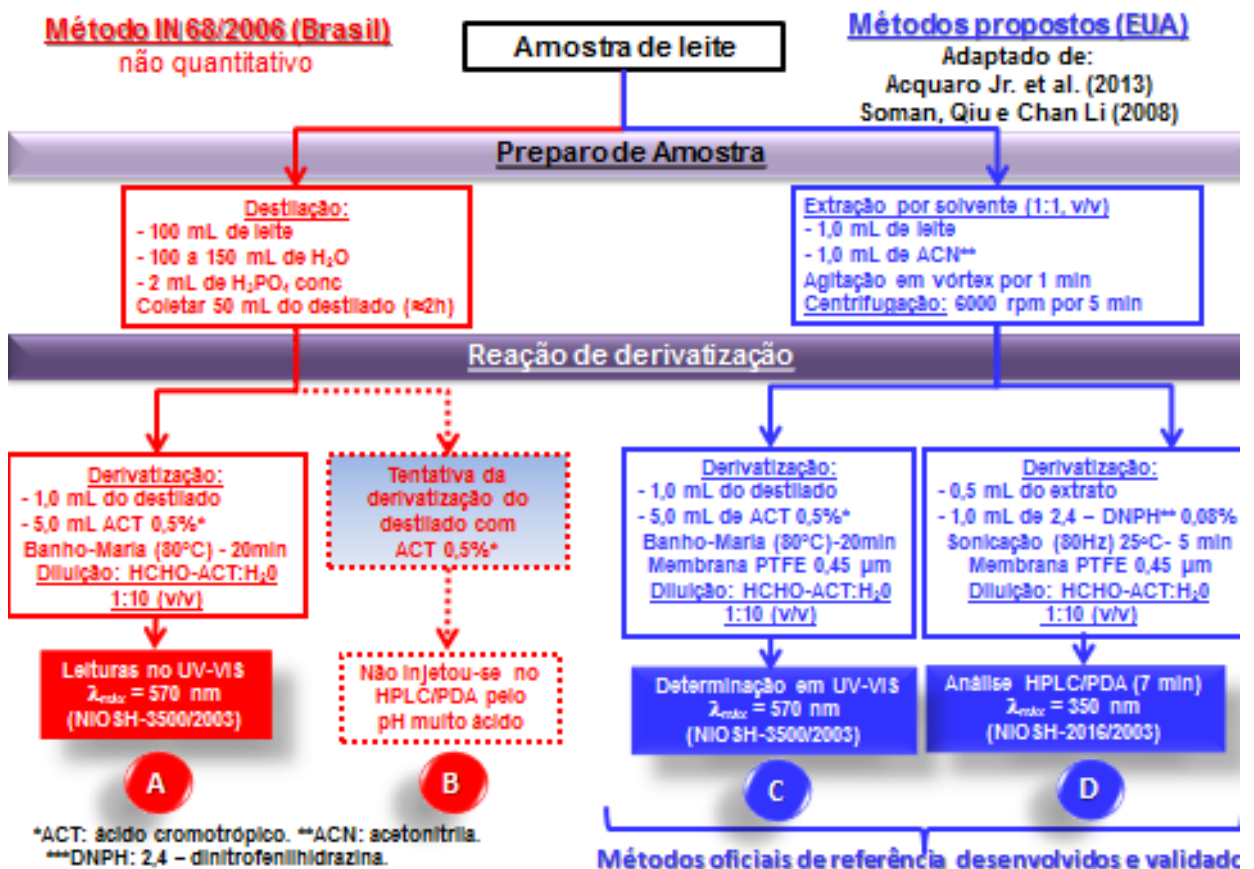
O procedimento de derivatização para o método HPLC-PDA, descrito no manual de métodos analíticos NIOSH-2016(2) (NIOSH, 2003c) e mais detalhado por De Oliveira e Andrade (1993) foi aplicado com modificações. Para meio mililitro de destilado ou extrato filtrado, adicionou-se 1,0 mL de solução de 2,4 – dinitrofenilhidrazina ou DNPH 0,08% (m/v), homogeneizado em frasco(do inglês *vial*) âmbar de 2,0 mL. Os *vials* foram sonicados em ultrassom (Elmasonic P) por 10 minutos em frequência de 80 Hz a temperatura ambiente. Lembrando que nesta etapa, todas as vidrarias utilizadas foram de material âmbar, uma vez que o reagente derivatizante, DNPH, é um composto fotossensível (OSHA, 2004). Na sequência as amostras foram injetadas em cromatógrafo a líquido da Waters

Alliance e2695, onde as condições cromatográficas foram: fase móvel – ACN:água (60:40, v/v); vazão - 1,0 mL min⁻¹; tempo de corrida - 10 minutos; comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}} = 350 \text{ nm}$) (NIOSH-2016(2):2003).

3.3.4. ESQUEMA DOS PROCEDIMENTOS RECOMENDADOS COMO OFICIAIS PARA ANÁLISE DE FORMOL

Para uma melhor compreensão dos procedimentos realizados neste capítulo, o esquema da Figura 1, traz resumidamente as etapas de preparo de amostra da extração de formol e derivatização pelo método legislado IN 68/2006 e pelo método alternativo proposto por Soman, Qiu e Chan Li (2008) adaptado de drogas para o leite.

Figura 1. Fluxograma dos procedimentos metodológicos executados no Capítulo 2



Fonte: Proprio autor - Laboratório DIA – UEL(2016).

3.4 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Os dois métodos espectrofotométrico (UV-Vis) e cromatográfico (HPLC-PDA) foram validados segundo a RDC nº 899/2003 da ANVISA avaliando-se os parâmetros de: especificidade e seletividade, linearidade e faixa dinâmica de trabalho, precisão (repetitividade – intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias), exatidão (recuperação), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e estabilidade da solução. Os limites de detecção e o limite de quantificação foram calculados matematicamente através da relação entre o desvio padrão do intercepto da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma, de acordo com as Equações 1 e 2.

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

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

Em que:

IC é a inclinação da curva

DP_0 é o desvio padrão do intercepto com eixo y das três curvas analíticas construídas em triplicata (BRASIL, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÕES PRELIMINARES

4.1.1. MÉTODO LEGISLADO (IN 68/2006)

Os testes preliminares referentes ao método legislado reforçam os cometários reportados pelos técnicos do laboratório LANAGRO-RS (ZH, 2013), com relação ao exacerbado tempo de análise. A montagem do sistema de destilação (Figura 2) e o preparo da mistura de leite no balão são relativamente simples e

rápidos, entretanto, o tempo de destilação com relação ao volume de destilado a ser coletado, o torna inviável para análise em rotina industrial. O tempo de destilação por amostra foi de aproximadamente 2 horas, sem contar o tempo de limpeza e secagem das vidrarias do sistema destilador. Caso não haja a limpeza adequada a possibilidade de contaminações com formol em outras amostras é grande (SILVA, 2013).

Figura 2. Sistema de destilação simples e a resultado da prova com ácido cromotrópico utilizado pelo método IN 68/2006



Fonte: Laboratório de Inspeção de Produto de Origem Animal (LIPOA/UEL)(2015).

Além do demasiado tempo gasto na destilação, após as diluições dos pontos da curva analítica, notou-se visualmente que não houve uma escala crescente da coloração violácea e em alguns pontos que deveriam apresentar o formol, não aparentavam ter a presença de formol, como indicado na Figura 3.

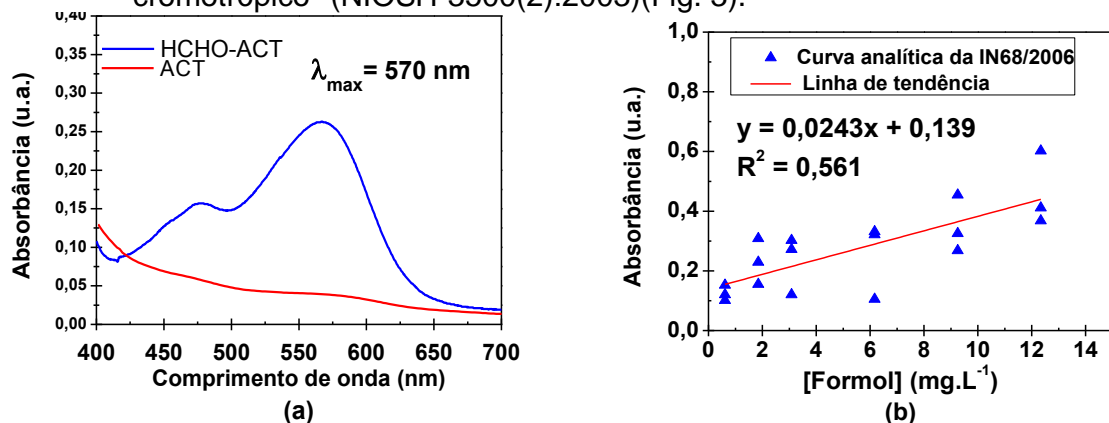
Figura 3. Um das replicatas dos pontos diluídos da curva analítica, após destilação simples e derivatização com ácido cromotrópico IN 68/2006



Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Na tentativa de validar o método IN 68/2006, varreduras do ácido cromotrópico (ACT) e de seu o complexo formol-ácido cromotrópico (HCHO-ACT) foram feitas no espectrofotômetro UV-Vis (UV-Mini 1240, Shimadzu) no comprimento de onda máximo de 570 nm, ambas representadas na Figura 4(a), condizentes com a literatura (NIOSH-3500(2):2003). Já na Figura 4(b), são mostrados os pontos da curva analítica feita em triplicata (n=3) após diluição (1:10 v/v) em água, nas concentrações entre 0,62 a 12,34 mg L⁻¹.

Figura 4. Método UV-Vis empregando a destilação na etapa do preparo da amostra e derivatização com ácido cromotrópico (IN 68, Fig. 1A). (a) Varredura do ácido cromotrópico (ACT - branco) e do complexo formol-ácido cromotrópico (HCHO-ACT). (b) Curva analítica triplicata (n=3) empregando a destilação de leite para a extração do formol (IN 68/2006) derivatizado com ácido cromotrópico* (NIOSH-3500(2):2003)(Fig. 3).



*(b) Formol em diferentes concentrações (0,62; 1,85; 3,08; 6,17; 9,25; 12,34 mg L⁻¹) após extração do formol do leite através da destilação (100 mL de leite+100 mL de água+2 mL de H₃PO₄ submetidos à destilação até a coleta de 50 mL do destilado), derivatização pela reação (1 mL do destilado do leite + 5 mL de ácido cromotrópico a 0,5% em H₂SO₄ 72%, mantidos em banho-maria 80°C por 20 min), diluído em água 1:10 (v/v), lido em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu) λ de 570 nm.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

A curva analítica empregada na validação do método analítico IN 68/2016 (Figura 4(b)) mostrou-se ineficaz para a quantificação do formol em leite, uma vez que indicou baixa correlação quando aplicada a regressão linear entre os valores de absorbâncias e as concentrações de formol, representada pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,561$). Este método poderia ser utilizado como prova qualitativa, segundo a Instrutiva Normativa n° 68 de 2006, para faixa de concentração de 18,5 a 370,0 mg L⁻¹, a mesma que Silva (2013) utilizou em seu trabalho. Entretanto, abaixo desta faixa de concentração, esse método não se mostrou adequado, pois a técnica de destilação simples mostrou baixa precisão (repetitividade) em vários pontos de

concentrações da curva após diluição (Figura 3), sendo não quantitativo na faixa de 0,62 a 12,34 mg L⁻¹.

Uma tentativa de redução no tempo de destilação foi feita coletando-se volumes menores do destilado (< 50,0 mL). Mesmo procurando-se manter a temperatura controlada, pelo controle de aquecimento da manta, em sistema fechado, não foi possível verificar a presença de formol em algumas amostras. Mesmo com tentativas de se manter os valores fixos de tempo em função do volume final de destilação, o formol em cada amostra pareceu sofrer volatilização e/ou condensação variáveis. Portanto, este problema pode ser atribuído às variações de temperatura e a solubilidade do formol. O formaldeído é um composto altamente volátil (ponto de ebulição = -19,2°C) e sua solubilidade e sua estabilidade em água depende muito da presença de um agente estabilizante, como o metanol, segundo Alves, Aciole (2012). Entretanto, no procedimento descrito pelo método da IN 68/2006, não se recomenda a utilização de nenhum estabilizante como metanol ou bissulfito de sódio durante a coleta da destilação. Diferentemente, no método da NIOSH-3500(2):2003 em que foram implementados refinamentos citados no trabalho de MacFadyre (1945), com o uso de bissulfito sódico 1,0% em frasco de vidro vedado. Outra possibilidade seria o uso de um excesso de metanol durante o processo de coleta do destilado, não realizado, considerando-se que seria inviável para a análise em rotina industrial, pela toxicidade do metanol.

As desvantagens do método IN 68/2006 ainda estão na utilização de ácidos de elevado grau de periculosidade para os analistas e prejudiciais ao meio ambiente, de acordo com Gasparini et al. (2008). Tanto o ácido fosfórico, usado no processo de destilação, quanto o ácido sulfúrico, utilizado na preparação do ácido cromotrópico, contribuem efetivamente para o baixíssimo pH das amostras destiladas. Para evitar problemas com a coluna cromatográfica C-18 X-Terra utilizada neste trabalho que suporta a faixa de pH de 2 a 8, considerando o pH ácido das amostras obtidas por destilação, essas não foram injetadas no cromatógrafo líquido. Apesar de Fagnani et al. (2003) e Gasparini et al. (2008), apresentarem em seus trabalhos ácidos com menor potencial corrosivo e, outros compostos básicos para reação de derivatização do formol com o ácido cromotrópico, a questão do elevado tempo analítico gasto para a destilação, continuava a ser um problema.

Portanto, visando obter uma alternativa mais rápida e simples, aplicou-se o método de extração de formol por solventes orgânicos, baseados nos trabalhos de Acquaro Jr (2013) e Soman, Qiu, Chan Li (2008), com adaptações para o leite.

4.1.2. MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PROPOSTO PARA EXTRAÇÃO DO FORMOL EM LEITE POR SOLVENTE ORGÂNICO

O método de preparo de amostra utilizando acetonitrila na etapa de *clean-up* e extração do formol do leite, feito tomando-se uma alíquota de leite e adicionando-se acetonitrila na proporção de 1:1 (v/v), apresentou-se mais adequado para a quantificação de formol comparado a destilação da IN 68/2006, pois, diferentemente da Figura 3, em que algumas amostras não apresentaram a cor violácea do complexo HCHO-ACT, observa-se na Figura 5 uma graduação definida.

Figura 5. Pontos da curva analítica diluídos com água nas concentrações de formol (0,62; 1,85; 3,08; 6,17; 9,25; 12,34 mg L⁻¹) após *clean-up* do leite e extração por solvente orgânico na proporção 1:1 (v/v) com acetonitrila, segundo Acquaro Jr (2013) e Soman, Qiu e Chan Li (2008), alternativamente a destilação da IN 68/2006, seguida da derivatização com ácido cromotrópico segundo NIOSH-3500(2):2003.



Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Com objetivo de diminuir o tempo do preparo de amostra, a utilização de solvente orgânico, seguiu os trabalhos de Acquaro Jr (2013) e Soman, Qiu e Chan Li (2008), em que a extração do analito ocorre por semelhança de polaridade. O princípio da técnica no leite parte da desnaturação das proteínas (desproteínização) pela mudança de polaridade do meio, causada pelo solvente orgânico (LEHNINGER, 1995). Alguns trabalhos relatam que o formol se liga às moléculas de

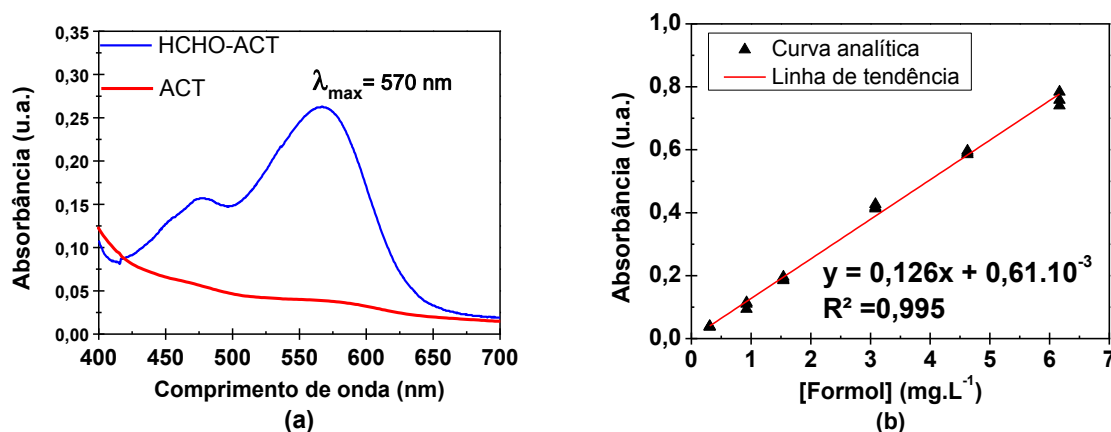
caseína, porém, após a adição de acetonitrila, essas partículas desnaturam-se ficando suspensas no leite, evitando assim a agregação micelar (LEHNINGER, 1995; DATTA; DEETH, 2001). Em contrapartida as macromoléculas hidrofóbicas, como gorduras e algumas vitaminas, geralmente de caráter mais apolares, acabam tornando-se mais solúveis e mais densas nesse meio, ocorrendo assim certa precipitação das mesmas (LEHNINGER, 1995). Assim, a centrifugação por 5 minutos, objetivou acelerar a precipitação das partículas em suspensão, promovendo a separação das fases.

A utilização da técnica de extração em fase sólida (SPE) empregando cartuchos extratores mostrou-se inadequada, uma vez que houve entupimento, durante o procedimento. Pois, apesar de parte dos compostos sólidos estarem precipitados, o sobrenadante não estava apenas com o formol, se apresentado rico em compostos de variadas naturezas. O reaproveitamento dos cartuchos também não se mostrou possível, segundo estudos de Barrionuevo, Lancas (2001), o que torna o seu uso em escala industrial inviável economicamente.

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS

O uso da técnica de preparo de amostra (*clean-up* e extração de formol do leite) por solvente orgânico utilizando-se acetonitrila mostrou-se efetiva quando analisada em espectrofotômetro UV-Vis, pela ausência de sinal na varredura do branco feita apenas com o ácido cromotrópico diluído (ACT) e, pelas bandas características para o complexo formol-ácido cromotrópico de (HCHO-ACT) com absorvância máxima em 570 nm, de acordo com a referência (NIOSH-3500(2):2003) (Figura 6(a)). A curva analítica de calibração intra-dia, representada na Figura 6(b), foi construída em triplicata ($n=3$), segundo o método proposto, após as etapas de precipitação/extração por acetonitrila, derivatização com ácido cromotrópico e diluição, para a faixa dinâmica de trabalho de 0,62 a 12,34 mg L⁻¹.

Figura 6. Método UV-Vis empregando extração por solvente orgânico (acetonitrila) baseado em Acquaro Jr. et al. (2013) e Soman, Qiu e Chan Li (2008) para a etapa do preparo da amostra e derivatização com ácido cromotrópico seguindo a NIOSH-3500(2):2003 (Fig. 1C). (a) Varredura espectrofotométrica de 400 a 700 nm do ácido cromotrópico (ACT - branco) e do complexo formol-ácido cromotrópico (HCHO-ACT). (b) Curva analítica em triplicata (n=3) empregando o método proposto** com acetonitrila para a *clean-up*/extração do formol no leite derivatizado com ácido cromotrópico (Fig. 5).



** (b) Formol adicionado ao leite em diferentes concentrações (0,62; 1,85; 3,08; 6,17; 9,25; 12,34 mg L⁻¹) com preparo de amostra - *clean-up*/extração feita por solvente orgânico (leite: acetonitrila, 1:1, v/v), centrifugada por 5 min a 6000 rpm, e reação de derivatização (leite: ácido cromotrópico 0,5% em H₂SO₄ 72%, 1:6, v/v) por 20 min a 80°C, passados em membrana PTFE (0,45 μm, 13,0 mm), seguida de diluição 1:10 (v/v) em água, lida em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu, Quioto, Japão) em λ_{máx}= 570 nm.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

O método utilizando-se o preparo de amostra com acetonitrila proposto mostrou-se linear (Fig. 6(b)) utilizando-se a regressão linear das absorbâncias em função das concentrações de formol, indicada pelo coeficiente de determinação (R²) de 0,995, com baixo resíduo aleatorizado de 5,56x10⁻³ (gráfico do resíduo não mostrado).

A precisão foi determinada pela repetitividade de cinco leituras sucessivas de padrão analítico 3,08 mg L⁻¹ de formol, enquanto a precisão intermediária foi feita na mesma concentração em 2 dias distintos. No 1º dia, a precisão intra-dia foi de 3,08 ± 0,05 (± desvio padrão), com desvio padrão relativo (DPR) de 1,62%; e para o 2º dia foi de 3,08 ± 0,09 (± DP), com DPR de 3,05%. A partir das curvas analíticas construídas em dias distintos, calculou-se a precisão inter-dias (intermediária), em que o desvio padrão máximo foi de ± 0,09 e o DPR de 2,99 %.

O complexo ACT-HCHO mostrou-se estável pelo período de 48 horas conservando as amostras em temperatura ambiente, mantidas em frascos de vidros

vedados, assemelhando-se as condições de trabalho de Silva (2013). O resultado concordou com os dados obtidos por Silva para a estabilidade, para esse mesmo intervalo de tempo. É importante ressaltar que a etapa de derivatização seguiu o procedimento da IN 68/2006, porém nota-se que utilizando o preparo com acetonitrila não houve a mesma discrepância de valores de repetitividade para uma amostra de mesma concentração, como quando se empregou a destilação. No entanto, aplicando-se este método proposto para o preparo de amostra, o método mostrou-se preciso e linear como nos trabalhos de Fagnani et al. (2003) e Gasparini et al. (2008), não necessitando do uso de algum estabilizante durante 48 horas estando em frasco de vidro vedado.

A exatidão do método foi determinada pela adição e recuperação de formol em três níveis diferentes de concentração: baixa ($0,62 \text{ mg L}^{-1}$) (R_1), média ($1,85 \text{ mg L}^{-1}$) (R_2) e alta ($5,5 \text{ mg L}^{-1}$) (R_3), com recuperação de 93,56, 99,84 e 102,90 %, respectivamente (Tab. 7), dentro do intervalo aceito de 70 a 120 % pela ANVISA.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas Equações 1 e 2, respectivamente, demonstrando ser um método relativamente sensível para concentrações inferiores de formol ($17,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), em relação as utilizadas para as fraudes no leite de 18,5 a $370,0 \text{ mg L}^{-1}$ segundo Silva (2013).

Os resultados de alguns parâmetros de validação do método espectrofotométrico UV-Vis, utilizando acetonitrila na fase do preparo da amostra (*clean-up*/extração de formol) do leite estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Porcentagem de recuperação, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação do método espectrofotométrico por UV-Vis proposto para determinação de formol no leite utilizando acetonitrila na fase do preparo de amostra e derivatização com ácido cromotrópico, conforme condições analíticas descritas na Figura 6

Níveis	[HCHO] adicionada (mg L^{-1})	[HCHO] encontrada (mg L^{-1}) $\pm DP$	Recuperação (%)	Faixa de trabalho (mg L^{-1})	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	R_1	0,62	$0,57 \pm 0,05$	93,56		
Exatidão	R_2	1,85	$1,84 \pm 0,04$	99,84	0,62 a 12,34	5,74
	R_3	5,55	$5,71 \pm 0,05$	102,90		

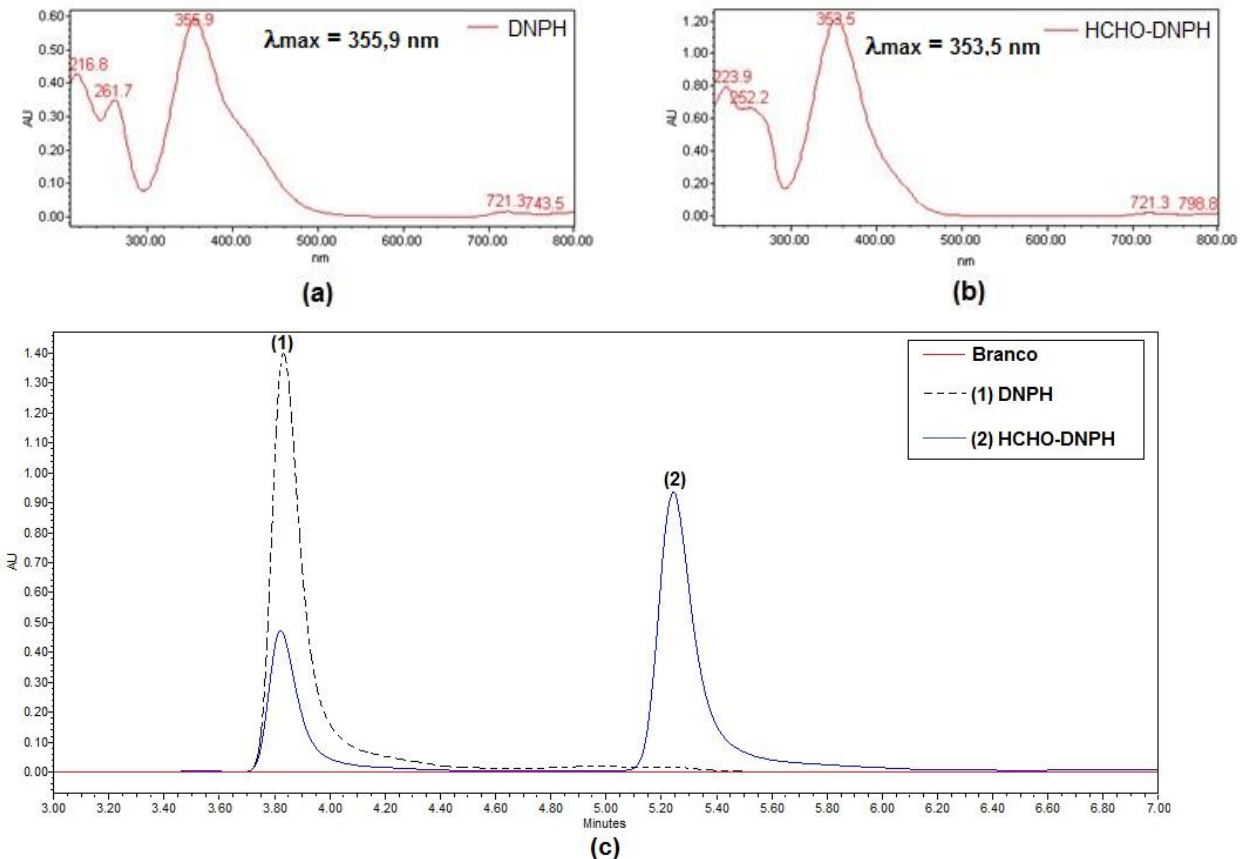
[HCHO]: Concentração de formol média ($n=3$); DP: Desvio padrão; LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação. Recuperação feita em triplicata ($n=3$) em três níveis de concentração de formol: baixa (R_1), média (R_2) e alta (R_3); para faixa de trabalho de 0,62 a $12,34 \text{ mg L}^{-1}$.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC-PDA)

As varreduras espectrais de 200 a 800 nm da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e do complexo formol-dinitrofenilhidrazina (HCHO-DNPH) obtidas durante a corrida cromatográfica correspondentes aos picos 1 e 2 (Fig. 7(c)) estão representadas nas Figuras 7(a) e 7(b), tendo comprimentos de onda máximo em 355,9 nm e em 353,5 nm, respectivamente, próximos da literatura, com o valor de 350 nm (NIOSH-2016(2):2003).

Figura 7. (a) Varredura espectrofotométrica de 200 a 800 nm do cromogênico derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) diluído (Fig. 1D). (b) Varredura do complexo formol-dinitrofenilhidrazina (HCHO-DNPH). (c) Cromatograma de formol 46,25 mg L⁻¹ adicionado ao leite, extraído por solvente e derivatizado por DNPH, mostrando a especificidade e seletividade do método empregando HPLC-PDA proposto^{***}, fixados em λ_{\max} de 350 nm



^{***} Amostra/Padrão de formol adicionado ao leite na concentração de 46,25 mg L⁻¹ com preparo de amostra (*clean-up*/extração) feita por solvente orgânico (leite: acetonitrila, 1:1, v/v, centrifugada por 5 min a 6000 rpm), e reação de derivatização (amostra extraída: DNPH 0,08% (m/v) na proporção 0,5:1 (v/v) em frasco âmbar, por 10 min a 80 Hz em ultrassom (Elmasonic P) a 25°C), passados em membrana PTFE (0,45 μ m, 13,0 mm). Condições cromatográficas: HPLC Waters Alliance e2695, fase móvel – ACN: água (60:40, v/v) a 1,0 mL min⁻¹; vol. de injeção: 10,0 μ L; separado em coluna C-18 (XTerra, 4,6x250 mm, 5 μ m, Waters) em detector de arranjo de diodos (PDA 2998, λ_{\max} de 350 nm) em 7 min de corrida. Picos: (1) Derivatizante DNPH. (2) Formol-DNPH. A.U.: unidades arbitrárias.

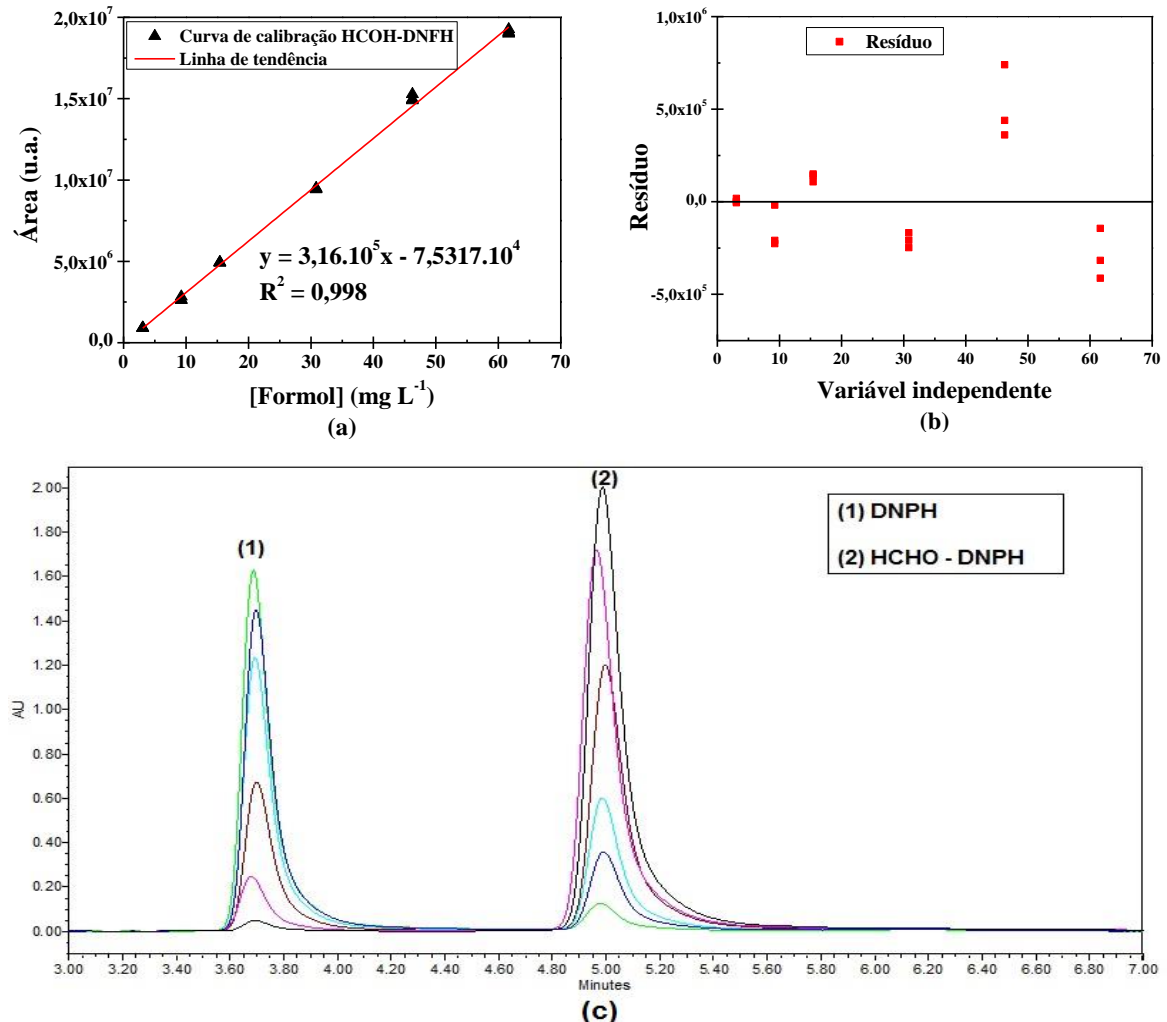
Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

O método de HPLC-PDA proposto mostrou-se seletivo e específico para o formol. Isto está demonstrado pela sobreposição dos cromatogramas da Figura 7(c). Observa-se a ausência de sinal analítico para o branco, uma amostra de leite adicionada de formol 46,25 mg L⁻¹ extraída pelo preparo de solvente orgânico, sem derivatização (linha vermelha); e para o derivatizante DNPH, uma amostra isenta de formol derivatizada com 2,4-dinitrofenilhidrazina (linha tracejada preta) no tempo de

retenção (TR = 5,3 min) do pico (2) de interesse do formol ($46,25 \text{ mg L}^{-1}$) detectado na forma do complexo HCHO-DNPH (linha azul). Observa-se ainda, que na amostra (Cromatograma azul) ocorre o decréscimo do pico 1 (TR=3,85 min) do derivatizante DNPH (Cromatograma tracejado em preto), que é utilizado em parte para formar o HCHO-DNPH (pico 2). Além do comparativo com os tempos de retenção (TR), checkou-se ainda, a pureza espectral ao longo do pico (2), considerando o espectro UV-Vis característico do HCHO-DNPH (Fig. 7(b)), demonstrando a ausência de coeluição, propício para a determinação quantitativa do formol em leite. É importante ressaltar que o DNPH pode apresentar outros produtos minoritários em outros tempos de retenção e, após adicionado as amostras deve ser sonicado por 5 min, para evitar a formação de micelas de acordo com Xu (2012).

A linearidade do método HPLC-PDA proposto foi verificada pela construção de três curvas analíticas, obtidas por seis injeções aleatorizadas de amostras de leite preparadas com adição de formol em diferentes concentrações com o preparo de amostra (*clean-up*/extração) feita com acetonitrila e derivatizadas com DNPH, tendo uma faixa de trabalho de $3,08$ a $61,67 \text{ mg L}^{-1}$, após diluição das amostras em água (Figura 8).

Figura 8. (a) Linearidade para o método de detecção de formol em leite por HPLC-PDA proposto*** a partir das curvas analíticas do complexo HCHO-DNPH feitas em triplicatas (n=3) nas concentrações de 3,08 a 61,67 mg L⁻¹ e (b) Resíduo aleatorizado. (c) Sobreposição dos cromatogramas cujas áreas do pico (2) do complexo HCHO-DNPH foram empregadas no levantamento das 3 curvas analíticas



***Diferentes concentrações de formol (3,08; 9,25; 15,42; 30,83; 46,25; 61,67 mg L⁻¹) adicionadas no leite, submetido ao preparo de amostra utilizando-se acetonitrila (leite com formol: ACN 1:1, v/v) para *clean-up*/extração do leite, filtrado em membrana descartável de PTFE (0,45 µm), em que 0,5 mL de amostra extraída foi derivatizada com 1,0 mL de DNPH 0,08%, agitada por 5 minutos em ultrassom (80 Hz), injetados 10,0 µL no HPLC Waters Alliance e2695, com fase móvel acetonitrila: água (60:40, v/v) na vazão de 1,0 mL min⁻¹ separado em coluna C-18 (XTerra, 4,6x250 mm, 5 µm, Waters) em detector de arranjo de diodos (PDA 2998, λ_{max} de 350 nm) em 7 min de corrida. Picos: **(1)** Derivatizante DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina 0,08% (m/v) em água). **(2)** Formol na forma do complexo HCHO-DNPH. A.U.: unidades arbitrárias.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

A Equação de regressão linear obtida foi: $y = 3,16 \times 10^5 x + 75317$, em que y é a área do pico do produto de derivatização (HCHO-DNPH) e x é a concentração de formol livre em mg L⁻¹. O coeficiente de determinação foi de 0,998, revelando o

ajuste do modelo, demonstrando a correlação linear entre a área do pico do produto derivatizado (HCHO-DNPH) e a concentração de formol livre na faixa dinâmica de trabalho no intervalo de concentração estudado de 3,08-61,67 mg L⁻¹.

A precisão para o método HPLC-PDA proposto para determinação de formol em leite intra-dia foi determinada pela repetitividade de cinco injeções sucessivas de uma amostra com padrão de formol adicionado em concentração mediana de 30,83 mg L⁻¹, durante um período de 48 horas. No 1º dia, o desvio padrão (*DP*) foi de ± 0,33 e desvio padrão relativo (*DPR*) de 1,11%; e para o 2º dia, um *DP* de ± 0,28 e *DPR* de 0,93 %. A precisão intermediária, feita em dois dias distintos, apresentou *DP* de ± 0,36 e um *DPR* de 1,20%, demonstrando precisão intra e inter-dias adequadas, considerando que os *DPR* foram menores que os 5% preconizados pela ANVISA.

A exatidão foi determinada pela adição de formol direto na matriz do leite em três níveis de concentração correspondentes a 6,16 (*R*₁); 30,83 (*R*₂); 55,5 mg L⁻¹ (*R*₃), realizadas em triplicatas (*n*=3), obtendo-se recuperações médias de 98,35, 99,23 e 97,90 %, respectivamente. Assim, o método proposto de HPLC-PDA foi considerado exato, uma vez que se encontra dentro da faixa de 70 a 120%, permitida pela ANVISA para matrizes complexas.

Os limites de detecção (*LD*) e quantificação (*LQ*), calculados, respectivamente pela Eq. (1) e Eq. (2) com valores de 4,20 µg L⁻¹ para o *LD* e 12,67 µg L⁻¹ para o *LQ* para o método de HPLC-PDA, mostraram adequados para quantificar fraudes, com patamares inferiores comparados aos obtidos para o método espectrofotométrico UV-Vis (*LD*= 5,74 µg L⁻¹ e *LQ*=17,40 µg L⁻¹).

Os resultados da validação para o método proposto por HPLC-PDA, com extração de formol por acetonitrila e derivatização por DNPH estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem de recuperação, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação do método para detecção de formol em leite por HPLC-PDA proposto para determinação de formol no leite utilizando acetoneitrila na fase do preparo de amostra e derivatização com 2-4-dinitrofenilhidrazina, conforme condições analíticas descritas na Figura 8

Níveis	$[HCHO]$ adicionada (mg L^{-1})	$[HCHO]$ encontrada (mg L^{-1}) $\pm DP$	Recuperação (%)	Faixa de trabalho (mg L^{-1})	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	R_1	6,16	$6,06 \pm 0,22$	98,35		
Exatidão	R_2	30,83	$30,60 \pm 0,45$	99,23	3,08 a 61,67	4,20
	R_3	55,50	$54,33 \pm 0,89$	97,90		

$[HCHO]$: média da concentração de formol ($n=3$); DP : desvio padrão; LD : limite de detecção; LQ : limite de quantificação. Recuperação feita em triplicata ($n=3$) em três níveis de concentração de formol: baixa (R_1), média (R_2) e alta (R_3); para faixa de trabalho de 3,08 a 61,67 mg L^{-1} .

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

A estabilidade do método foi verificada pela comparação dos teores de formol de duas amostras de leite com adição de padrão em concentração mediana de $30,83 \text{ mg L}^{-1}$, ambas preparadas no mesmo dia. A 1ª passou pelo preparo de amostra com acetoneitrila, foi derivatizada com DNPH em duplicata e, foi posteriormente injetada conforme condições analíticas já descritas, obtendo-se um valor médio de $30,6 \pm 0,52 \text{ mg L}^{-1}$. A 2ª amostra foi conservada por 48 horas em temperatura constante em frasco de vidro fechado. Transcorridas as 48 h, esta amostra foi submetida às mesmas condições de preparo da 1ª amostra, obtendo-se um valor médio de $29,71 \pm 0,65 \text{ mg L}^{-1}$ ($n=2$). Assim, verificou-se a estabilidade da amostra pelo período de 48 horas, considerando que não houve diferença significativa entre os resultados em nível de 5% de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2012).

5. CONCLUSÃO PARCIAL

A partir da avaliação feita dos métodos recomendados como oficiais baseados em: espectrofotometria UV-Vis (IN 68/2006, para formol em leite não quantitativo e, NIOSH-3500(2):2003 detecção de formol em ar por UV-Vis com derivatização com ácido cromotrópico); e cromatografia HPLC-PDA (NIOSH-2016(2):2003 detecção de formol em ar com derivatização com DNPH), visando produzir valores de referência para o método proposto, baseado em imagens digitais

por scanner, verificou-se que esses não puderam ser aplicados com sucesso diretamente, exigindo adaptações e alterações.

Conclui-se que o método legislado IN 68/2006 empregando UV-Vis em termos de derivatização (ácido cromotópico com ácido sulfúrico) apresentou uma reação estável ao formol, durante 48 horas, mantido em frascos de vidros, vedados e tampados. Entretanto, o preparo da amostra utilizando para extração a destilação simples foi moroso, demandando um tempo maior do que 2 horas/amostra, sem considerar o tempo de lavagem das vidrarias; apresentando baixa repetitividade e reprodutibilidade; indicando ausência de cor em amostras que continham formol, produzindo resultado falso negativo e, como consequência apresentou-se não linear; sendo considerado portanto, inadequado para as baixas concentrações testadas. Uma alternativa viável em substituição a etapa de destilação foi o preparo da amostra proposto com o *clean-up*/extração do formol feito com solvente orgânico acetonitrila, adaptado do método para extração de lactose em leite (ACQUARO JR et al., 2013) para extração de formol, seguindo a detecção espectrofotométrica, conforme norma oficial internacional NIOSH-3500(2):2003 para determinação de formol em ar com derivatização por cromotrópico e detecção UV-Vis, adaptada para o leite bovino.

Quanto ao método HPLC partiu-se do método oficial NIOSH-2016(2):2003 para determinação de formol em ar, portanto o método não contemplava o preparo de amostra, necessário para o leite, matriz complexa (proteínas, lipídios,...) especialmente para análise em colunas cromatográficas. Assim, com experiência bem sucedida para o UV-Vis, adotou-se o mesmo preparo de amostra do método proposto. Como a derivatização por ácido cromotrópico gerava um pH muito ácido incompatível com a coluna C-18 usada, o método de derivatização proposto por Soman, Qiu, Chan Li (2008) para determinação de drogas por HPLC empregando DNPH, foi adaptado para o leite bovino. Assim, a utilização do método de preparo e determinação de formol em leite por HPLC-PDA, após adaptações descritas mostrou-se adequado com respeito as figuras de mérito da validação da ANVISA, preciso, exato, linear, robusto, na faixa de trabalho comuns as fraudes por formol descritas na literatura, permitindo desta forma quantificações confiáveis para este adulterante. Conseguir-se uma redução do tempo de análise (<30 min/amostra-preparo e corrida cromatográfica) apreciável comparada a IN 68/2006. Desta forma,

é um método possível de ser utilizado como método de referência para determinação do formol em leites comerciais.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO USO DE

INSTRUMENTAL E MÉTODO

PROPOSTO POR IMAGENS

DIGITAIS (*AID-SCANNER*) PARA

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

DE ADULTERAÇÃO EM LEITE

BOVINO

AValiação DO USO DE INSTRUMENTAL E MÉTODo PROPOSTO POR IMAGENS DIGITAIS (AID-SCANNER) PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE BOVINO

1. INTRODUÇÃO

Nesses últimos anos, o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e diretas para o controle de qualidade do leite bovino vêm crescendo bastante, uma vez que este produto apresenta curta durabilidade e também, está sujeito à diversas tipos fraudes criminosas. As técnicas que têm-se destacados são as espectroscópicas na faixa do infravermelho e as análises de imagens digitais (FERRÃO et al., 2004; BORIN et al., 2007; COLTRO et al., 2014; SANTOS, PEREIRA-FILHO, 2013; SANTOS, WENTZELL, PEREIRA-FILHO, 2012).

A espectroscopia no infravermelho associada a quimiométrica é uma técnica rápida, não destrutiva e muitas vezes, não necessita de preparo de amostra (PASQUINI, 2003). Contudo, essa técnica apresenta certas desvantagem frente ao leite, principalmente pelo fato de mensurar um grande número de componentes em diferentes faixas de análise, como propriedades físico-químicas e microbiológicas, exigindo que os modelos matemáticos tenham um amplo banco de dados com amostras padronizadas, para uma quantificação efetiva. Um exemplo é o trabalho de Cassoli et al. (2011) que aplicou a técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para analisar o leite cru, utilizando 800 amostras no conjunto de referência na detecção de bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro do queijo em leite cru. Para a validação do modelo FTIR/ACP (Regressão dos componentes principais) foram analisadas 100 amostras adulteradas com esses três compostos, em que os resultados indicaram que o modelo (FTIR/ACP) pode identificar o leite cru adulterado em até 0,05% de bicarbonato e/ou 0,075% de citrato; e, para o soro, o modelo acertou em cerca de 60% das amostras.

O leite é um alimento que apresenta muitos componentes e, conseqüentemente, os modelos matemáticos referentes à este produto tornam-se complexos devido ao grande número de variáveis, não sendo capazes de quantificar baixos níveis de adulteração e, muitos deles, não levam em conta os erros associados as interferências instrumentais. Ferrão et al. (2007) em seu trabalho

propuseram uma nova ferramenta quimiométrica utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) aplicada como modelo de máquinas de vetores de suporte com mínimos quadrados (LS-SVM) comparando-a com a regressão clássica dos mínimos quadrados parciais (PLS). Ambos os modelos foram testados em amostra de leite em pó, avaliando fraudes com amido, soro de leite e sacarose. O modelo LS-SVM mostrou-se mais robusto e eficiente que o PLS, sendo capaz de inferir sobre a ausência de um ou mais dos adulterantes avaliados, enquanto que no modelo PLS apresentou falso positivo.

Outra técnica em ascensão na indústria do leite, que segue os princípios da Química Verde (Green Analytical Chemistry) por minimizar a quantidade de reagentes e resíduos, sendo rápida e de baixo custo, é a análise por imagens digitais (AID). Esta técnica baseia-se na captura das informações visuais de um objeto sendo os dados processados e armazenados em conjuntos binários (imagem digital) e quantificados por regressões matemáticas (SANTOS, PEREIRA-FILHO, 2013; SANTOS, WENTZELL, PEREIRA-FILHO, 2012).

Dos Santos et al. (2013) utilizaram-se a análise por imagens digitalizadas via *scanner* de mesa como um método alternativo para identificação e quantificação de adulterantes em leites. As amostras de leite bovino foram adulteradas em diferentes concentrações com água de torneira, soro, peróxido de hidrogênio, urina sintética e leite sintético. As imagens digitais foram obtidas considerando dez variáveis: vermelho, verde, azul, saturação, valor, luminosidade e as três cores relativas (vermelho-azul; vermelho-verde e azul-verde). Assim, a partir das imagens digitais foram criados modelos de classificação que apresentaram uma discriminação das amostras-controle do leite adulterado. Os modelos de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) e a dos componentes principais (PCR) mostraram que o método pode ser aplicado para calcular os níveis de adulteração no leite com elevados coeficientes de correlação (r) e baixo erro padrão de previsão (SEP). Porém, os modelos mostraram-se ineficientes para quantificação em níveis abaixo de 5,0 %, não podendo ser aplicado ao formol em leite que é abaixo desse valor. Apesar disso, este método inovador pode ser utilizado como alternativa frente aos métodos tradicionais, devido à sua rapidez, simplicidade, sensibilidade, baixo custo e portabilidade permitindo análise *in situ*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMAGEM DIGITAL

A imagem digital é uma projeção ou captura bidimensional de um objeto, pessoa, paisagem ou qualquer outro tipo de matéria, que pode ser processado, manipulado, compreendido, armazenamento, transferido ou visualizado, tendo a ideia mais próxima do material real (NÓBREGA et al., 2008).

Matematicamente, a imagem digital pode ser representada de duas maneiras: a primeira, como uma função bidimensional $f(x,y)$, onde x e y são coordenadas discretas e inteiras (Z) que representam a intensidade ou nível cinza de cada ponto (x,y) do plano; e a segunda, na forma de uma matriz \mathbf{A} , de m linhas e n colunas ($\mathbf{A}_{m \times n}$), composta por elementos a_{ij} , coordenados em linha i e coluna j , com valor discreto, contendo informações detalhadas do ponto espacial a_{ij} da imagem digital (Figura 9). Em ambas as representações matemáticas, o código binário ($f(x,y)$ e a_{ij}) é capaz de descrever detalhadamente a menor porção fundamental de uma imagem digital, denominada de “*pixel*” ou “*pel*”, abreviação do inglês *picture element*, que significa elemento de imagem (FILHO, NETO, 1999).

Figura 9. Matriz representando a imagem digital captada

$$f(x,y) = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0,y) \\ f(1,0) & f(1,1) & \dots & f(1,y) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ f(x,0) & f(x,1) & \dots & f(x,y) \end{bmatrix} \quad \text{ou} \quad \mathbf{A} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \dots & a_{1j} \\ a_{21} & a_{22} & \dots & a_{2j} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ a_{i1} & a_{i2} & \dots & a_{ij} \end{bmatrix}_{m \times n}$$

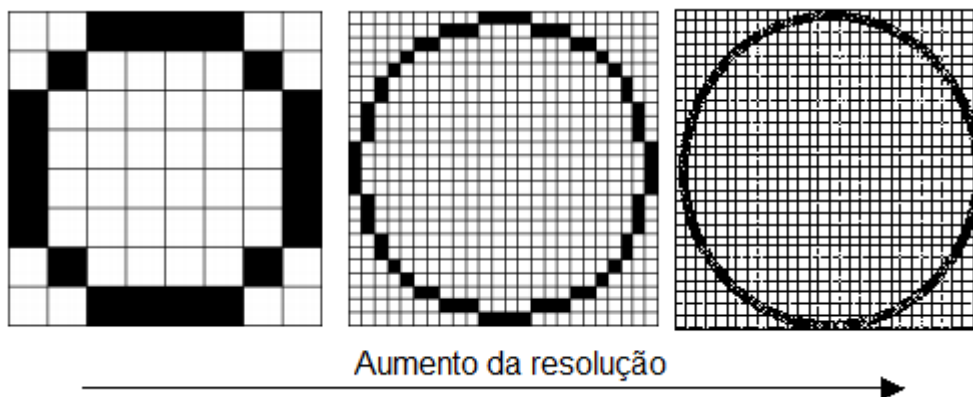
Fonte: adaptado de Scuri (2002).

Portanto, o *pixel* é a menor unidade que contém informações fundamentais de cada ponto (x,y) do plano espacial, capaz de agrupar-se, formando uma imagem digital. E as principais informações que esses conjuntos de *pixels* carregam são as resoluções e as cores das imagens digitais, que dependem dos dispositivos de aquisição e dos equipamentos que vão projetá-los.

2.1.1 RESOLUÇÃO

A resolução de uma imagem digital é o nível de detalhamento que cada *pixel* consegue representar com autenticidade do tamanho da imagem real em um projetor de imagem, como em monitores, telas de celulares e outros. Resumidamente, a resolução pode ser representada pela simples relação: *resolução = número de pixels/tamanho real*. Esta resolução pode ser calculada ou medida de diversas formas, mas a mais simples é pela a contagem do número de linhas em função da unidade do tamanho real da imagem digital (Figura 10), como por exemplo, linhas/mm ou linhas/polegada das dimensões (altura e largura) da tela de televisão ou *smartphone*. (NÓBREGA et al., 2008).

Figura 10. Diferentes resoluções da mesma imagem considerando o tamanho real



Fonte: adaptado de Scuri (2002).

Geralmente, a unidade de medida da resolução é em pontos por polegada ou *dpi* (*dots per inch*), que não pode ser confundido com a unidade da densidade de *pixel* ou qualidade da imagem, que é em *ppi* (*pixel per inch*, em português, pixel por polegada). A qualidade de uma imagem depende da dimensão dos *pixels* e a resolução controla as dimensões desses *pixels*, portanto uma boa qualidade de imagem depende de uma boa resolução, ou seja, de um elevado número de *pixels*. Por isso que, nem sempre, a imagem observada no monitor ou tela (qualidade limitada), é a mesma quando ela é impressa. Ou nem sempre o que é escaneado, é o que esta sendo projetado em tela. Cada equipamento tem sua máxima qualidade de projeção, como monitores atuais 96 *dpi*, *scanner* 1200 *dpi*; impressora jato de tinta 600 *dpi* (SCURI, 2002).

Portanto, a qualidade da imagem dependerá de sua resolução, que por sua vez dependerá da quantidade de *pixels*. Assim, o tamanho digital da imagem, que é medido em *bytes* (B), será proporcional às dimensões dos *pixels*, definindo o tamanho do arquivo. O tamanho do arquivo dependerá do formato ou extensão (GIF, JPG, JPEG ou PNG) da profundidade de cor (*bit-depth*) e da textura da imagem. As ferramentas dos programas de edição de imagem serão importantes para garantir as qualidade e resoluções de uma imagem digital (SCURI, 2002; NÓBREGA et al., 2008).

2.1.2 COR

A análise colorimétrica de uma imagem baseia-se na variação de cor do sistema, conforme a alteração de concentração de um determinado componente colorido (pigmento) (JEFREY, 1992). A forma de quantificação da concentração de uma substância desconhecida é pela análise da imagem digital, que dependerá dos fenômenos ópticos da reflexão da luz sobre o material (Figura 11). Com essa proporcionalidade entre energia absorvida, refletida ou transmitida e a concentração é possível fazer a quantificação da solução (NÓBREGA et al., 2008; SANTOS, 2013).

Uma imagem digital pode ser monocromática ou colorida, isso dependerá da cor natural do objeto e do quão esta característica pode ser captada e projetada. A cor de uma imagem digital é dependente de diversos fatores, desde os fenômenos ópticos da luz incidente, que podem ocorrer sobre a superfície do material ou imagem, como da reflexão, refração, transmissão ou absorção, até as maneiras ou formas de captação da luz refletida por um detector (SCURI, 2002; LOPES, 2009) (Figura 11).

Figura 11. Fenômenos que podem ocorrer com a luz incidente e a forma com que a cor pode ser vista dependendo do material

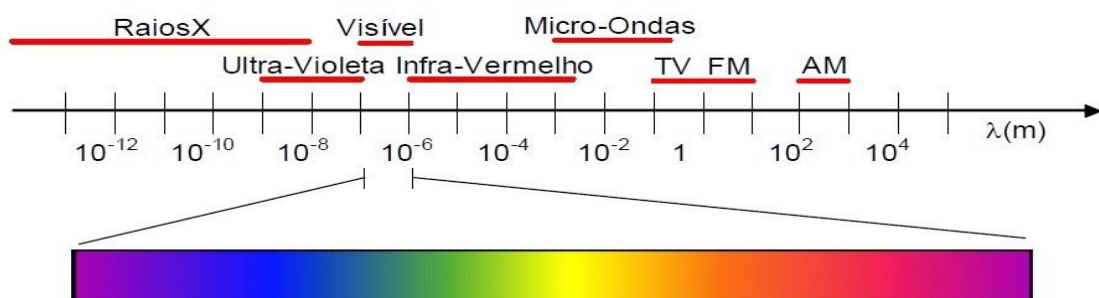


Fonte: adaptado de LOPES, 2009.

Por este motivo, a função matemática $f(x,y)$ da intensidade luminosa depende de outras funções que estão relacionadas com esses fenômenos ópticos sobre o objeto, como por exemplo, a quantidade de luz que incide (iluminância) $i(x,y)$; reflectância, refractância ou transmitância que podem ser representadas por $r(x,y)$, podendo ser escrita como $f(x,y) = i(x,y) \cdot r(x,y)$; em que $0 < i(x,y) < \infty$ e $0 < r(x,y) < 1$ (FILHO, NETO, 1999).

As cores e formas das imagens percebidas pelos humanos são determinadas principalmente pelo caráter da luz refletida dos materiais opacos e translúcidos para as retinas oculares. Em materiais de caráter transparentes a cor pode ser gerada com reagente cromogênico, ou mesmo por uma característica inerente a amostra a ser analisada. Cientificamente, o olho humano é sensível a faixa visível do espectro eletromagnético, que compreende de 400 a 800 nm, aproximadamente (SCURI, 2002; GONZALES, WOODS, 1992) (Figura 12).

Figura 12. Espectro eletromagnético com destaque para a faixa da região visível



Fonte: SCURI, 2002.

Devido a esta variabilidade de cores percebida de modo particular por cada indivíduo ou equipamento, as imagens coloridas são baseadas em modelos de cores que surgiram com objetivo de especificar as cores de forma padronizada. De modo geral, um modelo de cores é uma representação tridimensional na qual cada cor é representada por um ponto no sistema de coordenadas 3D. Os modelos mais comuns para representação de cores de qualquer imagem ou objeto, são: RGB (*red, green, blue*), CMY (*cyan, magenta, yellow*), CMYK (variante do modelo CMY, onde K denota *black*), YIQ (padrão NTSC de TV em cores) e HSI (*hue, saturation, intensity*), também denominado HSV (*hue, saturation, value*) (OLIVEIRA, 2012; GONZALES, WOODS, 2008). Neste trabalho, foi utilizado o modelo RGB, portanto este será explicado de forma mais detalhada.

2.1.2.1 Modelo RGB

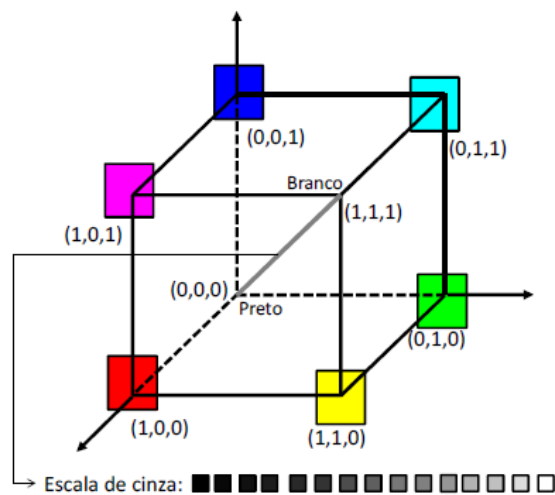
O modelo RGB, também chamado de padrão Bayer (em homenagem ao seu criador Bryce Bayer, pesquisador da Kodak), é um dos mais simples e utilizados dos sistemas de cores primárias das imagens digitais. Neste modelo são usados três sensores, cada um com um filtro específico para armazenar informações das imagens digitais em forma de matrizes, sendo que a matriz R (do inglês, *Red*) contém informações da cor vermelha, a G (*Green*) da cor verde e a B (*Blue*) da cor azul. Esses padrões são chamados de RGB (NÓBREGA et al., 2008; GODINHO et al., 2008).

Normalmente, as imagens RGB são armazenadas nos computadores utilizando 8 *bits* para cada cor, totalizando 24 *bits* (3 cores x 8 *bits*) e, como consequência, $2^8 = 256$ níveis para cada região espectral na região visível, podendo apresentar cerca de 16 milhões de cores diferentes (mais precisamente $256^3 = 16.777.216$) (SCURI, 2002; SANTOS, 2013 GONZALES, WOODS, 2008).

O modelo de cores RGB baseia-se em um sistema de coordenadas cartesianas das cores primárias (R, vermelho; G, verde; B, azul), em um subespaço unitário com vértices das três cores, produzindo uma forma alternada cúbica em outros três vértices pelas cores secundárias CMY (ciano, magenta e amarelo, do inglês, *cyan, magenta, yellow*), melhor representado na Figura 5. A cor preta

encontra-se na origem (0, 0, 0) e do lado oposto onde todas as bandas alcançam o seu valor máximo (255, 255, 255) está a cor branca. Além disso, também há a escala de cinza, que são pontos em que os valores de RGB se igualam. Convencionalmente, neste modelo, utilizam-se valores normalizados de 0 e 1 para cada cor e as cores são definidas por vetores que partem da origem (SCURI, 2002; OLIVEIRA, 2012; SOUZA et al., 2004).

Figura 13. Cubo de cores RGB e representação da escala de cinza, que parte da coloração preta (0,0,0) até a coloração branca (1,1,1)



Fonte: OLIVEIRA, 2012.

2.1.2.2 Modelo HSV

Já o modelo de cor HSV é mais intuitivo que o modelo RGB, muito aplicado em artes visuais para quem emprega os conceitos qualitativos de matiz (*Hue*), saturação (*Saturation*) e quantidade/valor (*Value*). Este modelo está relacionado com a intensidade, quantidade e brilho de uma imagem convertida em escala ou nível de cinza que varia do preto aos tons de cinza chegando ao branco (MACHADO, 2006; SANTOS, 2013).

As características utilizadas para diferenciar uma cor da outra são matiz, saturação e brilho/valor. A matiz (H) é a relação com a cor pura ou a cor percebida. A saturação (S) é a relação de pureza do matiz ou o quanto de luz branca está inserido na matiz. E o quantidade/brilho/valor (V) é um parâmetro particular

praticamente impossível de ser medido, que corresponde à intensidade da cor, sendo um dos fatores importantes para a descrição da sensação das cores (OLIVEIRA, 2012; SANTOS, 2013).

Os parâmetros matiz e a saturação, quando somados, definem cromaticidade, portanto uma cor é caracterizada pelo seu brilho e cromaticidade. (GONZALES, WOODS, 1992).

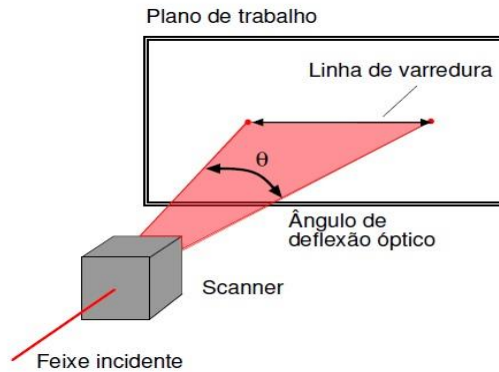
2.2 DISPOSIÇÃO AQUISITOR DE IMAGEM DIGITAL: **SCANNER**

Quando há incidência da luz sobre o objeto, o olho humano captura as características do material naquele ambiente e, o cérebro identifica e interpreta a imagem formada. Os digitalizadores das imagens reais foram projetados com esta funcionalidade, em que as características de um objeto são capturadas por um dispositivo eletrônico ou manual, e seu sinal refletido ou transmitido é convertido em combinações numéricas. Estas são decodificadas e processados por programas computacionais capazes de quantificar, manipular e transformar esses dados em um imagem digital de similar textura, cor, brilho, tonalidade e outras características do objeto real (NÓBREGA et al., 2008).

A aquisição da imagen de um objeto pode ser feita em qualquer dispositivo que consegue realizar a captação de sua imagem, como por exemplo: uma câmera ou filmadora de celular, *tablets*, *smartphones*, *scanners*, *webcams*, entres outros. Neste trabalho, utilizou-se o *scanner* de mesa como aquisitor de imagens devido ao seu baixo custo frente aos equipamentos mais modernos (WANG et al., 2011, LYRA et al., 2009).

Os *scanners* são dispositivos eletrônicos, que por meio da deflexão do feixe luminoso (visível ou não) consegue captar a imagem do objeto de forma controlada e reproduzível, como esquematizado na Figura 6, em que a função do feixe luminoso puntual do *scanner* depende um ângulo com o tempo $\theta(t)$ e a uma velocidade $v(t)$ (OLIVEIRA, 2006).

Figura 14. Um ponto luminoso é convertido em uma linha pela ação de um *scanner*



Fonte: OLIVEIRA, 2006.

Geralmente, um *scanner* realiza a aquisição de uma imagem ou objeto, usando uma barra de lâmpada de LEDs que emitem radiações luminosas sobre a superfície do material, que por sua vez, são refletidas e captadas por sensores do tipo CCD (*Charge Coupled Device*), que estão alinhados paralelamente aos LEDs. Esse sensor CCD é usado em grande parte dos *scanners* de mesa, fax e câmeras digitais. Sua função é capturar a luz refletida pelos fotodetectores e transformá-la em sinais elétricos, logo convertidos a dígitos binários ou *bits* por meio de um circuito analógico-digital e, transmitidos à um computador, celular ou meio eletrônico capaz de decodificar esses dados em imagem (NÓBREGA et al., 2008)

A tecnologia dos sistemas de varredura de equipamentos, como os *scanners*, são bem abrangentes, sendo aplicados nas impressoras à laser, fotocopiadoras e nos diversos tipos de leitores de código de barras, digitais de dedo, rosto e até mesmo, do olho humano. Porém, esses tipos de aplicações variam de complexidade, em tais sistemas são considerados, além da mecânica de controle do feixe luminoso, as características reais e fiéis da identidade do objeto, que podem ser digitalizadas em papéis e filmes, ou então, projetada em um monitor ou tela do computador (NÓBREGA et al., 2008; OLIVEIRA, 2006).

2.3 CONVERSORES E PROCESSADORES: COMPUTADOR

Atualmente, existem diversos aparelhos que conseguem realizar a captação da imagem ou objeto e projetá-los em suas formas digitais, como a câmera

fotográfica, *smartphone*, *tablet*, entre outros equipamentos que tenham uma câmera acoplada. Os computadores são equipamentos dependentes de um dispositivo aquisitor de imagens, capaz de receber, armazenar e manipular os dados da imagem em forma de *bits*, que são as menores informações que podem ser armazenadas ou transmitidas em forma de um dado. Seu valor numérico pode ser 0 ou 1 de uma coordenada (x,y) . A cada 8 *bits* forma-se 1 *byte*, que por sua vez pode assumir $2^8 = 256$ valores diferentes, variando de 0 a 255. Assim, o computador sempre trabalha com números de *bits* inteiro (Z), os números com casas decimais, chamados de ponto flutuante, são aproximados para o valor de *bits* inteiro. Por isso, uma função contínua não pode ser representada no computador, e sim, apenas simulada (CURI, 2002).

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver e validar um sistema instrumental simples e um método para determinação quantitativa de formol em leite rápido, baseado em imagens digitais obtidas por *scanner* de mesa comercial convencional (AID-*scanner*), comparando-o á métodos de referência oficiais descritos no Capítulo 2.

4. METODOLOGIA

4.1 REGENTES E MATERIAIS

Para execução dos experimentos deste capítulo foram utilizados balões volumétricos de 25 mL e 50 mL (Vidrolabor, Poá, SP, Brasil); frascos 15 mL de vidro com tampa de rosca (Frascolex, São Paulo, Brasil); pipeta volumétrica de 10 mL (Pyrex, Nova Iorque, EUA); balança analítica Shimadzu 200AX (Shimadzu, Quioto, Japão); micropipeta (LABMATE, St Albans, Inglaterra); Placa Elisa (PE) - microplaca de poliestireno branco sólido com 96 poços, fundo liso (85,4 x 127,6 mm, V_{max} /poço

400 μL) (Grether Microlon, Monroe, NC, EUA); água ultrapura de resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (MILLI-Q[®]); sonicador Elmasonic P (Elma, Singen, Alemanha). Padrão de 1,3,5-tri-hidroxibenzeno ou mais conhecido como floroglucina p.a. 98,0% (Merck, Darmstadt, Alemanha); formaldeído 37% ou mais conhecido como formol p.a. (Dinâmica, Brasil) e solução de hidróxido de sódio $47,38 \pm 0,21 \%$ (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).

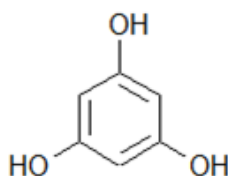
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água ultrapura utilizada na preparação das soluções e limpeza dos recipientes foi produzida pelo sistema MILLI-Q[®]. Todas as soluções utilizadas foram preparadas antes das análises realizadas neste trabalho.

4.2.1 SOLUÇÃO DE FLOROGLUCINA 1,0 % (M/V)

Uma massa de 250,0 mg do padrão de floroglicina ou 1,3,5-tri-hidroxibenzeno (Figura 15) foi pesada em balança analítica e, posteriormente, dissolvida em frascos âmbar com adição de pequenos volumes de água ultrapura, sob sonicação a frequência 80 Hz a temperatura ambiente, até à ausência de partículas do reagente, obtendo-se assim uma solução de floroglucina 1,0% (m/v).

Figura 15. Estrutura molecular da 1,3,5-trihidroxibenzeno ou floroglicinol ou floroglucina



Fonte: adaptado de Souza (2014).

4.2.2 SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 5% (v/v)

Um volume de 5,30 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 47,38 \pm 0,21% (m/v) padronizado foi diluída com água ultrapura em um balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se, assim uma solução de NaOH 5,0 % (v/v).

4.3 PREPARO DAS CURVAS ANALÍTICAS

As amostras utilizadas foram de cinco tipos de leite bovino, como anteriormente citada no Capítulo 2 (leite cru, UHT e pasteurizado; os dois últimos, integral e desnatado). Para cada tipo de leite, construíram-se quatro curvas analíticas, com adição de formol (37,0% m/m), nas concentrações de 0,005; 0,015; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100% (v/v), equivalendo a 18,5; 55,5; 92,5; 185,0; 277,5; e 370,0 mg L⁻¹ (ou ppm) para análise por imagens digitais via *scanner* de mesa (AID-*scanner*). Lembrando que é a mesma faixa utilizada no trabalho de Silva (2013) e, normalmente, utilizada pelos fraudadores (G1, 2014).

4.4 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

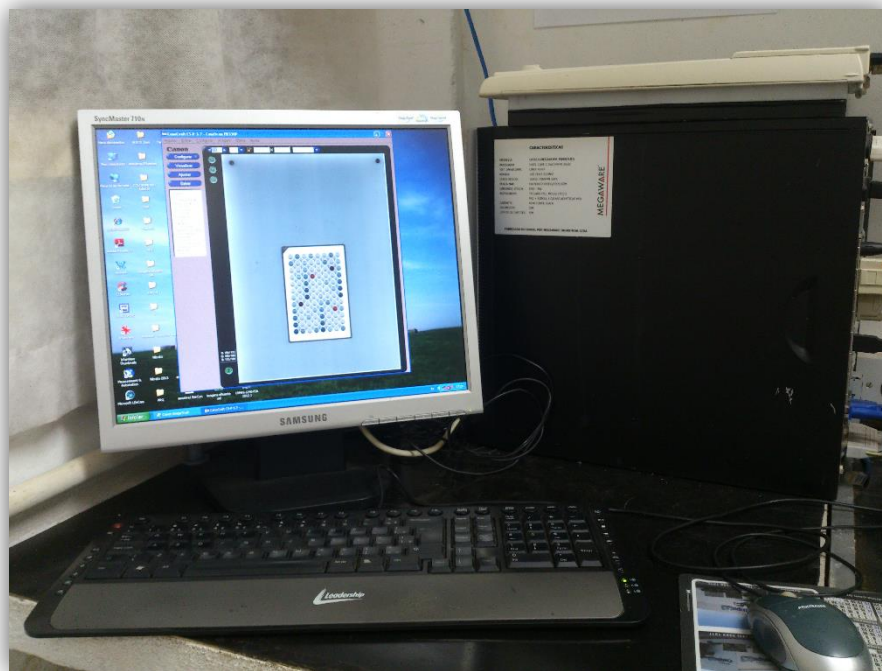
O sistema instrumental proposto neste trabalho baseado em imagens digitais obtidas via *scanner* de mesa convencional comercial foi validado avaliando-se os parâmetros de: especificidade e seletividade, linearidade e faixa dinâmica de trabalho, precisão (repetitividade – intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), exatidão (recuperação), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e estabilidade da solução, de acordo com a RDC nº 889/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente de acordo com as Equações 1 e 2, citada no Capítulo 2 item 3.4.

4.5 SISTEMA INSTRUMENTAL PARA ANÁLISE DE FORMOL EM LEITE POR IMAGENS DIGITAIS VIA *SCANNER* DE MESA

4.5.1 *HARDWARES* E EQUIPAMENTOS

No procedimento da aquisição e tratamento das imagens digitais utilizou-se um microcomputador AMD Athlon™ XP 1600+ (1,40 GHz) com 128 MB de DDR-SDRAM, contendo uma placa de vídeo aceleradora Nvidia AGP Riva TNT M64 – 32 MB SDRAM. A resolução da tela do monitor Samsung 17 SyncMaster 753 DFX foi de 1024 por 768 *pixels* e qualidade de cor máxima de 32 *bits*. O *scanner* CanoScan FB 330P (CanoScan FB 330P, Nova Iorque, EUA) foi o responsável pela aquisição das imagens digitalizadas, interfaciado ao microcomputador através da porta paralela. A Figura 16 mostra a foto do sistema utilizado no presente trabalho.

Figura 16. Sistema instrumental proposto neste trabalho para determinação do formol em leite. Captura via *scanner* de mesa convencional imagens digitais, provenientes da reflectância colorimétrica de amostras contidas em microplaca de 96 poços, tratadas na sequência pelo *software* “lab-made” desenvolvido QuantColor, baseado no sistema RGB



Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Mais detalhadamente, um suporte de polietileno de alta densidade (Teflon[®]) em chapa, com dimensões de 22 x 32 x 1,5 cm (largura x comprimento x altura), foi recortado para conter o espaço exato para o encaixe da microplaca de poliestireno (8,60 x 12,80 cm) de 96 poços. O *scanner* foi unido ao suporte em posição invertida (área de digitalização do *scanner* em cima) como mostra a Figura 17. Este sistema foi adotado com a finalidade de manter a placa sempre na mesma posição, o que facilita o tratamento das imagens digitais e evitar o escape de luz.

Figura 17. Parte interna do sistema instrumental para determinação de formol em leite, em que o *scanner* invertido está sob o suporte de polietileno ao redor da microplaca que contém as amostras



Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

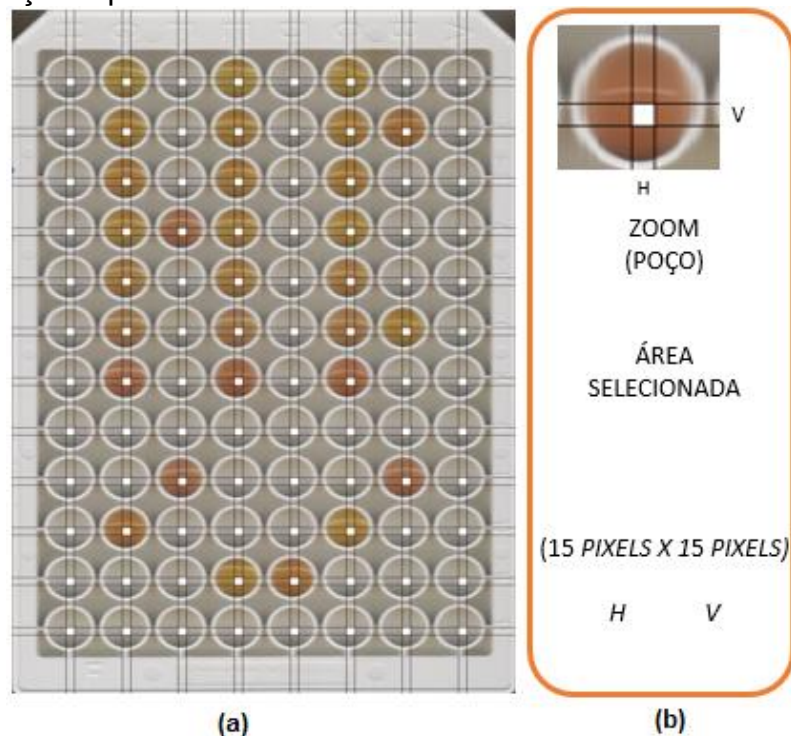
4.5.2 SOFTWARES DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DAS IMAGENS DIGITAIS

A aquisição das imagens foi feita pelo *software* do próprio *scanner*, o CanoCraft CS-P (versão 3.7) em sua resolução padrão de 300 *dpi*. O tipo de aquisição foi de 24 *bits*, onde cada um dos *pixels* pode assumir qualquer uma das 16 milhões de cores. Os arquivos foram armazenados em *bitmap*, sem compressão do arquivo. Desse modo, apesar dos arquivos *bitmap* ocuparem espaço, este formato fornece informações precisas sobre cada *pixel* (NÓBREGA et al., 2008; OLIVEIRA, 2006).

O tratamento das imagens digitais foi feito pelo *software* “lab-made” denominado QuantColor, criado pelo Professor Doutor Carlos Alberto Paulinetti da Camara (UEL - Departamento de Química - Lab. DIA), o qual foi desenvolvido em linguagem Microsoft Visual Basic[®] 6.0, operado em Windows XP/Vis/7/8 (32 *bits*).

O programa QuantColor disponibiliza a inserção da imagem digitalizada da microplaca de poliestireno contendo as amostras de leite, em uma janela gráfica. Posteriormente, as áreas de menor sombra ou falha são selecionadas sobre os poços com dimensões de 15 x 15 *pixels* (vertical (V) x horizontal (H)), totalizando um área de 225 *pixels*, em que cada *pixel* determina a intensidade das cores primárias RGB (Figura 18). O *software* apresenta ainda outras opções de selecionamento das áreas dos poços, como a intensidade mediana, média, valor máximo e mínimo, e frequências. Neste trabalho, utilizou-se a área média como padrão recomendado.

Figura 18. (a) Áreas selecionadas pelo programa QuantColor para aquisição da imagem digital das amostras. (b) Zoom da área selecionada de cada poço da placa

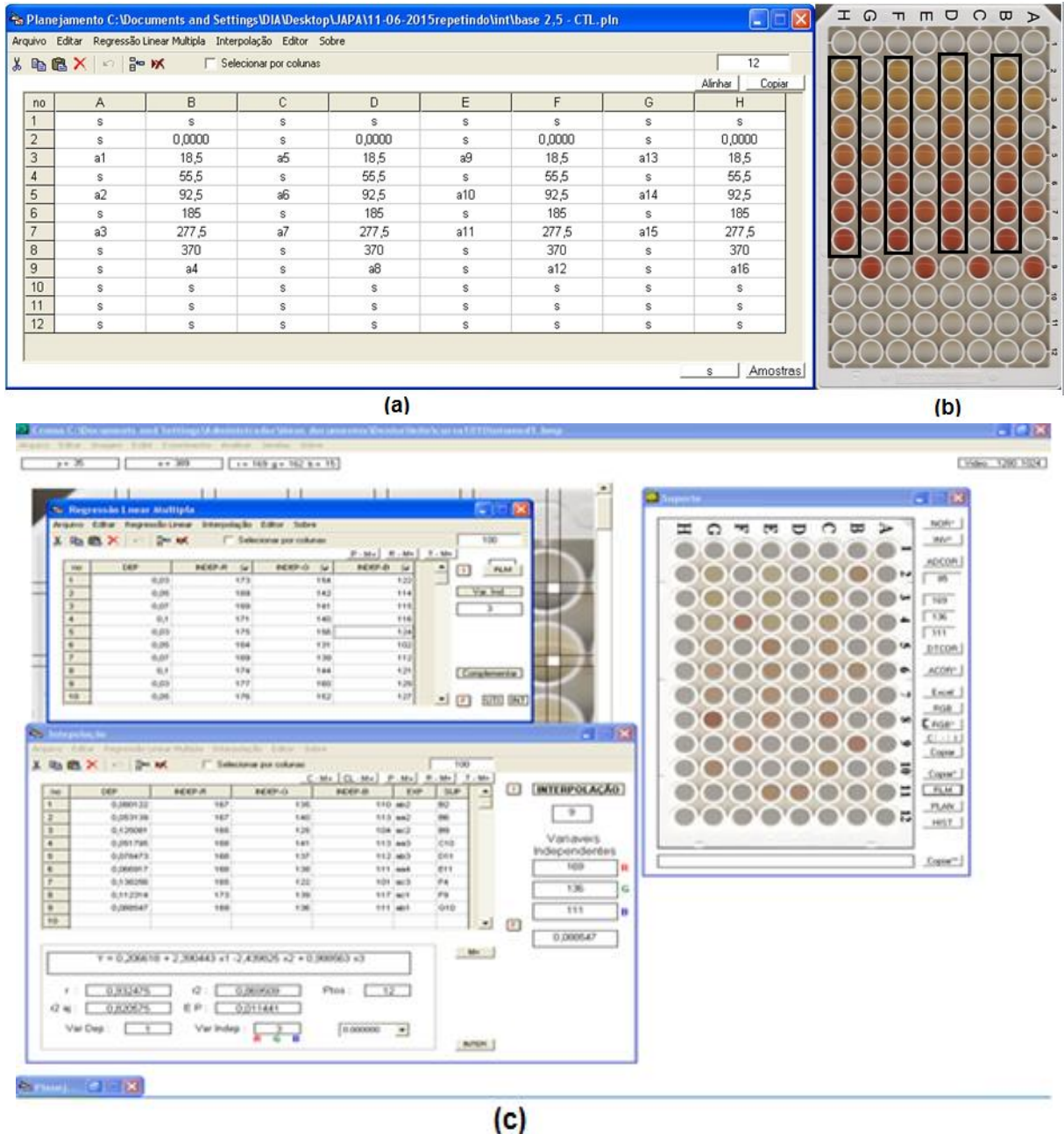


Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Selecionadas as áreas dos poços, o QuantColor disponibiliza no formato de planilha as informações do tipo de amostra versus seu posicionamento no poço, preenchidas anteriormente na fase do planejamento experimental. Desta forma, é possível observar as descrições das amostras atreladas às imagens digitais da microplaca, contendo os padrões de formol em diferentes concentrações empregados no levantamento das curvas analíticas para calibração do sistema, juntamente com as amostras de leite que serão quantificadas, como representado na Figura 19. Em seguida, o *software* processa automaticamente a correlação entre os *pixels* presentes em cada área do poço com as concentrações dos analitos nas amostras de leite, empregando regressões lineares univariáveis (RL) de cada uma das cores primárias (R, G e B) e/ou a regressão linear múltipla (RLM) do sistema RGB (SANTOS, 2013), quantificando os analitos presentes na amostra.

Deve-se ressaltar que o programa permite ainda a transferência direta dos dados experimentais para a planilha eletrônica do Microsoft Excel® para tratamentos posteriores (Correlação, Análise da Variância, Regressão Linear, Ajuste Não Linear, etc).

Figura 19. Recursos do software “lab-made” QuantColor. (a) Planilha de planejamento experimental contendo curvas analíticas e amostras de leite adulteradas. (b) Imagem digitalizada para um dos tipos de leite analisado. (c) Exemplo do tratamento dos dados utilizando o programa.



Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

4.5.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÃO ANALÍTICAS INSTRUMENTAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DO FORMOL EM LEITE POR AID-SCANNER

Diferentemente dos dois outros métodos recomendados como oficiais (IN 68/2006 e o HPLC-PDA) descritos anteriormente no Capítulo 2, este procedimento baseou-se nos trabalhos de Santos e Pereira (2013) e Li et al. (2007), que foi totalmente readaptado para o leite e não apresenta etapa de limpeza de amostra (*clean-up*).

Utilizando-se leite “in natura”, sem nenhum tipo de pré-tratamento de extração ou limpeza, 1,0 mL foi derivatizado com 100 μ L de solução de floroglucina 1,0% (m/v) e 200 μ L de solução de NaOH a 5,0% (v/v). Após agitação mecânica, 300 μ L das amostras foram imediatamente transferidos com micropipeta de 1000 μ L para os poços da microplaca de Elisa (placa de polipropileno de 96 poços de 85,4 x 127,6 mm, volume total de 400 μ L/poço). A placa foi encaixada no suporte de teflon® em que o *scanner* (CanoScan FB 330P) é disposto invertido, de cabeça para baixo, descrito anteriormente. O escaneamento das placas foi feito pelo *software* CanoCraft CS-P (versão 3.7) na resolução padrão de 300 *dpi*, em um intervalo tempo otimizado durante a validação do método. O tipo de escaneamento foi de 24 *bits*, com as imagens digitais não tratadas por filtros digitais ou processadas por qualquer edição de brilho, contraste, gama e saturação. E os arquivos foram salvos no formato *bitmap*, sem compressão do arquivo. Finalmente as imagens digitais foram tratadas e analisadas utilizando o *software* QuantColor.

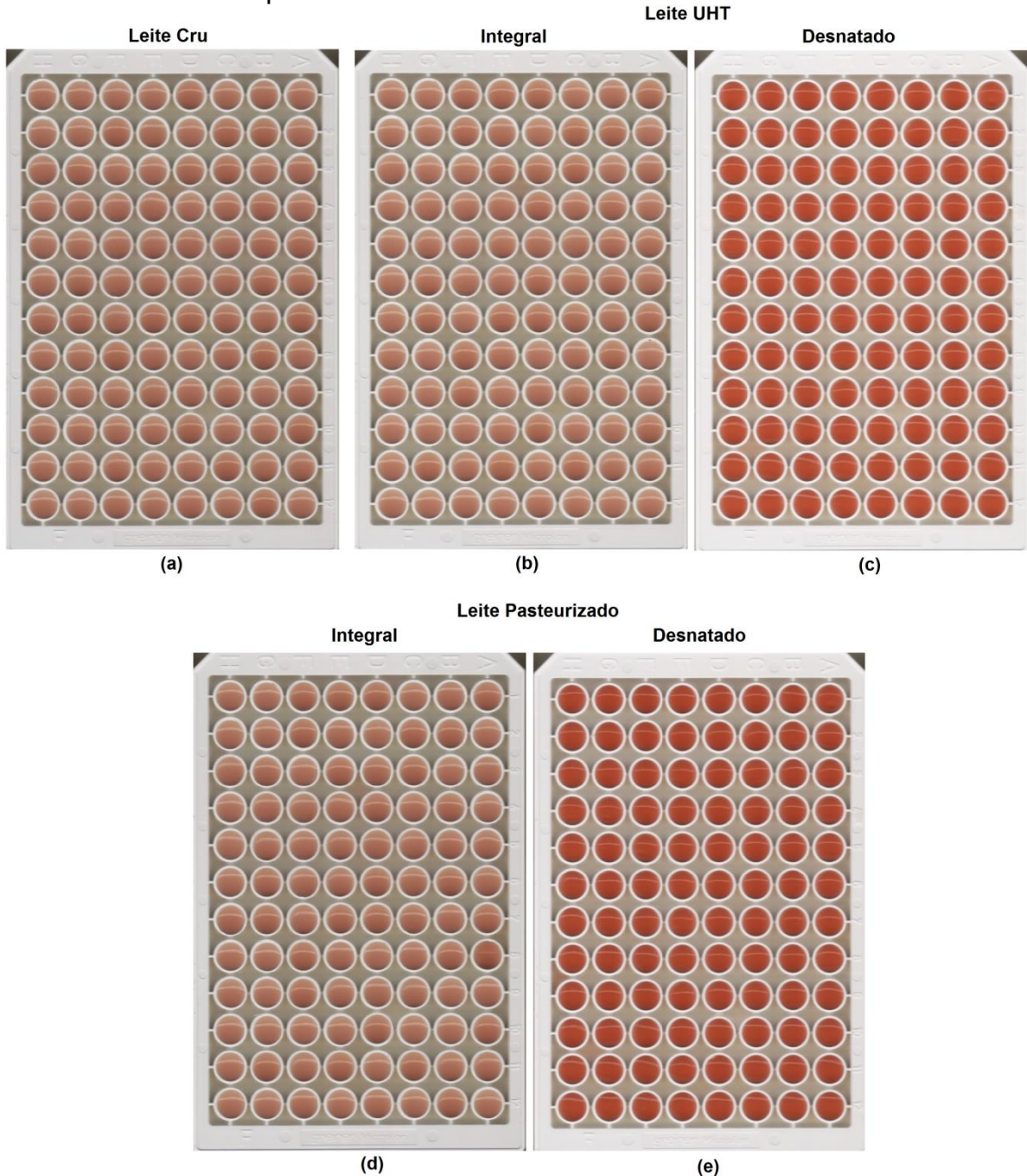
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÕES PRELIMINARES QUANTO À REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO FORMOL COM FLOROGLUCINA EM MEIO BÁSICO PARA DETECÇÃO POR AID-SCANNER

Nos testes preliminares notou-se que a reação de derivatização do formol com a floroglucina em meio básico, gera uma coloração salmão em qualquer tipo de

leite – cru, integral e desnatado (Figura 20). Para este teste foram fixadas as concentrações dos reagentes - floroglucina 1,0 % (m/v), NaOH 5,0% (v/v) e 185 mg L^{-1} de formol, com tempo para aquisição das imagens de cerca de 3 minutos.

Figura 20. Imagens digitais das microplacas contendo amostras adicionadas de formol dos 5 tipos de leite: cru; longa vida UHT de caixinha (integral e desnatado); e pasteurizado de saquinho (integral de desnatado) nas mesmas condições de preparo, capturadas por *scanner* de mesa e tratadas pelo *software* desenvolvido QuantColor

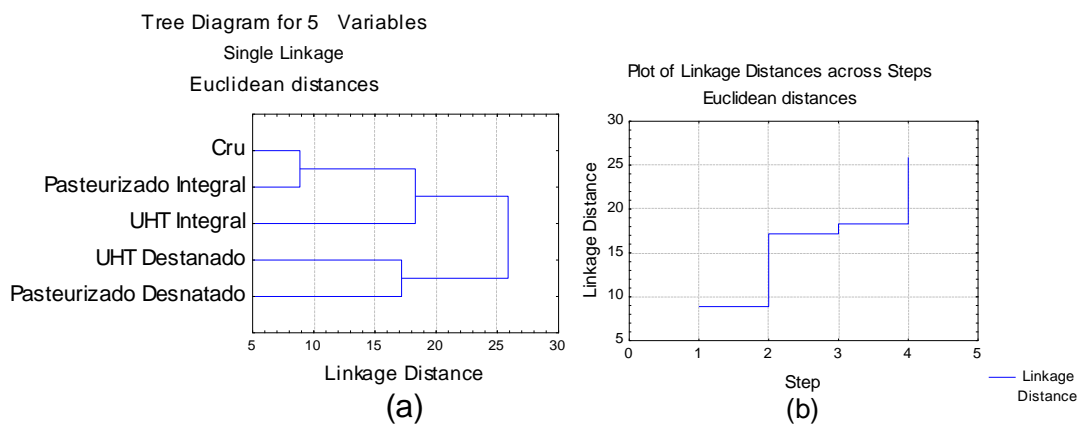


Amostras adulteradas com formol (185 mg L^{-1}) ($300 \mu\text{L/poço}$) após derivatização de 1 mL de leite do tipo: (a) cru "*in natura*"; (b) UHT integral; (c) UHT desnatado; (d) pasteurizado integral; (e) pasteurizado desnatado, com $100 \mu\text{L}$ de floroglucina 1% (m/v) e $200 \mu\text{L}$ NaOH 5%(v/v)

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Após análise das imagens digitais da Figura 20, tratadas com o *software* QuantColor, baseando-se nas médias das intensidades de cores dos poços, concluiu-se que a variação da intensidade da cor depende da quantidade de gordura no leite. Isto faz sentido, quando se observa que as Figuras 20(a), 20(b) e 20(d) que apresentam intensidade de cores similares entre si são todas de leites que contém gordura - cru, UHT integral e pasteurizado integral. Da mesma forma, um comportamento semelhante também foi observado nas imagens das Figuras 20(c) e 20(e) que são de leites desnatados - UHT e pasteurizado, que apresentaram maiores intensidades de cor comparadas aos integrais, mas não apresentam diferenças significativas entre suas intensidades de cores, em nível de 5,0%. Efetuando-se uma análise de agrupamento (AA) (Figura 21) empregando o *software* *Statistic Application*, nota-se que houve a separação em 2 grupos na maior distância euclidiana, havendo diferenças significativas entre os leites com gordura (cru/integral) e o desnatado. Assim, a princípio poderia se dizer que esta técnica consegue distinguir os tipos de leite quanto à porcentagem de gordura no meio. Entretanto, realizou-se uma investigação mais aprofundada desta reação de derivatização na literatura, para confirmar essa afirmação, uma vez que o leite consiste em uma matriz heterogênea e, notou-se experimentalmente uma diminuição da intensidade na coloração com o tempo.

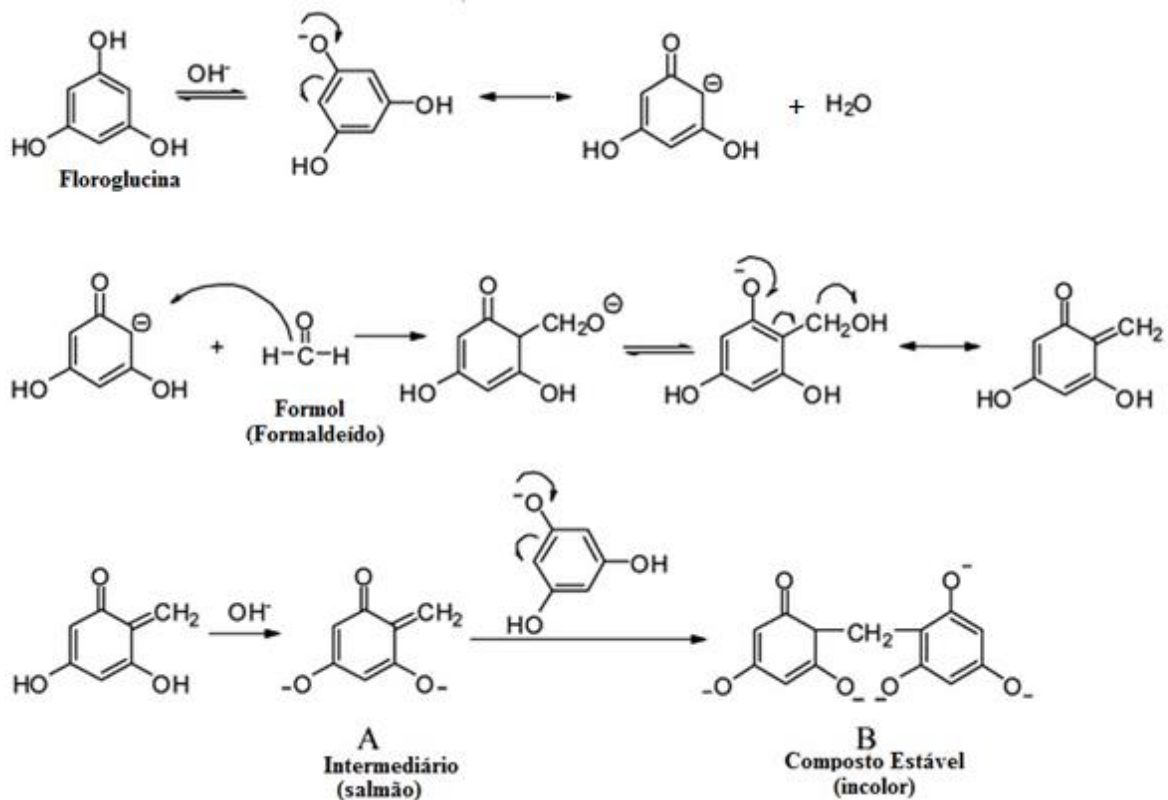
Figura 21. (a) Análise de agrupamento feito entre diferentes tipos de leites adulterados com 185 mg L^{-1} de formol, derivatizados com floroglucina em meio básico. (b) Distância euclidiana da análise de agrupamento, indicando a separação em 2 grupos – integral e desnatado



Fonte: Próprio autor (2016).

Por isso, optou-se por verificar a reação da floroglucina com o formol estudada por Gayathri, Balasubramanian (2000) e aperfeiçoada por Li et al. Segundo Li et al. (2007) no seu possível mecanismo (Figura 22), há produção de um composto intermediário instável (**A**) de cor laranja-rosado (salmão) que descora-se em função do tempo para formar um composto incolor estável (**B**). A cor salmão do composto **A** provém da conjugação das quatro ligações duplas e dos dois elétrons do oxigênio. Já o composto **B**, apesar de possuir ligações conjugadas é estabilizado pela ressonância dos anéis (LI et al., 2007).

Figura 22. Esboço do mecanismo de reação da floroglucina com o formol em meio básico de NaOH



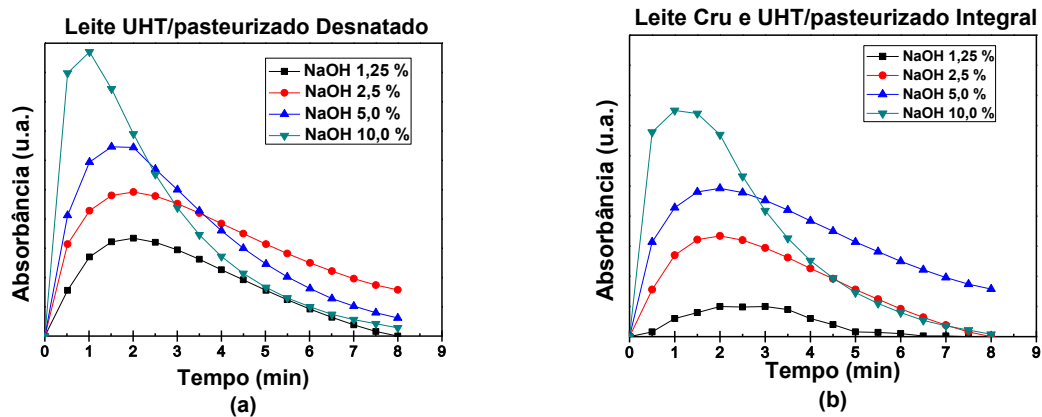
Fonte: Próprio autor (2016) adaptado de Li et al. (2007).

A quantidade produzida do composto **A** (salmão) depende ainda da concentração de base no meio, aumentando quanto maior for a concentração do NaOH. Isto explicaria a redução da cor quando o método é aplicado para o leite contendo proporção normal de gordura (cru e integral – UHT e pasteurizado), pois a base (NaOH) reagirá com essa gordura (reação de saponificação), reduzindo sua disponibilidade para formar o composto intermediário **A** (formol-floroglucina),

produzindo desta forma, uma coloração mais clara (Figuras 20(a), 20(b) e 20(d)) comparada á do leite desnatado (Figuras 20(c) e 20(e)). Além da reação de saponificação, ocorrem outros tipos de reações e efeitos no leite com a introdução do NaOH, como a reação de neutralização do ácido láctico e o aumento do meio micelar, que pode acarretar no aumento do efeito Tyndall, sem contar que a base favorece a formação do composto **B**, o qual é incolor (SMITH, 2005; PIVELI, 2014).

Devido a isso, um estudo cinético desta reação visando definir a melhor concentração da base (NaOH) a ser empregada na formação do composto intermediário **A**, foi realizado para o leite integral e desnatado em função do tempo de aquisição da imagem. Avaliou-se a estabilidade do composto **A** para quatro concentrações de NaOH distintas: 1,25; 2,50; 5,00 e 10,00 % (v/v), considerando a intensidade das cores do sistema RGB em função do tempo em minutos, mostradas na Figura 23.

Figura 23. Influência da concentração de NaOH sobre a reação entre o formol e a floroglucina para a formação do composto intermediário **A** de interesse para os: **(a)** leites desnatados – UHT e pasteurizado, **(b)** leites integrais – cru, UHT e pasteurizado



Fonte: Próprio autor (2016).

Observando a Figura 23(a), conclui-se que a faixa que apresenta maior linearidade de intensidade máxima de cor em função do tempo, para o leite desnatado, se encontra no intervalo de tempo entre 1,5 a 3 minutos para a concentração de 2,5 % (v/v) de NaOH. Para as concentrações maiores de base (5,0 e 10,0 %, v/v) a reação ocorre muito rapidamente, fazendo com que a sensibilidade decaísse bruscamente durante tempo de aquisição, podendo causar assim prejuízos a repetitividade dos dados. Em baixas concentrações de base (1,25%, m/v) apesar

da faixa de trabalho em que a cor permanece estável aumentar, ocorre perda significativa de sinal analítico, produzindo perda de sensibilidade.

Já, para o leite dos tipos cru *in-natura* e integral UHT e pasteurizado (Figura 23(b)) os melhores resultados foram para a concentração de NaOH a 5,0 % (v/v), justificada pela maior quantidade de gordura no meio. Utilizando-se concentrações menores de base (1,25 e 2,5 %, v/v) observou-se tendência similar ao desnatado, com aumento na faixa de trabalho estável, porém com redução drástica na sensibilidade. Portanto, optou-se pela aquisição de imagens na faixa de tempo de 1,5 a 3,0 minutos, tempo suficientes para preencher os poços da placa, com concentração de NaOH de 2,5% (v/v) para o leite desnatado e de 5,0 % (v/v) para o leite integral. Encontradas as melhores condições das concentrações dos reagentes e do tempo de aquisição para cada tipo de leite (cru, UHT integral, UHT desnatado, pasteurizado integral e pasteurizado desnatado) realizou-se a validação dos parâmetros do método conforme descrito anteriormente no item 4.4, para a análise de imagem digital via *scanner* de mesa (AID-*scanner*).

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO DE DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL (AID-SCANNER)

Como na avaliação preliminar o método AID-*scanner* proposto mostrou-se capaz de diferenciar os tipos de leite quanto à quantidade de gordura - cru/integral e desnatado, apenas os resultados da validação para os leites UHT integral e UHT desnatado serão aqui apresentadas por questões didáticas, já que os resultados foram semelhantes dentro de um mesmo grupo (integral e desnatado).

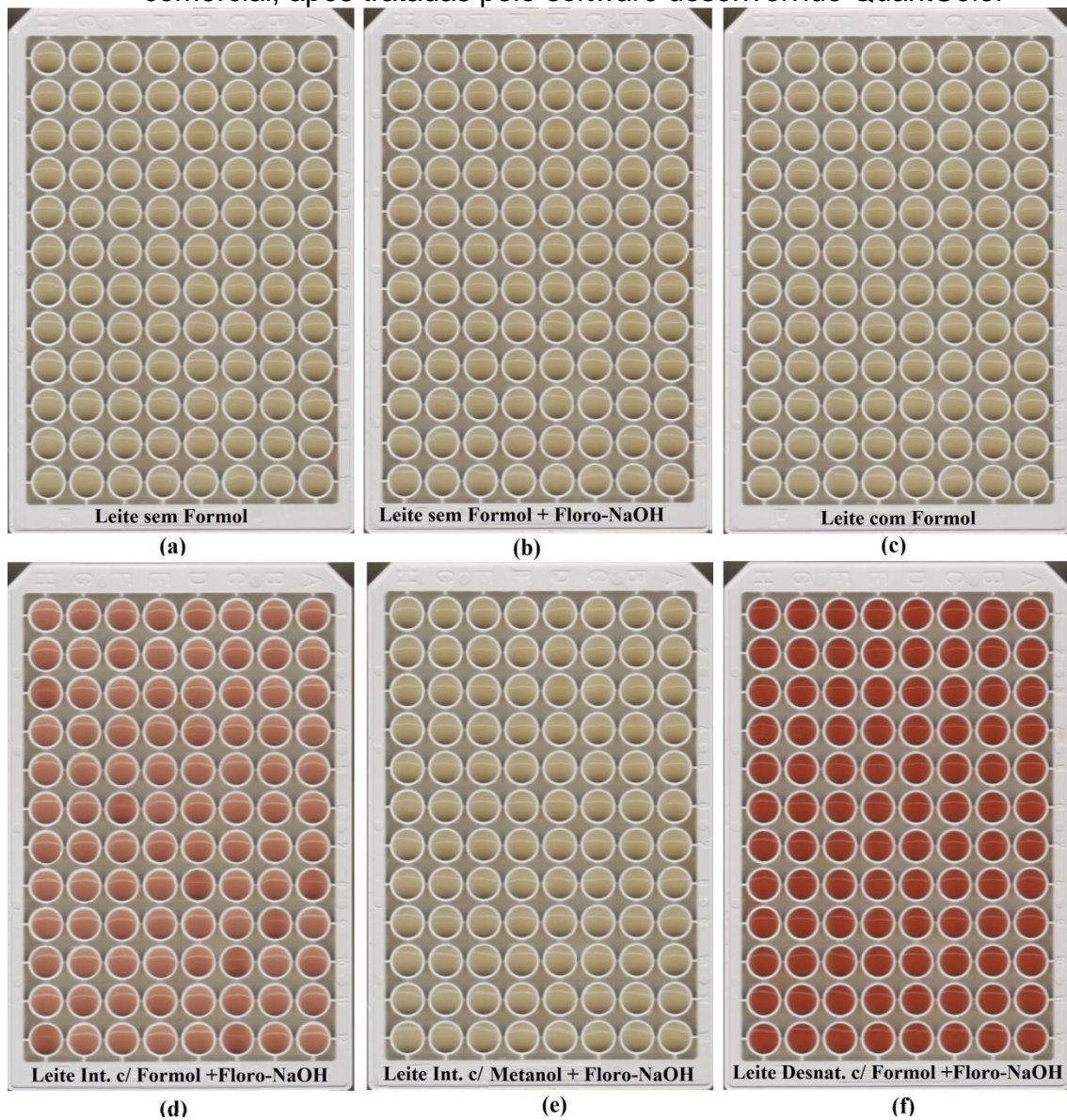
A especificidade e seletividade da análise digital por *scanner* na determinação de formol no leite foi realizada em 5 ensaios com o mesmo tipo de leite integral representados na Figura 24 ((a), (b), (c), (d), (e)), e um com leite desnatado adicionado de formol e derivatizado (Fig. 24(f)), para efeito de comparação do método para matrizes contendo diferentes teores de gordura.

Comparando as imagens da Figura 24(a) com a 24(d), nota-se que o derivatizante (floroglucina) só reage na presença de formol em meio básico (NaOH), em que ocorre o aparecimento da cor. Nas demais placas (Fig. 24(b), 24(c) e 24(e))

não houve nenhuma alteração na cor, não havendo nenhum tipo de interferente para este agente derivatizante, mostrando que o método das imagens digitais por *scanner* é seletivo para a análise de formol na matriz da amostra de leite. Isto foi comprovado pela elevada correlação ($r \approx 1,0$) sem diferenças significativas para as imagens dentro de uma placa, indicando que o *scanner* consegue captar as cores das imagens de cada um dos 96 poços de forma homogênea. E também, que não houve diferença significativa entre as placas 24(a), 24(b), 24(c) e 24(e) em nível de 5%, entretanto, houve diferença significativa com relação às placas 24(d) e 24(f), o que já era esperado e, indica que essa derivatização é específica para o formol.

Para o estudo da linearidade foram construídas 4 curvas de calibração nas colunas da microplaca intercaladas (**B, D, F, H** a direita), mostradas invertidas na cor verde no planejamento (**H, F, D, B** a esquerda), constituídas do branco ($n=4$) – leite sem formol (**0,0 mg L⁻¹**) dispostos na linha (**2**) destas mesmas colunas (Figura 25) e, de mais 6 pontos com amostras de leite adicionadas de formol em concentração crescente de **18,5; 55,5; 92,5; 185,0; 277,5; e 370,0 mg L⁻¹** (equivalendo a [formol] final de **0,005; 0,0150; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100% v/v**) derivatizadas com floroglucina em meio básico, dispostas nas linhas (**3-8**). Na mesma placa, simultaneamente a linearidade, foi testada a precisão (p) do método proposto pela repetitividade ($n=4$) com amostras de leite derivatizadas na concentração de 18,5 mg L⁻¹ de formol adicionado (colunas **A, C, E, G** e linha (**3**)) e, a recuperação (Rn) em 3 níveis de concentração – R1(**74,0 mg L⁻¹**), R2(**148,0 mg L⁻¹**) e R3 (**333,0 mg L⁻¹**), nas mesmas colunas e linhas (**5, 7 e 9**).

Figura 24. Imagens digitais das microplacas contendo amostras em diferentes condições de preparo, capturadas por *scanner* de mesa convencional comercial, após tratadas pelo *software* desenvolvido QuantColor



(a) Leite integral UHT (300 μL /poço) sem formol; **(b)** Leite integral UHT derivatizado sem formol (300 μL /poço) (1 mL de amostra sem formol com 100 μL floroglucina 1% (m/v) em meio básico de 200 μL NaOH 5%(v/v)); **(c)** Leite integral UHT adulterado com formol(185 mg L^{-1}) (300 μL /poço); **(d)** Leite integral UHT derivatizado com formol (300 μL /poço)(1 mL de amostra com formol(185 mg L^{-1}) com 100 μL floroglucina 1% (m/v) em meio básico de 200 μL NaOH 5%(v/v)); **(e)** Leite integral UHT após pré-tratamento com metanol (1:1 v/v) (300 μL /poço) derivatizado com 100 μL floroglucina 1% (m/v) em meio básico de 200 μL NaOH 5%(v/v); **(f)** Leite UHT desnatado derivatizado com formol (300 μL /poço)(1 mL de amostra com formol(185 mg L^{-1}) com 100 μL floroglucina 1% (m/v) em meio básico de 200 μL NaOH 5%(v/v)).

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL(2015).

Figura 25. Planejamento de distribuição dos experimentos e imagens digitais do composto intermediário **A** (HCHO-floroglucina) de cor salmão, formado a partir do leite adicionado de formol em diferentes concentrações derivatizado com floroglucina 1%(m/v) e NaOH 2,5 e 5%(v/v), utilizados para avaliação da linearidade (4 curvas analíticas com 7 pontos), precisão (*p*, *n*=4) e recuperação (3 níveis – *R1*, *R2*, *R3*, *n*=4) para: (a) leite desnatado e (b) leite integral

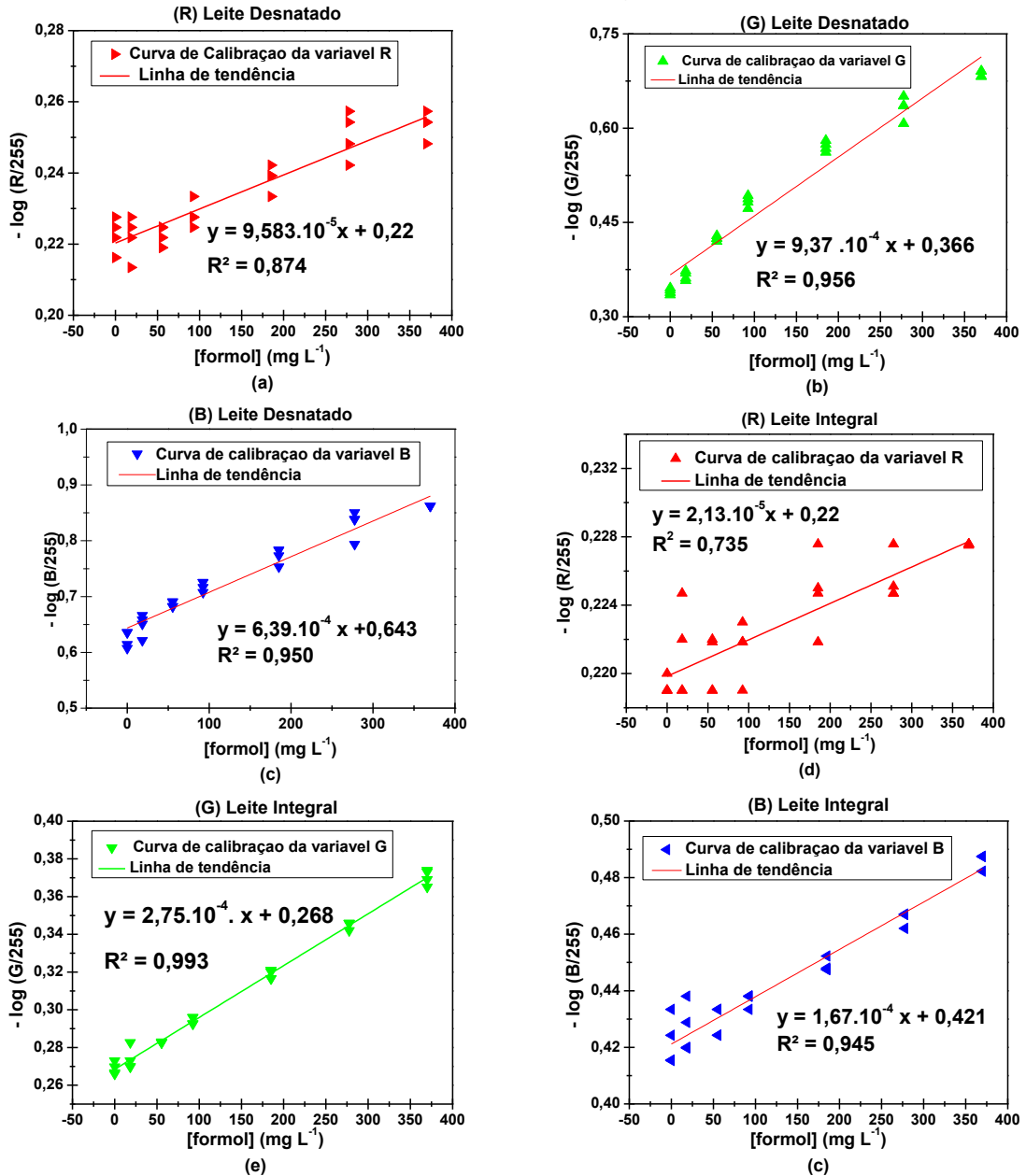
H	G	F	E	D	C	B	A	
s	s	s	s	s	s	s	s	1
0,0	s	0,0	s	0,0	s	0,0	s	2
18,5	p	18,5	p	18,5	p	18,5	p	3
55,5	s	55,5	s	55,5	s	55,5	s	4
92,5	R1	92,5	R1	92,5	R1	92,5	R1	5
185,0	s	185,0	s	185,0	s	185,0	s	6
277,5	R2	277,5	R2	277,5	R2	277,5	R2	7
370,0	s	370,0	s	370,0	s	370,0	s	8
s	R3	s	R3	s	R3	s	R3	9
s	s	s	s	s	s	s	s	10
s	s	s	s	s	s	s	s	11
s	s	s	s	s	s	s	s	12

s - poço vazio		p - precisão	
Rn - Recuperação			

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Primeiramente, foram feitas as análises univariadas independente (*R*, *G*, *B*), com objetivo de descobrir o nível de influência da cada variável sobre a cor obtida para cada tipo de leite, e assim calcular a sensibilidade que cada variável frente à coloração salmão (Figura 26). Logo, variaram-se todas variáveis independentes *R*, *G* e *B*, aplicando a regressão linear múltipla (RLM), com objetivo de minimizar os possíveis erros do sistema, como saturação de cor, sombras, espalhamento de luz, entre outras fontes de divergências (SANTOS, PEREIRA, 2012).

Figura 26. Gráficos das regressões univariadas independentes *R*, *G* e *B* de cada tipo de leite desnatado (a, b, c) e integral (e, f, g)



Curva analítica das regressões univariáveis do leite desnatado (a) variável *R*; (b) variável *G*; (c) variável *B*; e do leite integral (d) variável *R*; (e) variável *G*; (f) variável *B*.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

As curvas analíticas com os respectivos coeficientes das regressões univariadas (*R*, *G* e *B*) e multivariadas (*RGB*) estão apresentados resumidamente na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados das regressões lineares univariadas (*R*, *G* e *B*) e multivariadas (*RGB*) para as curvas de calibração empregando leite desnatado e integral

Leite	Variáveis	R^2	Equação
Desnatado	<i>R</i>	0,874	$y = 9,583 \times 10^{-5}x + 0,220$
	<i>G</i>	0,960	$y = 9,373 \times 10^{-4}x + 0,366$
	<i>B</i>	0,950	$y = 6,390 \times 10^{-4}x + 0,644$
	<i>RGB</i>	0,994	$y = -478,05 - 1256,49R + 4288,39G - 940,57B$
Integral	<i>R</i>	0,735	$y = 2,132 \times 10^{-5}x + 0,220$
	<i>G</i>	0,993	$y = 2,750 \times 10^{-4}x + 0,268$
	<i>B</i>	0,945	$y = 1,674 \times 10^{-4}x + 0,421$
	<i>RGB</i>	0,962	$y = -610,46 + 2393,64R + 1133,18G - 508,93B$

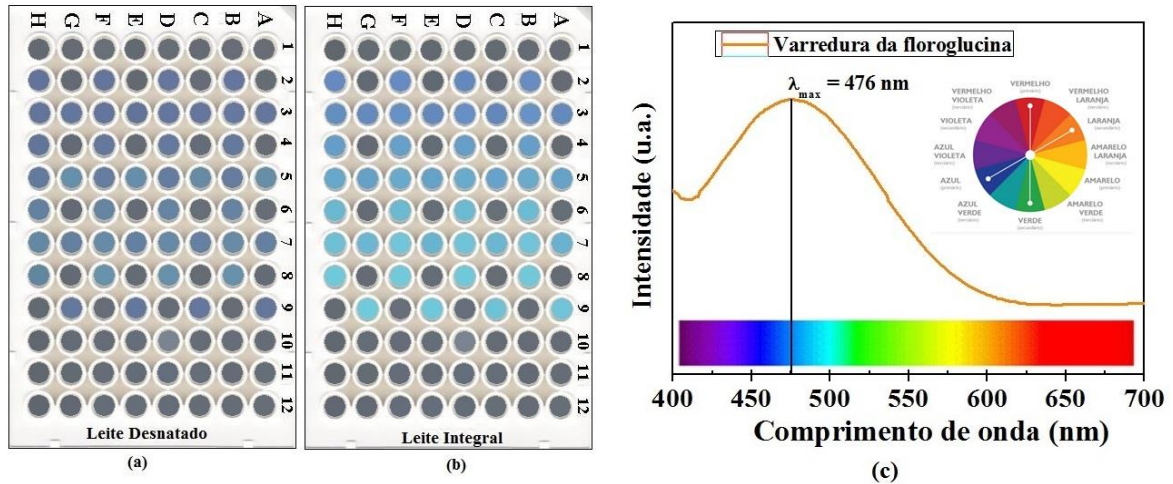
Cores primárias *R*: vermelho (*Red*); *G*: verde (*Green*); *B*: azul (*Blue*). R^2 : Coeficiente de determinação.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

A partir dos coeficientes das curvas independentes (*R*, *G* e *B*), observa-se que as regressões univariadas *G* e *B* são as que mais influenciam para ambos os tipos de leite, pois além dos maiores valores para R^2 , a coloração da derivatização (laranja-rosada/salmão) é complementar dessas variáveis, ocorrendo o oposto para a variável *R* que é próxima à cor refletida pela amostra. Como a variável *G* apresentam correlações um pouco superior que a variável *B*, e também melhores sensibilidades (inclinação da curva) em ambos os tipos de leite: $9,373 \times 10^{-4}$ para o desnatado e $2,750 \times 10^{-4}$ para o leite integral. Portanto, quem determinará os limites de detecção e quantificação para o sistema *RGB* será a variável *G* (verde).

Este fenômeno óptico, pode ser mais bem visualizado na Figura 27, pelas imagens digitais visualizadas na opção do *software* QuantColor de cores complementares para os leites desnatado (Fig. 27(a)) e integral (Fig. 27(b)), e pela varredura do composto intermediário **A** (formol-floroglucina) pela reação do leite em meio básico de NaOH (Fig. 27(c)).

Figura 27. Cores complementares para as imagens digitais do composto **A** (formol-floroglucina), formado a partir do leite com formol, floroglucina 1,0%(m/v) e NaOH 2,5 e 5,0%(v/v) das placas da Figura 25 (a) e (b) para os leites: (a) desnatado e (b) integral. (c) Varredura do composto intermediário **A** (formol-floroglucina)



Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Na análise multivariada (*RGB*) para o leite desnatado, com R^2 de 0,994, os coeficientes das variáveis são os que mais influenciam *R*- negativamente e *G*-positivamente, respectivamente, indicando que o modelo *RGB* é eficiente para a cor laranja-rosado (salmão). Uma vez que o leite desnatado torna-se quase transparente (por praticamente não conter gordura e ter menos proteínas), esta mistura derivatizada reflete facilmente sua cor complementar, que está na faixa do esverdeado (*G*) para o detector do *scanner*. Já para o leite integral, com R^2 de 0,962, os coeficientes que mais influenciam são as variáveis: *R* – positivamente e *B* – negativamente. Isto pode ser explicado pelo fato da refração ou dispersão da luz emitida pelo *scanner*, sobre as partículas brancas de gordura e/ou proteína, que fazem com que a cor salmão do derivatizante seja facilmente refletida pela cor branca, tendo uma influência negativa para sua cor complementar azul-esverdeado (*B*) (RUIZ, 2013).

Os limites de detecção (*LD*) e quantificação (*LQ*) foram determinados pelas equações Eq. (1) e Eq. (2), respectivamente, do item 3.4 do Capítulo 2, através dos coeficientes das curvas univariadas *R*, *G* e *B* (Figura 25), indicando que o método é capaz de quantificar amostras de leite com formol em baixos níveis de concentração na ordem de mg L^{-1} apresentados na Tabela 10, juntamente com sua Equações das curvas univariadas.

Tabela 10. Regressões lineares univariadas (*R*, *G* e *B*) e seus respectivos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os leites desnatado e integral

Leite	Variáveis	R ²	Equação	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Desnatado	<i>R</i>	0,874	$y = 9,583 \times 10^{-5}x + 0,220$	2,13	7,10
	<i>G</i>	0,960	$y = 9,373 \times 10^{-4}x + 0,366$	0,41	1,37
	<i>B</i>	0,950	$y = 6,390 \times 10^{-4}x + 0,644$	0,35	1,12
Integral	<i>R</i>	0,735	$y = 2,132 \times 10^{-5}x + 0,220$	14,20	47,34
	<i>G</i>	0,993	$y = 2,750 \times 10^{-4}x + 0,268$	4,90	16,29
	<i>B</i>	0,945	$y = 1,674 \times 10^{-4}x + 0,421$	0,33	1,18

Cores primárias *R*: vermelho (*Red*); *G*: verde (*Green*); *B*: azul (*Blue*). R²: Coeficiente de determinação. LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Os resultados da precisão (*p*) do método, para cada tipo de leite, foram determinados pela repetitividade de 4 amostras que sofreram a adição de padrão na concentração de 18,5 mg L⁻¹ de formol, de forma sucessiva pela leitura do *scanner* nos poços (Planejamento da Figura 25(a)) e estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11. Precisão do método proposto para detecção de formol em amostras de leite desnatado e integral, adicionadas de formol, analisadas pelo sistema proposto por imagens digitais capturadas via *scanner* aplicando regressão linear múltipla (*RGB*)

Leite	Precisão		[HCHO] adicionado (mg L ⁻¹)	[HCHO] encontrado (mg L ⁻¹) ±DP	DPR (%)
Desnatado	Repetitividade (<i>n</i> =4)	1° dia	18,5	17,82 ± 0,30	1,68
		2° dia	18,5	16,02 ± 0,55	3,43
	Intermediária (<i>n</i> =8)	inter-dia	18,5	17,13 ± 0,85	4,96
Integral	Repetitividade (<i>n</i> =4)	1° dia	18,5	16,85 ± 0,30	1,78
		2° dia	18,5	14,77 ± 0,77	5,22
	Intermediária (<i>n</i> =8)	inter-dia	18,5	15,81 ± 1,25	7,91

[HCHO]: concentração média do formol. DP: desvio padrão. DPR(%): desvio padrão relativo. Valor médio para precisão (repetitividade, *n*=4) e para precisão intermediária (*n*=8).

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

Observa-se que o método proposto mostrou-se preciso, considerando a repetitividade intra-dia para o leite desnatado e integral. O mesmo não ocorreu para a precisão intermediária, em nível de 5% de significância, sendo recomendável a construção da curva analítica todos os dias, principalmente para o leite integral, que

apresentou *DPR* maior entre os dias (7,91 %) e no dia (5,22 %), tornando-o ineficiente para uma quantificação confiável, embora este índice seja aceitável considerando a matriz ser biológica em um nível baixo de concentração (0,005 % de formol m/v). Entretanto, como trata-se de uma matriz complexa como o leite, é recomendável pela ANVISA, que crie a curva analítica com a própria amostra, sugerindo-se o levantamento de curvas com adição de padrões, uma vez que o efeito de matriz no leite é elevado (BRASIL, 2012).

A exatidão foi feita pela recuperação em 3 níveis (*R_n*) em quadruplicada para as amostras adicionadas de formol, calculadas pelo *software* QuantColor e apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Exatidão do método proposto para detecção de formol em leite desnatado e integral, adicionadas de formol em três níveis de concentração, analisadas pelo sistema proposto de imagens digitais capturadas via *scanner* (AID-*scanner*), aplicando regressão linear múltipla (*RGB*), expressas pelas taxas de recuperação

Leite	Níveis		[HCHO] adicionado (mg L ⁻¹)	[HCHO] encontrado (mg L ⁻¹) ±DP	Recuperação (%)
Desnatado	Exatidão (n=3)	<i>R</i> ₁	74,0	72,30 ± 4,51	97,70
		<i>R</i> ₂	148,0	147,83 ± 1,90	99,88
		<i>R</i> ₃	333,0	328,24 ± 9,59	98,57
Integral	Exatidão (n=3)	<i>R</i> ₁	74,0	69,25 ± 3,34	93,60
		<i>R</i> ₂	185,0	177,23 ± 4,75	95,80
		<i>R</i> ₃	333,0	344,10 ±17,10	103,33

[HCHO]: concentração média do formol. DP: desvio padrão; Valor médio para recuperação feita em triplicata (n=3) em três níveis de concentração de formol: baixa (*R*₁), média (*R*₂) e alta (*R*₃); para faixa de dinâmica de trabalho de 18,5 a 370 mg L⁻¹.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

O método foi considerado exato, uma vez que as taxas de recuperação variaram de 93,60 a 103,33 %, dentro dos limites aceitáveis pela ANVISA de 70 a 120%.

A estabilidade foi testada para uma amostra de leite tendo sido adicionado formol na concentração mediana de 185 mg L⁻¹, digitalizados na hora e depois de 48 h. O método não foi considerável estável após 48 h em condição ambiental, uma vez que os valores dos ensaios variaram acima de 5,0 % do valor inicial, resultado

esperado pela redução de coloração prevista pela cinética, convertendo do composto **A** (salmão) para incolor **B** (Fig. 22 e 23). Outras possibilidades são a degradação do formol pelas bactérias do próprio leite ou do ambiente, já que o formol é instável, facilmente degradado a ácido láctico (ADROER et al., 1990; SURUDA, 2003), ou sua volatilização, considerando que as amostras ficam expostas ao ambiente, uma vez que as microplacas são abertas.

5.3 COMPARATIVO DE EFICIÊNCIA DO MÉTODO PROPOSTO POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL (AID-SCANNER) NA DETERMINAÇÃO DE FORMOL EM LEITE CRU, UHT E PASTEURIZADO – INTEGRAL E DESNATADO, FRENTE À APLICAÇÃO DOS MÉTODOS OFICIAIS - ESPECTROFOTOMETRIA (UV-VIS) E CROMATOGRAFIA (HPLC-PDA)

Para comparação do desempenho do método *AID-scanner* proposto neste Capítulo 3 frente aos métodos recomendados como oficiais apresentados no Capítulo 2 (método IN 68/2006 ou UV-Vis e método HPLC-PDA) empregaram-se 10 amostras de leite, sendo duas de cada tipo (cru, UHT desnatado, UHT integral, pasteurizado desnatado e pasteurizado integral). Analisando essas 10 amostras de leite, não se detectou formol em nenhuma amostra empregando-se os três métodos: espectrofotometria (UV-Vis), cromatografia (HPLC-PDA) e análise por imagem digital (*AID-scanner*). Desta forma, a comparação foi feita adicionando-se formol em concentração mediana conhecida de 185 mg L^{-1} (equivalente a 0,050% (v/v)) nas 10 amostras, determinando-se as quantidades de formol pelos 3 métodos em triplicata. Com os teores das determinações de formol pelos 3 métodos, realizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de *Tukey* em nível de 5,0%, cujos resultados estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13. Comparativo de teores de formol determinados pelos 3 métodos - AID-scanner proposto adotando a regressão multivariada RGB e métodos oficiais de referência NIOSH – UV-Vis e HPLC-PDA em 10 amostras de leite bovino – 2 de cada tipo de leite adicionadas de formol (185 mg mL⁻¹) (n=3)

Tipo de leite	Método		
	UV-Vis	HPLC-PDA	AID-scanner
	<i>[HCOH]total ± DP (mg L⁻¹)</i>		
Cru	173,36 ^{a,A} ± 3,47	175,60 ^{a,A} ± 5,73	167,23 ^{b,A} ± 1,71
UHT desnatado	180,60 ^{a,A} ± 2,26	184,12 ^{a,A} ± 4,09	178,25 ^{a,A} ± 2,64
UHT integral	171,76 ^{a,A} ± 4,38	181,22 ^{a,A} ± 9,05	172,62 ^{a,b,A} ± 2,20
Pasteur. desnatado	180,00 ^{a,A} ± 6,32	180,20 ^{a,A} ± 3,79	179,33 ^{a,A} ± 4,01
Pasteur. integral	178,40 ^{a,A} ± 7,95	174,89 ^{a,A} ± 2,72	169,43 ^{b,A} ± 0,60

[HCOH]: Concentração média de formol (n=6); DP: desvio padrão; Leite Cru: “in-natura” retirado diretamente da vaca, sem tratamento industrial. UHT: leite longa vida submetido à ultra-alta temperatura comercializado em caixinha Tetra Pak. Pasteurizado: leite pasteurizado comercializado em saquinho plástico. Integral: mantém integralmente toda a gordura presente naturalmente no leite, apresentando um teor mínimo de 3% de gordura. Desnatado: teor reduzido de gordura por centrifugação, máximo de 0,5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna demonstram diferenças significativas pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha demonstram diferenças significativas pelo teste de Tukey em nível de 5%.

Fonte: Próprio autor - Laboratório DIA – UEL (2015).

A partir da análise de variância e teste de *Tukey* observou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para os resultados obtidos pelos 3 métodos UV-Vis, HPLC-PDA e o método proposto por análise de imagem digital (AID-scanner), indicada pela letra “A” maiúscula, que aparece nas mesmas linhas da Tabela 13. Já com relação aos tipos de leite, não houve diferença significativa em nível de 5,0% para os dois métodos de referência (UV-VIS e HPLC-PDA) e para as amostras de leite desnatado (UHT e pasteurizado) pelo AID-scanner, indicado pelas letras “a” minúsculas nas colunas da Tabela 13. Entretanto, observou-se diferença significativa ($p > 0,05$) indicada pelas letras “b” para as amostras de leite cru e integral (UHT e pasteurizado) pelo AID-scanner apresentando teores menores em relação aos quantificados pelos métodos de referência (UV-VIS e HPLC-PDA). Esta diferença é justificada pelo preparo da amostra com etapa de extração e limpeza do leite com acetonitrila, exigida pelos 2 métodos de referência (UV-VIS e HPLC-PDA), enquanto, o método de análise de imagem digital por scanner não passa por nenhum tipo de pré-tratamento de amostra, diferença percebida principalmente nas matrizes com mais gordura – cru e integral (UHT e pasteurizado).

Este fato indica que a análise por imagens digitais por scanner (AID-scanner), também apresenta potencial para quantificar gorduras, passível para detectar fraudes por reconstituintes, como apresentados nos trabalhos de SANTOS

et al. (2012) e SANTOS, PEREIRA (2013). Entretanto, se uma precisão de 5% for requerida, é possível se lançar mão da precipitação de gordura, o que conduziria a uma diferença não significativa.

6. CONCLUSÃO PARCIAL

O método *AID-scanner* mostrou-se simples, rápido e barato para controle de qualidade visando detectar adulterações por formol em diversos tipos de leite bovino, com resultados equivalentes para os leites desnatados, quando comparado aos métodos de referência oficiais (UV-Vis e HPLC-PDA), e teores pouco menores para o grupo dos que contém gordura (cru e integral). Como vantagens deste método destacam-se: o fato de não exigir pré-tratamento da amostra na etapa de extração e *clean-up*, apesar da matriz complexa do leite; a reação de derivatização ser imediata e seletiva, utilizando floroglucina com concentração de NaOH adequada, aplicável a qualquer tipo de leite; apresentar preparo rápido em minutos contra horas do método oficial IN 16/2008 apenas qualitativo, permitindo a análise simultânea quantitativa de formol em mais de 60 amostras, com 3 curvas analíticas, permitindo diferenciar o leite desnatado do integral.

Espera-se que o estudo possa contribuir para um monitoramento de rotina pelos analistas do controle de qualidade no recebimento do leite “*in natura*” nas indústrias e, para fiscalização dos produtos comerciais por órgãos fiscalizadores como o MAPA e a Vigilância Sanitária, garantindo o direito se o leite está livre de formol e apropriado para o consumo ao consumidor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método utilizando o sistema de determinação de formol por análise de imagens digitais empregando *scanner* (AID-*scanner*) proposto e validado neste trabalho se mostrou: sensível para a faixa comumente aplicada pelos fraudadores (0,005-0,100%); com limites de detecção e quantificação na ordem de miligramas por litro; linear; seletivo; preciso com menor dispersão; exato, com recuperação adequada em 3 níveis de concentração; quando comparado aos oficiais espectrofotométrico UV-Vis e cromatográfico (HPLC-PAD) considerados como métodos de referência também validados neste trabalho, porém permitindo efetuar análises simultâneas de até 68 amostras com 4 curvas de calibração de 7 pontos, sem a necessidade de pré-tratamento de amostra na extração e, tendo a derivatização imediata para os leites - cru, desnatado e integral - UHT e pasteurizado.

Sua praticidade e rapidez torna o método AID-*scanner* ideal para análise de um produto como o leite, complexo, altamente perecível, exigindo resultados rápidos para tomada de decisão, quanto ao aceite do leite cru pela indústria, tanto quanto para órgãos fiscalizadores, que podem fiscalizar os produtos comercializados, de forma fácil e com custo reduzido, considerando o *scanner* e os reagentes químicos. Portanto, o AID-*scanner* se mostrou a técnica mais adequada em rotina para controle de processo e produto para a determinação de formol em leite bovino, apresentando teores comparáveis para o leite desnatado e integral aos métodos recomendados como oficiais - espectroscopia UV-Vis e HPLC-PDA, apesar de apresentar diferença significativa nos teores em nível de 5% para os leites com maiores teores de gordura como o cru e o integral (UHT e pasteurizado). É possível, porém, fazer com que não haja esta diferença, se os leites cru e integral forem desengordurados com 1 mililitro de acetonitrila e filtrados em membrana de PTFE. Entretanto, é preciso avaliar se vale a pena o custo/benefício dos gastos com materiais e reagentes e, o tempo no pré-tratamento para desengordurar as amostras, pois seu uso da forma proposta apresenta patamares aceitáveis para triagem industrial, e ainda possibilita a distinção, considerando as diferentes porcentagens de gordura, entre os tipos de leite desnatado e, cru e integral, permitindo desse modo agregar o indicativo de uso de reconstituente proteico, como

mostrado em outros trabalhos, necessário quando há adição de água, uma das fraudes mais comuns.

Outra perspectiva interessante é que este método pode ser levado a campo, já que a análise pode ser feita com poucas adaptações, por qualquer instrumento capaz de captar imagens (celulares, *tablets* e câmera) disponibilizando a análise *in loco*, sendo uma ferramenta viável para a melhora da qualidade do leite, assegurando a ausência de formol, composto tóxico.

REFERÊNCIAS

- ACQUARO JR, V. R. ; MADEIRA, T. B. ; CASTILHO, D. C. ; WATANABE, L. S. ; BOVOLENTA, Y. R. ; NIXDORF, S. L. . Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação através de HPLC com índice de refração para lactose em leite pasteurizado. **Scientia Chromatographica**, v.5, p. 137-145, 2013.
- ANVISA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA avalia risco da presença de formol e ureia no leite. Informe técnico nº 53. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 1 dez. 2015.
- ANVISA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Escova progressiva, alisantes e formol. <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/alisantes/alisante_formol.htm> Publicação: 18 jul. 2005b. Acesso em: 6 jan. 2016.
- ALVES, C. A. ; ACIOLE, S. D. G. Formaldeído em Escolas: Uma Revisão. **Química Nova**. v.35, n.10, p.2025-2039, 2012.
- AGNESE, A. P. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.94, p.58-61, 2002.
- ATSDR** - Agency for Toxic Substances and Disease Registry; *Toxicological profile for formaldehyde*, ATSDR: Atlanta, 1999
- BANDEIRA, D. D.; MUNARETTO, J. S.; RIZZETTI, T. M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B.. Determination of pesticide residues in bovine milk using a modified QUECHERS method and GC-MS/MS. **Química Nova** (Impresso), v. 37, p. 900-907, 2014
- BARRIONUEVO, W. R.; LANCAS, F. M. . Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de Piretróides em água. **Química Nova** [online], v. 24, n.2, p. 172-175, 2001. ISSN 1678-7064. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000200003>
- BEN-NUN L. Breast-feeding: The roots. **Minerva Pediatr.** ; v 58(6), p. 551-556, 2006
- BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p.1-24.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos nºs.1255, de 25 de junho de 1962, n.1236, de 2 de setembro de 1994, n.1812, de 8 de fevereiro de 1996, n.2.244, de 4 de junho de 1997, nº 6.385, de 27 de Fevereiro de 2008, nº 7.216, de 17 de Junho 2010.Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem

Animal-RIISPOA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 set. 2002, p. 13, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006, p.8, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981. Cap.9, p.1: Sebo.

BORIN, A. ; FERRÃO, M. F. ; MELLO, C. ; CORDI, Livia ; PATACA, L. C. M. ; DURÁN, N. ; POPPI, R. J.. Quantification of lactobacillus in fermented milk by multivariate image analysis and least squares support vector machines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1105-1112, 2007.

BUCKLEY KE, FISHER LJ AND MACKAY VG. Levels of formaldehyde in milk, blood, and tissues of dairy cows and calves consuming formalin-treated whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 36, 1146–1150, 1988.

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 / Brazilian Journal of Animal Science**, v. 40, p. 2591-2596, 2011.

CASTILHO, S. D.; BARROS FILHO, A. A. . Alimentos utilizados ao longo da história para nutrir lactentes. **J. Pediatr. (Rio J.)** [online], v.86, n.3, p. 179-188, 2010. ISSN 0021-7557. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572010000300004>.

CASTILHO, S. D.; BARROS FILHO, A. A.; COCETTI, M. . Evolução histórica dos utensílios empregados para alimentar lactentes não amamentados. **Ciênc. saúde coletiva** [online]., vol.15, suppl.1, pp. 1401-1410, 2010. ISSN 1413-8123. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000700050>

CAVALETTI, L. C. S. **Resíduos de organoclorados, organofosforados e carbamatos em leite, água e alimentação animal**. 2008. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

COTSARIS E., NICHOLSON, B.C. . Low level determination of formaldehyde in water by high-performance liquid chromatography. **Analyst**. ;118:265–268,1993.

COLTRO, K. W. T.; GARCI, T.P.; JUNIOR, G.F.D.; SOUZA, F. R. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**. v.37, n.7, p.1171-1176, 2014.

DAR, A.; SHAFIQUE, U.; ANWAR, J.; ZAMAN, W.; NASEER, A. A simple spot test quantification method to determine formaldehyde in aqueous samples. **Journal of Saudi Chemical Society** [online]. 2012; doi:10.1016/j.jscs.2012.12.002

DIAS, J. C. **500 anos de leite no Brasil**. São Paulo: Calandra Editorial, 2006.

EMBRAPA GADO DE LEITE, Panorama do Leite – Ano 7, n.77 (jan./2016).

Disponível em:

<http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2016_01_PanoramaLeite.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2016.

FAGNANI, E.; MELIOS, C. B.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Desenvolvimento de método espectrofotométrico para análise de paraformaldeído em saneantes comerciais e industriais. **Eclet Quím** [internet]. vol. 27, 2002.

FAGNANI, E.; MELIOS, C. B.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Chromotropic acid - formaldehyde reaction in strongly acid aqueous media. The role of molecular oxygen. **Talanta** v.60,n.1, p.171-176, 2003,

FAGUNDES, C. M. **Inibidores e controle da qualidade do leite**. Pelotas: Editora Universitária/UFPEL, 1997. 126p.

FARIA, V. P. **Produção de leite: conceitos básicos**. 1a ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. p. 154.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 13 nov. 2015.

FELIPE, S. T. **Galactolatria: mau leite. Implicações éticas, ambientais e nutricionais do consumo de leite bovino**. São José: Ecoânima - Edição da Autora, p. 304, 2012.

FERRÃO, M. F. ; CARVALHO, C. W. ; MÜLLER, E. I. ; DAVANZO, C. U.. Determinação simultânea dos teores de cinzas e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP - Brasil, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.

FILHO, O. M.; NETO, H. V. **Processamento Digital de Imagens**, Brasport, p.330, 1999.

FIRMINO, C. F.; 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**. Minas Gerais, n. 376, p. 5-11, 2010.

FILDES, VA. *Breasts, bottles and babies: a history of infant feeding*. Edinburgh: Edinburgh University Press. p. 462, 1986

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Estratégias de controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314p.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos, 2000.

G1. **MP faz nova operação contra fraude no leite e prende suspeitos no RS**. 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2013/05/ministerio-publico-faz-nova-operacao-contradulteracao-do-leite-no-rs.html>> Acesso em: 29 nov. 2015.

G1. **Laboratório desenvolve método para flagrar adulteração de leite no RS**. 2014. Disponível em: <<http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/campo-e-lavoura/noticia/2014/05/laboratorio-desenvolve-metodo-para-flagrar-adulteracao-de-leite-no-rs.html>> Acesso em: 29 nov. 2015.

GASPARINI, F., WEINERT, P.L, LIMA, L. S., PEZZA, L., PEZZA, H. R.. A simple and green analytical method for the determination of formaldehyde. **J Braz Chem Soc.**;v19(8), p 1531-7, 2008.

GARRIDO, N.S. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p.141-146, 2001.

GEORGHIU, P. E., HO, C.K. . The chemistry of the chromotropic acid method for the analysis of formaldehyde. **Can J Chem**, v 67, p. 871–6, 1989.

GUIDO, E. S. et al. Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. v. 28; n.2; p. 303-312, 2010.

GODINHO, M. S.; Raquel O. PEREIRA, R.O.; RIBEIRO, K. O.; SCHIMIDT, F.; OLIVEIRA, A. E. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, 1485-1489, 2008.

GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. Estados Unidos da América, Pearsin, 2008.

GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E. **Processamento de Imagens Digitais**. 1ª. ed. Edgard Blücher, 1992. 509p.

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

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema de recuperação de informações – SIDRA. Homepage IBGE, Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 04 dez. 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema de recuperação de informações – SIDRA. Homepage IBGE, Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 04 dez. 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema de recuperação de informações – SIDRA. Homepage IBGE, Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Formol ou Formaldeído. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795>. Acesso em: 1 dez. 2015.

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

JEFREY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM & DENNEY. **Vogel Análise Química Quantitativa**, Rio de Janeiro, Guanabara, Koogan, 1992.

JELLIFFE, D. B., JELLIFFE, E. F.. Human milk in the modern world – psychosocial, nutritional, and economic significance. Oxford: **Oxford University Press**, p. 500, 1978.

KAMINSKI, J., ATWAL, A. S., MAHADEVAN, S.. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Formaldehyde in Milk, **Journal of Liquid Chromatography**, 16:2, 521-526, 1993. DOI: 10.1080/10826079308020929

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

KOLBERG, D. I. S.; PRESTA, M. A.; WICKERT, C.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. . Rapid and accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso), v. 20, p. 1220-1226, 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 3 ed. São Paulo: Ed. Sarvier. Cap3. p. 159-188, 1995.

LEITE JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M.; GELLI, D. S. Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000.

LEITE, Z. T.C.; Vaitsmanl, D. S.; Dutral, P. B.; GuedesII, A.; Milk and some of its derivatives: from antiquity to the present time. **Quím. Nova.**, São Paulo, v. 29, n. 4, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>. Acesso em: 26 Jan 2016.

LI, Z.; MA, H. ; LU, H. ; TAO, G. Determination of formaldehyde in foodstuffs by flow injection spectrophotometry using phloroglucin as chromogenic agent, **Talanta**. v.74, p. 788-792, 2008.

LISBOA, J. C. F.; BOSSOLANI, M. **Tipos de Leite, Substâncias Estranhas e Obtenção de Plástico**, QUÍMICA NOVA NA ESCOLA - Experiências Lácteas N° 6, 1997. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/exper1.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2015.

LICHTENSTEIN, Arnaldo & Grupo de estudos para o uso racional do laboratório clínico do hospital das clinicas da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo et al. Vitamina D: ações extra ósseas e uso racional. **Rev. Assoc. Med. Bras.** [online]. v.59, n.5, p.495-506, 2013. ISSN 0104-230. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ramb.2013.05.002>.

LOPES, L.C. **Controle metrológico da cor aplicado à estamperia digital de materiais têxteis**. 2009.142f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2009

LOPES, M. A.; DIAS, A. S. M. de; CARVALHO, F.; LIMA, A. L. R.; GHEDINI, M.; CARMO, E. A. do. Resultados econômicos de sistemas de produção de leite com diferentes níveis tecnológicos na região de lavras MG nos anos 2004 e 2005. **Ciência Agrotecnologia Lavras**, Lavras, v. 33, n. 1, p.252- 260, 2009.

LIU, J., PENG, J., CHI, Y, JIANG, G. . Determination of Formaldehyde in Shiitake Mushroom by Ionic Liquid-Based Liquid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography, **Talanta**, v. 65, p. 705-709, 2005.

LYRA, W.S., SANTOS, V.B., DIONÍZIO A.G.G., MARTINS, V.L., ALMEIDA, L.F., GAIÃO, E.N., DINIZ P.H.G.D., SILVA, E.C., ARAÚJO, M.C.U. Digital image-based flame emission spectrometry. **Talanta**. v.77, n.37, p.1584–1589, 2009.

MACHADO, A. M. L. **Extração automática de contornos de edificações utilizando imagem gerada por câmara digital de pequeno formato e dados LIDAR**. 2006. 190f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

MARTINS, P. R. G.; SILVA, C. A. da; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W.; ZANELA, M. B. Produção e qualidade do leite em sistemas de produção da região leiteira de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 212-217, 2007.

MARTINS, M. L.; DONATO, F. F.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. . Determination of pesticide residues and related compounds in water and industrial effluent by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple

quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** (Print), v. 405, p. 7697-7709, 2013.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. . Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações . **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 29-45, 2012.

MILKPOINT. Padrões mínimos de qualidade do leite: é necessária uma nova revisão da IN 62? Disponível em:

<http://www.milkpoint.com.br/mypoint/6239/p_padroes_minimos_de_qualidade_do_leite_e_necessaria_uma_nova_revisao_da_in_62_5597.aspx. Acesso em: 21 jan. 2016.

MIDDLETON, C., editor. **A aurora da humanidade**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Abril Livros Ltda; 1993.

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

MORFORD M.P.O.; LENARDON, R.J. **Classical Mythology**. 7th ed. New York: Oxford University Press; 2003.

MUNIZ, L.C., MADRUGA, S.W., ARAÚJO, C.L. Consumption of dairy products by adults and the elderly in the south of Brazil: a population-based study. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v.18, p.3515–3522, 2013.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. NIOSH manual of analytical methods (NMAN): method 2541 (2) – Formaldehyde, 4th.ed. 2003a.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. NIOSH manual of analytical methods (NMAN): method 2016 (2) – Formaldehyde, 4th.ed. 2003b.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. NIOSH manual of analytical methods (NMAN): method 3500(2) – Formaldehyde, 4th.ed. 2003c.

NÓBREGA, J. A.; TREVIZAN, L.C.; GOMES, M. S.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v.31, n.6, p.1577-1581, 2008.

OLIVEIRA, L. F. **Uso de imagens digitais e ferramentas quimiométricas para identificação e determinação de Cr (VI) em solos contaminados**. 2012. 72 f. Tese de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2012.

OLIVEIRA, L.C.M. Contribuições para melhoria do desempenho e viabilidade de fabricação de scanners indutivos. 2006. 250 fls. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

OLIVEIRA, M. C. **MPF/MG: Operação ouro branco desarticula organizações criminosas que adulteravam leite**. 2009. Disponível em: <<http://www.pgr.mpf.gov.br/noticias/noticias-dosite/criminal/operacao-ouro-branco-desarticulaorganizacaoescriminosas-que-adulteravam-leitenos-municipios-mineiros-de-uberaba-e-passos/>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

OSHA. Occupational Safety & Health Administration - Sampling and Analytical Methods - Determination of the Sampling Rate Variation for Supelco, Inc. DSD-DNPH Diffusive Sampler for Aldehydes. Disponível em: <<https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/studies/srvsupelco/srvsupelco.html>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

PARRÉ, J. L.; BÁNKUTI, S. M. S.; ZANMARIA, N. A. Perfil socioeconômico de produtores de leite da região Sudoeste do Paraná: Um estudo a partir de diferentes níveis de produtividade. **Revista de Economia e Agronegócio**, Viçosa, v.9, n.2, p.275-300, 28 out. 2011.

PASQUINI, C.. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n.2, 198-219, 2003.

PAULILO, **Leite: produção familiar, mercado e saúde pública**. 2001. Disponível em: <<http://nafa.paginas.ufsc.br/files/2010/08/Leite-prod.pdf>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

PETROBRAS. Ureia pecuária Petrobrás: informações técnicas. Rio de Janeiro: Petrobrás, 23p. 1998.

PIEROTTI, D. . Analysis of trace oxygenated hydrocarbons in the environment. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v.10, n.4, p. 373-382, 1990.

PIVELI, R. P. Fundamentos de química coloidal e de eletroquímica aplicados aos estudos de controle da qualidade das águas. 2014. Disponível em: <200.144.189.97/phd/LeArq.aspx?id_arq=729> Acesso em: 21 out. 2015.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; DELBEM, A.C. B.; LARA, J. A. F.de; PERRI, S. H. V. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais riscos de correntes de seu consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.86, p.86, 2001.

PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova** (Impresso), v.36, p.697-710, 2013.

RUIZ, R. M. Determinação de polifenóis totais em vinhos pelo método folin-ciocalteu através da análise de imagens digitais por scanner. 2013. 72 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Química Bacharelado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SANTOS, P. M. Aplicação de imagens digitais e técnicas espectro analíticas combinadas com quimiometria para a detecção e quantificação de adulteração em leite bovino. **Tese de Doutorado**. USP-São Carlos – SP, 2013.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R. . Digital image analysis - an alternative tool for monitoring milk authenticity. **Analytical Methods**, v. 5, n. 15, 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, n. 1, p. 89-95, 2012.

SCHUMAN, A. J. . A concise history of infant formula (twist and turns included). **Contemp Padiatr.**; 20, p. 91-103, 2003.

SABIN, G. P.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso), v.20, p.918-925, 2009.

SCURI, A. E. Fundamentos da Imagem Digital. **Tecgraf**, Rio de Janeiro, 2002. Disponível

em:<<http://www.tecgraf.pucRio.br/ortoledo/teaching/cg1/apostila%20imagem%20digital>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

SILVA, L.C.C. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado**. 2013. 83 f. Teses de Doutorado em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

SILVA, P. H. F. “Leite: aspectos de composição e propriedades”. **Química Nova na Escola**, v.6, p.3, 1997.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Do autor: Juiz de Fora, 2004.128p.

SIQUEIRA, K. B.; CARNEIRO, A. V.; ALMEIDA, M. F.; SOUZA R. C. S. N. P. O. (2013). Mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/industria-leiteira/artigos/mercado-lacteo-brasileiro-contexto-t1392/472-p0.htm>>. Acesso em: 7 mai. 2015.

SMITH, G. S.. Human color vision and the unsaturated blue color of the daytime sky. **American Journal of Physics**, v.73, p.590–597, 2005.

SOMAN, A.; QIU, Y.; CHAN LI, Q. HPLC–UV Method Development and Validation for the Determination of Low Level Formaldehyde in a Drug Substance. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 461-465, 2008.

SOUZA, D. C. de. Determinação de formol em leite por imagens digitais empregando *scanner*. 2014. 58 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Química Bacharelado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

SOUZA, S., CRUZ, A., WALTER, E., FARIA, J., CELEGHINI, R., FERREIRA, M., GRANATO, D., & SANT'ANA, A. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, 124, 692-695, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.074>

TAMANINI, R. **Controle de qualidade do leite UHT**. 2012. 128 f. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

TEIXEIRA, S.R. **Pagamento pela Qualidade**. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. A *Qualidade do Leite*. EMBRAPA/TORTUGA, p.51-58, 1998.

TIMM, C. D. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em micro usinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.106, p.100-104, 2003.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206p.

VEJA - Leite com formol, soda cáustica e água oxigenada foi vendido em SP. 2014. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/economia/leite-com-formol-soda-caustica-e-agua-oxigenada-foi-vendido-em-sp>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

VELIKONJA, S., JARC, I., KRALJ, L.Z. AND MARSEL, J. . Comparison of gas chromatographic and spectrophotometric techniques for the determination of formaldehyde in water. **Journal of Chromatographia A**. v.704, p. 449-454, 1995.

XU, L. N., GAI, F. Y., MU, G. F., GAO, Y., LIU, H. T., LUAN, F. . Determination of formaldehyde in aquatic products by micellar electrokinetic capillary chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization **Acta Chromatographica**, v. 24, p. 519-528, 2012.

WANG, L., ZHOU ,C., CHEN, H.Q., CHEN, J. G., FU, J., LING, B., Determination of formaldehyde in aqueous solutions by a novel fluorescence energy transfer system. **The Analyst**, v.135, p.2139, 2010.

WANG, S.; ZHAO, X.; KHIMJI, I.; AKBAS, R.; QIU, W.; EDWARDS, D.; CRAMER, D. W.; Ye, B.; DEMIRCI, U.; Integration of cell phone imaging with microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care. **Journal Lab Chip**, v.11, p.3371, 2011.

ZAFALON, L. F.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; OLIVEIRA, P. P. A. Melhoria da qualidade do leite em propriedade leiteira: uma abordagem inicial. (2011). Disponível

em: <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/administracao/artigos/melhoria-qualidade-leite-propriedade-t585/124-p0.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

ZH. **Exame passa a detectar formol em 24 horas**. 2013. Disponível em: <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticias/economia/noticia/2013/08/exame-passa-a-detectar-formol-em-24-horas-4233485.html>> Acesso em: 29 nov. 2015.

ZHANG, Z. Q., ZHANG, H., HE, G. F. Preconcentration with membrane cell and adsorptive polarographic determination of formaldehyde in air. **Talanta**. v.57, n.2, p.317-22, 2002.

ZHAO, C., LI, M., JIAO, K. . Determination of formaldehyde by staircase voltammetry based on its electrocatalytic oxidation at a nickel electrode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 61, p.1204-1208, 2006.

ZHEN, Y., WANG, S. E., XIAO, W., YUAN, H., XIAO, D. . A fluorescent dosimeter for formaldehyde determination using the Nash reagent in silica gel beads. **Microchimica Acta**, v.159, p.305-310, 2007.