UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANNA FLAVIA DE SOUZA SILVA

Metodologias analíticas alternativas para a avaliação de autenticidade de alimentos explorando análises hiperespectrais e fotometria por imagens digitais

Piracicaba
2021

ANNA FLAVIA DE SOUZA SILVA

Metodologias analíticas alternativas para a avaliação de autenticidade de alimentos explorando análises hiperespectrais e fotometria por imagens digitais

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

PIRACICABA

2021

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Anna Flavia de Souza

Metodologias analíticas alternativas para a avaliação de autenticidade de alimentos explorando análises hiperespectrais e fotometria por imagens digitais / Anna Flavia de Souza Silva; Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.
190 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2021.

1. Adulteração de alimentos 2. Análise espectral 3. Análise fotométrica 4. Canela 5. Contaminação de alimentos 6. Leite 7. Segurança dos alimentos I. Título

CDU (543.42 : 614.31)

Elaborada por:
Marilia Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631
Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

A todos aqueles que Deus colocou em meu caminho e
que me incentivaram e me encorajaram ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por me conceder saúde, paciência e coragem para enfrentar os desafios ao longo da minha caminhada.

Aos meus pais e irmã pelo carinho, cuidado e aprendizado ao longo da vida. Aos meus avós pelo carinho de uma vida todo e, embora não mais estejam presentes neste mundo, estas lembranças me ajudam a ter força para enfrentar os desafios da vida.

Ao meu orientador, Professor Fábio, pela oportunidade de confiar em mim e no meu trabalho, pelos incentivos, aprendizados e paciência ao longo destes anos.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa LEMA pelo acolhimento (principalmente ao Milton, Pedro, Sol e Samara) quando ingressei no grupo de pesquisa. Aos colegas atuais de grupo (Bianca, Ernesto, Isabela, Luís, Natália, Raíssa, Rita, Samara, Eduardo, Prof. Alex e Prof. Fábio) pelo aprendizado e pela boa convivência. Dedico um agradecimento especial aos estagiários, que se tornaram meus amigos, e se dedicaram ao longo dos últimos 2 anos para colaborar com este trabalho. Muito obrigada Isabela, Bianca e Luís!

Aos membros da Química Analítica do CENA pela boa convivência e pela possibilidade de um enorme aprendizado ao longo do tempo. Um agradecimento especial ao Prof. Francisco José Krug, Prof. Boaventura Freire dos Reis, Dr.ª Lidiane Nunes e Dr.ª Tuanne Reis pelo incentivo e contribuições com minha formação, ao longo destes anos. Às técnicas Sheila, Fátima e Liz e à secretária Cláudia por toda a ajuda, apoio, carinho, colaboração, e torcida para conquista dos meus objetivos.

Ao CENA por oferecer infraestrutura, pelos Professores do Programa e aos funcionários, antigos e atuais, da secretaria de pós-graduação (Gilson, Cleide, Marcos e Magali) por toda a atenção e auxílio prestado. À Marília Henyei pela colaboração com a revisão desta tese.

À Prof.ª Wanessa Mattos pelo incentivo e confiança no meu trabalho, permitindo a realização do meu estágio PAE obrigatório, logo no início do meu doutorado. Estendo os cumprimentos à 17ª turma de Ciências dos Alimentos pelo aprendizado na prática docente.

À Clínica do Leite (Piracicaba, SP) e ao Prof. Paulo Machado e Cristiane Oliveira por contribuírem com as análises de leite pelo procedimento de referência (NIR).

Ao Prof. Severino Alencar e à Dra. Adna Massarioli pela colaboração com as análises cromatográficas para determinação de formaldeído em leite.

À CAPES - Código de Financiamento 001, pela bolsa de doutorado concedida, pela bolsa de estágio PAE (2º semestre/2017) e pela bolsa pelo Programa PrInt (88887.371000/2019-00) que me permitiu a oportunidade de realizar um dos meus sonhos.

À Professora Saskia van Ruth pela oportunidade de realizar o meu estágio sanduíche na Universidade de Wageningen e por poder conduzir parte das minhas pesquisas no RIKILT (Wageningen, Holanda). Agradeço, também, à Dra. Sara Erasmus pela supervisão e atenção. Agradeço aos técnicos do RIKILT, principalmente, à Linda, e aos técnicos do FQD Frans, Mike, Xandra, Erick e Charlotte pelos treinamentos, colaboração e auxílio prestado.

Às secretárias Corine van Huen e Kimberley Boss por toda a ajuda e organização para minha viagem para a Holanda e recepção na Universidade de Wageningen. Aos colegas do grupo FQD pela acolhida calorosa, principalmente àqueles da divertida sala Y 1006 (Adrijana, Ornella, Onu, Alim, Mohammed, Luigi, Susanna, Marianna, Lucía e Fiametta). Ao Prof. Vincenzo Fogliano pela oportunidade de participar ativamente do seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Gerit Polder e ao Dr. Joseph Peller pela disponibilidade e auxílio para utilização das instalações do laboratório TUPOLA (*Plant Science*, Universidade de Wageningen) e pela autorização em utilizar gratuitamente o *software* perClass Mira.

Ao Expat Center Food Valley, especialmente à minha assessora Leonieke Klumpes pela ajuda com todos os trâmites antes, durante e após a minha chegada aos Países Baixos. Ao governo dos Países Baixos pelo suporte e autorização da minha permanência no país, em meio ao início da pandemia, até ser possível voltar ao Brasil com mais segurança.

À família Janse (principalmente ao Jonathan e aos seus pais, Anneke e Mart) pela minha acolhida em sua casa e família, principalmente, nos momentos de início da pandemia. Agradeço ao carinho, a atenção e pela apresentação da cultura holandesa.

Aos meus amigos (principalmente a Natasha, Bruno, Diogo, Érica, Rafaela, Cristiane, Maria Paula e Mariana), Professores e colegas de profissão pelo incentivo para realização deste trabalho.

À Prof.ª Sílvia Molina por me ajudar a descobrir uma força que nem sabia que tinha.

À equipe de assuntos regulatórios da Kerry do Brasil, principalmente à minha gerente (Isabel Martin) e gestora (Daniela Macedo), pela oportunidade de aprender e de poder aplicar “no mundo real” conhecimentos que adquiri ao longo desses anos de doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

“É bom amar tanto quanto se pode, pois aí reside a verdadeira força. Quem muito ama, muito faz e de muito é capaz, e aquilo que se faz com amor é bem feito.”

“Não tenha dúvidas que o caminho para o sucesso é manter a coragem, a paciência e continuar trabalhando duro.”

Vincent van Gogh

RESUMO

SILVA, A. F. S. **Metodologias analíticas alternativas para a avaliação de autenticidade de alimentos explorando análises hiperespectrais e fotometria por imagens digitais**. 2021. 190 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

Atualmente, há uma grande demanda no setor de alimentos por novos procedimentos analíticos, uma vez que o setor passa por uma grande transformação. Esta tese tem por objetivo o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos limpos para a avaliação de autenticidade, conformidade e qualidade de leite e canela. Os procedimentos propostos objetivaram: (i) Determinação de proteínas, formaldeído e pH em leite utilizando fotometria por imagens digitais adquiridas com a câmera de um *smartphone* e conversão destas em sinais analíticos, utilizando canais do sistema RGB; (ii) Determinação simultânea de proteínas e gorduras em leite explorando o efeito caotrópico do etanol e sua habilidade de extração de gorduras do leite; (iii) Diferenciação de canela e cássia utilizando imagens hiperespectrais associadas a *software* de reconhecimento de padrões; (iv) Diferenciação de canela e cássia com base na composição mineral determinada por ICP OES. Os procedimentos baseados em imagens digitais e o proposto para a determinação simultânea de proteínas e gorduras atingiram precisão na ordem de 2%, baixos limites de detecção, preparo de amostra simples, baixo consumo de reagentes e baixa geração de resíduos, com resultados concordantes com os procedimentos de referência (NIR e HPLC-UV). O procedimento baseado em imagens hiperespectrais permitiu identificar 12 padrões de cor predominantes nas amostras comerciais e uma banda de absorção de radiação associada à celulose em amostras de canela. Amostras de canela apresentaram maiores teores de Mg e Mn, elemento associado à clorofila, enquanto amostras de cássia apresentaram maior teor de Ca que, em *Cinnamomum* sp., possui relação com o teor de amido do vegetal. Foi possível identificar que amostras de canela em pó apresentavam perfil semelhante às amostras de cássia em pó, o que confirma relatos de adulteração do produto. Além disso, foi possível identificar que amostras de canela e cássia apresentam composição comparável quanto a Zn, K, P e S.

Palavras-chave: Fraude em alimentos. Segurança de alimentos. Leite. Canela.

ABSTRACT

SILVA, A. F. S. **Analytical alternative procedures based on digital and hyperspectral images aiming to evaluate food authenticity**. 2021. 190 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

Currently, there is an increasing demand in the food sector for new analytical procedures due to the high transformation the sector undergoes. This thesis aims to develop new green analytical procedures to assess the authenticity, conformity, and quality of milk and cinnamon. The proposed procedures aimed at: (i) Determination of proteins, formaldehyde, and pH in milk using smartphone-based digital images followed by their conversion into analytical signals by using the RGB color system; (ii) Simultaneous determination of proteins and fats in milk exploiting the chaotropic effect of ethanol and its ability to extract milk fatty acids; (iii) Differentiation of cinnamon and cassia samples based on hyperspectral images associated to a *software* of pattern recognition; (iv) Differentiation of cinnamon and cassia based on the mineral composition determined by ICP OES. The procedures based on digital images and that based on simultaneous determination of protein and fat achieved accuracy of 2%, low limits of detection, simple sample preparation, low consumption of reagents and waste generation, with results in agreement with the reference procedures (NIR and HPLC-UV). The procedure based on hyperspectral images allowed the identification of 12 predominant color patterns in commercial and cinnamon samples and an absorption band associated to cellulose. Cinnamon samples had a higher concentration of Mg and Mn, elements associated with chlorophyll, while cassia samples had a higher content of Ca, which is related to the starch content in *Cinnamomum* sp. It was possible to identify that cinnamon powder had a similar pattern of minerals than cassia powder, what can state the possible practice of tampering in these products. Furthermore, it was possible to identify that cinnamon and cassia samples have a comparable composition in terms of Zn, K, P, and S.

Keywords: Food fraud. Food Safety. Milk. Cinnamon.

SUMÁRIO

1. Introdução 19

2. Procedimento para a detecção de adulteração em leite com base na determinação de proteínas por colorimetria com imagens digitais 23

2.1. Introdução 25

2.2. Materiais e Métodos 28

2.2.1. Amostras e soluções 28

2.2.2. Instrumentação 29

2.2.3. Procedimento 30

2.3. Resultados e Discussão 32

2.3.1. Aspectos gerais 32

2.3.2. Otimização do procedimento 36

2.3.3. Características analíticas 39

2.4. Aplicações 42

2.4.1. Classificação de amostras de leite 42

2.4.2. Determinação quantitativa de proteínas 43

2.5. Conclusão 44

3. Nova estratégia para a determinação de formaldeído em leite explorando imagens digitais adquiridas com smartphone 47

3.1. Introdução 49

3.2. Materiais e Métodos 52

3.2.1. Reagentes, soluções e amostras 52

3.2.2. Equipamentos e acessórios 53

3.2.3. Procedimento proposto 54

3.2.4. Procedimento de referência 55

3.3. Resultados e Discussão 56

3.3.1. Aspectos gerais 56

3.3.2. Precipitação de proteínas 58

3.3.3. Derivação química 60

3.3.4. Características analíticas e aplicação 62

3.4. Conclusão 67

4. Alternativa analítica para a triagem de amostras de leite bovino a partir da determinação simultânea de proteína e gordura 69

4.1. Introdução 71

4.2. Materiais e Métodos 74

4.2.1. Determinação de gordura 75

4.2.2. Determinação de proteína 75

4.2.3. Procedimentos de referência 76

4.2.4. Cartas de controle 78

4.3. Resultados e Discussão 80

4.3.1. Aspectos gerais 80

4.3.2. Determinação de gorduras 84

4.3.3. Determinação de proteínas 88

4.5. Conclusão 91

5. Procedimento analítico para predição da qualidade microbiológica de leite explorando determinação de pH por fotometria por imagens digitais 93

5.1. Introdução 95

5.2. Materiais e Métodos 99

5.2.1. Amostras e soluções 99

5.2.2. Instrumentação 99

5.2.3. Procedimento proposto 100

5.2.4. Procedimento de referência 102

5.3. Resultados e Discussão 103

5.3.1. Aspectos gerais 103

5.3.2. Otimização do procedimento analítico 108

5.3.3. Características analíticas 111

5.3.4. Determinação quantitativa de pH 113

5.3.5. Screening de amostras de leite baseado no pH 114

5.4. Conclusão 117

6. Diferenciação de amostras de canela e cássia utilizando imagens hiperespectrais 123

6.1. Introdução 125

6.2. Materiais e métodos 128

6.2.2. Amostras 131

6.2.3. Tratamento de dados hiperespectrais 135

6.3. Resultados e Discussão 135

6.3.1. Caracterização das amostras baseadas na cor 135

6.3.2. Perfil hiperespectral das amostras: tendências observadas 139

6.4. Conclusões e perspectivas futuras 146

7. Explorando o potencial do perfil mineral para diferenciação de amostras comerciais de canela. 147

7.1. Introdução 149

7.2. Materiais e métodos 152

7.2.1. Amostras e soluções 152

7.2.2. Instrumentação 153

7.2.3. Análises estatísticas 155

7.3. Resultados e Discussão 155

7.3.1 Determinação elementar 155

7.3.2 Características das amostras: tendências observadas 162

7.4 Conclusão 168

8. Conclusão Geral 171

1. Introdução

A análise de alimentos é uma área multidisciplinar e que integra conceitos e práticas das Ciências dos Alimentos e Química Analítica, orientados ao atendimento de diferentes necessidades, que podem ser provenientes das indústrias (como suporte para as áreas de qualidade e pesquisa, desenvolvimento e inovação); dos órgãos regulatórios de alimentos e bebidas (instrumento de prova legal para identificações de irregularidades ou fornecendo dados para embasamento de normativas legais) e de pesquisas científicas básicas ou aplicadas (DAMODARAN; PARK, 2017).

Recentemente, a separação entre estas duas Ciências têm se tornado menos evidente e dois fatores determinantes podem ser apontados. O primeiro deles é a integração global das cadeias de produção, o que promove conexão entre diferentes regiões, mas traz como principal desafio o aumento da complexidade das cadeias produtoras de alimentos, em razão da segmentação da produção dos alimentos e bebidas em todo o mundo (SILVIS et al., 2017; van RUTH et al., 2018). Outro fator é a necessidade de rastreabilidade dos agentes envolvidos, assim como a necessidade do estabelecimento de políticas públicas para garantir a autenticidade e segurança sanitária dos alimentos (ESTEKI; REGUEIRO; SIMAL-GÁNDARA, 2019; SCHAARSCHMIDT, 2016; van RUTH et al., 2018). A pandemia de Sars-CoV-2 representou um momento disruptivo na cadeia global de alimentos, evidenciando as suas vulnerabilidades (CREW, 2020). Neste sentido, aquelas relacionadas às fraudes de alimentos foram as mais perceptíveis, reforçando a necessidade do desenho de estratégias globais mais eficientes para mitigação destas más práticas (CREW, 2020; REJEB et al., 2020).

As fraudes em alimentos são práticas antigas em diversas sociedades. A discussão a respeito é extensa e complexa, haja vista que incorre em diferentes âmbitos, por exemplo, jurídico, ético, antropológico e técnico. Inicialmente, as fraudes eram motivadas pela possibilidade de retorno econômico (ATKINS, 1991; CREW, 2020; MOORE; SPINK; LIPP, 2012). A Revolução Industrial trouxe a prática adicional do mascaramento de condições higiênico-sanitárias inapropriadas nos alimentos (ATKINS, 1991; CREW, 2020). A descentralização entre região produtora e consumidora dos alimentos, assim como o aumento da distância física entre elas,

favoreceu tanto o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos, quanto a possibilidade de sofisticação das fraudes, tornando a identificação um problema mais complexo (ATKINS, 1991; SILVIS et al., 2017; McGRATH et al., 2018). Ainda durante a Revolução Industrial foram desenvolvidos muitos procedimentos para a identificação destas práticas, sendo boa parte deles simples e de fácil execução (ATKINS, 1991; WHEELER, 1905). Hoje, boa parte destes procedimentos se tornaram métodos de referência, ou então, são utilizados para avaliação da conformidade dos alimentos, em relação aos parâmetros que determinam sua qualidade (ATKINS, 1991; DAMODARAN; PARK, 2017).

Há uma grande demanda na área de alimentos por propostas analíticas que possibilitem uma resposta rápida, que sejam portáteis, de fácil execução e compatíveis com a digitalização pela qual o setor vem passando (McGRATH et al., 2018). Além de proporcionar tomadas de decisão mais ágeis e corretas, a digitalização das indústrias permite a integração das informações analíticas às plataformas digitais de compartilhamento de dados, sobretudo as descentralizadas, como o *blockchain* (McGRATH et al., 2018; REJEB et al., 2020; WANG et al., 2020). A principal vantagem desta integração é a possibilidade de uma política de rastreabilidade mais eficiente, menos onerosa e que permite uma conexão mais profunda entre todos os elos envolvidos nas cadeias de alimentos (REJEB et al., 2020; WANG et al., 2020).

Embora ainda haja um longo caminho para a constituição e ampla aplicação prática das novas tecnologias na área de alimentos, muito já tem sido desenvolvido, sobretudo, em relação aos procedimentos analíticos (McGRATH et al., 2018; MENOR-GARCÍA, 2021). Diante desta nova ótica, esses são ferramentas essenciais para a aquisição de dados e definições de estratégias. Assim, métodos baseados em imagens, que podem fornecer informações químicas dos alimentos, tornam-se grandes alvos de demanda (McGRATH et al., 2018; MENOR-GARCÍA, 2021; OLIVEIRA; CRUZ-TIRADO; BARBIN, 2019). Diversas técnicas espectroscópicas são elegíveis para esta finalidade, como por exemplo: espectroscopia no infravermelho próximo, imageamento fotométrico, imageamento hiperespectral e espectroscopia Raman (OLIVEIRA; CRUZ-TIRADO; BARBIN, 2019). Cada uma destas técnicas espectroscópicas apresenta características analíticas que podem torná-las mais ou menos apropriadas para diferentes amostras ou aplicações. Apesar da necessidade de alguns desenvolvimentos, as técnicas de imageamento representam uma grande vantagem sob o ponto de vista de rotina industrial (McGRATH et al., 2018; OLIVEIRA;

CRUZ-TIRADO; BARBIN, 2019). Quando integradas a sistemas de aprendizado de máquina (*machine learning*) estas técnicas podem, por exemplo, ser úteis para o reconhecimento de padrões, possibilitando a triagem e classificação de matérias-primas, produtos acabados ou ingredientes, em relação ao grau de conformidade ao processo a que são submetidos, ou ao padrão esperado e regulamentado em legislação (MENOR-GARCÍA, 2021; SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021). Com isso, o controle de processos pode ser facilitado e tornar-se mais frequente e mais eficiente (MENOR-GARCÍA, 2021).

Com os desenvolvimentos recentes, a análise de alimentos tem expandido suas áreas de atuação e encontrado na tecnologia uma possibilidade de inovação e ampliação de seu caráter multidisciplinar (SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021). Ao mesmo tempo que estes processos favorecem muitos aspectos, como rotinas industriais, de inspeção e pesquisa, diminuição do impacto ambiental e consumo de recursos, é necessário atentar-se para o desenvolvimento de estratégias que também possam ser aplicadas no processo de transformação digital de regiões e setores economicamente menos favorecidos, de modo a incluir estes atores no processo de modernização do setor de produção de alimentos e bebidas (FAO, 2020; MENOR-GARCÍA, 2021; SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021).

Nesse contexto, o objetivo desta Tese consiste no desenvolvimento de metodologias analíticas alternativas limpas e de baixo custo, baseadas em técnicas de imagens, com destaque para a fotometria por imagens digitais e imageamento hiperespectral. Os procedimentos alternativos desenvolvidos nesta Tese baseiam-se nos princípios da química limpa, que preconizam a racionalização no consumo de reagentes e amostra, trazendo como consequência menores volumes de resíduos gerados. Além disso, objetivou-se que os procedimentos fossem simples, portáteis e viabilizassem tanto o *screening* de amostras quanto a determinação dos analitos.

O *Capítulo 2* apresenta uma alternativa fotométrica para a identificação de fraude em leite por diluição, a partir da determinação do teor de proteínas; no *Capítulo 3*, apresenta-se uma proposta fotométrica, simples e ambientalmente mais amigável, para a determinação de formaldeído em leite; o *Capítulo 4* apresenta um procedimento inovador, simples e de baixo impacto ambiental para a classificação de amostras de leite em função da determinação simultânea dos teores de proteína e gordura; enquanto no *Capítulo 5*, apresenta-se uma proposta fotométrica para

determinação de pH em leite, permitindo a predição química de uma possível contaminação microbiológica.

Os capítulos finais se relacionam com o período de estágio doutoral sanduíche. Assim, no *Capítulo 6* é apresentada uma proposta para classificação de amostras de canela utilizando técnicas espectroscópicas de imageamento; enquanto no *Capítulo 7*, discute-se a possibilidade de explorar a composição mineral de amostras de canela, para identificação do perfil mineral de amostras comerciais de canela e cássia. Ao final da tese, a conclusão apresenta uma avaliação crítica e geral sobre os estudos desenvolvidos, assim como as possibilidades de seus impactos e tendências aplicados à área de alimentos.

2. Procedimento para a detecção de adulteração em leite com base na determinação de proteínas por colorimetria com imagens digitais[1]

Resumo

Um novo procedimento foi desenvolvido para a identificação de fraude em leite por diluição. O procedimento baseia-se na determinação indireta de proteína e envolve a precipitação das proteínas utilizando sulfato de cobre em excesso e a adsorção proporcional de íons Cu^{2+} no precipitado. A concentração de íons Cu^{2+} remanescentes no sobrenadante foi determinada por fotometria por imagens digitais, utilizando a câmera de um *smartphone*. O procedimento proposto é rápido (frequência analítica de 32 ensaios h^{-1}), preciso (coeficiente de variação de 3%, n = 20), ambientalmente mais amigável e com baixo limite de detecção, possibilitando a detecção de 1% v/v de diluente adicionado ao leite. O procedimento é seletivo e capaz de identificar fraude no leite, uma vez que as principais espécies nitrogenadas adicionadas com o objetivo de mascarar a diluição deste alimento não interferem nas medidas analíticas. O procedimento foi aplicado com sucesso para a classificação de amostras de leite em relação à conformidade ao padrão de qualidade do produto e, também, para a determinação de proteínas, com resultados concordantes (95% de confiança) com o método de referência baseado em espectroscopia no infravermelho próximo.

Palavras-chave: Fraude em alimentos; Laticínios; Efeito *salting-out*; Caseína; Fotometria com imagens digitais.

---

1 Capítulo referente a artigo publicado. SILVA, A.F.S.; ROCHA, F.R.P. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. **Food Control**, 115, 107299, 2020. DOI: https://doi.org/10.106/j.foodcont.2020.107299.

Abstract

A novel alternative for detection of milk adulteration by dilution based on the determination of the protein content is proposed. The method involves protein precipitation by the salting-out effect of copper(II) sulfate and the proportional adsorption of Cu(II) on the precipitate. Subsequently, the remaining amount of Cu(II) is determined by smartphone-based digital colorimetry. The proposed procedure is fast (sample throughput of 32 assays h^{-1}), precise (coefficient of variation = 3.0%, n = 20), environmentally friendly, and allows the detection of as low as 1.0% v/v water in adulterated milk. The main species used to mask the protein content do not interfere, thus permitting the effective detection of adulteration. The procedure was successfully applied to classification of milk samples as compliant and non-compliant as well as for the indirect determination of the protein content in milk. The quantitative results agreed with those obtained by the reference method (near infrared spectroscopy) at the 95% confidence level.

Keywords: Food fraud; Dairy industry; Salting-out effect; Casein; Digital Image Photometry.

2.1. Introdução

Historicamente, o leite é um alimento alvo de fraudes e adulterações em todo o mundo, o que foi agravado e sofisticado a partir da revolução industrial, dada a necessidade de ampliar e concentrar a produção de alimentos para, posteriormente, escoá-la às aglomerações urbanas (ATKINS, 1991). As principais causas e motivações para este tipo de prática são ganhos financeiros (essencialmente a partir da diluição do produto) e o mascaramento de baixa qualidade do produto, que ocorrem em função de más práticas de produção e de higiene no processamento, armazenamento e transporte (DAS; GOSWAMI; BISWAS, 2016; HANDFORD; CAMPBELL; ELLIOT, 2016). Essas práticas ilícitas provocam depreciação na qualidade nutricional do leite e também podem afetar a saúde do consumidor, provocando alergias, náusea, diarreia, toxinfecções alimentares e, em casos mais graves, alergias respiratórias, hemorragia, doenças renais e até a morte (HANDFORD; CAMPBELL; ELLIOT, 2016). Exemplos recentes de fraudes em leite são: a adição de melamina em leite em pó e fórmulas infantis na China, em 2008, levando à hospitalização e intoxicação de muitas crianças, o que se configurou como um dos incidentes mais graves de fraude de alimentos no mundo (PEI et al., 2011); a adição de ureia sintética e urina em leite (AZAD; AHMED, 2016); e a mistura de leites de menor valor de mercado (*e.g.* leite de vaca) aos leites considerados nobres (*e.g.* ovelha e cabra) (CALVANO et al., 2012).

A diluição do leite utilizando água e/ou soro é uma prática antiga e recorrente que, com o passar do tempo, foi aprimorada e passou a envolver: (i) a adição de componentes para reconstituir características físico-químicas do leite, *e.g.* densidade e ponto crioscópico; (ii) o uso de compostos com o objetivo de aumentar a validade (*shelf-life*) do produto, *e.g.* formaldeído, ácido salicílico e hipoclorito e (iii) a tentativa de mascaramento da concentração total de proteína, ao utilizar sais de amônio, ureia ou outros compostos nitrogenados, uma vez que métodos usuais para a determinação de proteínas (*e.g.* Kjeldahl e Dumas) são baseados na determinação do teor de nitrogênio no produto (CHAUHAN et al., 2019).

A principal limitação dos métodos de Kjeldahl e Dumas para determinar proteínas em leite são a baixa seletividade para proteínas, alto consumo de reagentes e o elevado tempo de análise, o que traz como consequências práticas a diminuição

na frequência analítica e um atraso na tomada de decisão, já que o processo de triagem de amostras conformes e não conformes torna-se lento (SIMONIAN; SMITH, 2006). Outros procedimentos usuais para avaliar fraude por diluição em leite avaliam os aspectos físico-químicos do produto, isto é, densidade, ponto crioscópico (também conhecido como ponto de congelamento) e índice de refração do soro, após a precipitação quantitativa das proteínas. Estas propostas são frequentemente ineficientes já que podem sofrer interferência de adulterantes que mascaram o efeito da diluição, *e.g.*, sais, açúcares, ureia e maltodextrina (REZENDE et al., 2015). Além disso, estes métodos apresentam baixa sensibilidade, dificultando a identificação das fraudes, que tipicamente ocorrem na faixa de diluição de 1 a 10% v/v (REZENDE et al., 2015).

Métodos alternativos para a determinação de proteína em leite baseiam-se na espectrofotometria UV-Vis (SIMONIAN; SMITH, 2006), com destaque para os métodos de Lowry (LOWRY et al., 1951), biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949), Bradford (BRADFORD, 1976) e Smith (SMITH et al., 1985). As principais limitações na aplicação destas metodologias na rotina laboratorial relacionam-se com o alto consumo de reagentes e consequente geração de resíduos, tempo demandado para a análise, preparo de amostras moroso e complexo, e suscetibilidade a efeitos de matriz (SMITH et al., 1985). Ainda em relação à técnica espectrofotométrica, foi proposta a determinação de proteínas em leite por medidas no ultravioleta, especificamente utilizando os comprimentos de onda 205 nm e 280 nm (SIMONIAN; SMITH, 2006), embora esta alternativa apresente severas limitações quanto à seletividade. Outras estratégias analíticas para avaliar a autenticidade de leite são baseadas na determinação de nitrogênio não-proteico no soro, obtido após precipitação das proteínas (de VRIES et al., 2017) ou em fotometria por vídeos digitais associada às técnicas de aprendizagem de máquinas, como a linguagem de reconhecimento de padrões (SONG et al., 2020).

Atualmente, o procedimento analítico de rotina para avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do leite baseia-se na espectroscopia no infravermelho próximo (cujo acrônimo é NIR, do inglês *Near infrared spectroscopy*), técnica que viabilizou a adoção do sistema de pagamento do leite de acordo com a sua qualidade, sendo os componentes considerados para precificação, principalmente, os teores de proteína, gorduras e a razão entre estes teores (GUILLOU; PELISSIER; GRAPPIN, 1986). Essa técnica atende aos requisitos do novo sistema de pagamento de leite no

Brasil, que também considera a concentração de lactose e o teor total de sólidos (MILKPOINT, 2020). Na França, parâmetros adicionais como a concentração de caseína e o perfil lipídico do leite estão sendo estudados para serem incluídos na análise de qualidade do produto, pois poderão ser úteis, por exemplo, para otimizar processos industriais e avaliar a saúde dos animais (CNIEL, 2021).

A espectroscopia NIR é uma técnica analítica considerada limpa e não destrutiva, pois permite a análise direta da amostra, normalmente dispensando ou requerendo um preparo de amostras mínimo (normalmente moagem de sólidos ou homogeneização de líquidos), além de apresentar baixa suscetibilidade a efeitos de matriz (GUILLOU et al., 1986; RIBADEAU-DUMAS; GRAPPIN, 1989). Apesar das muitas vantagens analíticas e ganhos ao setor proporcionados por esta técnica, há limitações relacionadas à necessidade de instrumentação padronizada (geralmente pouco disponível), de modelos quimiométricos para a predição de resultados e de avaliação periódica dos modelos preditivos utilizados requerendo analistas qualificados, o que impacta no custo da análise. Além disso, a técnica requer calibração utilizando amostras de referência, cuja concentração dos componentes já tenha sido previamente determinada (*e.g.* método de Kjeldahl para a determinação de proteínas) (RIBADEAU-DUMAS; GRAPPIN, 1989).

A fotometria por imagens digitais é uma técnica emergente na área de análise de alimentos, já tendo sido aplicada para monitorar a cor (YAM; PAPADAKIS, 2004) e para avaliar parâmetros relacionados à qualidade, deterioração, adulteração e autenticidade dos alimentos (MACEDO DOS SANTOS; PEREIRA-FILHO, 2013; ZHANG; SUSLICK, 2007). As principais vantagens desta técnica para finalidades analíticas são a praticidade, portabilidade, baixo custo, ampla disponibilidade da instrumentação e possibilidade de rápida obtenção de resultados analíticos (MACEDO DOS SANTOS; PEREIRA-FILHO, 2013).

Em função das vantagens mencionadas, a fotometria por imagens digitais é uma alternativa analítica bastante atrativa para a cadeia do leite, já tendo sido desenvolvidas soluções para a avaliação de importantes parâmetros de qualidade química, tais como a determinação de resíduos de antibióticos (LU et al., 2019; MASAWAT; HARFIELD; NAMWONG, 2015); teor de água e adição de soda cáustica (SANTOS; WENTZELL; PEREIRA-FILHO, 2012); adulterantes diversos, como amido, açúcar, glicose e ureia (LUTHER, FRAHAN, LIEBERMAN, 2017);

surfactantes aniônicos (ACEVEDO et al., 2018); e até para indicar a presença de *Lactobacillus* em leite fermentado (BORIN et al., 2007). Outra estratégia explorada nesta técnica foram as medidas indiretas de dispersão da luz associada à quimiometria (regressão por mínimos quadrados parciais), com o objetivo de determinar os teores totais de gordura e proteína em leite (KUCHERYAVSKIY; MELENTEVA; BOGOMOLOV, 2014).

O objetivo deste capítulo da Tese foi desenvolver um procedimento alternativo rápido, de fácil execução e de baixo custo para identificar fraude em leite por diluição, por meio da utilização de sulfato de cobre(II) em excesso. Após a precipitação das proteínas, íons Cu^{2+} remanescentes foram determinados em solução após complexação com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A intensidade da coloração azul da solução final foi medida utilizando a câmera de um *smartphone* e é inversamente proporcional à concentração de proteína na amostra, representando um indicador viável da fraude do leite por diluição.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Amostras e soluções

Amostras de leite integral (pasteurizadas e esterilizadas comercialmente pelo processo de ultra alta temperatura, UHT) foram adquiridas em mercados locais da cidade de Piracicaba-SP. Amostras de referência de leite cru foram previamente analisadas pelo procedimento de referência baseado na espectroscopia NIR, na Clínica do Leite (Piracicaba-SP), que é um laboratório certificado pelo Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL).

As soluções utilizadas neste estudo foram preparadas utilizando água deionizada (resistividade > 18,2MΩ cm) e reagentes de grau analítico (Merck, Alemanha), exceto quando discriminado. Soluções salinas de concentração 0,30 mol L^{-1} foram preparadas utilizando $CuSO_4.5H_2O$, Na_2SO_4, $Fe_2(SO_4)_3.H_2O$, $(NH_4)_2SO_4.H_2O$, $CaSO_4.2H_2O$ ou $FeSO_4.7H_2O$ (Synth, Brasil). Uma solução de concentração equimolar (0,30 mol L^{-1}) de $CuSO_4$ e Na_2SO_4 também foi utilizada.

Uma solução 0,25 mol L^{-1} do complexante EDTA foi preparada a partir de seu sal dissódico ($Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8.2H_2O$). Uma solução 0,1 mol L^{-1} de ácido 4,4'-dicarboxílico 2,2'-biquinolínico (BQA) (Sigma Aldrich, EUA) foi preparada em meio

0,1 mol L^{-1} acetato de amônio. Soluções de ácido ascórbico 1,0% m/v e 2,5% m/v hidróxido de amônio foram preparadas em água e empregadas no método BQA.

Uma suspensão de β-caseína (Sigma Aldrich, Suíça) foi preparada utilizando 3,30 g da proteína em 100 mL de uma solução 2,5 mol L^{-1} $Ca_3(PO_4)_2$ para mimetizar parte dos componentes químicos e interação entre componentes observadas no leite bovino.

Soluções contendo 2,36 g L^{-1} de melamina (Sigma Aldrich, EUA); 7,80 g L^{-1} de NH_4Cl e 3,36 g L^{-1} de ureia (Synth, Brasil) foram usadas para avaliar a seletividade do procedimento. Ainda em relação a esta etapa, também foi utilizado soro de leite, obtido após a adição de 800 µL de quimosina (extraída do fungo *Aspergillus niger*, 75 IMCU, CHR Hansen, Brasil) em 1000 mL de leite cru.

Soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de uma amostra de leite contendo 3,60% m/v de proteína, previamente analisada pelo método de referência (ISO, 2006).

2.2.2. Instrumentação

A precipitação das proteínas do leite foi realizada em tubos Falcon® de fundo cônico de 15 mL, e o sobrenadante foi transferido para tubos incolores do tipo Eppendorf®. Medidas fotométricas foram realizadas diretamente nestes tubos utilizando um smartphone LG K10 Pro (Taubaté, Brasil) equipado com uma câmera de 13 megapixel (resolução de 4128 x 2096 pixel), abertura de lente de f/2.2 e Android 7.1. O aplicativo gratuito ColorGrab® (Loomatix, versão 3.6.1, 2017), disponível para sistema Android, foi utilizado para converter os dados adquiridos nas imagens em sinais analíticos, a partir da utilização dos espaços espectrais RGB.

Uma caixa de isopor (14 cm de altura x 16 cm de largura x 10,5 cm de profundidade) foi adaptada para inserir os tubos contendo as amostras e um suporte para celular foi utilizado para fixa-lo a 9 cm de distância da amostra. Uma lâmpada LED (Osram Superstar, R50 40, 6W, E14 30º) foi posicionada no topo da caixa, com o objetivo de manter a iluminação controlada e constante. As medidas fotométricas foram realizadas no centro de tubos Eppendorf®, utilizando uma área de análise (ROI, acrônimo para *region of interest*) de 32 x 32 *pixel*.

Os espectros de absorção dos produtos foram adquiridos utilizando um espectrofotômetro multicanal UV-Vis (Ocean Optics®, EUA) utilizando uma cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm. O procedimento de referência foi realizado de acordo com o protocolo NF ISO 21543 (ISO, 2006), implementado em um espectrômetro NIR (FOSS Analytics, Dinamarca).

2.2.3. Procedimento

O procedimento proposto baseia-se na precipitação de proteínas em suspensão, pelo efeito *salting-out*. A uma alíquota de 5 mL de leite foram adicionados 1,25 mL de sulfato de cobre(II) 0,30 mol L^{-1}, seguida de agitação manual. Outros sais de sulfato (Na_2SO_4, mistura equimolar $CuSO_4$ + Na_2SO_4, $FeSO_4$, $Fe_2(SO_4)_3$, $(NH_4)_2SO_4$ e $CaSO_4$) também foram avaliados como precipitantes, assim como uma solução de EDTA 0,25 mol L^{-1}. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 2380 rpm (950 g), por 10 min, para acelerar a precipitação das proteínas. Uma alíquota de 1 mL de sobrenadante foi transferida para tubos tipo Eppendorf® e adicionou-se 2 mL de solução de EDTA 0,25 mol L^{-1}. Os complexantes BQA em meio amoniacal (ROCHA; ROCHA, 2010) e amônia (FISHER; HALL, 1967) também foram avaliados nos métodos fotométricos para determinar a concentração de íons cobre em solução.

Medidas fotométricas foram realizadas a partir da intensidade da radiação refletida pelo sobrenadante, diretamente nos tubos Eppendorf®, após 3 min da adição do EDTA. As medidas foram realizadas em condições de iluminação controlada e convertidas em espaços espectrais RGB. Os valores medidos para o canal R foram utilizados como sinal analítico para quantificar as proteínas no leite. O procedimento desenvolvido nas condições otimizadas é ilustrado na Figura 2.1 - Representação infográfica da metodologia proposta para a determinação de proteínas em leite.

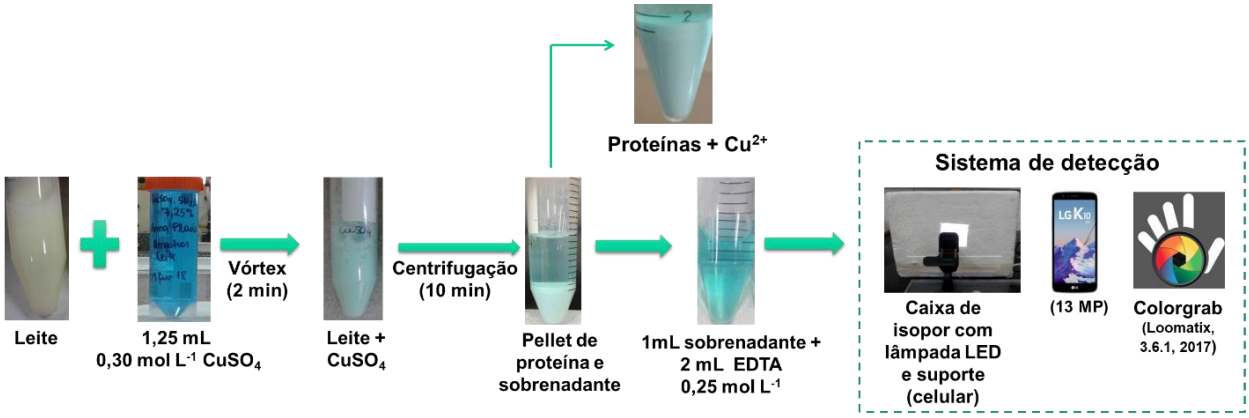


Figura 2.1 - Representação infográfica da metodologia proposta para a determinação de proteínas em leite

A classificação das amostras de leite de acordo com o grau de conformidade em relação ao teor de proteínas foi realizada do sinal analítico (S) determinado pela Equação 1.

$$S = R_0 - R_1 \quad (1)$$

Em que:

R_0 = intensidade de radiação refletida (canal R) por água ultrapura (neste caso, R = 208 $\pm$ 2, considerando 20 medidas)

R_1 = intensidade de radiação refletida (canal R) pelas amostras de leite processadas pelo procedimento proposto

Amostras de leite cru, cujas concentrações de proteína foram determinadas previamente pelo procedimento de referência (ISO, 2006), foram utilizadas para a otimização e avaliação de exatidão do procedimento proposto. Estas amostras contém o conservante bronopol (0,02% m/v), utilizado devido ao seu poder bacteriostático e que permite a adequabilidade das amostras para análises por *ca.* 10 dias. Devido ao conservante, as amostras apresentavam uma coloração alaranjada, mensurada no sobrenadante após a precipitação das proteínas, utilizando 0,25 mol L^{-1} EDTA em substituição ao sulfato de cobre(II). As demais etapas do procedimento foram realizadas de modo semelhante ao mostrado na Figura 2.1. A média dos valores do sinal do canal R no sobrenadante (3 $\pm$ 1) foi então subtraída do sinal analítico (S) para corrigir o efeito aditivo da coloração do conservante. A Figura 2.2 ilustra o aspecto visual do precipitado proteico de diferentes amostras de leite.

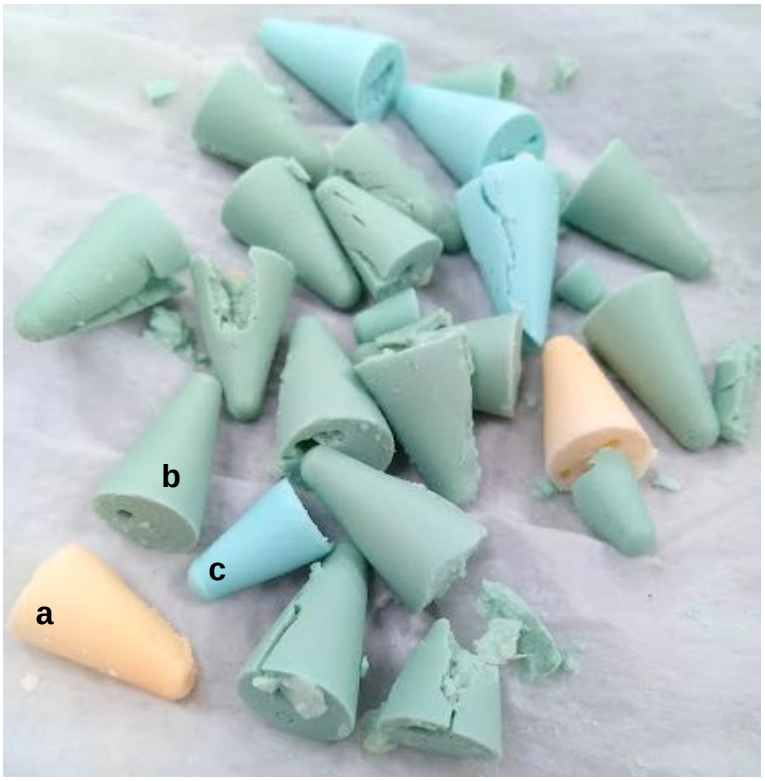


Figura 2.2 - Aspecto visual dos pellets de amostras: (a) leite cru contendo o conservante bronopol 0,02% m/v utilizando para a precipitação 1,25 mL de EDTA 0,25 mol L^{-1}; (b) leite cru contendo o conservante bronopol 0,02% m/v utilizando para a precipitação 1,25 mL de $CuSO_4$ 0,30 mol L^{-1}; (c) leite integral pasteurizado utilizando para a precipitação 1,25 mL de $CuSO_4$ 0,30 mol L^{-1}

O limite de detecção (LOD) foi determinado a partir de uma diluição seriada, preparada a partir de uma amostra de leite, de concentração de 3,60% m/v de proteína, em água ultrapura. Estas soluções foram analisadas pelo procedimento proposto (n = 5) e os valores do sinal obtido para o canal R foram comparados aos obtidos para uma amostra de leite sem diluição (n = 10). O LOD foi determinado a partir da menor concentração de proteína que permite obter um sinal de R significativamente distinto do sinal obtido para a amostra sem diluição, utilizando o teste *t* de Student com nível de confiança de 95%.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Aspectos gerais

O procedimento proposto envolve a precipitação das proteínas suspensas no leite provocada pela adição de um sal em excesso (efeito *salting-out*) e na medida da radiação refletida por uma alíquota do sobrenadante contendo os cátions

remanescentes em solução. No processo de precipitação das proteínas, outras macromoléculas responsáveis pela turbidez do leite também são separadas da matriz (ESKIN; GOFF, 2013). Isto contribui significativamente para a minimização do espalhamento de radiação, ainda que este não seja um processo crítico para medidas fotométricas baseadas na intensidade da radiação refletida, como no caso do presente trabalho.

As soluções salinas promovem uma separação eficiente das proteínas presentes em meio aquoso, uma vez que o aumento da força iônica da solução dificulta as interações hidrofílicas entre a água e as proteínas, que mantém essas espécies em suspensão. Com a predominância de interações hidrofóbicas, *i.e.* proteína-proteína, ocorre a agregação destas macromoléculas, favorecendo sua precipitação. A eficiência do processo de *salting-out* está diretamente relacionada aos íons envolvidos, assim como às suas concentrações e da proteína dispersa no meio. Outros aspectos que afetam a eficiência de precipitação são a estrutura das proteínas, o perfil dos aminoácidos que as compõem e as ligações peptídicas estabelecidas (BALDWIN, 1996; LEBERMAN, 1991; VOET; VOET, 2010; WINGFIELD, 1998).

A seleção do precipitante foi realizada de acordo com a série aniônica de Hofmeister (PO_4^{3-} > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > ClO_4^- > SCN^-), relacionada à habilidade de promover a precipitação das proteínas ao favorecer o estabelecimento de interações hidrofóbicas entre as espécies (BALDWIN, 1996; WINGFIELD, 2001). Assim, o ânion mais eficiente para provocar o efeito *salting-out* é o fosfato. Entretanto, estes ânions formam sais de baixa solubilidade em solução aquosa (*e.g.* $Cu_3(PO_4)_2$) e, por isso, optou-se pela utilização de sais de sulfato.

Os sais avaliados foram $Fe_2(SO_4)_3$, $FeSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ e a mistura equimolar $CuSO_4$ + Na_2SO_4, todos na concentração 0,30 mol L^{-1}, já que em concentrações inferiores não houve separação aparente das proteínas em suspensão. Além disso, também foram avaliados como precipitante: sal dissódico de EDTA (0,25 mol L^{-1}); ácidos diluídos (H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}; HCl 0,1 mol L^{-1}); e a combinação de uma solução salina em meio ácido ($CuSO_4$ 0,30 mol L^{-1} em solução aquosa contendo H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}). A Figura 2.3 ilustra os resultados observados.

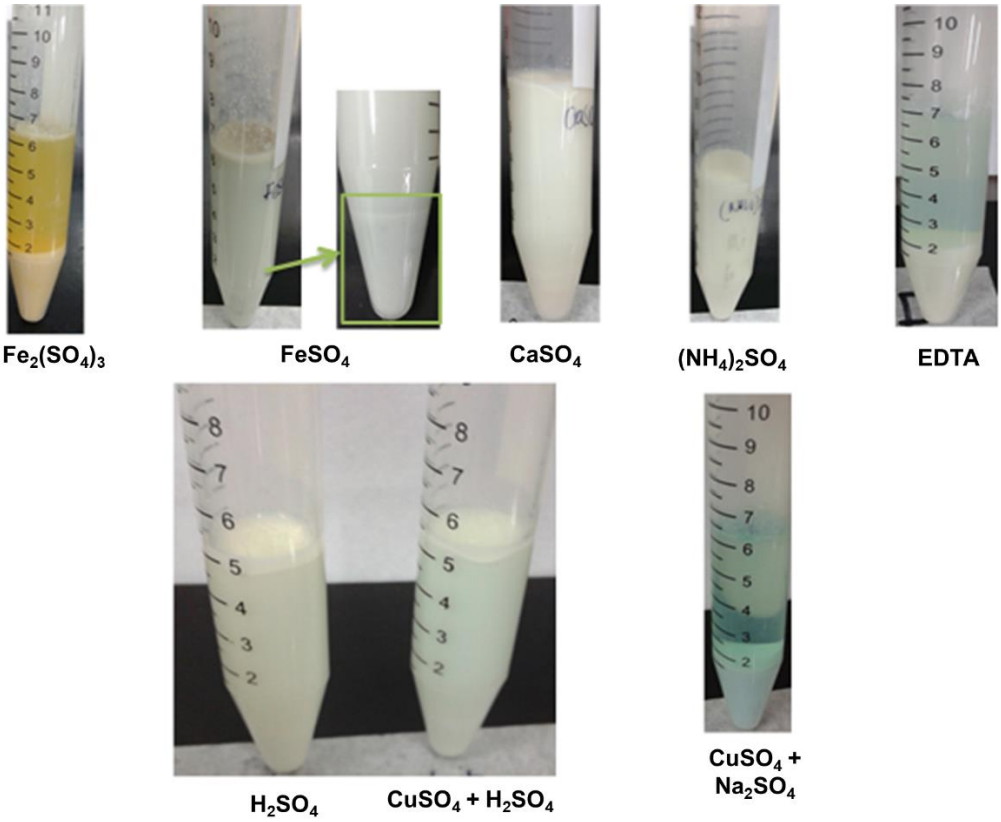


Figura 2.3 - Aspecto visual dos efeitos da adição dos diferentes precipitantes avaliados em amostras de leite integral

A utilização do EDTA 0,25 mol L^{-1} proporcionou a precipitação efetiva das proteínas, uma vez que a solução atingiu o ponto isoelétrico das caseínas, *i.e.*, pH = 4,60. Entretanto, o sobrenadante era turvo e o precipitado coloidal não se encontrava totalmente compactado ao fundo do tubo. A precipitação utilizando ácido diluído também não foi eficiente, uma vez que o pH das soluções variou de 3,20 a 3,50, o que favorece a ressuspensão e solubilização de parte do grupo das proteínas separadas. Precipitações ineficientes também foram observadas para os outros sais avaliados. Embora os íons sulfato favoreçam a remoção das proteínas em solução, os cátions favorecem a estabilidade das proteínas em solução, o que faz com que parte das estruturas das caseínas possam ser ressolubilizadas (VOET; VOET, 2010).

A precipitação de proteínas foi mais eficiente utilizando a solução de $CuSO_4$ 0,30 mol L^{-1}, que proporcionou a obtenção de um sobrenadante límpido e translúcido (Figura 2.4). O $CuSO_4$ também foi explorado como precipitante, nesta mesma concentração, no procedimento para identificação de adulterações em leite, por meio de diluições, utilizando medidas do índice de refração do soro (REZENDE et al., 2015),

utilizando o método proposto por Ritthausen e Pott (1873) (OSBORNE; LEAVENWORTH, 1916; KLUNGSÖYR, 1969).

Após a adição da solução salina, homogeneização e centrifugação, as proteínas foram compactadas no *pellet* ao fundo do tubo Falcon. Um benefício incremental deste tratamento foi a remoção da gordura presente na amostra, a qual permaneceu na superfície do sobrenadante ou adsorvida às paredes do tubo, o que também contribuiu para a obtenção de um sobrenadante límpido. A combinação $CuSO_4$ + Na_2SO_4 resultou em um processo de precipitação de proteínas eficiente, entretanto, o sobrenadante permaneceu turvo, não havendo uma separação eficiente da gordura, como quando se utilizou apenas $CuSO_4$ (Figura 2.4). A combinação de $CuSO_4$ com H_2SO_4 (Figura 2.3) também não apresentou melhores eficiências de precipitação, do que quando utilizando apenas $CuSO_4$, conforme ilustrado pela Figura 2.4.

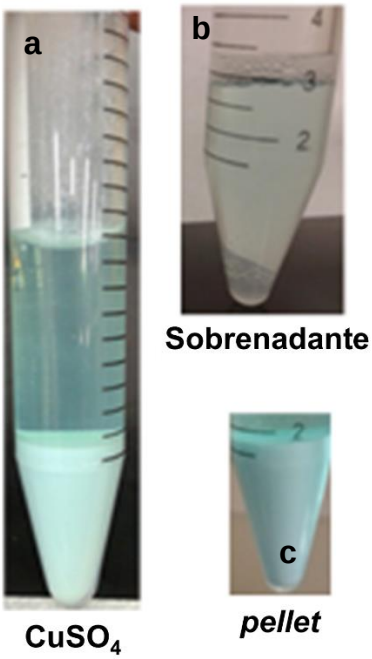


Figura 2.4 - Aspecto visual de uma amostra tratada com $CuSO_4$, evidenciando: (a) a separação da gordura e proteínas, gerando sobrenadante translúcido e sem material particulado (b) e proteínas compactadas ao fundo do tubo (c).

A utilização de $CuSO_4$ é vantajosa pois, além de promover a precipitação das proteínas em solução (provocada pelos ânions sulfato), os íons Cu^{2+} são adsorvidos ao precipitado. Isto ocorre em parte devido à formação de complexos com as cadeias laterais dos aminoácidos, principalmente com a histidina, que são abundantes na estrutura das proteínas do leite (AGARWAL; GUPTA, 1994). Portanto, os íons Cu^{2+}

são removidos proporcionalmente à quantidade de proteínas precipitadas. Assim, a quantificação dos íons Cu^{2+} remanescentes no sobrenadante possibilita a determinação indireta de proteína. A interação preferencial dos íons cobre(II) com os aminoácidos garante seletividade ao método proposto (AGARWAL; GUPTA, 1994; RIBADEAU-DUMAS; GRAPPIN, 1989).

2.3.2. Otimização do procedimento

O procedimento foi otimizado com o objetivo de promover a precipitação quantitativa de proteínas com o menor consumo de reagentes, de modo a minimizar a geração de resíduos. Assim, as variáveis concentração (variando de 0,10 a 0,40 mol L^{-1}) e volume (0,25 a 2,00 mL) de $CuSO_4$, volume de amostra (1,00 a 10,0 mL) e o tempo de centrifugação (1 a 20 min) a uma velocidade de centrifugação de 2380 rpm foram otimizadas visando precipitações quantitativas.

Observou-se que a adição de reagente em concentrações inferiores a 0,30 mol L^{-1} não era suficiente para promover a remoção significativa das caseínas, resultando em uma solução turva e em que não havia remoção significativa de proteínas. Após essa observação, avaliou-se o volume mínimo do reagente para remover as proteínas e obter um sobrenadante límpido. Volumes inferiores a 1,00 mL não promoveram o efeito desejado, enquanto a adição de 2,00 mL gerou um sobrenadante de coloração intensa, o que saturaria a medida fotométrica. O menor volume de reagente que gerou resultados reprodutíveis foi 1,25 mL. Em relação às amostras, volumes inferiores a 4,00 mL geraram um sobrenadante de coloração muito intensa e que poderia comprometer a medida fotométrica, enquanto volumes superiores a 6,00 mL comprometeram a precipitação das proteínas e aumentaram a turbidez do sobrenadante, sendo o volume de 5,00 mL selecionado para os experimentos subsequentes.

Observou-se que amostras centrifugadas por 7 min ou menos não apresentavam uma separação adequada da proteína do meio, resultando em sobrenadantes turvos. Quando as amostras foram centrifugadas por 12 min ou mais, observou-se que as mesmas tenderam a formar uma emulsão, resultando no aumento de turbidez da solução. O tempo mínimo que gerou resultados reprodutíveis foi de 10 min. Assim, a melhor resposta foi obtida com 5,00 mL de amostra de leite e 1,25 mL de sulfato de cobre 0,30 mol L^{-1}, com centrifugação a 2380 rpm por 10 min.

A condição ótima observada foi a mesma estabelecida por Rezende et al. (2015), que exploraram medidas do índice de refração do soro de leite para determinar fraude por diluição.

Na condição otimizada, a concentração de $CuSO_4$ está em excesso de 7 vezes em relação à concentração de proteínas, o que favorece o processo de precipitação (*salting-out*). O excesso é também requerido para a determinação indireta de proteínas no leite, a partir da quantificação dos íons Cu^{2+} remanescentes no sobrenadante. Embora o sobrenadante já apresentasse uma coloração ciano inerente aos aquo-complexos de cobre(II), a medida direta da intensidade de radiação refletida apresentava sensibilidade reduzida, não permitindo a detecção de diluições inferiores a 15 % v/v. Portanto, com a finalidade de melhorar a sensibilidade, avaliou-se a possibilidade de adicionar complexantes (EDTA, BQA e amônia) à solução, com o objetivo de formar complexos de cobre com maior absortividade molar. Os espectros de absorção dos complexos são apresentados na Figura 2.5.

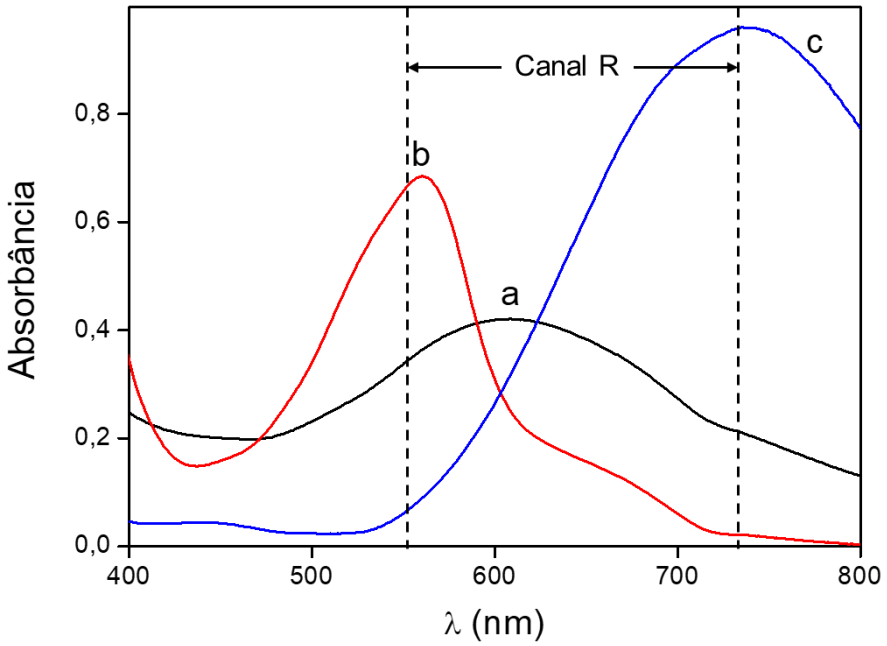


Figura 2.5 - Espectros de absorção dos complexos de cobre formados com os complexantes: (a) amônia (0,1 mol L^{-1} Cu^{2+}), (b) BQA ($7{,}5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} Cu^{+}) e (c) EDTA (0,1 mol L^{-1} Cu^{2+}). A banda indicada corresponde à faixa espectral do canal R.

A Figura 2.5 mostra a sobreposição do canal R ao espectro de absorção do complexo Cu(II)-EDTA. Os sinais monitorados no canal R correspondem a 70% da variação total nos valores de RGB, enquanto as contribuições dos canais G e B foram de 25% e 5%, respectivamente. Outro aspecto relevante para esta escolha deve-se à relação linear entre o sinal monitorado no canal R e a concentração de proteína, conforme discutido no item 2.3.2.

A escolha do canal de cor para as medidas fotométricas foi baseada na complementaridade com a cor do complexo cobre(II)-EDTA formado, que apresenta coloração ciano, conforme apresentado na Figura 2.6.

Figura 2.6 - Aspecto visual do complexo cobre(II)-EDTA formado a partir de 0,5 mL de sobrenadante, obtido de uma amostra de leite integral e 1,0 mL de EDTA 0,25 mol L^{-1}.

Embora o complexo cobre-BQA (ROCHA; ROCHA, 2010) tenha apresentado maior absortividade molar, uma alta diluição do sobrenadante (cerca de 400 vezes) foi necessária para realizar as medidas fotométricas. Além disso, o uso deste reagente implica no aumento dos custos operacionais e do volume de resíduos gerados, além da necessidade de redução de Cu(II) a Cu(I). Os complexantes EDTA e amônia apresentaram resultados semelhantes e ambos podem ser utilizados como complexantes. Contudo, optou-se pela utilização do EDTA em função do seu complexo com o cobre(II) ter apresentado maior absortividade molar, maior estabilidade (Kf ~ 10^{18} mol^{-1} L) e menor toxicidade do produto gerado. Além disso, sulfato de cobre e EDTA são reagentes de baixo custo e de ampla disponibilidade.

2.3.3. Características analíticas

Nas condições otimizadas, o procedimento proposto permitiu a determinação de proteínas na faixa de 0,36% a 3,6% m/v, com reposta linear descrita pela equação: R = (17,9 ± 0,4) C + (68 ± 1), r = 0,999, em que R corresponde aos valores medidos no canal R e C representa a concentração (% m/v) de proteína (Figura 2.7). Este intervalo de concentração é compatível com a faixa de concentração de proteína esperada no leite, que varia de 3,0 a 3,6% m/v.

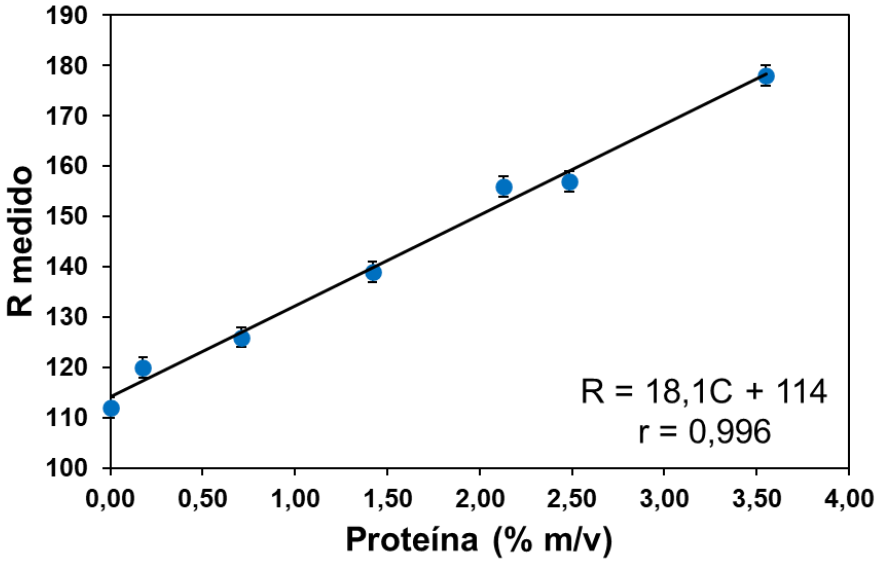


Figura 2.7 - Resposta linear para determinação da concentração de proteína em leite obtida a partir da diluição de uma suspensão de β-caseína 3,6 % m/v e fosfato de cálcio 1 mol L^{-1}, preparada em meio aquoso

O limite de detecção foi determinado experimentalmente como sendo a menor concentração de proteína que gera resultado diferente de uma solução de referência. Assim, a menor concentração de uma solução contendo o analito que diferia do branco, a 95% de confiança, foi 0,03% m/v de proteína. Esse resultado é altamente relevante, dado que a maioria dos métodos para a detecção de adulteração do leite são limitados a diluições iguais ou superiores a 10% v/v (REZENDE et al., 2015).

O coeficiente de variação foi estimado em 3,0% (n = 20). O tempo de análise demandado pelo procedimento proposto é de 15 min, sendo que o maior tempo corresponde à etapa de centrifugação (10 min). Sendo assim, considerando uma centrífuga com capacidade para centrifugação de 8 amostras simultaneamente, a

frequência analítica do procedimento foi estimada em 32 ensaios h^{-1}. O procedimento consumiu *ca.* 90 mg de $CuSO_4$ e EDTA (por determinação) e gerou, a cada determinação, 7,8 mL de resíduo.

A suscetibilidade do procedimento proposto ao mascaramento da diluição com compostos nitrogenados foi investigada, pois é uma prática usualmente adotada por fraudadores para encobrir a infração cometida. Assim, diferentes substâncias (soro de leite, melamina, NH_4Cl e ureia) foram adicionadas em amostras de leite diluídas, de modo a restaurar o teor de nitrogênio proporcionalmente à diluição realizada. A comparação dos sinais analíticos para amostras adulteradas por estas substâncias em relação à resposta para leite não adulterado é mostrada na Figura 2.8.

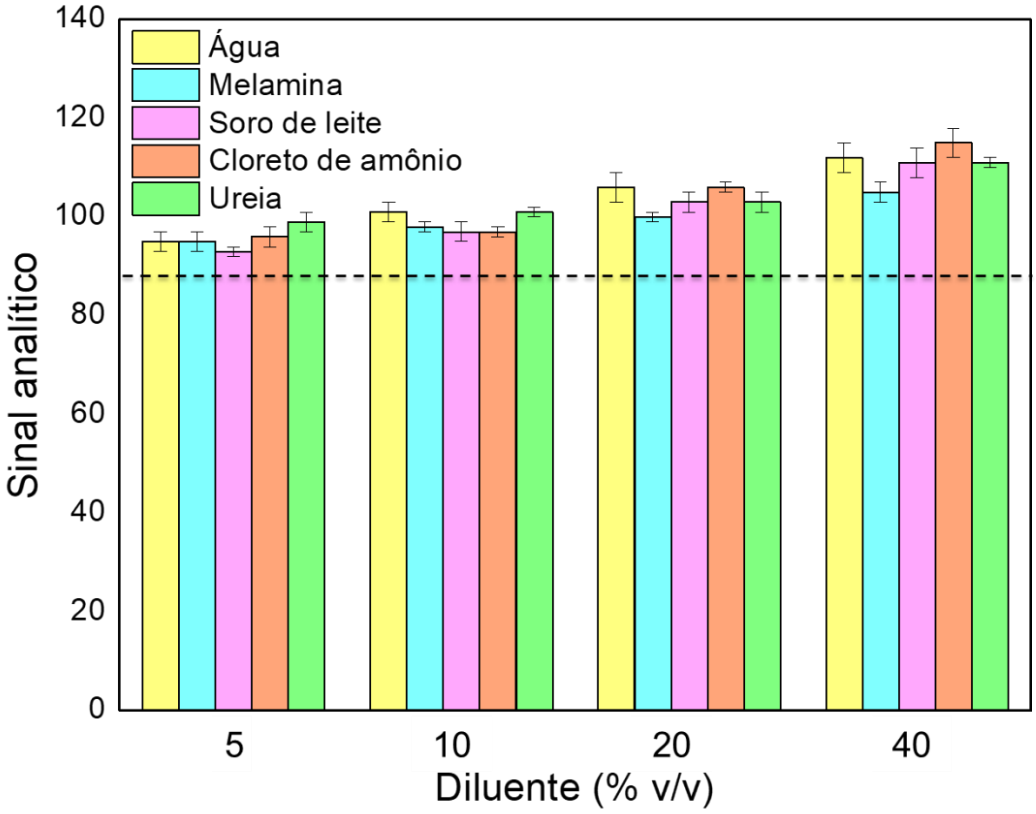


Figura 2.8 - Sinais analíticos obtidos para diferentes diluições de uma amostra de leite com ou sem a adição de espécies nitrogenadas para mascarar a adulteração. As barras de erro indicam os desvios padrão estimados para medidas em triplicata e a linha tracejada corresponde ao sinal analítico de uma amostra de leite conforme.

As substâncias adicionadas não mascararam a diluição do leite, conforme demonstrado na Figura 2.8, uma vez que todos os resultados foram significativamente diferentes daquele obtido para o controle (*i.e.*, amostra de leite não adulterado) em um nível de confiança de 95%. No caso da adição de melamina em concentrações

iguais ou superiores a 20% v/v, observou-se que houve diferença significativa em relação à diluição com água. Isto pode ser explicado pelo efeito da melamina na estrutura das micelas de caseína, promovendo uma alteração estrutural das micelas e reduzindo a capacidade do “sistema esponja” destas. Quanto maior a adição de melamina no meio, mais pronunciando é este efeito. Isto traz como consequência a redução das interações entre as proteínas, a água e o precipitante $CuSO_4$ (DAY et al., 2017). Apesar da adição de altas concentrações de melamina poder provocar interferências na determinação quantitativa de proteína em leite, o mesmo não deve ocorrer para a classificação de amostras quanto à conformidade do teor de proteínas.

O potencial efeito de mascaramento da diluição do leite por outras substâncias (cloreto de sódio, lactose e leite sintético) também foi avaliado. Observou-se que nenhuma das substâncias adicionadas afetou as medidas, diferentemente do que foi observado em outros métodos que envolvem formação e monitoramento de complexos, como no caso do cobre(II)/BQA (SMITH et al., 1985). Os resultados obtidos demonstraram alta seletividade do procedimento proposto, o que pode ser explicado pela alta estabilidade dos complexos de cobre(II) formados com os aminoácidos presentes no leite (etapa de precipitação das proteínas) e EDTA (etapa de detecção fotométrica). A seletividade alcançada é uma vantagem clara em relação a algumas abordagens bem estabelecidas e consideradas de referência para a detecção de diluição do leite, como aquelas baseadas na crioscopia, medições do índice de refração e pelo método de Kjeldahl (REZENDE et al., 2015).

Especificamente em relação à adição de β-caseína, um dos tipos de proteína que compõem a estrutura quaternária da caseína presente no leite, o efeito de mascaramento também não foi observado. Isto pode ser explicado devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso, decorrente de sua alta hidrofobicidade, e da incapacidade destas frações adicionadas adentrarem na estrutura micelar, onde poderiam estabelecer ligações hidrofóbicas. Fatores adicionais são a falta de hidratação do produto comercial e a baixa interação desta fração com outros componentes do leite, como os fosfolipídios, que contribuem para manter a estabilidade das proteínas suspensas e parcialmente solubilizadas.

2.4. Aplicações

2.4.1. Classificação de amostras de leite

O procedimento desenvolvido foi avaliado como uma ferramenta de *screening* para identificar a conformidade de amostras de leite em relação ao teor de proteína. O intervalo de confiança foi estabelecido utilizando uma amostra de referência de leite, *i.e.*, amostra previamente analisada pelo método de referência (ISO, 2006). As faixas limítrofes foram estabelecidas a partir da concentração real de proteína na amostra de referência (3,50% m/v) e após a diluição da mesma à concentração de 3,00% m/v. Estas soluções geraram os sinais analíticos ($S = R - R_0$, conforme descrito no item 2.3). Os dados apresentaram distribuição normal, conforme avaliado pelos testes F e de Shapiro-Wilk, a um nível de confiança de 95% (MEAD; CURNOW; HASTED, 2003). Os limites inferior e superior de controle foram determinados a partir da Equação 2 e a Figura 2.9 mostra visualmente os resultados obtidos para cada faixa de LC.

$$LC = (\text{média} \pm \text{desvio padrão}) + (\text{e.p.m.\%} \times k) \qquad (2)$$

Em que:

LC = Limite de Controle

e.p.m.% = erro padrão da média (0,5), calculado a partir da relação: $(sd/\sqrt{n})*100$, em que sd = desvio padrão das medidas e número de amostras

k = 2, quando o limite de controle é calculado em nível de confiança de 95%

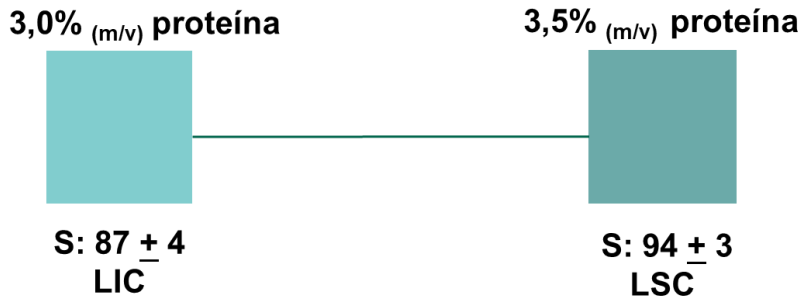


Figura 2.9 - Intervalo de confiança estabelecido para classificação de amostras de leite, ou seja, $83 \leq S \leq 97$. LIC corresponde ao limite inferior de controle, quando a amostra de leite apresentar 3,00% m/v de proteína e LSC ao limite superior de controle, quando a amostra de leite apresentar 3,50% m/v de proteína. Sinais analíticos (S) seguidos dos desvios-padrão (n = 9)

Para a validação do modelo de classificação proposto, 29 amostras de leite cru (com concentrações de proteína variando de 3,00 a 3,53% m/v, determinadas pelo método de referência (ISO, 2006), foram analisadas em triplicata pelo procedimento proposto. Os sinais analíticos (S) variaram de 86 ± 1 a 90 ± 2, e todas as amostras foram classificadas como conformes, em concordância com os resultados obtidos pelo método de referência. Além disso, a abordagem de classificação proposta foi aplicada em 5 amostras (escolhidas aleatoriamente) do conjunto de validação que foram diluídas com água, na faixa de 10% a 40% v/v. Os sinais analíticos (S) variaram de 99 ± 2 a 109 ± 1, o que permitiu a classificação destas amostras como não conformes ao modelo estabelecido, confirmando a capacidade do procedimento em detectar diluições de amostras leite nesta faixa.

Outra avaliação do modelo proposto ocorreu com a classificação de amostras de leite comerciais integrais (n = 8), adquiridas no mercado local, integrais e esterilizados comercialmente (UHT). Este tipo de amostra recebe uma padronização nos principais componentes do leite para atender aos requisitos da legislação vigente, o que inclui a padronização da concentração de proteínas em *ca.* 3,0% m/v. Neste caso, estabeleceu-se um intervalo específico, variando de 3,0 (LIC) a 3,2% m/v (LSC) de proteína. O intervalo estabelecido foi de $92 \leq S \leq 98$, calculado de acordo com a Equação 1, e obteve-se como resultados: 3 amostras conformes; 4 amostras suspeitas, sendo que 2 delas continham, provavelmente, teor de proteína superior ao LSC estabelecido para o intervalo neste caso (*i.e.*, 3,2% m/v), enquanto 2 delas, provavelmente, concentrações de proteínas inferiores a 3,0% m/v. Apenas 1 amostra apresentou teor de proteína < 3,0% m / v, de acordo com o critério de classificação estabelecido. Esses resultados demonstraram a viabilidade da proposta para a triagem de amostras de leite, o que contribui para a simplificação da detecção de fraudes e maximização da utilização de recursos (financeiros e tempo).

2.4.2. Determinação quantitativa de proteínas

O procedimento proposto também foi avaliado para a determinação da concentração de proteína no leite. Neste caso, a calibração foi baseada na diluição de uma amostra de referência; que continha concentração de proteína de 3,6% m/v, e cuja faixa analítica variou de 2,2% m/v a 3,6% m/v; conforme determinação prévia pelo procedimento de referência (ISO, 2006). A avaliação da exatidão foi realizada a

partir da comparação dos resultados obtidos com os determinados pelo procedimento de referência (NIR), conforme mostrado na Tabela 2.1. O efeito da cor das amostras no sinal analítico foi superado conforme mencionado anteriormente.

Tabela 2.1 - Avaliação de exatidão do procedimento proposto em comparação ao procedimento de referência (ISO, 2006). Médias seguidas dos desvios padrão para a concentração de proteína (% m/v).

Amostra	Procedimento proposto [a]	Procedimento de referência [b]	Erro relativo (%)
1	3,79±0,09	3,50	+ 8,4
2	3,17±0,09	3,29	- 3,6
3	3,39±0,03	3,29	+ 3,0
4	3,33±0,06	3,26	+ 2,1
5	3,4±0,2	3,25	+ 4,6
6	3,06±0,07	3,22	- 5,0
7	3,1±0,2	3,20	- 3,1
8	3,0±0,1	3,19	- 5,9

[a] Medidas realizadas em triplicata; [b] Coeficiente de variação típico de 1,0% (FOSS ANALYTICS, 2019).

As diferenças individuais observadas na comparação dos métodos encontram-se normalmente distribuídas e os resultados são concordantes a um nível de confiança de 95%, conforme teste *t* pareado (MILLER; MILLER, 2005). Outros indicadores de exatidão do procedimento proposto são os erros relativos inferiores a 8,4% e o baixo valor de RMSEP estimado, *i.e.*, 0,161. Como as amostras da Tabela 2.1 continham de 2,88% a 4,70% m/v de gordura os resultados obtidos também demonstram a aplicabilidade do procedimento para amostras com grande variabilidade neste parâmetro, além de ser possível detectar diluição indiretamente, com base na determinação de proteínas do leite.

2.5. Conclusão

Um procedimento analítico rápido, de simples execução, ambientalmente amigável e de baixo custo foi desenvolvido tanto para o *screening* de amostras, com base no teor de proteína, quanto para a determinação quantitativa destas espécies em amostras de leite cru e integral, sendo o último pasteurizado ou UHT.

O procedimento proposto utiliza reagentes e equipamentos de baixo custo, além de utilizar um aparato amplamente disponível e acessível como ferramenta de detecção. Além disso, o procedimento apresenta melhor detectabilidade do que a maioria das alternativas analíticas já existentes para a mesma finalidade, normalmente limitadas à identificação de diluições iguais ou superiores a 10% v/v de água. As principais espécies utilizadas para mascarar os efeitos da diluição do leite (*i.e.*, nitrogênio não proteico e mesmo β-caseína) não impedem a triagem de amostras não conformes das conformes. Além disso, o procedimento permite determinações quantitativas da concentração de proteína em amostras de leite, o que foi demonstrado pela concordância dos valores obtidos com o procedimento de referência baseado na utilização da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).

Referências do Capítulo 2 encontram-se ao final desta Tese.

3. Nova estratégia para a determinação de formaldeído em leite explorando imagens digitais adquiridas com *smartphone*[2]

Resumo

O leite é uma importante fonte de proteínas e o consumo deste produto tem aumentado em função das novas evidências de seu papel nutricional e funcional para o ser humano. Entretanto, a qualidade do leite tem sido frequentemente depreciada por adulterações e fraudes, incluindo a adição de formaldeído com o objetivo de mascarar a deterioração do produto e, por consequência, aumentar sua durabilidade. Apesar de relativamente comum, esta prática pode ocasionar sérios danos à saúde dos consumidores. Considerando-se todos estes aspectos, neste capítulo é descrito o desenvolvimento de um novo procedimento analítico que apresenta como principais premissas: baixo custo, elevada frequência analítica, portabilidade e mínima geração de resíduos. O procedimento proposto explora a reação entre o formaldeído e o reagente de Schiff, gerando um produto de coloração violeta, cuja intensidade foi monitorada com a câmera de um *smartphone*. As imagens obtidas foram posteriormente convertidas em valores RGB, utilizando-se um *software* de acesso livre. O preparo de amostra consistiu apenas da precipitação de proteínas em meio ácido e a determinação do analito exigiu apenas poucos microgramas de reagentes. A alternativa proposta apresentou um limite de detecção de 120 µg L^{-1}; resposta linear até 1250 µg L^{-1} formaldeído e precisão estimada em 2% (n = 20). Efeitos de matriz foram desprezíveis, com recuperações de 92 a 106% do analito. A exatidão foi avaliada por meio da comparação com o procedimento de referência baseado em cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção na região do ultravioleta, após derivação química do analito e extração líquido-líquido a baixa temperatura do produto formado. Os resultados foram concordantes a nível de 95%. O procedimento é aplicável a amostras de leites integral, semidesnatado e desnatado, processados termicamente via pasteurização ou por esterilização comercial (UHT).

Palavras-chave: Fraudes em alimentos; Adulteração em alimentos; Química analítica limpa; *Food defense*.

---

[2] Capítulo referente ao artigo publicado: SILVA, A.F.S.; GONÇALVES, I.C.; ROCHA, F.R.P. Smartphone digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. **Food Control**, 125, 107956, 2021. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.107956.

Abstract

Milk is an important source of protein and its consumption has gained relevance because of new evidences of its nutritional and functional roles for humans. On the other hand, milk quality has been impaired by tampering, including the addition of formaldehyde to mask product deterioration and increase its shelf life, although this substance may cause harm to consumers. Considering these aspects, a novel, fast, greener, portable, and cost-effective method was proposed for the determination of formaldehyde in milk. The method relies on the monitoring of the product formed upon the reaction between formaldehyde and the Schiff reagent by smartphone-based digital image colorimetry, followed by the conversion of the images into RGB values using a free application software. Sample preparation was based in a simple protein precipitation in acidic medium and analyte determination required only a few micrograms of reagents. The proposed method achieved a limit of detection as low as 120 μg L^{-1} formaldehyde with a linear response up to 1250 μg L^{-1} and good precision (CV = 2%, n = 20). Recoveries of formaldehyde spiked milk samples were within 92–106%, thus showing that matrix effects were negligible after protein precipitation. The accuracy was assessed using a reference procedure (HPLC with UV detection) after analyte derivatization and low temperature liquid–liquid extraction, and the results statistically agreed at a 95% confidence level. The procedure is applicable to whole, semi-skim, and skim milk samples processed using pasteurization or ultra-heat treatment (UHT).

Keywords: Food fraud; Food tampering; Green analytical chemistry; Food defense.

3.1. Introdução

O leite é um alimento essencial em função de seu alto valor nutricional, seja na garantia da ingestão diária de proteínas, seja pelo suprimento de minerais, vitaminas e lipídeos (ESKIN; GOFF, 2013). Além disso, esse alimento encontra-se amplamente disponível em todo o mundo e apresenta um custo relativamente baixo, quando comparado à outras fontes de proteínas animais, vegetais ou até mesmo fontes alternativas, como as proteínas de algas (JOSHI; KUMAR, 2015).

Recentemente, tem se observado um aumento do interesse em estudos sobre o leite, o que se traduz na acentuada quantidade de trabalhos disponíveis na literatura. Vários aspectos relevantes para a ciência do leite e derivados têm sido identificados, tais como investigação das alergias alimentares e das funções bioativas de proteínas e peptídeos do soro do leite, desenvolvimento de alimentos sintéticos ou de base vegetal análogos ao leite, assim como o desenvolvimento de novas alternativas para monitorar a autenticidade e rastrear fraudes alimentares neste produto (ESTEKI et al., 2019; MOORE; SPINK; LIPP, 2012; MUSCOGIURI et al., 2020; PAUL et al., 2020; YANG et al., 2020a).

A fraude em alimentos é um tema de grande preocupação em todo o mundo e apresenta relevância nas esferas científica, industrial e governamental, em função dos riscos que podem representar à saúde humana e dos prejuízos econômicos que podem gerar à cadeia de alimentos (ESTEKI et al., 2019). Esses fatos vêm motivando o desenvolvimento, implementação e atualização de novas tecnologias na indústria de alimentos. O *blockchain* e a internet das coisas (IoT) são exemplos de tecnologias recentes que estão sendo implementadas por indústrias em todo o mundo para identificar, monitorar e compartilhar informações sobre fraude em alimentos (WANG et al., 2020). Além disso, vários bancos de dados dedicados a fraudes em alimentos vêm despontando como soluções de tecnologia para mitigá-las, podendo ser exemplificados: o *Economic Motivated Adulteration* (EMA), o *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) e o Decernis (BOUZEMBRAK; MARVIN, 2016; DECERNIS, 2021), os quais têm se concentrado na identificação, previsão, regulação ou motivação de práticas de fraude em alimentos.

O leite é um dos principais alvos de fraudes alimentares, que ocorrem com o objetivo de aumento do volume (via diluição) ou da vida útil do produto (via adição de

conservantes ou substâncias antissépticas, *e.g.* formaldeído), sendo que, em ambos os casos, se objetiva ganhos financeiros. Além disso, a adição dessas substâncias também pode visar mascarar a qualidade sanitária na produção ou armazenamento do produto (ESTEKI et al., 2019; HANDFORD et al., 2016; SINGH; GANDHI, 2015). Fraudes podem impactar toda a cadeia agroindustrial do leite e seus derivados, demonstrando sua a vulnerabilidade. As regiões do mundo mais atingidas por estas práticas danosas são as mais pobres e aquelas que se encontram em desenvolvimento, conforme identificado e demonstrado em estudos recentes (LEDO et al., 2019; 2020; YANG et al., 2020a; YANG et al., 2020b).

A adição de formaldeído ao leite é proibida em muitos países devido aos efeitos adversos e riscos associados à saúde dos consumidores, incluindo vômitos, diarreia, dermatite, dor abdominal, danos ao fígado e rins e, em casos mais severos, pode ser letal (HANDFORD et al., 2016). Assim, o limite para exposição oral ao formaldeído foi estabelecido em 2,6 mg L^{-1} (OMS, 2017), de acordo com o índice NOAEL (acrônimo em inglês para *No Observed Adverse Effect Level*). Além disso, recomenda-se o constante monitoramento do formaldeído em leite como meio de mitigar fraudes, o que exige a utilização de procedimentos analíticos mais rápidos e práticos.

A determinação de formaldeído em leite é tipicamente realizada por procedimentos baseados em cromatografia líquida (KAMINSKI et al., 1993; RANI; SRIVASTAVA, 2016; REZENDE et al., 2015) ou a gás (BUCKLEY et al., 1986; JEONG et al., 2015). O principal inconveniente desses procedimentos relaciona-se com a necessidade de uma etapa de limpeza (*clean up*) da amostra, geralmente por extração líquido-líquido, e da derivação química do analito, visando gerar produtos mais adequados para o processo de separação e detecção. Essas etapas reduzem a frequência analítica e tornam os procedimentos opções menos sustentáveis sob o ponto de vista ambiental. Outros procedimentos utilizados para a determinação de formaldeído baseiam-se em colorimetria, como os testes de Hehner ou do ácido cromotrópico (SINGH; GANDHI, 2015), com limitações quanto à toxicidade dos reagentes empregados, alta acidez do meio reacional, limitada sensibilidade e baixa seletividade. No caso do teste do ácido cromotrópico, algumas limitações adicionais são a necessidade de uma etapa de aquecimento e um moroso procedimento de preparo da amostra (BRASIL, 2006).

Procedimentos analíticos alternativos que objetivam maior rapidez, menor consumo de reagentes e determinação de baixas concentrações de formaldeído em leite foram relatados na literatura. Uma destas alternativas consiste de um sistema em fluxo envolvendo microextração líquido-líquido dispersiva utilizando um líquido iônico como extrator (NASCIMENTO et al., 2015). Esse procedimento alcançou um LOD de 100 µg L^{-1}, uma frequência analítica de 10 amostras h^{-1}, e baixo consumo do solvente extrator (*ca.* 120 µL por determinação). Por outro lado, frequências analíticas superiores (72 amostras h^{-1}) foram alcançadas utilizando um procedimento de análise por injeção em fluxo com o reagente fucsina (*p*-rosanilina), porém com aplicabilidade limitada a concentrações relativamente altas de formaldeído, com faixa linear entre 100 e 600 mg L^{-1} (CERDÁN et al., 1992).

Outro procedimento alternativo se baseou na detecção do analito por espectroscopia de reflectância total atenuada no infravermelho médio (ATR-MIR) que, combinado com ferramentas quimiométricas, permitiu a classificação correta de 89,6% das amostras estudadas (BOTELHO et al., 2015). Entretanto, esta abordagem foi restrita a concentrações de formaldeído superiores a 0,5% m/v. Uma limitação adicional de muitos procedimentos para a determinação de formaldeído em leite refere-se à inadequabilidade para determinações *in situ*, o que representa uma demanda relevante e justificável em função da produção de leite envolver várias operações. Tendo em vista essa demanda, Veríssimo et al. (2020) desenvolveram um sensor de fibra óptica revestido com um sal (polioxometalato). As determinações foram baseadas em dados espectrais registrados pelo sensor, monitorados por meio de espectrofotômetro portátil. O procedimento apresentou LOD de 200 µg L^{-1} e uma ampla faixa linear, 600 a 8500 µg L^{-1}, para a determinação do analito.

Métodos analíticos explorando imagens digitais representam uma possibilidade emergente para o setor de alimentos e bebidas, reunindo vantagens como praticidade, análise rápida e baixo custo, contribuindo para a melhoria de processos de rastreabilidade e de autenticação dos alimentos (CHEN et al., 2013). Nesse sentido, destacam-se as medidas colorimétricas adquiridas com a câmera de um *smartphone*, sob iluminação controlada, e a posterior conversão das imagens em dados relativos a um sistema de cores (geralmente RGB) utilizando um *software* apropriado (BÖCK et al., 2020). Dentre as diversas aplicações reportadas, podem ser citadas aquelas voltadas à determinação de adulterantes em leite e derivados, como

tensoativos aniônicos (ACEVEDO et al., 2018), peróxido de hidrogênio (LIMA et al., 2020), determinação simultânea de amido, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio (COSTA et al., 2020), bem como a detecção de adulteração de leite por diluição, via determinação do teor de proteínas (SILVA; ROCHA, 2020), descrita no Capítulo 2 desta Tese.

O objetivo deste capítulo consiste no desenvolvimento de um procedimento rápido, de simples execução, de baixo custo e de maior sustentabilidade ambiental para determinar formaldeído em leite. O procedimento se baseia em medidas fotométricas, com a câmera de um *smartphone*, do produto obtido na derivação química do formaldeído utilizando o reagente de Schiff em meio ácido. Para minimização de interferências, uma proposta simples e rápida de preparo de amostra também foi proposta.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ cm) e reagentes de grau analítico (Merck, Alemanha).

Uma amostra de leite integral foi utilizada para a otimização do procedimento de preparo de amostra, que envolveu a avaliação de três estratégias para a precipitação de proteínas: (i) a via salina (efeito *salting out*); (ii) a via do ponto isoelétrico (em que se ajusta o pH ao ponto isolétrico das proteínas) e (iii) a via ácida, em que ácidos são adicionados para promover a remoção dessas macromoléculas.

Na primeira estratégia, foram avaliados os efeitos provocados pelos sais cloreto de sódio, sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) e por uma mistura equimolar de NaCl e Na_2EDTA, na faixa de concentração de 0,2 a 0,5 mol L^{-1}. Na precipitação via ponto isoelétrico, avaliou-se os efeitos provocados por Na_2EDTA 0,25 mol L^{-1} e, no terceiro procedimento, foram avaliados diferentes volumes de HCl 3,0 mol L^{-1}, atingindo-se concentrações finais na faixa de 0,032 - 0,8 mol L^{-1}.

O reagente de Schiff foi preparado em composição semelhante ao descrito nos trabalhos de Martins et al. (2017) e Soares et al. (2019). Assim, 300 mg de cloridrato de *p*-rosanilina e 650 mg de metabissulfito de sódio foram dissolvidos em 5,0 mL de

solução de ácido sulfúrico 1,5 mol L^{-1}. A solução resultante foi levada a um volume final de 100,0 mL utilizando-se água deionizada. O reagente foi armazenado em frasco âmbar, sob refrigeração, por 48h e filtrado previamente ao uso.

Amostras comerciais de leite integral, semidesnatado e desnatado, tanto pasteurizados quanto esterilizados comercialmente pelo processo de UHT, foram adquiridas no comércio local (Piracicaba, SP) para avaliação da aplicabilidade do procedimento proposto.

3.2.2. Equipamentos e acessórios

A precipitação das proteínas do leite foi realizada em tubos de polipropileno tipo Falcon (capacidade de 15 mL) com fundo cônico (Corning®), enquanto a etapa de derivação química e medidas fotométricas foram realizadas em tubos Eppendorf® incolores (capacidade de 1,5 mL).

A detecção do analito foi realizada utilizando um *smartphone* LG K10 Pro (Taubaté, SP, Brasil) equipado com um *software* Android versão 7.1. Utilizou-se a câmera traseira para obtenção das imagens, que apresenta 13 megapixels (resolução de 4128 x 2096 pixels) e abertura de lente de f/2.2. O aplicativo ColorGrab® (Loomatix, versão 3.6.1, 2017) foi utilizado para converter as imagens em valores dos canais RGB. As medidas analíticas foram realizadas em uma área (ROI) de 28 x 28 pixels.

As imagens foram adquiridas em uma caixa de isopor de 18 cm (altura) x 21,5 cm (largura) x 13 cm (profundidade), revestida internamente com papel sulfite branco de gramatura 75 g/cm^2 e adaptada com um orifício na parte superior para inserir os tubos Eppendorf®. O *smartphone* foi fixado em um suporte de modo que sua câmera do permanecesse a uma distância de 10,5 cm do tubo contendo a amostra. Uma lâmpada com 30 LEDs SMD de alto brilho (1,5 W e 3,7 V) equipada com uma bateria de lítio (Kian, São Gonçalo, RJ, Brasil) foi inserida na base da caixa a fim de manter a iluminação ambiente constante e controlada. Um espectrofotômetro UV-visível multicanal (USB4000, OceanOptics®, Dunedin, FL, USA) e uma cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico foram utilizados para aquisição dos espectros de absorção e para avaliar a possível ocorrência de efeitos de matriz.

3.2.3. Procedimento proposto

O procedimento proposto foi executado em duas etapas, sendo a primeira de preparo de amostra e a segunda de derivação química do analito e aquisição dos dados analíticos. A etapa de preparo de amostra envolveu a precipitação das proteínas por via ácida. Assim, 5,00 mL de leite foram transferidos para um tubo Falcon® e, em seguida, adicionou-se 1,6 mL de HCl 3,0 mol L^{-1}. Após agitação da mistura em vórtex por 2 min, a mesma foi centrifugada por 10 min a 2380 rpm (950 g). Em seguida, 0,50 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf® juntamente com 125 µL do reagente de Schiff. As medidas fotométricas do produto violeta foram realizadas diretamente nesses tubos após 35 min de reação. As intensidades da radiação refletida foram convertidas em canais RGB. A Figura 3.1 ilustra as etapas do procedimento nas condições otimizadas.

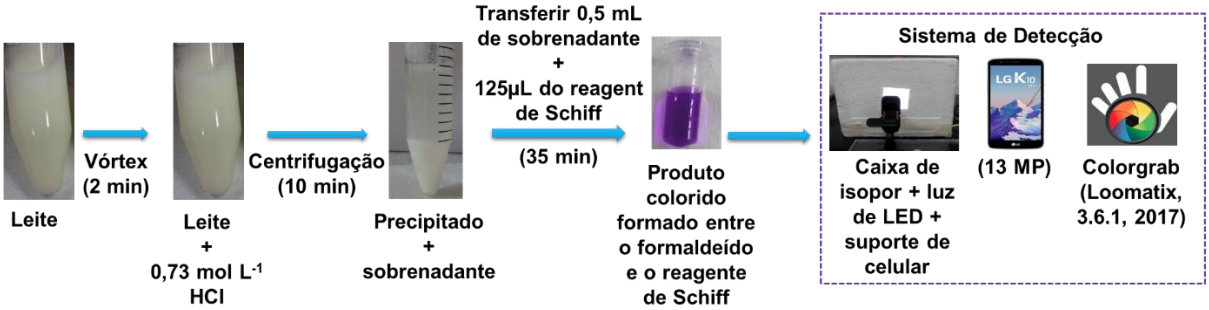


Figura 3.1 - Diagrama esquemático do procedimento proposto indicando as condições experimentais otimizadas.

As medidas registradas para o canal G foram convertidas em sinais analíticos (S) por meio da subtração do canal medido para a amostra do valor (G_0) obtido para o tubo preenchido com água (Equação 1).

$$S = G_0 - G \qquad (1)$$

Em que:

S = sinal analítico

G_0 = valor do canal G obtido para o tubo de medida preenchido com água

G = valores do canal G obtidos para as amostras nos tubos de medida

Os valores experimentais do branco foram obtidos após a execução do procedimento como demonstrado na Figura 3.1, substituindo-se a amostra de leite por solução de água deionizada. Em todos os casos, as medidas foram realizadas em triplicata e sob temperatura ambiente (25 ± 1 ºC). A determinação do limite de detecção foi realizada experimentalmente e utilizando parâmetros de regressão linear descritos na Equação 2 (MILLER; MILLER, 2005).

$$LOD = yb + 3sb \quad (2)$$

Em que:
yb = sinal do branco
sb = desvio padrão do branco

3.2.4. Procedimento de referência

O procedimento de referência, baseado na separação cromatográfica em fase reversa com detecção espectrofotométrica (REZENDE et al., 2017), foi utilizado para a avaliação da exatidão do procedimento proposto. Inicialmente, procedeu-se a derivação química do formaldeído com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura do produto formado.

Um cromatógrafo Shimadzu (Tóquio, Japão) equipado com os módulos: SCL 10 A VP (controlador); SIL 10AF (injetor automático); CTO 10AS VP (forno para controle de temperatura); LC 6 AD (bombas); e um detector espectrofotométrico SPD M10A VP foi utilizado nas medidas. Para a separação cromatográfica, utilizou-se uma coluna cromatográfica C18 ODS de dimensões 250 x 4,6 mm recheada com partículas de 5 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), com uma coluna de guarda de 2 cm. Foi utilizada eluição por gradiente, com fase móvel composta de acetonitrila e água (vazão de 1 mL min^{-1}), conforme indicado na Tabela 3.1. A detecção espectrofotométrica foi realizada a 360 nm.

Tabela 3.1 - Composição da fase móvel para a eluição por gradiente no procedimento de referência (REZENDE et al., 2017).

Etapa do gradiente	Proporção de ACN (% v/v)	Proporção de H_2O (% v/v)	Tempo (min)
1	65	35	6
2	90	10	2
3	65	35	4

O volume de amostra injetado foi de 10 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 30ºC. As medidas foram realizadas em triplicata e basearam-se na área dos picos no tempo de retenção de 4,6 min. O procedimento de referência descrito por Rezende et al. (2017) foi validado considerando os parâmetros analíticos descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Parâmetros analíticos de validação do procedimento de referência para determinação de formaldeído (REZENDE et al., 2017).

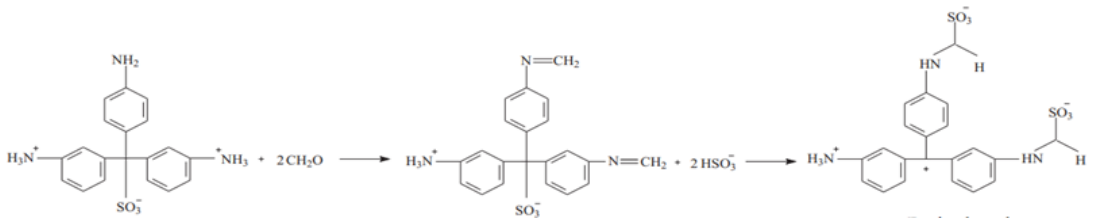
Parâmetro analítico	Resposta
Intervalo de resposta linear (µg L^{-1})	10–400
R^2	0,9999
Limite de Detecção (µg L^{-1})	3
Limite de Quantificação (µg L^{-1})	9
Repetibilidade (%), n = 10	< 2,5
Reprodutibilidade (%), n = 10	< 3,8
Recuperação média[a] (%)	102,2±1,3

[a] Recuperação avaliada para adições de formaldeído em amostras de leite pasteurizado e UHT integral, semidesnatado e desnatado (n = 6).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Aspectos gerais

O método proposto baseou-se na derivação química, em meio ácido, do formaldeído, utilizando o reagente de Schiff (p-rosalinilina e bissulfito), conforme ilustrado na Equação 3. A derivação química é essencial, uma vez que o analito não apresenta grupos cromóforos, o que representa uma limitação para a detecção fotométrica.



(3)

O produto da reação apresenta absorção máxima de radiação na região de 560 nm, que corresponde à máxima absorção no canal G do sistema RGB (cor complementar ao produto formado). De fato, a resposta no canal G correspondeu a *ca.* 70% da variação do sinal monitorado. Foi também observada uma relação linear entre o sinal medido e a concentração de formaldeído no meio, conforme mostrado na Figura 3.2.

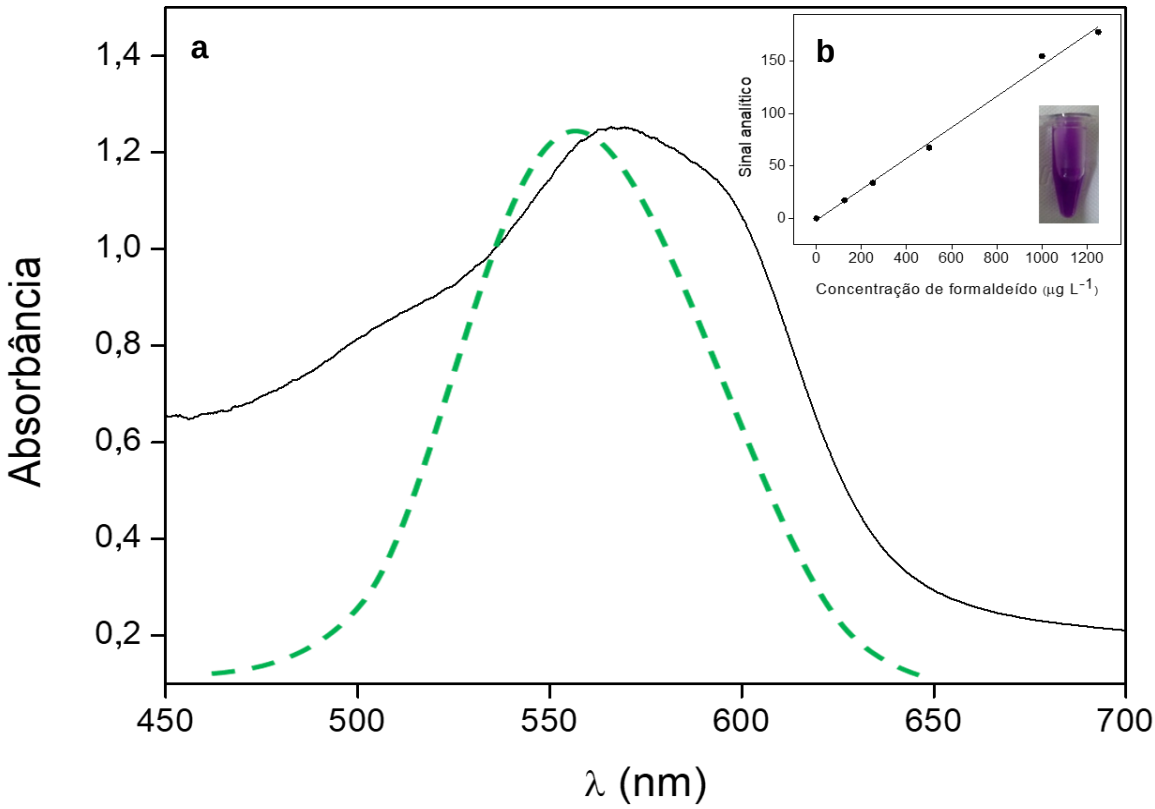


Figura 3.2 - (a) Espectro de absorção do produto derivado da reação entre o formaldeído e o reagente de Schiff (linha preta contínua) em sobreposição à faixa espectral correspondente ao canal G (linha verde tracejada); (b) curva de calibração correlacionando o sinal analítico (G_0-G) e a concentração do analito e imagem do produto no tubo de polipropileno em que as medidas foram realizadas.

Em condições apropriadas, a reação de Schiff apresenta boa seletividade para formaldeído, conforme demonstrado em várias aplicações, por exemplo, nas áreas ambiental, de cosméticos e de alimentos (HLADOVÁ et al., 2019; MARTINS et al., 2017). Contudo, alguns trabalhos na literatura mostram a aplicação de uma reação similar para a determinação de caseína em leite (MCDOWALL; MCDOWELL, 1936; PYNE, 1932). Com relação a essa aplicação, já foi reportada a interferência de ácidos graxos, sobretudo dos insaturados (KASTEN, 1960), além da possibilidade de avaliação do grau de oxidação de lipídios explorando o reagente de Schiff (AWASTHI et al., 2018; XIE et al., 2020). Em conformidade com essas informações, foram observadas interferências na determinação direta de formaldeído em leite. O efeito pode ser observado na Figura 3.3 (I e II), assim como os resultados da estratégia de preparo da amostra baseada na precipitação de proteínas em meio ácido (Figura 3.3 III).

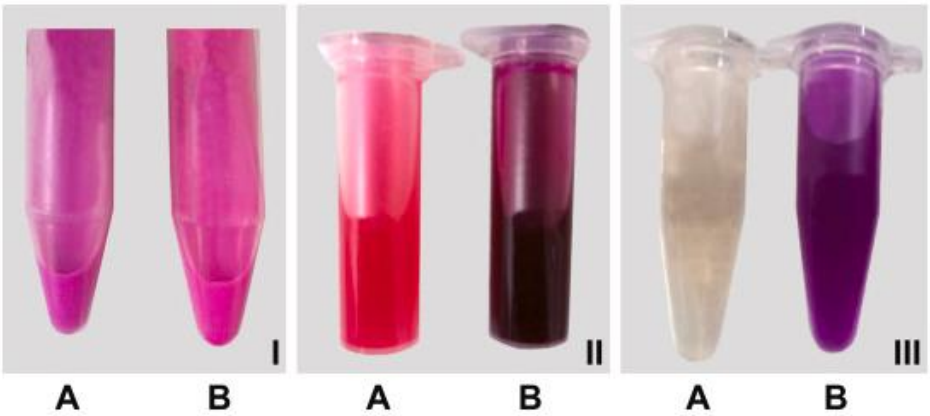


Figura 3.3 - Fotografias ilustrando a interferência provocada pela caseína no procedimento analítico proposto: (I) imagens adquiridas em amostra de leite, sem preparo de amostra, sem (A) e com (B) a adição de 500 µg L^{-1} de formaldeído; (II) imagens adquiridas em solução aquosa de β-caseína 3,3% m/v sem (A) e com (B) adição de 500 µg L^{-1} de formaldeído; (III) amostra de leite integral, após a precipitação de proteínas, sem (A) e com (B) adição de 500 µg L^{-1} de formaldeído.

3.3.2. Precipitação de proteínas

Conforme discutido no item anterior, a etapa de precipitação das proteínas é essencial para a minimização de interferências nas medidas analíticas. Nesse contexto, a precipitação das proteínas foi avaliada considerando os efeitos de *salting out* (adição de sal em excesso) e de ponto isoelétrico (neste caso, em pH = 4,6).

A precipitação via salina não foi eficiente para nenhum dos sais avaliados, ou seja, NaCl e Na_2EDTA, o que foi evidenciado pela presença de partículas remanescentes suspensas no sobrenadante, mesmo após centrifugação. A condição que possibilitou a obtenção de um sobrenadante mais límpido ocorreu quando se utilizou uma solução salina equimolar composta por NaCl + Na_2EDTA a 0,3 mol L^{-1}. Para a precipitação via ponto isoelétrico, foram também observadas algumas partículas no sobrenadante. Nessas condições, persistiram as interferências nas medidas analíticas, levando à conclusão de que tais procedimentos não eram apropriados para o preparo de amostra.

Precipitações quantitativas das caseínas e geração de sobrenadantes translúcidos ocorreram por meio da precipitação ácida, quando se atingiu a concentração final de HCl de 0,73 mol L^{-1} (*i.e.*, 5,0 mL de amostra + 1,6 mL de HCl 3,0 mol L^{-1}), que é muito superior àquela necessária para atingir o ponto isoelétrico das caseínas (pH 4,6). Muitos trabalhos da literatura demonstram que esta concentração de HCl é eficiente para a precipitação quantitativa de proteínas (FUCHS et al., 2011; IYIOLA et al., 2019; LI et al., 2013) e, quando se associa o processo de centrifugação, a ressuspensão das caseínas, que poderia ocorrer em função da acidez do meio, foi evitada (DAMODARAN; PARKIN, 2017; ESKIN; GOFF, 2013).

Outra vantagem proporcionada pela combinação de meio ácido com o processo de centrifugação foi a desestruturação da emulsão do leite, resultando também na separação das gorduras. Dessa forma, as gorduras se concentraram na fase superior do sobrenadante no formato de discos e as proteínas foram precipitadas no fundo do tubo. Esses fenômenos são ilustrados na Figura 3.4.

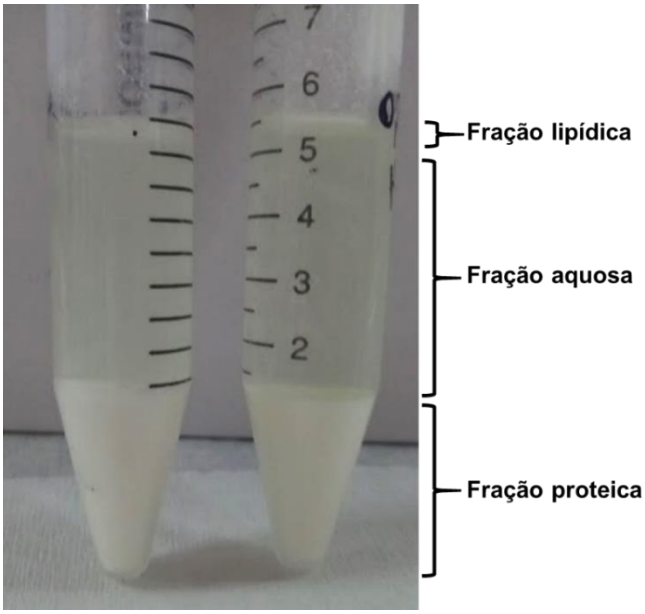


Figura 3.4 - Aspecto visual da separação provocada pela adição de HCl na amostra após a etapa de centrifugação. No fundo do tubo encontram-se as proteínas, na parte superior o disco de gordura e a fase aquosa intermediária contém o analito.

A centrifugação é essencial para acelerar o processo de separação de fases e os parâmetros: tempo de centrifugação (variando de 1 a 30 min) e velocidade de rotação (variando de 19 a 1940 g) foram avaliados de modo univariado. A melhor condição foi obtida quando se aplicou 950 g por 10 min, em concordância ao reportado em trabalhos anteriores que também objetivavam a precipitação quantitativa de proteínas (REZENDE et al., 2015; SILVA; ROCHA, 2020). Após a separação, uma alíquota do sobrenadante foi coletada para utilização no processo de derivação química do analito.

3.3.3. Derivação química

A reação de Schiff foi utilizada para a derivação do formaldeído em um produto com absorção de radiação na região visível. Alguns fatores podem afetar a formação dos produtos derivados da reação e, por este motivo, o volume do sobrenadante, o volume de reagente, a composição do reagente de Schiff e o tempo de reação foram avaliados com o objetivo de maximizar a resposta analítica. A concentração do reagente de Schiff foi fixada nas condições experimentais previamente exploradas por Martins et al. (2017) e Soares et al. (2019). Os efeitos dos parâmetros otimizados nesta etapa são mostrados na Figura 3.5.

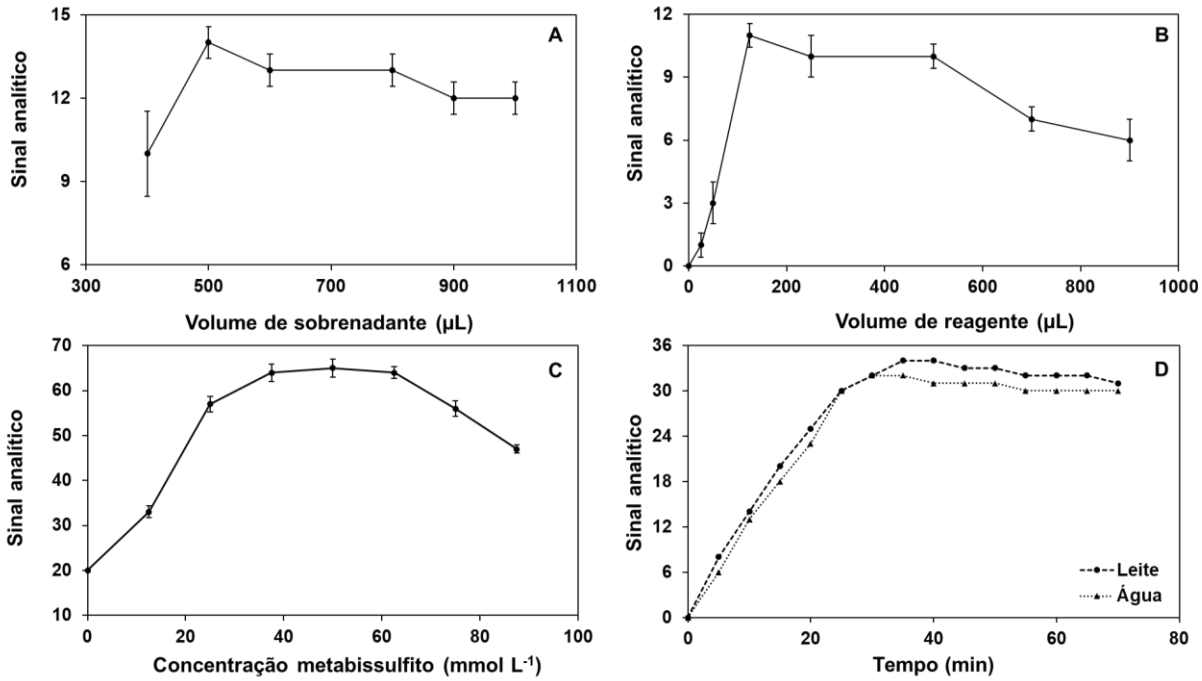


Figura 3.5 - Otimização univariada do procedimento analítico. Efeito de (A) volume de sobrenadante; (B) volume de reagente de Schiff; (C) concentração de metabissulfito de sódio e (D) tempo de reação na resposta analítica (n = 3). Todos os experimentos foram realizados com soluções contendo 250 µg L^{-1} de formaldeído, exceto em C, em que foi utilizado 500 µg L^{-1} de formaldeído.

Conforme observado na Figura 3.5A e Figura 3.5B, a resposta analítica foi máxima quando foram utilizados 500 µL de sobrenadante e 125 µL de reagente de Schiff. Adicionalmente, é possível observar que as respostas analíticas não foram afetadas significativamente pelo volume de sobrenadante; entretanto, ao utilizar volumes de reagente superiores a 125 µL observou-se uma diminuição do sinal analítico ocasionada pela diluição da amostra. Outro destaque importante é que a precisão das medidas fotométricas foi afetada significativamente quando um volume de sobrenadante < 500 µL foi utilizado (CV = 15% para volume de 400 µL), como indicado na Figura 3.5A, o que pode ser explicado em função da projeção da sombra do menisco na área utilizada para captura das imagens.

A composição ótima do reagente de Schiff (*p*-rosanilina e metabissulfito de sódio em meio ácido) depende do aldeído a ser determinado. Trabalhos anteriores com foco na determinação de formaldeído em amostras diversas demonstraram o efeito da concentração de metabissulfito, recomendando desde a ausência (DAPSON, 2016; KASTEN, 1960) até concentrações tão elevadas quanto 10 mol L^{-1} (KASTEN, 1960). Assim, efeito da concentração desta espécie também foi

avaliado e observou-se que a resposta analítica foi até 3 vezes maior com a adição de metabissulfito ao reagente, conforme mostrado na Figura 3.5C. Foi escolhida a menor concentração do sal que proporcionou a maior intensidade do sinal analítico (*i.e.*, 40 mmol L^{-1}). Essa observação experimental é concordante com o descrito em trabalhos anteriores para determinação de formaldeído, onde foram recomendadas concentrações entre 28 e 48 mmol L^{-1} (KRAMM; KOLB, 1955 *apud* KASTEN, 1960).

Além de reduzir o consumo de ácido sulfúrico, outras vantagens de se adicionar metabissulfito ao reagente de Schiff são o aumento da velocidade da reação com formaldeído e a possibilidade de se conduzir a reação à temperatura ambiente, evitando a volatilização do analito, tornando o procedimento mais prático e minimizando o gasto energético (DAPSON, 2016; KASTEN, 1960). Kasten (1960) destaca a importância de utilizar o metabissulfito em proporção estequiométrica à concentração do analito, uma vez que, em excesso, o reagente leva à formação de um produto incolor e supressão do sinal analítico. Esse efeito foi também observado neste trabalho, quando foram utilizadas concentrações superiores a 60 mmol L^{-1} (Figura 3.5C).

O efeito do tempo de reação na formação do produto foi avaliado tanto em amostra de leite, quanto em solução aquosa, sendo que o estado estacionário foi obtido para ambos os casos após 35 min de reação (Figura 3.5D). Esse tempo de reação é concordante com aqueles recomendados em procedimentos que objetivaram determinar sulfitos em diversas matrizes utilizando-se uma reação análoga (GUIDO, 2016). É importante destacar que, em algumas circunstâncias, a determinação qualitativa de formaldeído é suficiente, uma vez que essa espécie não deve estar presente em leite. Nesse caso, é desnecessário aguardar 35 min para que a reação atinja seu estágio estacionário, uma vez que a cor do produto formado já é visível após 5 min da adição do reagente para concentrações de formaldeído iguais ou superiores a 500 µg L^{-1}.

3.3.4. Características analíticas e aplicação

Conforme observado na Figura 3.5D, o tempo de estabilização para formação do produto foi semelhante em solução aquosa e em leite. Esse fato indica que os efeitos de matriz foram desprezíveis, após a etapa de tratamento da amostra. A ausência de efeitos de matriz foi confirmada a partir da comparação das inclinações

das curvas analíticas obtidas com (0,150 ± 0,007 L μg^{-1}) e sem (0,149 ± 0,007 L μg^{-1}) a matriz da amostra (125 a 1250 µg L^{-1} de formaldeído, r = 0,997). Esses resultados confirmam a eficiência do pré-tratamento da amostra e demonstram a possibilidade de emprego da calibração externa para determinação do analito. Este último aspecto representa uma grande vantagem para a aplicação do procedimento em análises de rotina.

Nas condições otimizadas, a resposta linear do procedimento foi de 125 a 1250 µg L^{-1} de formaldeído, descrita pela equação S = (0,149 ± 0,007) C - (3 ± 5), r = 0,997, em que S representa o sinal analítico (ou seja, G_0-G) e C representa a concentração de analito (µg L^{-1}). O LOD foi estimado avaliando-se a mínima concentração de formaldeído distinguível do branco, a um nível de confiança de 95%. O resultado experimental (LOD = 120 µg L^{-1}) concordou com aquele estimado usando os parâmetros de regressão linear, ou seja, 116 µg L^{-1} (MILLER; MILLER, 2005). Outras características analíticas do método são: coeficiente de variação de 2% (250 µg L^{-1} formaldeído, n = 20) e frequência analítica de 10 amostras h^{-1}. Essa frequência analítica é maior que a obtida em procedimentos cromatográficos (KAMINSKI et al., 1993; REZENDE et al., 2017), especialmente considerando-se as etapas de preparo de amostra.

O procedimento foi aplicado a amostras de leite de diferentes tipos e processamentos: integral, semidesnatado e desnatado, via pasteurização ou por esterilização comercial UHT. Em todos os casos, observou-se o mesmo sinal analítico (*i.e.*, S = 174 ± 2) após a adição de 1250 µg L^{-1} de formaldeído às amostras.

O procedimento proposto foi aplicado à para determinação de formaldeído em amostras de leite comercial adicionadas de 400 µg L^{-1} do analito. As recuperações obtidas variaram de 92 a 106% (Tabela 3.3) e corroboraram a conclusão sobre efeitos de matriz negligenciáveis.

A exatidão foi avaliada comparando-se os resultados do procedimento proposto com aqueles obtidos pelo procedimento de referência baseado em cromatografia a líquido (REZENDE et al., 2017), Tabela 3.3. Os resultados obtidos foram avaliados por meio de um teste t pareado (*t* calculado = 1,632 e *t* crítico = 2,571) e se mostraram estatisticamente concordantes a nível de 95% de confiança. As variâncias foram também comparáveis, de acordo com o teste F (nível de confiança de 95%), e os erros relativos foram inferiores a 10%.

Tabela 3.3 - Recuperações e avaliação da exatidão do procedimento proposto em comparação com o procedimento de referência (Rezende et al., 2017) para amostras adicionadas de 400 µg L^{-1} de formaldeído (média ± desvio padrão, n = 3).

Amostra	Procedimento proposto		Procedimento de referência		F *
	Concentração (µg L^{-1})	Recuperação (%)	Concentração (µg L^{-1})	Recuperação (%)	
1	369±15	92±4	375±6	94±1	6,2
2	402±34	101±8	420±15	105±4	5,1
3	410±7	102±2	408±11	102±3	2,5
4	402±34	101±8	446±44	112±11	1,7
5	397±12	97±4	407±6	102±1	9,0
6	415±4	106±4	415±12	104±3	1,6

*F crítico = 19.

As principais características analíticas do procedimento proposto para determinação de formaldeído em amostras de leite foram comparadas às de outros procedimentos (Tabela 3.4). O procedimento desenvolvido representa uma alternativa econômica, portátil, mais limpa e de fácil execução, além de estar alinhado aos objetivos e diretrizes dos novos modelos de sistemas alimentares, que exploram a importância da transformação digital no setor agropecuário (FAO, 2020).

O limite de detecção do procedimento foi comparável àquele obtido utilizando microextração líquido-líquido dispersiva (NASCIMENTO et al., 2015) e superior à maioria dos procedimentos relatados anteriormente (BOTELHO et al., 2015; CERDÁN et al., 1992). Dessa forma, o procedimento possibilita a determinação de formaldeído em concentrações inferiores àquelas que provocam danos à saúde dos consumidores.

Quando comparado com outros métodos espectrofotométricos, o procedimento proposto é bastante vantajoso. Embora possibilitem a determinação quantitativa e evitem o consumo de volumes elevados de reagentes tóxicos (como na determinação via ácido cromotrópico), muitos procedimentos espectrofotométricos se limitam à determinação de concentrações de *ca.* 1% de formaldeído (CERDÁN et al., 1992;

BRASIL, 2006). Considerando-se a capacidade de realização de análises *in situ* em níveis de detecção comparáveis aos do procedimento proposto, alguns trabalhos descritos apresentam limitações quanto à utilização de reagentes mais tóxicos, como acetonitrila e 2,4-dinitrofenilhidrazina (GUPTA et al., 2019), ou à necessidade de construção de sensor óptico (VERÍSSIMO et al., 2020), cuja estabilidade a longo prazo ainda carece de comprovação.

Dentre os procedimentos avaliados, o método de referência utilizando separação cromatográfica (REZENDE et al., 2017) alcançou o LOD mais baixo (3 µg L^{-1}), embora apresente limitações quanto ao maior custo, necessidade de instrumentação mais complexa e de uma etapa de preparo de amostra com derivação química e *clean-up* que requerem de 8 a 12 h para execução (KAMINSKI et al., 1993; REZENDE et al., 2017).

Tabela 3.4 - Características analíticas de procedimentos para determinação de formaldeído em leite

Parâmetro analítico	Procedimento proposto	Procedimento de referência (Rezende et al., 2017)	Teste do ácido cromotrópico (Brasil, 2006)	Imageamento digital (Gupta et al., 2019)	Sensor de fibra óptica com detecção espectrofotométrica (Veríssimo et al., 2020)
Técnica analítica	Fotometria por imagens digitais	Cromatografia	Ensaio qualitativo	Fotometria por imagens digitais	Espectrofotometria
Modo de detecção	Reflectância	UV-DAD	Visual	Reflectância	Absorbância
Limite de detecção (µg L^{-1})	120	3	> 1000	310	200
Faixa linear (µg L^{-1})	125-1250	10-400	Não avaliado	250-4000	600-8500
Precisão (%RSD)	2	3,8	Não avaliado	3,5	N.I.
Volume de amostra (mL)	5	2,5	100	N.I.	6
Consumo de reagentes por determinação* (massa)	HCl (175 mg) p-rosanilina hidroclórica (0,37 mg) $Na_2S_2O_5$ (0,8 mg) H_2SO_4 (0,9 µg)	HCl (0,73 mg) DNPH (0,5 mg) Acetonitrila (10,4 g)	H_3PO_4 (0,2 g) H_2SO_4 (0,35 g) Ácido cromotrópico (8 mg)	Acetonitrila DNPH N.I.	1,0 g ácido tricloroacético NH_4OH (para ajustar o pH para 6,0-6,5)
Volume de resíduo gerado por determinação (mL)*	8,3	15,7	257	N.I.	59
Necessidade de controle de temperatura (tempo)	Não	- 4 ºC (*overnight*)	Banho maria (15 min)	Não	Não
Aplicável a análises *in situ*	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Frequência analítica (amostra h^{-1})	10	7	4*	N.I.	N.I.

* Estimado a partir de dados disponíveis nos trabalhos consultados. N.I. = Não informado.

3.4. Conclusão

O procedimento proposto é uma alternativa analítica para a determinação de formaldeído em leite, visto que permite a quantificação de concentrações na ordem de µg L^{-1} e apresenta outras vantagens como: aspectos de sustentabilidade (baixo consumo de amostra e de reagente e geração de resíduos), portabilidade, baixo custo e elevada frequência analítica, quando comparado aos procedimentos baseados em cromatografia. Outro destaque importante é o preparo de amostra simples, explorando precipitação de proteínas em meio ácido, com consequente separação de gorduras. Esse tratamento de amostra possibilitou o emprego da calibração externa, uma vez que efeitos de matriz foram desprezíveis.

O procedimento é aplicável a amostras de leite integral, semidesnatado e desnatado, independentemente do tipo de tratamento térmico executado no mesmo (*i.e.*, pasteurização ou UHT). O LOD (120 µg L^{-1}) foi adequado para monitorar o adulterante em concentrações mais baixas do que aquelas que podem provocar efeitos adversos à saúde dos consumidores.

A alternativa proposta é viável para o monitoramento de fraudes por adição de formaldeído em qualquer etapa da cadeia agroindustrial do leite, sobressaindo-se das alternativas convencionais que geralmente requerem instrumentação complexa e/ou morosas etapas de preparo de amostra, o que limita sua aplicabilidade. As características do procedimento proposto estão alinhadas ainda às demandas relacionadas à segurança alimentar e contribuem para aumento da rastreabilidade da produção do leite.

Referências do Capítulo 3 encontram-se ao final desta Tese.

4. Alternativa analítica para a triagem de amostras de leite bovino a partir da determinação simultânea de proteína e gordura[4]

Resumo

O leite é alimento muito vulnerável a fraudes e adulterações precificado, tradicionalmente, pelo sistema de pagamento por qualidade, que considera os teores de proteína e gordura. A maior parte dos procedimentos analíticos para a determinação dessas espécies apresenta limitações técnicas ou em virtude da indisponibilidade instrumental. Assim, este capítulo descreve uma nova alternativa analítica para a triagem de amostras de leite bovino baseada na determinação simultânea de proteínas e gorduras. O procedimento desenvolvido é baseado no efeito do etanol no leite, que provoca tanto a precipitação das proteínas quanto a extração das gorduras. As medidas analíticas foram baseadas na massa de proteína precipitada e do volume mínimo de água necessário para provocar turbidez no extrato etanólico. A massa de precipitado (que variou de 0,1036 ± 0,0072 a 0,1134 ± 0,0068 g) não diferiu significativamente para os tipos de amostra de leite avaliados, uma vez que o teor de proteína é padronizado industrialmente para *ca.* 3,0% m/v. Em relação ao volume de água, obteve-se como resultado 64 ± 5 µL para leite integral (3% m/v de gordura) e 104 ± 5 µL (1% m/v de gordura) para leite semidesnatado. Cartas de controle de qualidade foram exploradas para a triagem das amostras, considerando os teores de proteína e gordura. Todas as amostras foram corretamente classificadas quanto ao teor de gordura (100% de especificidade e sensibilidade). Para proteína, obteve-se 100% de especificidade e 75% de sensibilidade. O único reagente necessário no procedimento é o etanol (800 µL de solução 92,8% v/v), o que caracteriza a proposta como uma alternativa analítica limpa. O procedimento proposto é simples, rápido e de baixo custo, sendo adequado para a triagem de amostras de leite em relação à conformidade com o padrão de proteína e gordura, parâmetros de grande importância para caracterização do produto ao longo da cadeia produtiva.

Palavras-chave: Fraude em alimentos; Adulteração em leite; Laticínios; Efeito caotrópico; Precipitação de proteínas; Cartas de controle de qualidade.

---

[4] Capítulo referente ao artigo publicado: SILVA, A.F.S.; GODOY, B.B.R.; GONÇALVES, I.C.; MARTINS, L.C.; ROCHA, F.R.P. Novel analytical approach for screening milk based on fast and environmentally friendly determination of the protein and fat content. **Journal of Food Composition and Analysis**, 104, 104178, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104178.

Abstract

Milk is very vulnerable to fraud and it is generally priced by the protein and fat contents. Most analytical alternatives available for determining these species show limitations concerning technical aspects or instrumental unavailability. So, a novel analytical alternative for screening milk samples based on simultaneous determination of protein and fat contents is proposed. The procedure relies on the effect of ethanol in milk, which causes both protein precipitation and fat extraction. The analytical measurements are based on the precipitated mass (protein content) and the amount of water needed to make the ethanolic extract turbid (fat determination). The amount of water was determined by microtitration of the extract, resulting in (64 ± 5) µL for whole milk (3% m/v fat) and (104 ± 5) µL for skim milk (1% m/v fat). On the other hand, the mass of precipitate (from 0.1036 ± 0.0072 to 0.1134 ± 0.0068 g) did not differ significantly for these milk types, which is expected because the protein contents are standardized to ca. 3.0% m/v. Quality control charts were exploited for sample screening, achieving specificity and sensitivity rates of 100% for fat and, 100% and 75% for protein, respectively. Ethanol (800 µL of 92.8% v/v solution per determination) is the only reagent needed, showing the environmental friendliness of the approach. The proposed procedure is then suitable for fast and cost-effective screening of milk samples, aiming at detection of non-conformities in the most important quality parameters of bovine milk at different stages of the production chain.

Keywords: Food fraud; Milk adulteration; Dairy products; Chaotropic effect; Protein precipitation; Quality control charts.

4.1. Introdução

O leite de vaca é uma das fontes de proteína de alta qualidade mais acessíveis, em todo o mundo, o que pode ser explicado pela combinação de fatores como o relativo baixo custo de aquisição do produto; alta disponibilidade, em função de uma produção capilarizada e composta, essencialmente, por produtores da agricultura familiar; e a alta aceitação pelo mercado consumidor, seja pelo consumo do produto fluido ou de seus derivados (MONTGOMERY et al., 2020; ROY et al., 2020). Entretanto, historicamente, o leite é objeto de fraudes sendo os primeiros relatos datados de documentos greco-romanos (CREW, 2020) e, atualmente, é considerado um dos alimentos mais fraudados e suscetíveis às fraudes em todo o mundo (HANDFORD et al., 2016). Este tipo de conduta ilegal, muitas vezes criminosa, deve-se à motivação econômica, condições fitossanitárias inadequadas, programa de boas práticas mal implementado ou de execução incorreta, e alta complexidade da cadeia produtiva, em função de ser altamente segmentada e compostas por vários agentes até que o produto esteja disponível ao consumidor final (MONTGOMERY et al., 2020; SPINK et al., 2017).

O programa de pagamento do leite está, geralmente, baseado na avaliação do padrão microbiológico e da composição química do produto, especialmente os teores de proteínas e gorduras (DRAAIYER et al., 2009; ISO, 2020). Ainda atrelada a esta política de pagamento, diversas iniciativas foram adotadas para bonificar produtores que apresentam um produto com maior teor de gordura, determinado perfil de ácidos graxos, ou que apresente um padrão higiênico-sanitário do tipo premium, caracterizado pelas baixas contagens de células somáticas e totais no produto (BOTARO et al., 2013; DRAAIYER et al., 2009). Um exemplo é a nova proposta de pagamento de leite no Brasil, que se baseia no teor e composição de sólidos (proteínas, gorduras e lactose). O novo modelo de pagamento pode beneficiar os pequenos e médios produtores, uma vez que a precificação dependerá da qualidade nutricional do produto e não somente do volume comercializado. Este modelo de pagamento entrou em vigor em 2020, com o laticínio Verde Campo, localizado em Minas Gerais (AGROURBANO, 2019; MILKPOINT, 2020).

Outro exemplo de inovações no sistema de pagamento é o proposto na França, que se baseia em alternativas analíticas não alvo e de classificação *on-line*. Este

sistema envolve também a implementação de diversas tecnologias no sistema de produção, como meio de garantir a qualidade química e nutricional do leite, além de tornar o processo produtivo mais eficiente (CNIEL, 2021).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) vêm sendo amplamente utilizada como uma ferramenta analítica de apoio à política de garantia da qualidade do leite. Esta aplicação ocorre na prática por meio de regulamentações e normativas propostas por governos nacionais e, também, por órgãos internacionais para garantir a segurança do produto em relação ao comércio internacional (CNIEL, 2021). As diretrizes para a análise de leite por NIR são definidas pela norma ISO 21543 (ISO, 2020), sendo um dos pré-requisitos a execução das análises em laboratórios certificados e acreditados. Este pré-requisito limita a sua aplicabilidade no Brasil, uma vez que, atualmente, apenas 11 laboratórios são credenciados e acreditados para execução das análises (CBQL, 2021).

Além do procedimento de referência, outras alternativas analíticas baseadas em NIR vêm sendo propostas para aplicação no setor de laticínios. Alguns exemplos são: (i) a proposta de avaliação qualitativa do perfil de ácidos graxos em leite (COPPA et al., 2010); (ii) avaliação de autenticidade de leites orgânicos utilizando um espectrômetro portátil (LIU et al., 2018); (iii) identificação de fraude em leite de cabra, por mistura com leite bovino (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2021) e (iv) avaliação do desempenho de um sensor NIR portátil na classificação de amostras de leite, em função dos teores de proteína, gordura e lactose (RIU et al., 2020). Todas estas propostas analíticas apresentam vantagens, sobretudo em relação à possibilidade de avaliação multianalito, utilizando um preparo de amostra mínimo e, em muitos casos, inexistente. Além disso, por serem compatíveis com técnicas de aprendizagem de máquinas, que podem ser utilizadas para o reconhecimento de padrões, estas alternativas analíticas possibilitam procedimentos de triagem mais rápidos, confiáveis e rastreáveis (MUÑIZ; CUEVAS-VALDÉS; ROZA-DELGADO, 2020; ZHANG et al., 2014). Entretanto, ainda há muitas lacunas nestes procedimentos como, por exemplo, a possibilidade de mascarar o teor de proteínas por meio da adição de soro de leite e/ou outros compostos nitrogenados, como a melamina, uma vez que a capacidade de discriminação dos procedimentos para estes compostos é limitada (YANG et al., 2020a). Além disso, há dificuldades em relação à necessidade de instrumentos e técnicas de análises mais sofisticadas, com ferramentas quimiométricas e estratégias de mineração de dados, como alternativas analíticas para mitigação das fraudes.

Entretanto, essas alternativas podem encontrar limitações de ordem prática, que vão desde os custos de implementação até a análise dos dados, limitando a aplicabilidade prática, sobretudo, em regiões economicamente mais desfavorecidas, que concentram fragilidades nas cadeias de alimentos (SPINK et al., 2017). Assim, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas para superar estas limitações, que vão desde o desenvolvimento e implementação de práticas educacionais focalizadas às necessidades dos agentes envolvidos na cadeia de laticínios (LEDO et al., 2021) até a aplicação de procedimentos analíticos mais simples e adequados às análises *in situ*.

Procedimentos analíticos alternativos aplicados às necessidades da indústria de leite e com baixo impacto ambiental vêm sendo desenvolvidos, especialmente envolvendo detecção fotométrica. Podem ser citados como exemplos a identificação de fraude em leite por diluição (Capítulo 2 desta Tese), a detecção de adição de surfactantes em leite (ACEVEDO et al., 2018) e a determinação de substâncias com ação conservante em leite, como formaldeído (Capítulo 3 desta Tese) e peróxido de hidrogênio (LIMA et al., 2020). Além disso, outras aplicações de baixo custo alinhadas à química limpa incluem o desenvolvimento de procedimentos utilizando dispositivos de detecção produzidos em papel, como o procedimento desenvolvido por Luther et al. (2017) para a determinação de adulterantes em leite, o procedimento para a determinação de formaldeído em leite e produtos lácteos (MARTINS et al., 2017) e o procedimento qualitativo baseado em *spot test* para a identificação de antibióticos em leite cru (RYAN et al., 1986). Ainda no escopo de procedimentos de baixo custo, instrumentos portáteis também vêm sendo desenvolvidos, como o fotômetro LED para a determinação de ureia em leite explorando a reação de Berthelot (SUAREZ et al., 2018).

Além disso, ferramentas de controle de qualidade também estão sendo exploradas na indústria de leite e derivados para complementar os métodos não-alvo que vêm sendo amplamente explorados. Cartas de controle são ferramentas de gestão da qualidade de produtos e processos industriais, muito utilizadas na indústria de alimentos (HUBBARD, 2003). Esta ferramenta foi proposta no início do século XX por Walter Shewhart e amplamente difundida por Edwards Deming, quando utilizou o conceito para implementação do ciclo PDCA (acrônimo em inglês para: Planejar – Fazer – Checar – Agir) para controle de processos industriais (BEST; NEUHAUSER, 2006; PRATA et al., 2020). O principal objetivo das cartas de controle é analisar e

identificar a variabilidade de processos (PRATA et al., 2020; LIM et al., 2015). São exemplos desta integração, a utilização de cartas de controle para avaliar a autenticidade de leite de cabra (TEIXEIRA et al., 2020), para controlar a qualidade do leite em relação à contagem de células somáticas (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2020) e como ferramenta de apoio ao desenvolvimento de um novo método analítico para determinação de fosfolipídios em produtos lácteos (FERRARIS et al., 2020).

O objetivo deste capítulo é o desenvolvimento de uma estratégia simples, de baixo custo e alinhada aos princípios da química limpa para a triagem de amostras de leite, simultaneamente, em função dos teores de gordura e de proteína no produto. Os procedimentos desenvolvidos exploram os efeitos da adição de etanol em leite, *i.e.*, precipitação de proteínas e extração de gordura. A determinação de gorduras explorou as diferenças de solubilidade de lipídios em água e etanol, enquanto a determinação de proteínas foi baseada na massa de precipitado.

4.2. Materiais e Métodos

Os equipamentos utilizados para a execução do procedimento proposto foram uma mini centrífuga (BSC 1006, Benchmark Research Products Inc., Roebling, NJ, United States), tubos de polipropileno incolores (MCT-200-C, 2 mL, Axygen Scientific, Mexico) e uma balança analítica (Mettler Toledo, Brazil).

Água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ cm) foi utilizada para o preparo das soluções etanólicas. Foram também utilizados etanol anidro (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e hidratado 92,8% v/v (Flop’s, Pederneiras, SP, Brasil).

As amostras de leite integral (n = 10) e semidesnatado (n = 10) foram adquiridas no comércio local (Piracicaba, SP, Brasil) e foram previamente analisadas pelos procedimentos de referência descritos no item 4.2.3. Em seguida, estas amostras foram analisadas pelo procedimento proposto (itens 4.2.1 e 4.2.2) e classificadas em função do teor de proteínas e de gordura utilizando cartas de controle, construídas com base nas concentrações de ambos componentes regulamentadas pela Legislação Brasileira (2018).

O procedimento proposto foi otimizado utilizando um modelo experimental univariado, com experimentos em triplicata. As variáveis avaliadas foram: volume de amostra; concentração de etanol; volume de etanol e tempo de centrifugação. A rotação da centrífuga foi mantida fixa em 6600 rpm (2000 g).

4.2.1. Determinação de gordura

Para o procedimento de triagem com relação ao teor de gordura, a 250 µL de leite adicionou-se 800 µL de etanol 92,8% v/v e, após agitação, a mistura foi centrifugada a 6600 rpm, durante 10 min. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante (extrato etanólico) foi transferida para um tubo de polipropileno de 2 mL de volume. Então, um procedimento semelhante à microtitulação foi executado, adicionando-se alíquotas de 10 µL de água deionizada ao extrato, até a observação de turvação do extrato etanólico. A Figura 4.1 ilustra o procedimento realizado.

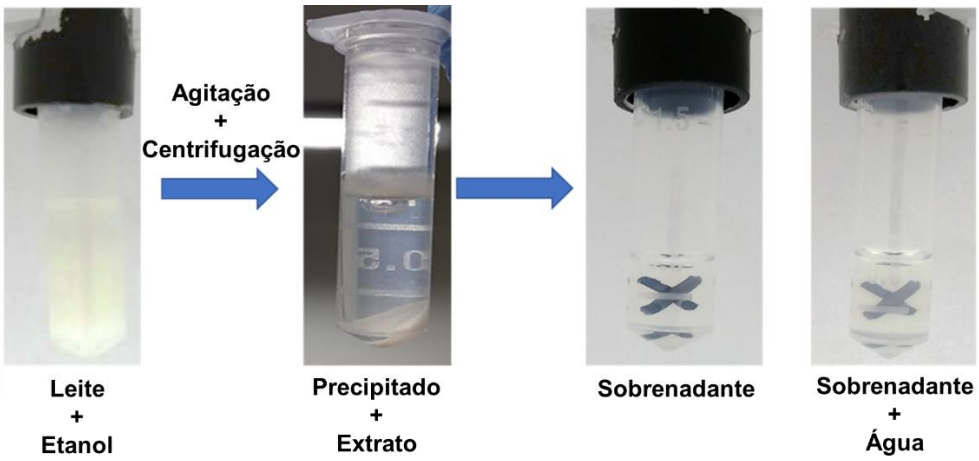


Figura 4.1 - Esquema do procedimento para a determinação de gordura em leite.

A classificação das amostras foi realizada utilizando-se a estratégia de cartas de controle, sendo que os limites foram definidos de acordo com o intervalo de gordura de 0,6 a 3,6% m/v. Em todos os casos, as medidas foram realizadas a temperatura ambiente (25 ± 1 ºC).

4.2.2. Determinação de proteína

A determinação de proteína foi realizada a partir da massa do precipitado gerado após a execução do procedimento. Assim, uma alíquota de 250 µL de leite foi transferida para um tubo de polipropileno de 2 mL, ao qual adicionou-se 800 µL de solução de 92,8% v/v de etanol. Após a mistura e centrifugação a 6600 rpm por 10 min, todo o sobrenadante foi removido e o precipitado obtido foi pesado, ainda úmido. O resultado final foi calculado a partir da diferença de massa medida

considerando a massa média dos tubos vazios (1,040 g, CV = 0,5%, n = 50) e a massa dos tubos contendo o precipitado. A Figura 4.2 ilustra o procedimento realizado.

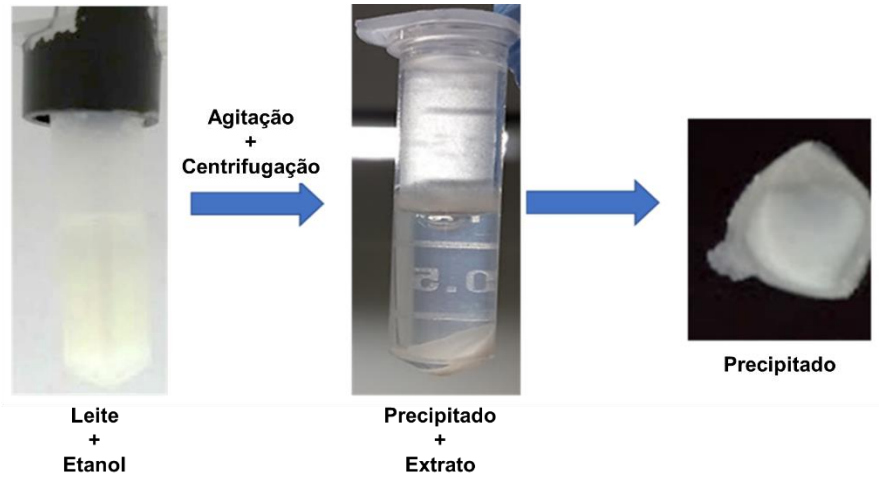


Figura 4.2 - Ilustração do procedimento para a determinação de proteína em leite.

A classificação das amostras também foi realizada utilizando-se a estratégia de cartas de controle, sendo que, neste caso, os limites foram definidos de acordo com o intervalo de concentração de proteínas determinado nas amostras de leite pelo procedimento de referência (2,63 a 3,15% m/v), representando o intervalo de concentração mínimo e máximo de proteínas nas amostras. Em todos os casos, as medidas foram realizadas a temperatura ambiente (25 ± 1ºC).

4.2.3. Procedimentos de referência

Com a finalidade de avaliar a exatidão do procedimento proposto, amostras de leite cru (n = 5) foram analisadas previamente pelo protocolo IDF 201:2020 (ISO, 2020) o qual se baseia em medidas por espectroscopia no infravermelho próximo e posterior classificação da amostra de acordo com um modelo quimiométrico, estabelecido após um protocolo de calibração e validação. Embora não haja um modelo único, a IDF 201:2020 (ISO, 2020) recomenda a utilização de modelos de calibração de regressão linear múltipla (MLR), regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), regressão localmente ponderada (LWR) ou redes neurais artificiais (ANN), também apresentando diretrizes para a validação dos modelos. As análises foram realizadas na Clínica do Leite (Piracicaba, SP, Brasil), laboratório que pertence à rede de laboratórios de referência para avaliação da qualidade do leite, credenciado

pelo Conselho Brasileiro da Qualidade do Leite (CBQL, 2021). Estas amostras foram também utilizadas para construir os limites das cartas de controle utilizadas no estudo, sendo que todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Amostras comerciais de leite integral e semidesnatado foram previamente analisadas pelos métodos de Babcok (CECCHI, 2003) e Kjeldahl (BRASIL, 2013) para a determinação de gordura (n = 20) e de proteína (n = 16), respectivamente, com o objetivo de avaliar a eficiência do método de triagem proposto. Em todos os casos, as determinações foram realizadas em triplicata.

O método de Babcock é baseado na extração exaustiva das gorduras da amostra utilizando ácido sulfúrico e água aquecida (CECCHI, 2003). O procedimento é executado a partir da adição de 8,5 mL de ácido sulfúrico 95% m/v a 17,6 mL de leite, em um butirômetro de Babcock. Após homogeneização da mistura, adiciona-se novamente 8,5 mL de ácido sulfúrico. As amostras são, então, centrifugadas a 60ºC por 5 min e, em seguida, adiciona-se água destilada até que a mesma atinja o menisco do butirômetro. O procedimento é repetido e utiliza-se a média dos resultados.

O método Kjeldahl para a determinação de proteínas consiste na digestão da amostra com conversão dos compostos orgânicos nitrogenados em amônio, destilação de amônia e absorção em solução ácida e titulação da solução aceptora (BRASIL, 2013). No presente trabalho, foi utilizado um procedimento miniaturizado (micro-Kjeldahl), executado utilizando 2 g de amostra de leite, 7 mL de ácido sulfúrico 96% m/v e 2,5 g de uma mistura composta por sulfato de potássio e sulfato de cobre(II), na proporção 10:1. A mistura é submetida à digestão a 450ºC e, após a conclusão desta etapa, o tubo é acoplado ao destilador. Em seguida, adiciona-se 20 mL de uma solução 50% m/v de hidróxido de sódio ao digerido e o vapor destilado é coletado em um Erlenmeyer contendo 20 mL de ácido bórico 4% m/v e algumas gotas de uma solução indicadora, composta por vermelho de metila e verde de bromocresol. A solução indicadora é preparada dissolvendo 0,132g de vermelho de metila e 0,060g de verde de bromocresol em 200 mL de etanol 70% v/v.

A solução aceptora é, então, titulada utilizando uma solução padronizada de ácido sulfúrico (0,05 mol L^{-1}) e o teor de nitrogênio determinado é multiplicado por um fator de correção específico para cada tipo de proteína, sendo 6,38 no caso das proteínas do leite.

4.2.4. Cartas de controle

As cartas de controle foram construídas a partir de modelos univariados e de duas classes, utilizando como parâmetros de classificação o teor de proteínas e gorduras. Os dados utilizados para a construção das cartas de controle e estabelecimento das classes foram obtidos experimentalmente e consideraram a faixa aceitável para cada parâmetro considerando o padrão de identidade do leite descrito pela Legislação brasileira (BRASIL, 2018a). A Tabela 4.1 mostra os teores de gordura esperados para cada tipo de amostra, enquanto o teor de proteína é padronizado em 3% (m/v).

Tabela 4.1 - Faixas de concentração esperadas para gordura em leite bovino fluido, de acordo com a Legislação brasileira (BRASIL, 2018a). A concentração de proteína esperada, em todos os casos, é ≥ 3,0 % m/v

Tipo de leite	Gordura (% m/v)
Integral	≥ 3,0
Semidesnatado	0,6–2,9
Desnatado	≤ 0,5

Considerando as faixas de concentração para os parâmetros já mencionados, amostras de referência de leite cru (n = 5) foram previamente analisadas pelo método de referência (ISO, 2020) para estabelecer os intervalos de classe em que as amostras de leite integral e semidesnatado seriam, posteriormente, classificadas. A única exceção foi em relação à faixa de concentração de 0,6% m/v de gordura, que não puderam ser preparadas pela diluição de amostras de leite cru. Neste caso, uma amostra de leite semidesnatado (contendo 1% m/v de gordura) foi utilizada e o teor de gordura foi determinado pelo método de Babcock (2003). Os intervalos de classe foram estabelecidos considerando 95% de nível de confiança. O modelo estabelecido levou em consideração as faixas mínimas (*i.e.*, limite inferior de controle, LIC) e máximas (*i.e.*, limite superior de controle, LSC) esperadas para cada parâmetro avaliado. As equações 1 e 2 mostram como o cálculo de LSC e LIC foi realizado.

LSC (1)

(média das amostras + sd) + (e.p.m.% x *k*)

LIC (2)

(média das amostras – sd) + (e.p.m.% x *k*)

Em que:

sd = desvio padrão

e.p.m.% = erro padrão da média, calculado a partir da relação: $(sd/\sqrt{n})*100$, em que sd = desvio padrão das medidas e número de amostras

k = 2, considerando 95% de confiança

A proposta de triagem foi validada utilizando os indicadores analíticos: taxa de sensibilidade e taxa de especificidade. A taxa de *sensibilidade* (T_S) é definida como a probabilidade de um procedimento classificar corretamente uma amostra testada como positiva, quando esta é um verdadeiro positivo; enquanto a taxa de *especificidade* (T_E) corresponde à probabilidade de um procedimento classificar como um verdadeiro negativo quando esta é um verdadeiro negativo (TRULLOLS et al., 2004). As equações 3 e 4 descrevem como esses parâmetros foram calculados.

$$T_s = 100 \times t_p / t_{vp} \quad (3)$$

Em que:

t_p = amostras classificadas como positivas

t_{vp} = total de amostras verdadeiramente positivas

$$T_E = 100 \times t_n / t_{vn} \quad (4)$$

Em que:

t_n = amostras classificadas como negativas

t_{vn} = total de amostras verdadeiramente negativas

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Aspectos gerais

O procedimento desenvolvido é baseado na avaliação simultânea de dois parâmetros de qualidade do leite, também utilizado para a precificação do produto. Em sistemas emulsionados, como é o caso do leite, solventes, como o etanol, podem exercer diferentes papéis no meio, como alterar a conformação das micelas, a estrutura da emulsão e, até, remover componentes como lipídeos (DAY et al., 2017; de KRUIF; HUPPERTZ, 2012). Especificamente no caso estudado, o etanol promove tanto um efeito sobre as proteínas do meio (já que se trata de um agente caotrópico), diminuindo sua solubilidade, quanto promove a extração das gorduras da emulsão (DAY et al., 2017; de KRUIF et al., 2012; de KRUIF; HUPPERTZ, 2012).

Em relação ao efeito da interação etanol-gorduras cabe destacar que cerca de 70% das gorduras do leite são compostas por ácidos graxos saturados (C4 a C18, sendo que cerca de 25% destes correspondem aos ácidos graxos de cadeia curta, *i.e.*, C4-C10) e, em uma menor extensão, também apresenta ácidos graxos monoinsaturados, como C18:1, e poli-insaturados, como C18:3, que apresentam funções benéficas no organismo, como efeito anti-inflamatório (MÅNSSON, 2008; ZOU et al., 2013; ELLIS et al., 2006). Esses ácidos graxos são altamente solúveis em solventes orgânicos, como o etanol, mas apresentam baixa solubilidade em água (PUBCHEM, 2021), o que favorece a extração em etanol e viabiliza o procedimento proposto, baseado na diminuição da solubilidade mediante a adição de água ao extrato. De fato, o etanol se mostrou bastante eficaz para extrair os ácidos graxos do leite e, a adição progressiva de água, promoveu a turbidez no meio, associada à diminuição da solubilidade das gorduras extraídas no extrato. O volume de água necessário para provocar esta turbidez é inversamente proporcional ao teor de gordura no leite. Além da capacidade de solubilizar a fração lipídica do leite, o etanol pode levar à agregação de micelas de caseína, que correspondem a 80% das proteínas do leite, levando à precipitação das proteínas suspensas (BOTARO et al., 2013; HEWEDI et al., 1985; YE; HARTE, 2013).

O procedimento proposto foi otimizado com o objetivo de obter um sobrenadante translúcido após a adição do solvente e centrifugação. Isto é um indício da precipitação quantitativa das caseínas do leite, produzindo uma massa de

precipitado proporcional à concentração dessas proteínas, assim como um extrato apropriado para a estimativa do teor de gordura. Os parâmetros experimentais avaliados, assim como as condições otimizadas, encontram-se descritos na Tabela 4.2. Os resultados observados em cada condição analítica avaliada são apresentados na Figura 4.3.

Tabela 4.2 - Parâmetros analíticos avaliados na otimização do procedimento proposto

Parâmetros analíticos	Faixa avaliada	Condição otimizada
Volume de amostra (µL)	25–350	250
Volume de etanol (µL)	500–1000	800
Concentração de etanol (% v/v)	75,0–99,9	92,8–95,0
Tempo de centrifugação (min)	2–15	10

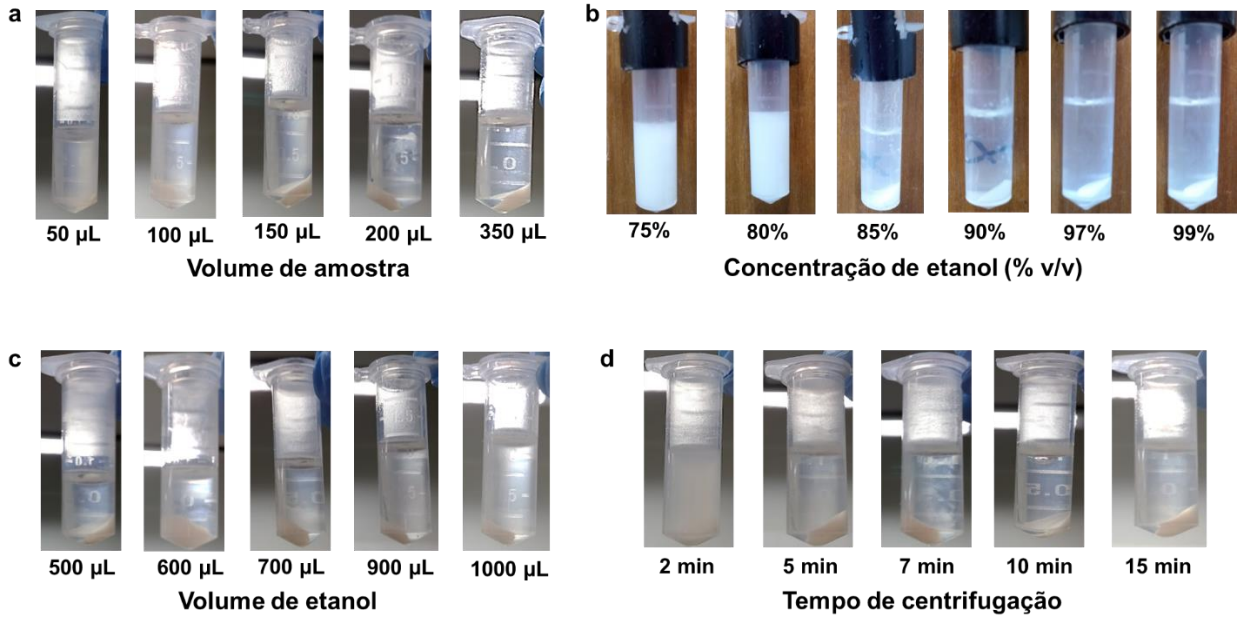


Figura 4.3 - Aspecto visual da mistura leite-etanol nas diferentes condições experimentais avaliadas para otimização do procedimento. (a) Efeito do volume de amostra avaliado com a adição de 800 µL de etanol 95% v/v; (b) Efeito da concentração de etanol avaliado com 250 µL de amostra e 800 µL de solução etanólica; (c) Efeito do volume de etanol e do tempo de centrifugação avaliados com 250 µL de amostra e solução de etanol 95% v/v. (d) Efeito do tempo de centrifugação (6600 rpm) avaliado com 250 µL de amostra e 800 µL de solução etanólica 95% v/v. Nos demais experimentos, o tempo de centrifugação foi mantido constante em 10 min.

Observou-se experimentalmente (Figura 4.3a) que baixos volumes de amostra (50 e 100 µL) produziram um sobrenadante turvo e sem a formação de precipitado. A turbidez observada impede a determinação de gordura, assim como a ausência de precipitado impede a determinação de proteínas considerando a proposta apresentada. A turbidez relaciona-se com o excesso de solvente extrator em relação à concentração de proteínas no meio. A proporção entre ambos é fundamental para alterar o arranjo das micelas de caseínas e produzir seus agregados com íons de cálcio e, por consequência, gerar a precipitação quantitativa destas sob a forma de caseinatos de cálcio (HEWEDI et al., 1985). A formação de precipitado foi observada a partir de 150 µL de amostra e a obtenção de um sobrenadante límpido apenas para volumes de amostra superiores a 250 µL.

Sobrenadantes turvos também foram observados quando foi utilizado 97% v/v de etanol (Figura 4.3b), uma vez que baixa disponibilidade de água afeta drasticamente a solubilidade da lactose (MAJD; NICKERSON, 1976). Açúcares dissacarídeos, como a lactose, apresentam baixa solubilidade em etanol e a utilização de etanol anidro é uma maneira eficiente para cristalização, sendo considerada uma estratégia de purificação simples e de baixo custo para remoção da lactose, como no caso dos leites com teor reduzido e/ou zero lactose (MAJD; NICKERSON, 1976; MACHADO et al., 2000; BUND; PANDIT, 2007; WONG; HARTEL, 2014). Neste sentido, a lactose poderia ser um interferente no procedimento proposto, sendo coprecipitada com a proteína e, também, aumentando a turbidez do extrato, afetando a determinação de gorduras. Para confirmar esse efeito, uma solução aquosa de lactose 5% m/v (concentração esperada do açúcar em leite) foi misturada a etanol anidro, executando-se o mesmo procedimento descrito para as amostras de leite. Foi possível recuperar 77 ± 2% do açúcar como precipitado e o restante promoveu a turvação do extrato, confirmando que concentrações elevadas de etanol não são apropriadas para execução do procedimento proposto.

Sobrenadantes translúcidos e recuperações quantitativas de proteínas foram obtidos quando foi utilizada solução 95% v/v de etanol, concordando com observações experimentais de Hewedi et al. (1985). Resultados semelhantes foram observados quando se utilizou solução comercial de etanol 92,8% v/v. Em ambas as concentrações, não foram observadas turvações no extrato, o que sugere que solubilidade da lactose não foi afetada, pois há disponível no meio a concentração mínima de água necessária para garantir a solubilidade do açúcar. De fato, quando o

experimento descrito anteriormente, com solução aquosa de lactose 5% m/v, foi repetido com etanol 95%, não foi observada a formação de precipitado. Ressalta-se que concentrações de etanol inferiores a 90% v/v não foram eficientes para promover a extração das gorduras e precipitação das proteínas do meio, sendo que os extratos obtidos após centrifugação eram turvos, como pode ser observado na Figura 4.3b.

Nos experimentos realizados para otimizar o volume de solvente (Figura 4.3c) adicionado utilizou-se etanol 95% v/v e observou-se que um sobrenadante mais translúcido foi obtido quando foram utilizados volumes superiores a 700 µL. No entanto, a utilização de 1000 µL de solvente gerou extratos turvos, o que pode estar associado à redução da solubilidade da lactose, devido à menor quantidade de água no meio, já que o volume de leite foi mantido constante em 250 µL. Volumes de solventes entre 700 a 900 µL geraram extratos límpidos e precipitação quantitativa, sendo escolhida como condição analítica o volume de 800 µL de etanol 95% (v/v).

Centrifugação (Figura 4.3d) foi explorada para acelerar a precipitação das proteínas. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos com 10 min de centrifugação, o que é concordante com trabalhos anteriores em que a precipitação das proteínas ocorreu por via salina (SILVA; ROCHA, 2020) ou por acidificação (SILVA; GONÇALVES; ROCHA, 2021).

Nas condições otimizadas, o procedimento proposto para a determinação simultânea de proteína e gordura foi avaliado para leite integral e semidesnatado. Observaram-se diferenças significativas nos volumes de água necessários para a promover a turvação de 500 µL do extrato, enquanto o mesmo não foi observado para a concentração de proteínas (Tabela 4.3). Isto pode ser explicado pelo procedimento industrial de padronização dos leites quanto ao teor de proteína, sendo que a classificação dos mesmos difere em relação à concentração de gordura no produto (GAUR et al., 2018).

Tabela 4.3 - Determinações experimentais para os parâmetros gordura e proteínas para leites integral e semidesnatado. Médias seguidas dos respectivos desvios, para determinações em triplicata de 10 amostras

Leite	Determinação de gorduras		Determinação de proteínas	
	% m/v de gorduras[a]	Volume de água adicionado (µL)	% m/v de proteína[a]	Massa do precipitado úmido (g)
Integral	3,0	64±5	3,1	0,113±0,007
Semidesnatado	1,0	104±5	3,0	0,104±0,007

a. Valores rotulados.

4.3.2. Determinação de gorduras

A composição dos tipos de leite processados (*i.e.*, integral, semidesnatado ou desnatado) é regulada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo que a principal diferença é a concentração de gordura. Neste sentido, espera-se uma concentração de, pelo menos, 3% m/v de gordura em leites do tipo integral e de 0,6% a 2,9% m/v de gorduras para leites do tipo semidesnatado e menos de 0,5% m/v para leite desnatado (BRASIL, 2018b).

A ideia inicial para este trabalho era explorar um procedimento de microtitulação, já explorado por Soares e Rocha (2020) para a determinação de biodiesel em misturas de diesel, em que o sobrenadante obtido seria a solução titulada e a água deionizada, o titulante. Entretanto, ao executar o procedimento observou-se que, após a adição da primeira gota da solução titulante, já era observada turvação na solução titulada, indicando que o limite de solubilidade dos ácidos graxos tinha sido ultrapassado. A fim de resolver este problema experimental e simplificar o procedimento analítico, resolveu-se avaliar a possibilidade da adição progressiva de alíquotas de 10 µL de água deionizada no extrato, utilizando uma micropipeta volumétrica. A alternativa proposta demonstrou ser uma estratégia mais simples e eficiente, pois observou-se uma relação linear entre o volume de água adicionado (V_a, µL) e o teor de gordura (X_g, % m/v) nas amostras, utilizando soluções preparadas pela de diluição de amostras de leite integral (3,0% m/v de gordura) e semidesnatado (2,0% m/v de gordura), como indicado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Parâmetros analíticos determinados considerando leites do tipo integral e semidesnatado

Leite	Faixa de gordura avaliada (% m/v)	Curva analítica	R
Integral	2,25 a 3,00	$V_a = (-35\pm9)\ X_g + (180\pm22)$	0,920
Semidesnatado	0,72 a 1,00	$V_a = (-300\pm32)\ X_g + (399\pm28)$	0,983

As inclinações negativas observadas nas curvas demonstram que um menor volume de água é necessário para promover a turvação no extrato quando há maior teor de gordura no meio. Para padronizar o procedimento e garantir seu alinhamento à proposta de química limpa, adotou-se o volume mínimo de extrato que permitisse observar a turvação do meio quando a água fosse adicionada. Por este motivo, adotou-se a condição em que se utilizava 500 µL de extrato. A Figura 4.4 apresenta extratos obtidos a partir de amostras de leite integral e semidesnatado antes e após o procedimento de microtitulação.

Figura 4.4 - Sobrenadante antes (esquerda) e após (direita) a adição de água em uma amostra de leite integral (A) e de leite semidesnatado (B). Em A adicionou-se 70 µL de água, enquanto que em B 130 µL.

O procedimento analítico pode ser considerado semiquantitativo e tem como finalidade a triagem de amostras de leite, de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2018b). Para isto, amostras de leite de referência (*i.e.*, 5 amostras de leite cru) foram previamente analisadas pelo procedimento de

referência (NIR), conforme descrito no item 4.2.3 e os resultados obtidos permitiram estabelecer os limites de controle. A Tabela 4.5 reúne os resultados obtidos para amostras de leite comerciais integral e semidesnatado.

Tabela 4.5 - Volumes médios de água e desvios determinados por microtitulação de leites integral e semidesnatado. Limites da carta de controle determinados com 95% de confiança

Tipo de leite	Teor de gordura (% $_{m/v}$)	V_a (µL)	Limites da carta de controle (µL)
Integral	3,6	38±3	LIC: 34
	3,0	64±5	LSC: 80
Semidesnatado	2,4	87±6	LSC: 86
	0,6*	111±7	LIC: 138

* Concentração obtida pela diluição de amostra de leite contendo 1% m/v de gorduras.

No caso do leite desnatado, que apresenta teor de gordura inferior a 0,5% m/v, a determinação do volume de água necessário para promover turvação do extrato foi dificultada pela baixa concentração do analito e observou-se experimentalmente que seriam necessários volumes superiores a 1500 µL. Sob o ponto de vista prático, pode-se dizer que volumes de água superiores a 138 µL indicam que o leite apresenta teor de gordura inferior a 0,6% m/v ou, em outras palavras, que a amostra corresponde a leite desnatado. Eventualmente, isso pode indicar que o leite integral foi adulterado por diluição.

Para a avaliação da eficiência desta proposta amostras comerciais de leite integral (n = 10) e semidesnatado (n=10) foram previamente analisadas pelo procedimento de Babcock (CECCHI, 2003) e, posteriormente, analisadas de acordo com o procedimento proposto e classificadas em função da concentração de gordura. A Tabela 4.6 apresenta os resultados para determinação de gordura das amostras, pelo método de Babcock, e pelo procedimento proposto, indicando os volumes de água necessários para promover a turvação do extrato, enquanto a Figura 4.5 apresenta a carta de controle obtida.

Tabela 4.6 - Características das amostras de leite integral e semidesnatado analisadas, quanto ao teor de gordura. Os procedimentos foram executados em triplicada e consideraram um nível de confiança de 95%

Tipo de leite (número de amostras)	Teor de gordura determinado (% m/v)	V_a (µL)	Limites da carta de controle (µL)
Integral (n = 10)	2,70±0,07 3,30±0,01	73±6 53±6	LIC: 34 LSC: 80
Semidesnatado (n = 10)	1,90±0,07 0,50±0,14	93±6 110±1	LSC: 86 LIC: 138

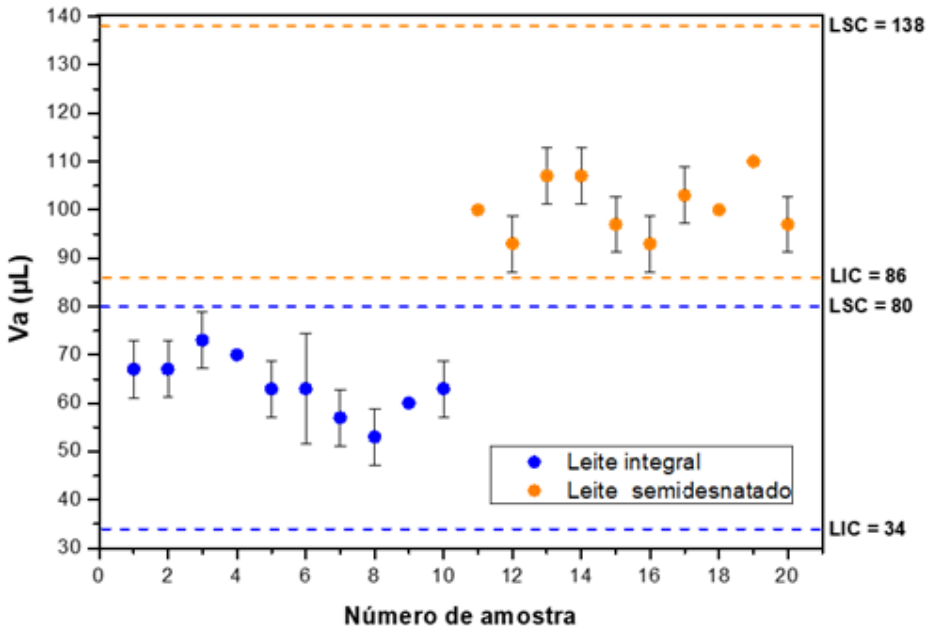


Figura 4.5 - Distribuição das amostras comerciais de leite integral (n=10) e semidesnatado (n = 10)

Na carta de controle (Figura 4.5) é possível observar que todas as amostras foram classificadas corretamente, assim como pode-se observar que, em todos os casos, as amostras avaliadas apresentam variabilidade aceitável entre a concentração de gordura e aquela declarada (BRASIL, 2013). A eficiência da classificação obtida com o modelo proposto foi calculada (conforme descrito no item 4.2.4) utilizando-se os parâmetros: taxa de especificidade e taxa de sensibilidade. Em ambos os casos, obteve-se taxas de 100%, o que indica que todas as amostras foram classificadas corretamente.

O procedimento proposto demonstra ser uma ferramenta eficiente para a distinção entre diferentes tipos de leite (independentemente do processamento térmico realizado), permitindo sua classificação. O procedimento proposto apresenta vantagens em relação a estratégias clássicas já bem estabelecidas e aplicadas com o mesmo propósito na indústria de leite e derivados, como o método de Babcock, pelo fato de apresentar maior simplicidade, praticidade e por ser um procedimento analítico mais limpo (CECCHI, 2003). Outras vantagens que podem ser apontadas para o procedimento proposto são, o baixo custo operacional e o fato de não demandar instrumentação específica, como um butirômetro ou um espectrômetro NIR, além de dispensar tratamento complexo dos dados, podendo ser inserido e executado em qualquer etapa operacional da cadeia de produção do leite.

4.3.3. Determinação de proteínas

A avaliação do teor de proteínas foi realizada explorando-se o efeito caotrópico do etanol em leite, sendo uma alternativa bastante eficiente para a precipitação destas macromoléculas (FOX et al., 2015; HORNE, 2015; HUPPERTZ; DE KRUIF, 2007). Hewedi et al. (1985) demonstraram o efeito caotrópico utilizando solução de etanol 95% v/v, com recuperações de proteínas do leite na ordem de 83 a 85% m/v. O procedimento visava à determinação quantitativa de proteínas totais (*i.e.*, caseínas + proteínas solúveis) no leite. Apesar de obter recuperações superiores a 80%, os autores indicaram que características da matriz afetam o processo de precipitação, que foram determinados em estudos posteriores. Os fatores relevantes foram: (i) a concentração de íons Ca^{2+} no leite, que influenciam diretamente a estabilidade das proteínas suspensas e, em meio alcoólico, favorecem a formação de caseinatos de cálcio, os quais apresentam baixa solubilidade em solução e precipitam (MEZDOUR et al., 2006); (ii) a concentração de estabilizantes adicionados ao leite, sobretudo sais de fosfato, que contribuem para alterar o ambiente iônico do meio, o que favorece a precipitação das proteínas em meio etanólico (HORNE, 2015); (iii) o processamento térmico ao qual as amostras de leite foram submetidas, que pode afetar a estabilidade das proteínas em solução, uma vez que temperaturas altas podem levar à degradação destas macromoléculas (BORAD et al., 2017; van LIESHOUT et al., 2020).

O teor de proteína em diferentes tipos de leite processado é padronizado em 3%. Assim, o procedimento foi executado para amostras de leite integral e semidesnatado obtiveram-se as correlações lineares, expressas pelas Equações 5 e 6. Em ambos os casos, a faixa linear foi de 2,25% a 3,5% m/v de proteínas.

Leite integral (5)

$$\% P = (0{,}0152 \pm 0{,}0008)\ m + (0{,}125 \pm 0{,}002)$$

$$r = 0{,}992$$

Leite semidesnatado (6)

$$\% P = (0{,}010 \pm 0{,}001)\ m + (0{,}131 \pm 0{,}003)$$

$$r = 0{,}991$$

Em que:

% P = teor de proteína, em % m/v

m = massa de proteína precipitada, em g

Ressalta-se que não possível avaliar amostras com menos de 2,25% m/v de proteínas, uma vez que a maior quantidade de água nas amostras afetou a precipitação das macromoléculas (HORNE, 2015; MEZDOUR et al., 2006).

Em seguida, avaliou-se a maneira mais apropriada para estimar o teor de proteínas no leite. Para isto, foram avaliadas as estratégias de pesagem do precipitado úmido, obtido após a remoção de todo o extrato sobrenadante do tubo, e do precipitado após secagem a 70ºC.

As amostras comerciais de leite foram previamente analisadas pelo procedimento de referência micro-Kjeldahl (BRASIL, 2013) e, então, classificadas com base nos limites de controle que foram estabelecidos de acordo com a Legislação, com base nas concentrações esperadas de proteínas no leite (BRASIL, 2018b), conforme apresentado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Massas dos precipitados e limites de controle determinados para proteína em leite, considerando 95% de confiança. Médias seguidas de desvios, considerando experimentos realizados em triplicata

Teor de proteína (% m/v)	Massa de proteína precipitada (g)	Limites de controle (g)
3,15	0,119±0,008	LSC: 0,1312
2,63	0,108±0,008	LIC: 0,1042

Experimentalmente, 4 amostras de leite integral foram identificadas como *outliers*, uma vez que o teor de proteína determinado variou de 1,9 a 2,2% m/v, o que não se encontra em conformidade com a variação aceitável prevista em legislação, que no Brasil é de ± 20% para o teor de nutriente declarado no rótulo (ANVISA, 2020). As demais amostras avaliadas (n = 16) apresentaram teor médio de proteína de 2,8 ± 0,2% m/v, sendo estas utilizadas para classificação na carta de controle da Tabela 4.6. Em todos os casos, observou-se uma variação máxima (estimada por meio do coeficiente de variação) de 13% na massa do precipitado.

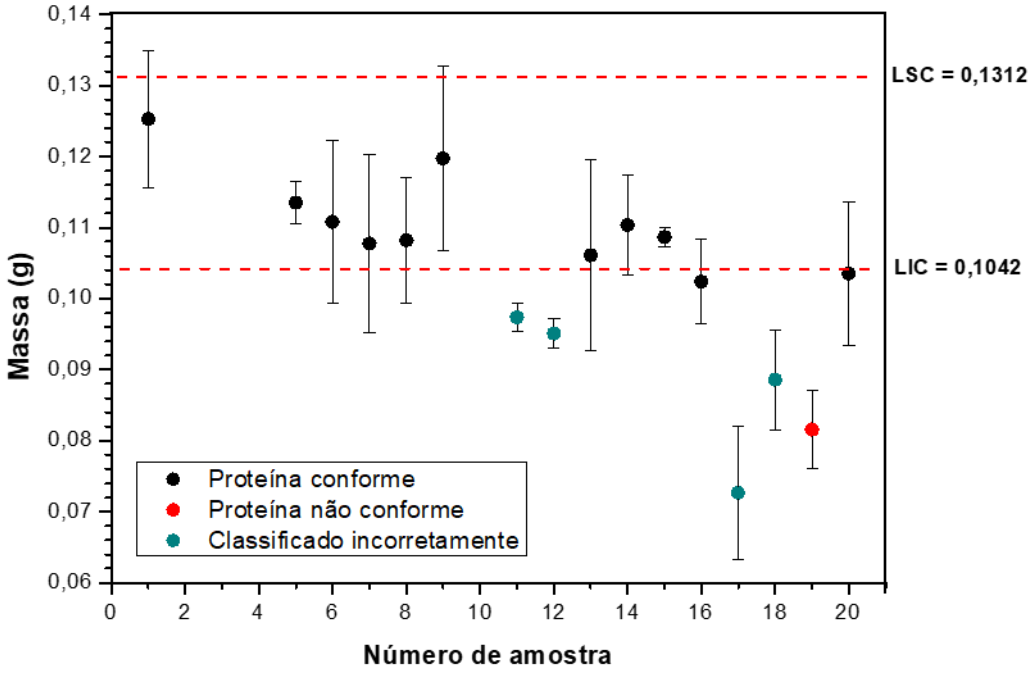


Figura 4.6 - Classificação das amostras comerciais de leite integral (n = 6) e semidesnatado (n = 10), em função dos limites de controle inferior e superior estabelecidos

A interpretação da Tabela 4.6 permite identificar que 4 amostras foram classificadas como não conformes, quando estas são, na verdade, conformes (*i.e.*, falso negativo). A eficiência da classificação também foi avaliada por meio das taxas de especificidade (item 4.2.4) e sensibilidade, que foram, respectivamente, de 100% e 75%. Em todos os casos, as amostras foram submetidas ao tratamento térmico de ultra alta temperatura. Pode-se inferir dos resultados obtidos que o tratamento térmico, a concentração de sais fosfatados (estabilizantes) e a concentração de cálcio são fatores que podem afetar na interação proteínas-etanol e, por conseguinte, na recuperação do precipitado (FOX et al., 2015; HEWEDI et al., 1985).

Ao se comparar o procedimento proposto com estratégias clássicas aplicadas para a determinação de proteínas, como o método de Kjeldahl, nota-se que o mesmo apresenta como vantagens a facilidade de execução, baixa complexidade do preparo de amostras, baixo custo, além de menor impacto ambiental, pois é um procedimento que consome baixo volume de solvente de baixa toxicidade.

Apesar do procedimento apresentar uma taxa de sensibilidade abaixo de 90%, destaca-se que para ser considerada uma estratégia apropriada para triagem de amostras a relação entre sensibilidade e especificidade deve ser de, pelo menos, 1,5 (POWER et al., 2013). Esta relação é calculada a partir da soma entre os índices brutos (ou seja, sem %) de sensibilidade e especificidade, sendo 1,5 o mínimo aceitável e 2 o desejável (POWER et al., 2013). O procedimento proposto obteve relação de 1,75 (sensibilidade = 0,75 e especificidade = 1,00), o que sugere que a proposta analítica é promissora para ser explorada com a finalidade de classificar amostras em conforme e não-conforme. Para isto, entretanto, é necessário ampliar o conjunto amostral de modo que as fontes de variabilidade não aleatórias observadas possam ser minimizadas.

4.5. Conclusão

O procedimento proposto pode ser considerado uma abordagem analítica apropriada para a determinação semiquantitativa de proteínas e gorduras, podendo ser aplicado como uma alternativa para a triagem de amostras de leite, considerando a concentração de ambos analitos. A abordagem proposta pode ser aplicada para o controle de qualidade de matérias-primas, como também em quaisquer outras etapas

da cadeia (campo, transporte e para verificação do produto final) em função da sua facilidade de execução e portabilidade. Além disso, o procedimento também apresenta outras vantagens, tais como rapidez (frequência analítica de 48 determinações h^{-1}), baixo custo operacional e sustentabilidade ambiental, já que são consumidos baixos volumes de amostras e de solvente, o qual apresenta baixa toxicidade.

O preparo da amostra pode ser considerado de baixa complexidade e mostra-se muito eficiente na separação das proteínas e extração das gorduras do leite. O procedimento proposto é aplicável para amostras de leite cru, integral, semidesnatado e desnatado sendo que os três últimos podem ser pasteurizados ou submetidos ao tratamento térmico à ultra alta temperatura. O procedimento desenvolvido se destaca frente às alternativas já existentes para o controle de qualidade do leite e para a detecção de não conformidades no referido produto, permitindo a determinação de dois analitos e dispensando a utilização de instrumentação complexa, contribuindo para a elaboração de estratégias com a finalidade de aumentar a rastreabilidade do produto.

Referências do Capítulo 4 encontram-se ao final desta Tese.

5. Procedimento analítico para predição da qualidade microbiológica de leite explorando determinação de pH por fotometria por imagens digitais

Resumo

Uma nova estratégia analítica foi desenvolvida para a previsão da contaminação do leite por microrganismos, com base em medidas fotométricas de pH. O procedimento proposto se baseia na adsorção do corante vermelho de fenol nas proteínas do leite e formação de produtos de diferentes colorações, em função do pH do meio. As medidas fotométricas foram realizadas com a câmera de um *smartphone* após a adição de 70 µL vermelho de fenol 0,1% m/v em 500 µL de leite. As principais características analíticas do procedimento proposto são: rapidez (frequência analítica de 30 medições h^{-1}), precisão (coeficiente de variação = 2,0%, n = 20), baixo custo, reduzida geração de resíduos (570 µL por determinação) e faixa analítica para determinação quantitativa de pH entre 5,4 e 7,2. O procedimento proposto foi comparado com dois procedimentos de referência baseados em princípios de medida distintos (*i.e.*, espectroscopia no infravermelho próximo, NIR, e potenciometria com eletrodo de vidro) e os resultados foram concordantes a nível de confiança de 95%, com erros relativos inferiores a 2,0 %. As principais substâncias mascarantes utilizadas para neutralizar a acidez do leite (amônia e NaOH) foram investigadas e todas puderam ser identificadas, mesmo quando o pH foi ajustado ao padrão normal (*i.e*., entre 6,60 e 6,80). O procedimento pode ser aplicado para a determinação do pH em amostras de leite cru e processado (integral, semidesnatado e desnatado) e também apresenta potencial para ser aplicado como estratégia de triagem de leite com relação à contaminação microbiológica.

Palavras-chave: Fraude em alimentos; Contaminação microbiológica; Boas práticas de fabricação; Leite ácido; Detecção fotométrica com *smartphone*.

Abstract

A novel assay for photometric pH measurements aiming at the prediction of milk contamination by microorganisms is proposed. The proposed procedure is based on the adsorption of the dye phenol red on the milk proteins, whose color depends on the acidity, and smartphone-based photometric measurements. The proposed procedure is fast (sample throughput of 30 measurements h^{-1}), precise (coefficient of variation of 2.0 %, n = 20), cost-effective, environmentally friendly (570 µL per determination), and it can be applied for pH determination within 5.4 and 7.2. The proposed procedure yielded results in agreement with NIR and potentiometric reference procedures at the 95% confidence level, with relative errors lower than 2.0%. The main substances used to mask the pH of fermented milk (ammonia and sodium hydroxide) could be identified, even when sample pH was adjusted to the expected values (*i.e.*, from 6.60 to 6.80). The procedure can be applied for pH determination of in raw and processed milk samples (whole, semi-skim, and skim milk), showing potentialities to be applied as a screening strategy to predict microbiological contamination of milk samples.

Keywords: Food fraud; Microbiological contamination; Good manufacturing practices; Acid milk; Smartphone-based photometric detection.

5.1. Introdução

O leite é um sistema biológico complexo, sintetizado pelas glândulas mamárias de mamíferas sadias e bem alimentadas, que se apresenta sob a forma de uma emulsão, em que os lipídeos estão dispersos em uma fase aquosa. Neste sistema, as proteínas desempenham um papel fundamental para conferir estabilidade e impedir a separação de fases (ESKIN; GOFF, 2013). O leite é uma das principais fontes de proteínas em função da ampla disponibilidade e, por consequência, baixo custo no mercado (ROY et al., 2020).

A deterioração microbiológica do leite é um dos principais problemas relacionados à validade do produto. A perecibilidade do leite pode ser atribuída a uma combinação de fatores que beneficiam o desenvolvimento de microrganismos, incluindo a alta atividade de água (que no leite varia de 0,95 a 1,00), a disponibilidade de açúcares fermentescíveis (no caso, a lactose) e a faixa de pH, que usualmente varia de 6,60 a 6,80 (ESKIN; GOFF, 2013; ROY et al., 2020). Além das características físico-químicas que favorecem o desenvolvimento de microrganismos, outros fatores que contribuem para a deterioração do leite estão associados à cadeia agroindustrial fragmentada e heterogênea além da importância da higiene ao longo da cadeia de processamento do leite (ÅKERSTEDT et al., 2012; HANDFORD et al., 2016; LEDO et al., 2019; YANG et al., 2019; YANG et al., 2020b). Problemas decorrentes de más práticas de produção, armazenamento ou transporte são frequentemente relatados na literatura e explicam a origem da contaminação do leite (HANDFORD et al., 2016). Aiello et al. (2019) demonstraram que essas más práticas ocorrem mesmo em países desenvolvidos e que a prática de neutralização do pH do leite pode ser entendida sob a dimensão de fraude em alimentos por motivação econômica (*Economic Motivated Adulteration*) (SILVA et al., 2015; HANDFORD et al., 2016).

Muitas estratégias vêm sendo desenvolvidas para avaliar a qualidade do leite com base na conformidade microbiológica. Dentre os ensaios microbiológicos tradicionais, destaca-se o método de referência do caldo vermelho de metila (FDA, 2017). Este procedimento é baseado na fermentação da lactose presente no meio de cultura e, em função da formação ácidos orgânicos, é possível observar a mudança da cor de vermelho para amarelo e também ser avaliada a produção de gás, utilizando o tubo de Durham, como demonstrado na Figura 5.1 (THERMO FISHER, 2011).

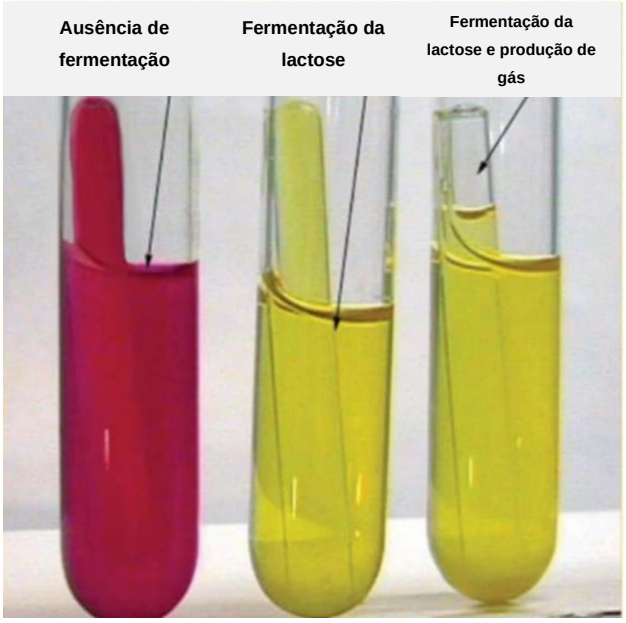


Figura 5.1 - Teste do caldo vermelho de metila, que permite a detecção de contaminação microbiológica utilizando como marcador a acidez do meio. A formação de gás, dependente da(s) espécie(s) de bactérias contaminantes, é ilustrada no último tubo. Fonte: Imagem retirada na íntegra de *Microbiological Notes*. Disponível em: <https://microbiologyinfo.com/phenol-red-fermentation-test/>. Acesso em: 15 abr. 2021

O procedimento do caldo vermelho de metila apresenta como vantagens a possibilidade de predizer a carga microbiana total da amostra e triar as espécies e/ou gêneros de bactérias mais prováveis, sendo um procedimento recomendado para leite e produtos derivados (FDA, 2017; THERMO FISHER, 2011). A principal limitação diz respeito ao tempo necessário para a obtenção de resposta, uma vez que é necessária a incubação do meio de cultura por, ao menos, 24 h. Além disso, há a necessidade de controle de temperatura (37$\pm$1) ºC, de infraestrutura laboratorial adequada e de esterilização do ambiente, além do alto consumo de reagentes e geração de resíduos.

Ensaios químicos também foram propostos para contornar as limitações do procedimento do caldo vermelho de metila e permitir determinações de pH mais rápidas. Um dos procedimentos mais usados em todo o mundo é o teste da alizarina, um procedimento semiquantitativo, baseado nas mudanças de cor do indicador, em meio etanólico, na presença da amostra. As mudanças de coloração relacionam-se às faixas de viragem do indicador em função da acidez do meio, resultante da fermentação da lactose sob ação de microrganismos. Assim, o meio apresenta coloração amarela em pH $\leq$ 4,0; marrom-avermelhada na faixa de pH de ocorrência natural do leite (entre 6,60 e 6,80) e, por fim, coloração entre rosado e roxo, em

condição alcalina (EBNER et al., 2016). Como o indicador é preparado em um meio rico em etanol (> 60% v/v), é possível observar a coagulação das proteínas em meio ácido e o início de sua precipitação, ambos processos favorecidos em função do aquecimento (HEWEDI et al., 1985; YE; HARTE, 2013).

Outro procedimento muito utilizado para a previsão de contaminação microbiológica do leite se baseia na determinação da acidez titulável, também conhecido como acidez Dornic (medida em ºDornic, sendo 1º Dornic = 0,01% m/v de ácido lático). A maior área de aplicação deste teste são os bancos de doação de leite materno humano, conforme demonstrado recentemente (BORGES et al., 2018; VÁZQUEZ-ROMAN et al., 2013). Embora não exija instrumentos de alto custo e apresente boa capacidade de determinação semiquantitativa de acidez, as principais limitações do teste da alizarina e medida de acidez Dornic se relacionam com a morosidade para execução e baixa sensibilidade, dificultando a detecção de baixas concentrações de substâncias utilizadas para restaurar o pH do leite à sua faixa esperada (SILVA et al., 2015).

Em virtude das limitações dos procedimentos tradicionais, alternativas analíticas têm sido propostas para prever a fermentação do leite por bactérias. A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) tem sido utilizada como procedimento de triagem para determinar a qualidade físico-química do leite em todo o mundo. No modelo de calibração, valores de pH podem ser previstos indiretamente utilizando ferramentas quimiométricas, tendo como base valores de referência determinados por medidas potenciométricas com eletrodo de vidro. A aplicação do NIR para esta finalidade pode ser vista como uma grande vantagem, pois permite da predição da qualidade microbiológica das amostras e a determinação de múltiplos analitos em uma única medida. Entretanto, a adição de substâncias mascarantes iônicas (como NaOH) ou indetectáveis (como o formaldeído) exemplificam as principais limitações dessa técnica.

Aiello et al. (2019) propuseram como estratégia para a predição da contaminação microbiológica do leite o monitoramento da fermentação da lactose, que é provocada por diversos grupos de microrganismos, como por exemplo: *Lactobacillus* sp., *Coliformes* sp., *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Flavobacterium* sp. (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007). A estratégia proposta também permite a avaliação do risco de contaminação por bactérias patogênicas, tais como

Campylobacter jejuni, *Staphylococcus coagulase positivo* e *Salmonella* sp., uma vez que o desenvolvimento destas é favorecido por alterações no meio (diminuição do pH, proteólise e lipólise, por exemplo) provocadas pelo primeiro grupo de microrganismos citados (JAYARAO; HENNING, 2001). O procedimento proposto por Aiello et al. (2019) se baseia em uma separação cromatográfica acoplada à detecção espectrofotométrica do ácido lático na região do UV (λ= 205 nm). O preparo de amostra é baseado em um processo simples de extração do ácido lático da matriz, o qual demanda *ca.* 15 min. Além disso, os autores empregaram a espectrometria de absorção atômica em chama para identificar a adição de NaOH, a partir da determinação quantitativa de íons Na^+ (AIELLO et al., 2019). Embora a estratégia proposta seja precisa, robusta e com preparo de amostra fácil e rápido, é importante destacar a necessidade de infraestrutura laboratorial e também de múltiplos instrumentos que nem sempre estão disponíveis, o que pode representar uma limitação para sua aplicação em rotina.

A fotometria por imagens digitais já foi explorada para a identificação de adulterações em leite relacionadas aos impactos provocados por contaminações microbiológicas no produto. Masawat et al. (2015) descreveram um procedimento sensível e de fácil execução que explora imagens digitais para determinar o antibiótico tetraciclina em leite. Amelin et al. (2021) desenvolveram um procedimento para determinar resíduos de antibióticos em leite, explorando o fenômeno de fluorescência e a aquisição de imagens digitais. Guinati et al. (2021) propuseram uma estratégia baseada em plataformas de papel que visavam a determinação de pH de amostras de leite, além de ureia e peróxido de hidrogênio, associadas às imagens digitais adquiridas com um *scanner*.

O objetivo deste capítulo consiste no desenvolvimento de um procedimento analítico inovador, rápido, portátil e de baixo custo para determinar o pH do leite, como um indicador da atividade microbiológica. A proposta analítica se baseia na reação entre os íons H_3O^+ gerados no meio, em função da formação de ácidos orgânicos (*e.g.*, ácido lático, propiônico e acético) na amostra via fermentação da lactose por bactérias, com o indicador vermelho de fenol, o que promove a formação de produtos com diferentes colorações em faixas de pH específicas. As medidas de pH são então realizadas indiretamente por fotometria por imagens digitais usando a câmera de um *smartphone*.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Amostras e soluções

As soluções utilizadas neste procedimento foram preparadas utilizando água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ cm) e reagentes de grau analítico: etanol anidro (Merck, Darmstadt, Alemanha) e indicadores ácido-base azul de bromotimol (Sigma, Steinheim, Alemanha) e vermelho de fenol (Synth, Diadema, SP, Brasil).

Foram analisadas um total de 95 amostras de leite, sendo que este conjunto foi composto por amostras de leite cru (n = 80) e amostras comerciais de leite (n = 15) adquiridas em mercado local (Piracicaba, SP, Brasil). O conjunto das amostras de leite comercial foi composto por amostras de leites integral (n = 5), semidesnatado (n = 5) e desnatado (n = 5), processados à ultra alta temperatura (UHT).

Todas as amostras de leite foram homogeneizadas em vórtice e transferidas para tubos de polipropileno incolores de 2 mL (MCT-200-C 2 mL, Axygen Scientific, México).

As soluções dos indicadores utilizados no procedimento proposto (azul de bromotimol e vermelho de metila) foram preparadas solubilizando 0,1 g do sólido em 100 mL de uma solução hidroetanólica 50% v/v.

Soluções de amônia (0,15 mol L^{-1}), ureia (0,06 mol L^{-1}), melamina (0,02 mol L^{-1}) e formaldeído (0,01 mol L^{-1}) foram preparadas em água deionizada para simular o efeito de mascaramento de condições de acidez no meio.

5.2.2. Instrumentação

O sistema de detecção utilizado foi a câmera do *smartphone* LG K10 Pro (Taubaté, SP, Brasil), equipado com Android versão 7.1 e câmera de 13 megapixels (resolução de 4128 × 2096 pixels, com abertura de lente de f/2.2). O aplicativo gratuito ColorGrab (Loomatix®, versão 3.8.1, 2020) foi utilizado para converter as imagens adquiridas em sinais dos espaços espectrais RGB.

Com a finalidade de manter a iluminação constante durante as medidas analíticas, uma caixa de isopor (18 cm de altura x 21,5 cm de largura x 13 cm de profundidade) foi adaptada para inserir os tubos contendo as amostras, em sua face superior. A caixa foi internamente revestida com folhas de papel branco.

Uma lâmpada à base de LED, com 30 LED SMD de alto brilho (1,5 W, 3,7 V) alimentada por bateria de lítio (Kian, São Gonçalo, RJ, Brasil) foi acoplada na parte inferior da caixa, visando garantir um ambiente com iluminação controlada e constante durante a aquisição das imagens.

Um suporte para telefones celulares foi fixado à frente da caixa, com o objetivo de manter a câmera do aparelho a uma distância de 10,5 cm do centro do tubo contendo a amostra. As imagens foram adquiridas na região central dos tubos, utilizando as seguintes configurações do *software* livre ColorGrab: região de interesse (ROI) de 28 x 28 pixels, brilho na tela do aplicativo (para a aquisição de imagem) = + 3.0 e zoom padrão em 1.0 (ou seja, sem ampliação ou redução do tamanho da imagem e/ou de um ponto focal de escolha).

Para a aquisição dos espectros de absorção do produto monitorado foi utilizado um espectrofotômetro multicanal UV-Vis (USB4000, Ocean Optics®, Dunedin, FL, EUA) e uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm. Um eletrodo de vidro para medida de pH acoplado a um potenciômetro (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) foi utilizado no procedimento de referência, após calibração usando soluções tampão em pH 4,0 e 7,0 (Merck, Alemanha). Um sistema vórtice (Modelo NI 1059, 1800 rpm, Nova Instruments, Piracicaba, SP, Brasil) foi utilizado para homogeneizar as amostras de leite previamente à análise pelo procedimento proposto.

5.2.3. Procedimento proposto

Após homogeneização, 500 µL de leite foram transferidos para tubos de polipropileno de 2 mL juntamente com 70 µL do indicador vermelho de fenol 0,1% m/v. A cor do produto formado foi monitorada considerando a intensidade da radiação refletida, sob as condições descritas no item 5.2.2. Os sinais obtidos foram convertidos para valores dos espaços espectrais RGB, utilizando o aplicativo ColorGrab® (Loomatix®, 2020). A diferença dos canais G e B, em módulo (Eq. 1), foi utilizada como sinais analíticos (S), após correção utilizando valores obtidos nos mesmos tubos preenchidos com água deionizada como referência (230 para o canal G e 228 para o canal B). A resposta analítica é associada à intensidade da cor e aos tons observados (Figura 5.2).

$$S = | G_1 - B_1 | \qquad (1)$$

Em que:

S = sinal analítico

G_1 = sinal resultante para o canal G (230-G)

B_1 = sinal resultante para o canal B (228-B)

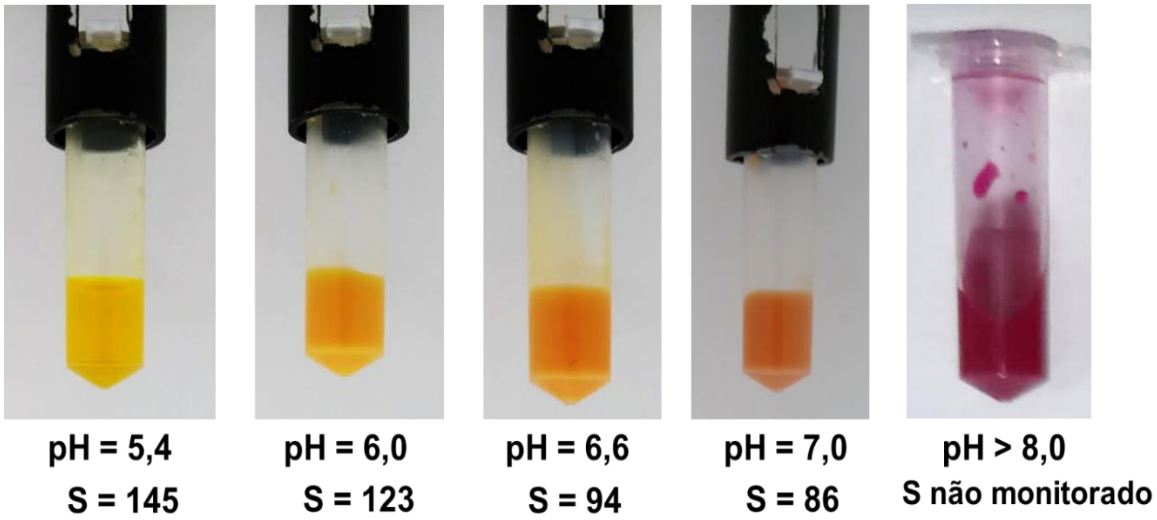


Figura 5.2 - Variação nas intensidades e tonalidades de cor observadas em amostras de leite em diferentes condições de acidez

As amostras de referência (n = 80) apresentaram uma coloração laranja, em virtude da presença do conservante bronopol (0,02% m/v), utilizado para prolongar o prazo de validade da amostra e viabilizar as análises de amostras provenientes de regiões distantes dos laboratórios de referência para análise. Com o objetivo de corrigir o efeito desse componente, a cor de todas as amostras comerciais foi monitorada (em triplicata, para cada amostra) e utilizada para corrigir os sinais analíticos das amostras de referência. As amostras comerciais registraram sinal de 239 $\pm$ 4 para o canal G e 227 $\pm$ 4 para o canal B. As medidas de correção do sinal analítico para as amostras de referência foram realizadas como o indicado pelas Equações 2 e 3.

$$G_{corrigido} = G + 10 \qquad (2)$$

Em que,

G = sinal monitorado no canal G na amostra de referência

10 = fator de correção para o sinal, considerando a diferença entre o valor medido no canal G por amostras de leite (G = 239 ± 4) e o sinal monitorado no mesmo canal por amostras contendo bronopol (G = 229 ± 3)

$$B_{corrigido} = B + 29 \qquad (3)$$

Em que,

B = sinal monitorado no canal B

29 = fator de correção para o sinal, considerando a diferença entre o valor medido no canal B por amostras de leite (B = 227 ± 4) e o sinal monitorado no mesmo canal por amostras contendo bronopol (B = 198 ± 5)

Para amostras de leite comercial, os sinais monitorados foram corrigidos somente em função da solução de referência (água deionizada; R: 232 ± 2; G: 230 ± 3; B: 228 ± 3), já que não houve efeito aditivo de cor, para que fossem convertidos em sinal analítico (S). Todas as medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

5.2.4. Procedimento de referência

O procedimento de referência foi realizado previamente à determinação de pH pelo procedimento proposto, seguindo as diretrizes da norma ISO 21543: 2020 (ISO, 2020). Estas análises foram realizadas nos laboratórios da Clínica do Leite (Piracicaba, SP, Brasil), certificado pelo Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL). O pH de todas as amostras deste estudo (n = 95) foi também medido com um eletrodo de vidro. As medições foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Aspectos gerais

O procedimento proposto neste capítulo é baseado na determinação do pH do leite explorando a adsorção de um indicador ácido-base em proteínas do leite. O processo de adsorção ocorre a partir de interações entre os aminoácidos, que compõem e caracterizam as proteínas, e indicadores ácido-base, como o vermelho de fenol, sendo que a interação entre estas moléculas é bastante afetada pela acidez do meio (GROLLMAN, 1925; PAVAN; MAZZOCATO; GUSHIKEM, 2008; PASCHE et al., 2005; SAMIEY; ASHOORI, 2012). No caso da caseína, que é um agregado proteico, a concentração de ácido no meio pode disponibilizar a interação com diferentes frações que compõe esta proteína, afetando a cor percebida na solução (SWAISGOOD, 2010).

O aumento da concentração de ácido no leite é decorrente da fermentação da lactose, gerando como principal produto o ácido lático. A intensidade e a cor do indicador ácido-base dependem do pH da solução e pequenas diferenças de tonalidades de cor podem ser detectadas utilizando fotometria por imagens digitais. Dessa forma, a determinação indireta de pH possibilita prever se o leite está contaminado com microrganismos, uma vez que ocorre aumento de acidez no meio.

A seleção do indicador ácido-base foi baseada na capacidade de produzir respostas analíticas dentro da faixa de pH esperado para o leite, permitindo, assim, a identificação de não conformidades de acordo com este parâmetro. Neste contexto, foram escolhidos o azul de bromotimol (faixa de viragem: $6,2 \leq pH \leq 7,6$) e o vermelho de fenol (faixa de viragem: $6,8 \leq pH \leq 8,4$). A avaliação foi realizada utilizando um volume fixo de solução de indicador (30 µL) em amostra de leite com pH ajustado para: 5,0; 6,0; 6,6; 6,8 e 7,0. No caso do azul de bromotimol não foi possível observar variações na coloração com a variação de acidez, mesmo quando foram adicionados maiores volumes do reagente. Para avaliar a possibilidade de contornar este problema, foi avaliada a precipitação das proteínas utilizando 250 µL de leite, 800 µL de etanol 95% v/v e centrifugação, conforme descrito e discutido no Capítulo 4. A opção por utilizar este procedimento como estratégia de preparo de amostra se deve ao fato de o mesmo não afetar o pH do meio, evitando

interferências no processo de medida. Entretanto, ambas as estratégias (adição direta do indicador ou após a precipitação de proteínas) não apresentaram um contraste adequado frente a valores de pH distintos, conforme mostrado na Figura 5.3.

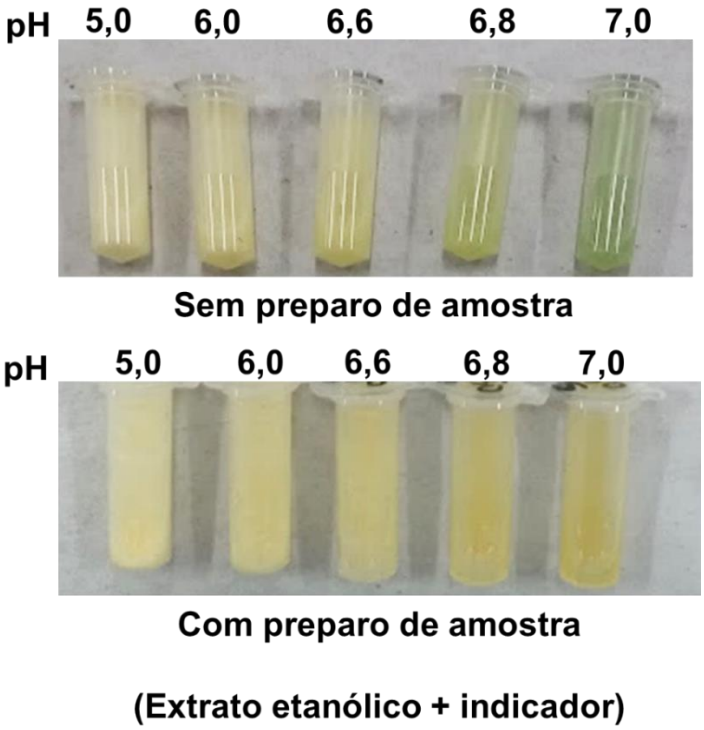


Figura 5.3 - Efeito da adição de azul de bromotimol em amostras de leite antes e após a precipitação de proteínas

No primeiro caso, o indicador não possibilitou distinguir diferenças no sinal analítico para as faixas de pH estudadas, exceto em pH 7,0. O processo de adsorção entre as proteínas e o indicador azul de bromotimol é mais favorecido em condições de pH > 7,0 (PAVAN; MAZZOCATO; GUSHIKEM, 2008). Esta condição limita a aplicabilidade do procedimento para identificação de neutralizantes adicionados em leite. Conforme demonstrado pelas imagens, o processo de adsorção entre o reagente e as proteínas foi severamente afetado em função da adição de etanol no meio reacional, inviabilizando a distinção das alterações de pH. Isso pode ser atribuído ao efeito caotrópico do etanol em solução, que afeta a estrutura das proteínas e o processo de adsorção do indicador. Assim, quanto mais elevada a concentração de etanol na solução, menor é a adsorção do azul de bromotimol nas proteínas (PASCHE et al., 2005; SAMIEY; ASHOORI, 2012).

O vermelho de fenol foi avaliado nas mesmas condições de pH descritas para o azul de bromotimol. Neste experimento, foi possível identificar visualmente as diferenças em função do pH, indicando a viabilidade da utilização deste reagente (Figura 5.4).

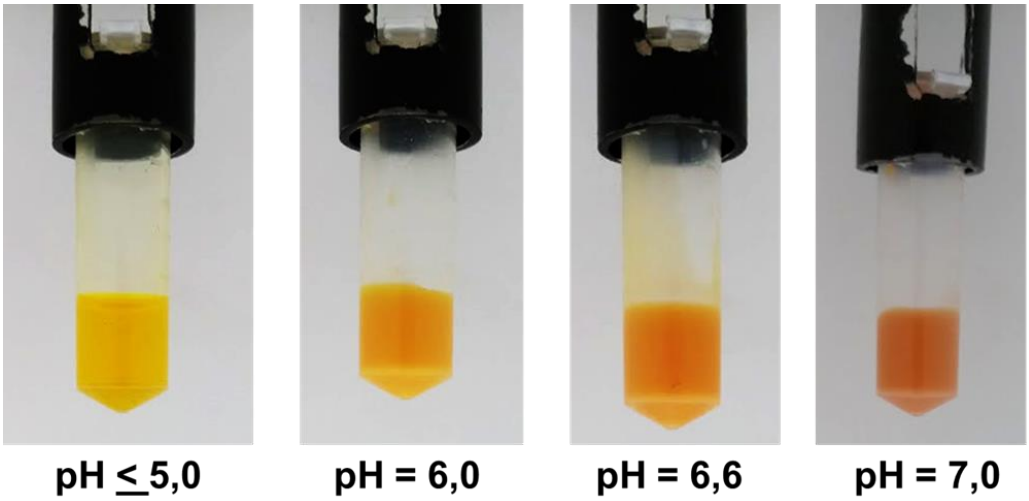


Figura 5.4 - Diferenças de cor observadas, em diferentes condições de pH, quando adicionou-se vermelho de fenol às amostras de leite.

Outro tópico importante para a determinação quantitativa de pH refere-se à escolha dos canais de cor. Maior sensibilidade e melhor relação linear são usualmente obtidas utilizado o canal do sistema RGB que corresponde à cor complementar do produto monitorado em solução (SILVA; ROCHA, 2020; SILVA; CAMARGO; ROCHA, 2021; MARTINS et al., 2021; SOARES et al., 2020; MARINHO et al., 2019). No caso deste trabalho, observou-se que há uma mudança no espectro de absorção de radiação em função do pH do meio (Figura 5.5), relacionada com o efeito da concentração de ácido sobre as interações proteínas-água e proteína-proteína. Em maior acidez, a interação proteína-proteína é altamente favorecida e somente parte das estruturas das proteínas estão disponíveis; na região do pH esperado para o leite, as interações proteínas-água são mais favorecidas e frações hidrofóbicas apresentam disponibilidade para o estabelecimento de interações com o indicador; em meio alcalino, a estrutura das micelas de proteínas é afetada, o que favorece o estabelecimento de interações com outras frações proteicas, não disponíveis para ligação anteriormente (PAVAN; MAZZOCATO; GUSHIKEM, 2008; PASCHE et al., 2005; SAMIEY, ASHOORI, 2012).

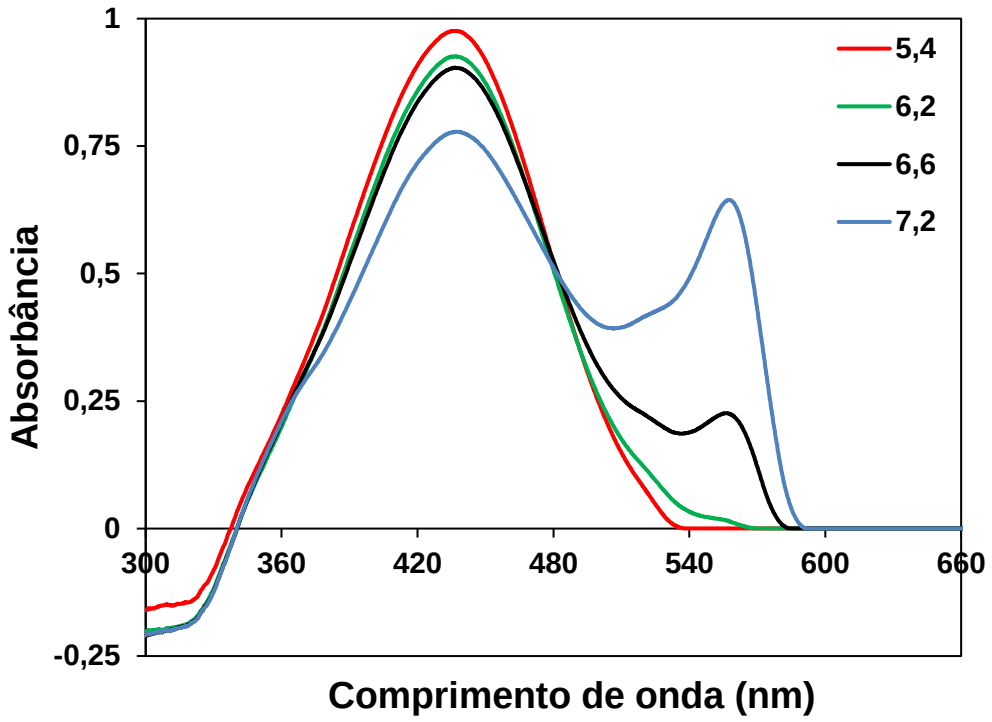


Figura 5.5 - Espectros de absorção do vermelho de fenol em soluções tampão fosfato em diferentes condições de pH. As faixas de resposta são 400 a 500 nm (Canal B) e 500 a 600 nm (Canal G)

Para a medida de pH, o sinal analítico deve contemplar as variações de interações estabelecidas nas diferentes condições do meio. A Figura 5.6 mostra a variação do sinal monitorado nos canais RGB em função do pH. Pode-se perceber que o canal que apresentou maior variação nas medidas foi G, relacionado à cor complementar do produto monitorado.

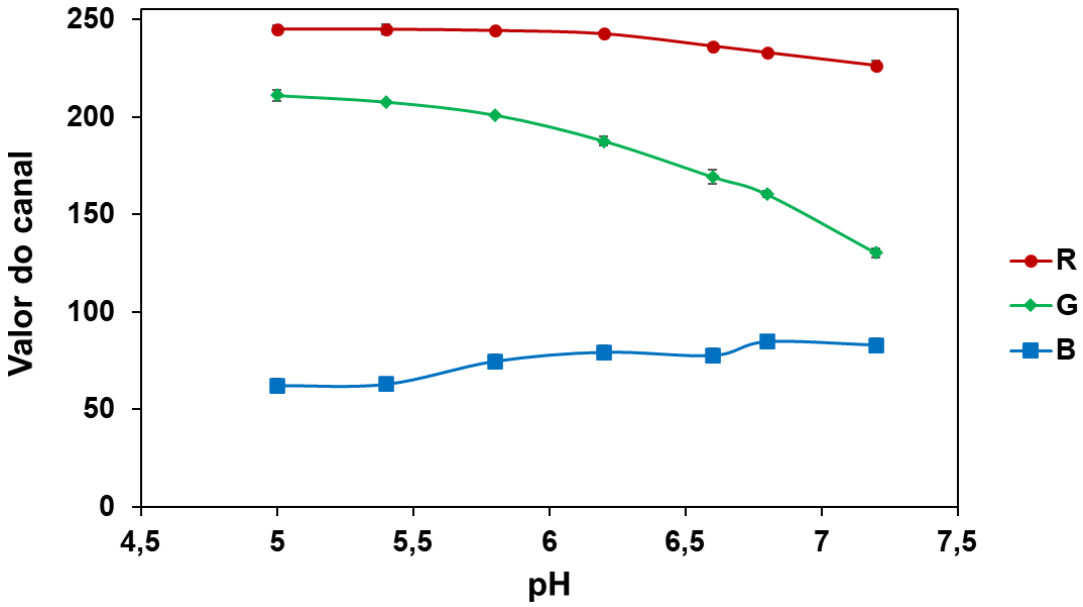


Figura 5.6 - Variação dos valores dos canais RGB em função do pH das amostras de leite adicionadas de vermelho de fenol.

Apesar de ter apresentado menores variações, o canal B apresentou maior contribuição para o sinal analítico em condições de maior alcalinidade. Ao combinar o sinal monitorado no canal B ao canal G, conforme descrito na Equação 1 e que resulta no sinal analítico S, sensibilidade e seletividade do procedimento foram melhoradas, conforme mostrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Resultados para pH obtidos utilizando apenas o sinal do canal G corrigido e o sinal analítico (S)

Amostra	Procedimento de referência (NIR)	Sinal canal G corrigido	Sinal analítico (S)
1	6,69	6,50±0,05	6,64±0,02
2	6,72	6,40±0,02	6,60±0,03
3	6,71	6,30±0,04	6,69±0,01
4	6,71	6,43±0,07	6,64±0,02
5	6,72	6,40±0,03	6,77±0,00
6	6,69	6,29±0,04	6,60±0,00
7	6,72	6,33±0,04	6,63±0,01
8	6,69	6,22±0,03	6,63±0,01
9	6,72	6,40±0,04	6,75±0,04
10	6,68	6,21±0,05	6,64±0,03

5.3.2. Otimização do procedimento analítico

Após a definição do indicador ácido-base, foram otimizados os volumes de amostra e de indicador e avaliada a necessidade de precipitação de proteínas. A Figura 5.7 mostra os resultados obtidos para otimização das variáveis do procedimento analítico.

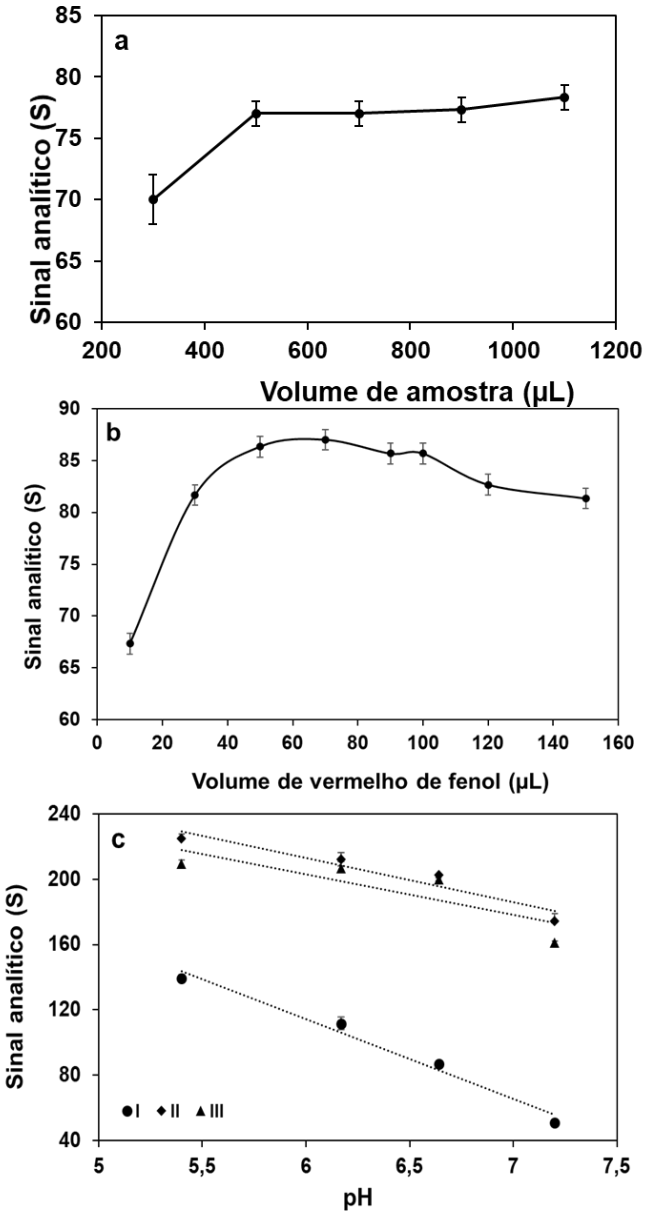


Figura 5.7 - Otimização do procedimento analítico: (a) efeito do volume de amostra (volume de vermelho de fenol = 30 µL); (b) efeito do volume de solução do indicador (volume de amostra = 500 µL) e (c) respostas analíticas para amostras sem preparo de amostra (I), com adição do reagente à amostra e posterior precipitação de proteínas (II) e com precipitação de proteínas e posterior adição do reagente (III)

Na Figura 5.7a, pode-se verificar que para um volume de 300 µL de amostra houve uma maior variabilidade no sinal analítico, o que pode ser explicado em função da projeção da sombra provocada pelo menisco da solução. As melhores respostas analíticas foram obtidas utilizando volumes de amostra iguais ou superiores a 500 µL. O volume de 500 µL de amostra foi selecionado, uma vez que não há comprometimento da resposta analítica, além desta condição estar alinhada a um dos pilares centrais desse trabalho, que propõe o desenvolvimento de estratégias alinhadas à química limpa.

Na Figura 5.7b foi avaliado o efeito do volume de reagente e observou-se que adições de 10 a 50 µL de vermelho de fenol 0,1 % m/v na amostra provocaram um aumento gradual do sinal analítico. Foi verificada a ocorrência de um platô quando foram utilizados volumes iguais ou superiores a 70 µL do indicador. Assim, visando maximizar a resposta analítica, selecionou-se a seguinte condição para continuidade dos experimentos: 500 µL de amostra e 70 µL de vermelho de fenol 0,1% m/v, preparado em meio etanólico 50% v/v.

Na Figura 5.7c verifica-se que a sensibilidade diminuiu ao se adotar a estratégia de preparo de amostra com remoção das proteínas, o que pode ser observado visualmente em I, II e III e algebricamente pelas informações disponibilizadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Parâmetros analíticos relativos a diferentes condições experimentais (n = 3). Em todos os casos, as medidas foram realizadas a temperatura ambiente (25ºC ± 1) e a faixa de pH avaliada foi de $5,4 \leq pH \leq 7,2$

Condição	Procedimento de preparo de amostra	Curva analítica	Coeficiente de correlação (r)
I	Sem preparo de amostra	S = - 48,8 pH + 407	0,989
II	Adição do reagente antes da adição de etanol	S = - 26,9 pH + 375	0,956
III	Adição do reagente após obtenção do extrato hidroetanólico*	S = - 25,0 pH + 353	0,842

S = sinal analítico. *Condições de preparo de amostra apresentadas no item 5.3.1.

Assim, é possível identificar que a curva em I (inclinação = -48,848) apresenta maior sensibilidade que em II e em III (inclinações = -26,94 e -24,965, respectivamente), demonstrando que o preparo de amostra não apresenta ganhos de sensibilidade. Isto pode ser explicado pelo efeito do etanol no processo de adsorção que ocorre entre o vermelho de fenol e a caseína. Grollman (1925) utilizou a caseína e outros grupos de proteínas como modelo e demonstrou que o vermelho de fenol é adsorvido às proteínas. O modo como esta interação é estabelecida é altamente afetado pela estrutura morfológica (ou seja, amorfa ou cristalina) em que a proteína se encontra. Além disso, o autor cita que outros fatores, como o pH e a temperatura da solução, também podem influenciar no processo de adsorção. Considerando a etapa de preparo de amostra com etanol, os fatores citados pelo autor que afetam o processo explorado neste experimento são (i) a alteração na estrutura morfológica das proteínas, que se torna cristalina, na presença do etanol, formando sais caseinatos; e o (ii) o estabelecimento de mecanismos de competição pela interação com o indicador, entre o álcool e as proteínas, passam a ocorrer, principalmente em meio ácido (GROLLMAN, 1925; HEWEDI et al., 1985). Assim, a diminuição de sensibilidade observada adotando-se o preparo de amostra possui relação com a formação de sais caseinatos na presença de etanol e, em função de sua baixa solubilidade, precipitam a maior parte das proteínas (HEWEDI et al., 1985; SHEPPARD; GEDDES, 1944).

O último parâmetro avaliado relaciona-se ao controle de luminosidade adotado no procedimento, a partir da aplicação de correções de imagem feitas pelo aplicativo utilizado (ColorGrab). Desde 2020, a desenvolvedora Loomatix, tem realizado sucessivas atualizações das funcionalidades do aplicativo, de modo a facilitar as medidas e atender a diversas demandas, inclusive as aplicações de cunho científico[6]. A versão do *software* utilizada neste trabalho possibilita a correção da iluminação no processo de aquisição das imagens ao tornar constante a emissão de luz no processo analítico, o que é feito pelos algoritmos do próprio aplicativo.

Isto representa um ganho notável às medidas fotométricas, uma vez que variações na emissão da lâmpada LED se tornam menos significativas. Assim, para otimizar este parâmetro, foram realizadas medidas do sinal de referência

[6] Informação pessoal obtida em 21 de abril de 2020, via e-mail, com Shay Shahaf, CEO da Loomatix, empresa de tecnologia criadora do aplicativo utilizado para conversão das imagens nos trabalhos apresentados nesta tese.

(*i.e.*, tubo preenchido com água deionizada), em 10 dias diferentes, visando identificar a condição com menor variação nos sinais. As condições avaliadas foram: 1 – iluminação com a lâmpada LED, sem ajuste de brilho no aplicativo; 2 – iluminação com lâmpada LED combinada à correção de brilho nível 1.0; 3 – iluminação com lâmpada LED combinada à correção de brilho nível 2.0; 4 – iluminação com lâmpada LED combinada à correção de brilho nível 3.0. Os resultados são apresentados na Figura 5.8 e a condição de iluminação adotada foi a de número 4.

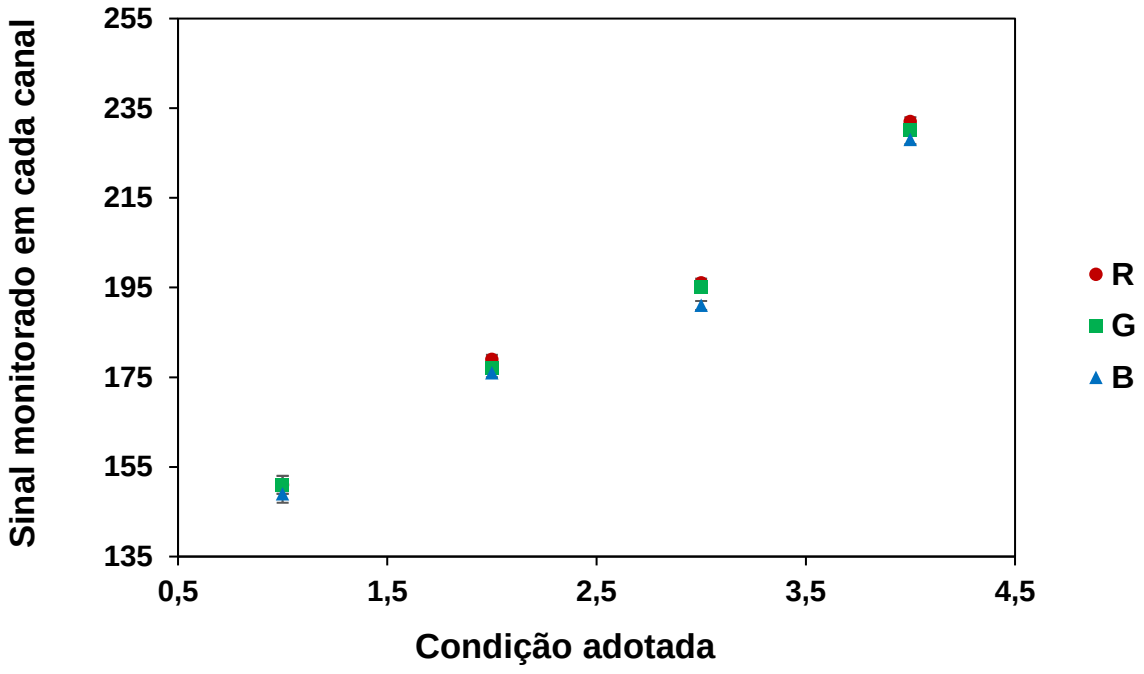


Figura 5.8 - Condições de controle de iluminação para o procedimento analítico, considerando medidas experimentas realizadas em 10 dias utilizando tubo preenchido com água deionizada. Em todos os casos os desvios encontram-se representados no gráfico e são inferiores a 2%.

5.3.3. Características analíticas

Nas condições otimizadas, o procedimento proposto pode ser aplicado a amostras de leite com pH entre 5,4 e 7,2. Embora seja possível diferenciar soluções lácteas com pH superior a 7,2 (vide Figura 5.2), é importante destacar que essas condições não foram consideradas para a construção das curvas analíticas, já que se tratam de condições drásticas e não observáveis em rotina, dadas as alterações visíveis do leite quando este se encontra nestas faixas de pH.

Uma amostra de leite integral foi utilizada para construir a curva analítica, uma vez que não foi possível prepará-la utilizando água e soluções de tampão fosfato, uma vez que o efeito da adsorção do reagente nas proteínas não estaria sendo considerado. Isto pode ser demonstrado a partir da comparação entre a curva analítica gerada utilizando solução de tampão fosfato (S = - 81,598 pH + 633,750, r = 0,982) e uma amostra de leite (S = - 48,8 pH + 407, r = 0,989). Dessa forma, a compatibilização de matriz é essencial para viabilizar o procedimento proposto.

Uma vantagem do procedimento proposto se relaciona à alta reprodutibilidade das curvas de calibração. Soluções de referência, armazenadas sob refrigeração (8ºC), puderam ser utilizadas com confiabilidade por até 27 dias (desvio dos coeficientes angulares das curvas = 1,94%, n = 7), conforme demonstrado na Figura 5.9. As determinações quantitativas de pH foram baseadas na curva analítica calculada a partir da média das 7 curvas, ou seja, S = - 53,8 pH + 442, r = 0,993, em que S se refere ao sinal analítico.

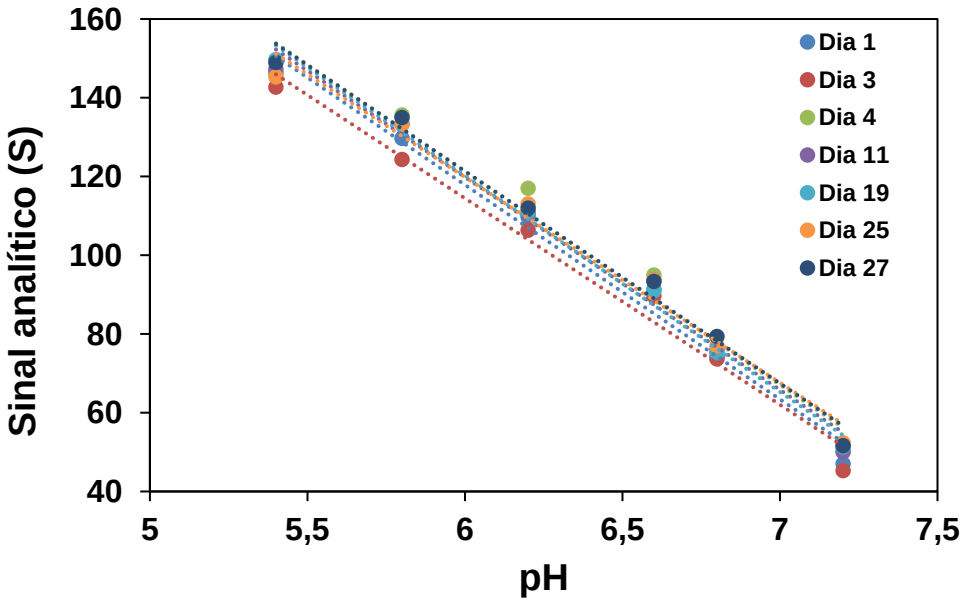


Figura 5.9 - Avaliação da reprodutibilidade interdiária do procedimento proposto. As medidas foram realizadas em triplicata em temperatura ambiente (25 ± 1) ºC

É importante destacar que o procedimento permite a distinção de valores de pH muito próximos, o que representa uma grande vantagem neste caso, visto que a faixa de pH para o leite bovino se restringe à estreita faixa de 6,60 < pH < 6,80. Para comprovar isso, um teste *t* foi realizado com a finalidade de comparar os sinais analíticos em pH 6,60 (93,0 ± 0,6) e em pH 6,80 (79 ± 2). Obteve-se

t calculado (12,124) maior que *t* crítico (4,303), a um nível de confiança de 95% e quando n = 3 (MILLER; MILLER, 2005). Isto demonstra uma boa capacidade do procedimento determinar pequenas alterações de pH no intervalo usualmente esperado em leite.

O procedimento proposto apresentou frequência analítica de 30 ensaios por hora e alinha-se aos princípios da química analítica limpa, uma vez que consumiu 70 µg de vermelho de fenol, 35 µL de etanol 99% v/v e gerou como resíduo final 570 µL por determinação.

5.3.4. Determinação quantitativa de pH

O procedimento proposto foi aplicado à determinação do pH em amostras de leite cru (n = 80), que foram previamente analisadas pelo procedimento de referência NIR (ISO 21543, 2020). Visando avaliar a exatidão do procedimento proposto, o pH das mesmas amostras foi também determinado por potenciometria, utilizando eletrodo de vidro. As amostras de referência apresentaram variabilidade significativa, com teores de proteína entre 2,71 e 3,84% m/v e teores de gordura entre 2,42 e 4,29% m/v.

Os resultados determinados pelos procedimentos proposto e de referência, bem como os erros relativos encontram-se na Tabela A.1 (ANEXO). Os resultados (Tabela A.1, ANEXO) seguem a distribuição normal (Shapiro-Wilk) e são concordantes a um nível de confiança de 95%, conforme avaliado por teste *t* pareado (MILLER; MILLER, 2005). Os erros relativos foram inferiores a 2,0% e as variâncias obtidas no método proposto e determinação potenciométrica foram comparáveis.

A determinação do pH em amostras de leite comercial UHT (n = 15, sendo 5 amostras de leite integral, 5 de semidesnatado e 5 de leite desnatado), também foi realizada. Os resultados foram comparados com os obtidos por medidas potenciométricas (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Determinações analíticas de pH (n = 3) pelo procedimento proposto e pelo método potenciométrico com eletrodo de vidro. Todas as determinações foram realizadas a temperatura ambiente (25 ± 1 ºC)

Amostra de leite	pH		F	Erro relativo (%)
	Procedimento proposto	Potenciometria		
I1	6,94±0,02	6,52±0,03	2,3	6,4
I2	6,89±0,04	6,59±0,04	1,0	4,6
I3	7,03±0,03	6,62±0,03	1,0	6,2
I4	6,88±0,02	6,63±0,01	4,0	3,8
I5	6,97±0,04	6,61±0,01	16,0	5,4
SD1	6,62±0,02	6,59±0,01	4,0	0,5
SD2	6,66±0,03	6,71±0,01	9,0	-0,7
SD3	6,59±0,01	6,76±0,01	1,0	-2,5
SD4	6,61±0,01	6,65±0,01	1,0	-0,6
SD5	6,72±0,02	6,64±0,01	4,0	1,2
D1	6,78±0,02	6,60±0,03	2,3	2,7
D2	6,53±0,07	6,65±0,04	3,1	-1,8
D3	6,71±0,03	6,58±0,08	7,1	2,0
D4	6,73±0,02	6,65±0,03	2,3	1,2
D5	6,78±0,01	6,65±0,04	16,0	2,0

*Codificação se refere a: I = Leite integral (Concentração de gordura = 3,0% m/v); SD = leite semidesnatado (Concentração de gordura = 1,0% m/v); D = leite desnatado (Concentração de gordura < 0,5 % m/v). F crítico (nível de confiança de 95%, quando n = 3): 19,0.

Observou-se que, para os leites semidesnatado e desnatado os erros relativos foram comparáveis aos registrados para leite cru, enquanto que para o leite integral, maiores erros relativos foram registrados. Esta diferença observada possui relação com os efeitos do tratamento térmico sobre a estrutura das proteínas, afetando a resposta com o indicador (SWAISGOOD, 2010).

5.3.5. Screening de amostras de leite baseado no pH

A utilização de medidas de pH para *screening* de amostras de leite, para predição de contaminação microbiológica, foi investigada. Isto foi realizado estabelecendo intervalos de confiança pela determinação de limites de controle (inferior, LIC, e superior, LSC) baseados no intervalo 6,60 ≤ pH ≤ 6,80 e estabelecidos

após a análise de 5 amostras de leite integral, em triplicata. As Equações 4 e 5 demonstram como LIC e LSC foram definidos e a Tabela 5.4 apresenta os resultados obtidos e os intervalos de confiança estabelecidos para o sinal analítico e para o canal G (MEAD; CURNOI; HASTED, 2003).

Limite Inferior de Controle (LIC) (4)

$$LIC = (\text{média} - \text{desvio padrão}) + (ep_m \times k)$$

Limite Superior de Controle (LSC) (5)

$$LSC = (\text{média} + \text{desvio padrão}) + (ep_m \times k)$$

Em que,

ep_m = erro padrão da média;

k = 2, considerando nível de confiança de 95%.

Tabela 5.4 - Dados utilizados para o estabelecimento dos limites de confiança para o sinal analítico e para o canal G visando à classificação das amostras

Canal	pH	ep_m	Limites para S	Limites para o canal G
G	6,60	0,38	LIC: 74 LSC: 94	LIC: 68 LSC: 86
	6,80	1,29		
B	6,60	0,58		
	6,80	1,39		

A concentração máxima de ácido que pode ser determinada por este procedimento foi determinada considerando: (i) o limite inferior de pH 5,0, uma vez que em pH inferior ocorre a precipitação das proteínas em função da aproximação do ponto isoelétrico das proteínas lácteas e (ii) a diferença mínima de pH que resulta em sinal analítico diferente de pH 5,0. Esta diferença foi significativa (*t* calculado = 3,219 e *t* crítico = 2,447; n = 7) a partir de pH 5,4, que foi adotado como limite inferior de determinação de pH nas amostras de leite. O coeficiente de variação do procedimento foi estimado em 2,0% (considerando n = 20, em solução láctea com pH = 6,80).

A validação do modelo de classificação proposto foi realizada utilizando as 80 amostras de leite (que apresentaram pH variando na faixa de 6,69 ≤ pH ≤ 6,73) que foram previamente analisadas utilizando potenciometria e, em seguida, pelo procedimento proposto. O sinal analítico determinado nas amostras variou de 74 ± 2 a 90 ± 2 e, em todos os casos, as amostras foram classificadas como conformes.

Além disso, a adição de substâncias comumente empregadas para mascarar o pH do leite também foi avaliada. Os limites de controle para o canal G foram estabelecidos porque observou-se, experimentalmente, que alguns adulterantes adicionados provocaram maior alteração no sinal analítico monitorado para este canal. Essas diferenças possuem relação com o processo de adsorção do reagente às proteínas, uma vez que estes adulterantes promovem uma alteração na conformação estrutural das proteínas (DAY et al., 2017). Assim, os sinais foram monitorados em amostras de leite após a adição de amônia, formaldeído, ureia e cloreto de amônio. Outras condições também avaliadas foram leite ácido (acidificado via contaminação microbiológica), leite com pH ajustado (ou seja, no leite ácido foi adicionado NaOH para correção do pH para 6,60) e leite diluído com água. Como controles foram usados uma amostra de leite conforme, uma amostra de leite acidificado (adição de HCl em leite conforme, até atingir pH 5,70), uma amostra de leite acidificado mascarado (adição de HCl até atingir pH 5,70 e posterior reajuste do pH a 6,60, utilizando NaOH).

Para a avaliação da capacidade de detecção de adulterantes, além do intervalo definido para o canal G foi também utilizada a combinação G-B (em módulo). Assim, para facilitar a interpretação, estabeleceu-se um sistema de pontuação para as amostras que apresentassem medidas fora de conformidade (atribuindo-se o valor 1), enquanto o valor 0 foi atribuído a amostras conformes. Para ser considerada conforme, a amostra deve apresentar 0 para cada um dos dois parâmetros avaliados. Os resultados são mostrados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Resultados obtidos para os adulterantes estudados e para as soluções de controle utilizando um sistema de pontuação com valor de *score* 0 para condição conforme e 1 para condição não conforme. Os valores representam a média de medidas realizadas em triplicata, a temperatura ambiente (25 ± 1 ºC)

Adulteração avaliada	Sinal analítico		*Score*	
	G	G-B	G	G-B
Amônia	139	20	1	1
Formaldeído	38	84	1	0
Ureia	46	72	1	1
Leite ácido (pH = 5,70)	24	127	1	1
Leite ácido ajustado (pH final = 6,60)	57	88	1	0
Leite diluído (diluição 1:10)	47	113	1	1
Controles				
Leite não adulterado (pH = 6,60)	70	93	0	0
Leite ácido (adição de HCl até pH = 5,70)	25	128	1	1
Leite ácido corrigido (adição de HCl até pH = 5,70 e correção para pH = 6,60 com adição de NaOH)	55	89	1	0

É possível identificar que mesmo as substâncias que não foram detectadas considerando a condição de resposta analítica G-B, puderam ser identificadas explorando o canal G. Todos os adulterantes resultaram em respostas diferentes daqueles previstos para o canal G (ou seja, $68 \leq S \leq 86$), indicando a possibilidade de detectar mesmo substâncias que não alteram o pH do meio, como formaldeído e ureia.

5.4. Conclusão

O procedimento proposto neste capítulo visando à determinação quantitativa do pH de amostras de leite é rápido, econômico, de fácil execução e baseado nos princípios da química limpa. O procedimento proposto é aplicável como ferramenta de triagem de amostras considerando o pH como marcador, mesmo quando substâncias mascarantes são adicionadas. O procedimento proposto é preciso (CV = 2%, n = 20), robusto e apresenta alta reprodutibilidade. Volumes reduzidos de amostra e reagentes são necessários para execução do procedimento, resultando em uma geração de 570 µL de resíduos por determinação. O procedimento permite a possibilidade de

determinação quantitativa do pH de amostras de leite considerando uma ampla faixa analítica, ou seja, 5,4 < pH < 7,2.

Os resultados experimentais obtidos neste capítulo representam um ponto de inovação para a predição da contaminação microbiológica do leite, frente a outros procedimentos colorimétricos desenvolvidos para finalidade semelhante, uma vez que a estratégia adotada não é suscetível ao mascaramento por substâncias comumente utilizadas para restaurar o pH do leite e que não são identificáveis em outros procedimentos de referência.

Referências do Capítulo 5 encontram-se ao final desta Tese.

ANEXO

Tabela A1 - Resultados da determinação de pH para as amostras de referência (n = 80)

Amostra	Procedimento		Erro relativo (%)	Amostra	Procedimento		Erro relativo (%)
	Proposto	Referência (NIR)			Proposto	Referência (NIR)	
1	6,64±0,02	6,69	-0,8	17	6,63±0,02	6,69	-0,9
2	6,60±0,03	6,72	-1,8	18	6,72±0,03	6,71	0,2
3	6,69±0,01	6,71	-0,3	19	6,71±0,02	6,71	0,1
4	6,64±0,02	6,71	-1,1	20	6,63±0,03	6,71	-1,2
5	6,77±0,00	6,72	0,8	21	6,71±0,05	6,71	0,0
6	6,60±0,00	6,69	-1,3	22	6,73±0,04	6,71	0,4
7	6,63±0,01	6,72	-1,4	23	6,64±0,03	6,69	-0,7
8	6,63±0,01	6,69	-1,0	24	6,71±0,02	6,70	0,1
9	6,75±0,04	6,72	0,5	25	6,62±0,00	6,69	-1,1
10	6,64±0,03	6,68	-0,5	26	6,71±0,03	6,69	0,4
11	6,74±0,06	6,71	0,4	27	6,73±0,02	6,72	0,1
12	6,71±0,05	6,72	-0,1	28	6,72±0,04	6,71	0,2
13	6,77±0,03	6,72	0,7	29	6,59±0,03	6,69	-1,5
14	6,68±0,00	6,69	-0,2	30	6,61±0,01	6,69	-1,2
15	6,72±0,02	6,72	0,0	31	6,64±0,01	6,70	-0,8
16	6,57±0,03	6,70	-2,0	32	6,68±0,05	6,69	-0,1

Amostra	Procedimento		Erro relativo (%)	Amostra	Procedimento		Erro relativo (%)
	Proposto	Referência (NIR)			Proposto	Referência (NIR)	
33	6,66±0,03	6,70	-0,6	51	6,74±0,00	6,70	0,6
34	6,76±0,06	6,70	0,9	52	6,72±0,02	6,70	0,3
35	6,77±0,09	6,70	1,1	53	6,73±0,03	6,70	0,5
36	6,72±0,08	6,71	0,1	54	6,81±0,02	6,71	1,5
37	6,68±0,03	6,71	-0,4	55	6,68±0,04	6,70	-0,4
38	6,72±0,05	6,71	0,2	56	6,85±0,01	6,71	2,0
39	6,69±0,02	6,70	-0,1	57	6,80±0,05	6,73	1,0
40	6,75±0,01	6,71	0,6	58	6,72±0,01	6,72	0,0
41	6,78±0,00	6,71	1,0	59	6,77±0,01	6,70	1,1
42	6,77±0,01	6,70	1,1	60	6,64±0,03	6,68	-0,5
43	6,73±0,04	6,70	0,5	61	6,76±0,04	6,70	0,8
44	6,74±0,04	6,71	0,5	62	6,58±0,03	6,68	-1,5
45	6,79±0,07	6,71	1,2	63	6,73±0,03	6,70	0,5
46	6,71±0,02	6,70	0,1	64	6,75±0,01	6,70	0,7
47	6,68±0,01	6,70	-0,4	65	6,75±0,04	6,71	0,6
48	6,69±0,01	6,70	-0,1	66	6,67±0,08	6,71	-0,6
49	6,76±0,05	6,70	0,9	67	6,76±0,01	6,72	0,6
50	6,76±0,02	6,72	0,5	68	6,73±0,02	6,70	0,5

Amostra	Procedimento		Erro relativo (%)
	Proposto	Referência (NIR)	
69	6,76±0,01	6,71	0,7
70	6,75±0,01	6,69	0,9
71	6,72±0,02	6,68	0,6
72	6,72±0,02	6,71	0,2
73	6,72±0,02	6,69	0,5
74	6,74±0,00	6,72	0,3
75	6,78±0,05	6,70	1,2
76	6,79±0,07	6,71	1,2
77	6,72±0,02	6,70	0,3
78	6,75±0,03	6,71	0,6
79	6,74±0,04	6,70	0,6
80	6,79±0,04	6,70	1,3

6. Diferenciação de amostras de canela e cássia utilizando imagens hiperespectrais[8]

Resumo

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma especiaria muito apreciada e consumida em todo o mundo. Contudo, o controle de qualidade desta especiaria é bastante limitado e consiste geralmente na inspeção visual do produto. Casos de fraudes nesta especiaria são frequentes e a identificação destas, muitas vezes, é limitada dada a lacuna analítica existente. O objetivo deste capítulo consiste na diferenciação de amostras comerciais de canela e cássia com base na identificação do seu padrão de cor, utilizando olho eletrônico, e no perfil espectral destas utilizando imagens hiperespectrais. Os resultados obtidos permitiram identificar que o padrão de cor das amostras não é homogêneo e que, portanto, o controle de qualidade baseado na identificação visual pode comprometer a identificação de adulterações. Além disso, o capítulo apresenta os primeiros registros quantitativos para este atributo em amostras de canela e cássia. Com base no perfil espectral, foi possível identificar que amostras de canela apresentam bandas de absorção de radiação associadas à clorofila *a*, enquanto amostras de outras espécies do gênero *Cinnamomum* sp. (incluindo a cássia) não apresentam o mesmo perfil. O sistema de reconhecimento de padrões utilizado permitiu identificar corretamente 100% das amostras rotuladas como cássia e 84,4% das amostras identificadas como canela. Os resultados são promissores e indicam que imagens hiperespectrais associadas ao reconhecimento de padrões podem ser utilizadas para distinguir canela de outras espécies do gênero *Cinnamomum* sp. comercializadas como canela.

Palavras-chave: Autenticidade de alimentos; Especiarias; Segurança dos alimentos.

[8] Resultados referentes a parte do trabalho realizado durante o estágio sanduíche no *Food Quality and Design group*, Wageningen University and Research (Wageningen, Países Baixos), sob orientação da Prof.ª Saskia van Ruth e Dr.ª Sara W. Erasmus. O trabalho integra o projeto HORIZON 2017-2021: *EU-China Safe: Delivering an effective, resilient and sustainable Food Safety Partnership.*

Abstract

Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) is a highly appreciated and consumed spice worldwide. However, the quality control of this spice is very limited and it is usually based on visual inspection of the product. Fraud of this spice is frequent and their identification is often limited due to lack of suitable analytical methods. The aim of this chapter is to differentiate cinnamon and cassia commercial samples based on their color pattern, using an electronic eye, and also their spectral profile using hyperspectral images. It was identified that the color pattern of the samples is not homogeneous and, therefore, quality control based on visual inspection can compromise the identification of adulterations. In addition, the chapter presents the first quantitative records for this attribute in cinnamon and cassia samples. Based on the spectral profile, it was possible to identify that cinnamon samples showed a radiation absorption band associated with chlorophyll a, differently from other species of the genus *Cinnamomum* sp. (including cassia). The pattern recognition system allowed identifying correctly 100% of the samples labelled as cassia and 84.4% of those identified as cinnamon. The results are promising and indicate that hyperspectral images associated with pattern recognition can be used to distinguish cinnamon from other species of the genus *Cinnamomum* sp. sold as cinnamon.

Key words: Food authenticity; Spices; Food Safety.

6.1. Introdução

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma especiaria de origem asiática derivada da casca de uma árvore, sendo originária do Sri Lanka (antigo Ceilão). A canela também é associada ao nome de sua região de origem, sendo muito comum ser identificado em rótulos de produtos industrializados a menção à origem, *e.g.*, Canela do Ceilão (RAO; GAN, 2014; SURIYAGODA et al., 2021). Esta denominação é frequentemente realizada porque existem mais de 250 espécies do gênero *Cinnamomum* sp. conhecidas, contudo, poucas espécies apresentam valor comercial (GHODKI; GOSWAMI, 2016; SURIYAGODA et al., 2021). Outra espécie de interesse comercial, porém que apresenta menor valor agregado, é a canela da China (*Cinnamomum cassia*) (BARCELOUX, 2009; GHODKI; GOSWAMI, 2016; SURIYAGODA et al., 2021).

Embora apresentem aspecto visual diferente quando em bastão intacto, um dos maiores desafios existentes consiste na diferenciação destas especiarias quando são comercializadas com o bastão fracionado (lascas) ou em pó. A principal estratégia adotada para a diferenciação da especiaria consiste na avaliação visual da cor da amostra, sendo que à canela atribui-se uma coloração mais clara (variando do bege ao marrom pálido) e à cássia uma coloração mais escura (marrom-avermelhado a marrom escuro). Quando em bastão, a medida do comprimento do bastão, espessura da casca e distribuição, tamanho e formato dos grânulos de amido (identificados utilizando microscopia) são estratégias adicionais adotadas para diferenciar canela de cássia (RAVINDRAN, 2017; RAO, PATEL, 2011). Uma alternativa analítica para a identificação da adulteração de amostras comerciais de canela em pó com cássia em pó foi proposta recentemente, utilizando medidas com espectroscopia NIR associadas a ferramentas quimiométricas. No estudo, foi possível diferenciar misturas de canela com cássia nas proporções de 75-25% e 90-10%, respectivamente (CANTARELLI et al., 2020).

Não há na literatura informações quantitativas de cor que permitam uma distinção objetiva entre as especiarias. Assim, a classificação das amostras ocorre de um modo subjetivo, altamente dependente da percepção do analista (CANTARELLI et al., 2020). A percepção da cor a olho nu pode ser afetada por diversos fatores, tais como luminosidade, tamanho de partículas, contraste e até mesmo a fatores

fisiológicos e emocionais (DELWICHE, 2012; PANTONE, 2021). Como aspecto secundário, a cor dos alimentos pode alterar a percepção de gostos, sabores, e até influenciar na escolha do consumidor, sendo, portanto, um dos parâmetros de identidade e qualidade mais importantes para controle, de acordo com os estudos de análise sensorial e sensometria (DELWICHE, 2012; SHANKAR et al., 2009; HOEGG; ALBA, 2007). Dessa forma, se basear exclusivamente na percepção visual da cor como parâmetro de distinção entre canela e cássia em pó não representa uma estratégia segura para diferenciação das amostras, uma vez que este parâmetro pode ser facilmente alterado (SILVIS et al., 2017; ERASMUS et al., 2021). Esta alteração pode ocorrer a partir da mistura de partes vegetais de C. *zeylanicum*, de *Cinnamomum* sp. ou, até mesmo, de outras espécies vegetais seguidas por uma etapa de moagem para homogeneização da mistura (RAO, PATEL, 2011; RAVINDRAN, 2017). Essa prática é muito antiga e que já foi aplicada para diversos alimentos de origem vegetal comercializados em pó, como farinhas e açúcares (WHEELER, 1905). Outra prática muito comum na adulteração de amostras em pó consiste na adição de corantes, muitas vezes não comestíveis, com a finalidade de alterar a cor do produto e torná-lo atrativo ao consumidor, o que é considerada uma prática ilegal (SILVIS et al., 2017; ERASMUS et al., 2021).

As especiarias apresentam uma categoria de alta vulnerabilidade a fraudes e adulterações em função dos produtos serem apreciados em diversas culturas, por serem precificados pelo peso em que são comercializados e, também, em função da capacidade limitada da maior parte dos consumidores em identificar que os produtos estão adulterados (SCHAARSCHMIDT, 2016; SILVIS et al., 2017). Silvis et al. (2017) apontam que existem fatores de motivações econômicas (*e.g.*, espécie, origem geográfica e sistema de cultivo) e culturais (principalmente corrupção e falta de ética) para a ocorrência de fraude nesta categoria de produtos, demonstrando a complexidade do tema. Dessa forma, são muitas as dificuldades a serem superadas para traçar políticas de mitigação de fraudes para esta categoria. Neste contexto, métodos analíticos não alvo podem ser alternativas viáveis para contribuir com a identificação de adulterações em amostras de alimentos, contribuindo para diferenciá-las (McGRATH et al., 2018).

Métodos de análise não-direcionados podem ser entendidos como procedimentos analíticos que não monitoram um ou mais analitos específicos, mas sim, determinam o perfil químico para cada amostra (ESSLINGER et al., 2014).

Diferentes técnicas analíticas podem ser utilizadas para a determinação do perfil químico das amostras, como as espectroscopias no infravermelho próximo, Raman e por imagens hiperespectrais (McGRATH et al., 2018; OLIVEIRA; CRUZ-TIRADO; BARBIN, 2019). Apesar de apresentarem vantagens, como a possibilidade de análise direta e rapidez no processo de coleta de dados, as principais limitações destas técnicas se relacionam à etapa de calibração e, no caso das análises para identificação de adulterações e fraudes, garantir que haja, ao menos, um grupo de amostras que são autênticas, de modo a viabilizar a diferenciação de amostras adulteradas daquelas não adulteradas (ELLIS et al., 2012; McGRATH et al., 2018).

As imagens hiperespectrais (HSI) são métodos de análise não alvo que permitem, a partir da aquisição de imagens, a coleta de sinais de dados espectrais e espaciais que, ao serem empilhados, formam uma estrutura tridimensional (hipercubo) para cada ponto da imagem coletada (EL-MASRY; SUN, 2010; OLIVEIRA; CRUZ-TIRADO; BARBIN, 2019). Isso significa que, para cada pixel da imagem, é possível obter uma medida espectral (EL-MASRY; SUN, 2010; KIANI et al., 2019). As principais vantagens desta técnica consistem na possibilidade de análise de sólidos com pouco ou nenhum preparo da amostra, de avaliar a heterogeneidade das amostras, além de possibilitar a identificação espacial de componentes de interesse (EL-MASRY; SUN, 2010; OLIVEIRA; CRUZ-TIRADO; BARBIN, 2019). Após a obtenção das imagens, análises de dados por quimiometria ou aprendizagem de máquinas, vêm sendo exploradas para atender demandas semiquantitativas, de autenticação e triagem de amostras (OLIVEIRA; CRUZ-TIRADO; BARBIN, 2019; SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021).

A aprendizagem de máquinas é uma subárea da inteligência artificial que utiliza algoritmos para identificar, extrair e utilizar informações de um conjunto de dados para aprender as tendências destes dados e, posteriormente, classificar ou prever informações (SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021). A evolução de *hardware* e *software* de microcomputadores vem tornando o processo de reconhecimento de informações mais rápido e confiável (SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021). Apesar de ainda ser considerada uma tecnologia *black box*, a aprendizagem de máquinas vem sendo bastante explorada nos setores agrícolas e de alimentos (SAHA; MANICKAVASAGAN, 2021; CHANG; COHEN; OSTDIEK, 2018).

Procedimentos de análise de imagens hiperespectrais já foram aplicados em amostras de especiarias e temperos, como nos estudos de autenticação de noz-moscada (KIANI et al., 2019); para avaliação de qualidade, determinação de origem e autenticidade de açafrão (LU et al., 2020) e para predição da concentração de alicina em alho, associando as imagens hiperespectrais a ferramentas quimiométricas e aprendizagem de máquinas (RAHMAN; FAQEERZADA; CHO, 2018). As imagens hiperespectrais também vêm sendo amplamente exploradas como procedimentos de análises alternativos na área de carnes. Exemplos de aplicação são a associação de HSI a ferramentas quimiométricas para detecção rápida de células viáveis de microrganismos em carne de porco, permitindo a previsão do estágio de degradação (HUANG et al., 2013); para previsão do pH e texturas em carnes curadas (LIU et al., 2014) e utilização de sistema hiperespectral no modo *snapshot* a ferramentas de *deep learning* para determinação de autenticidade de diferentes cortes de carnes (AL-SARAYREH et al., 2020).

Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar a potencialidade do padrão de cor e perfil espectral de cada tipo de amostra para a diferenciação de amostras comerciais de canela e cássia.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Instrumentação e procedimento analítico

Primeiramente, as amostras de canela e cássia foram homogeneizadas. Para as amostras em pó, procedeu-se com uma homogeneização simples e quarteamento da mesma. Para amostras em bastão, adotou-se um procedimento de moagem criogênica a fim de tornar as amostras adequadas para análise e evitar a oxidação de compostos responsáveis pela coloração das amostras, uma vez que isto poderia descaracterizar as amostras em bastão. As amostras foram moídas durante 20 min, distribuídos em 5 min de pré-congelamento e 5 ciclos de moagem de 2 min a uma taxa de 15 cps, intercalados com 5 ciclos de recongelamento por 1 min.

Após moagem ou homogeneização, pesou-se (1,5000 $\pm$ 0,0002) g das amostras em pó em placas de Petri descartáveis, incolores, transparentes e estéreis (United Scientific, Waukegan, IL, EUA) de 3,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura.

As amostras foram identificadas e as placas foram lacradas utilizando Parafilm “M”® (Bemis™, Neenah, WI, EUA) até o momento das análises.

Anteriormente às análises, as amostras foram niveladas nas respectivas placas utilizando um utensílio nivelador semelhante à uma espátula, uma vez que a deposição desuniforme das mesmas pode provocar alterações nos resultados e invalidá-los. Após uniformização, foram realizadas medidas de cor das amostras utilizando o sistema de olho eletrônico (Iris V400, Varian, Palo Alto, EUA) mostrado na Figura 6.1. As análises foram realizadas no laboratório de análise instrumental do *Food Quality and Design (FQD)*, localizado no Departamento de Agrotecnologia e Ciência dos Alimentos (AFSG), da Universidade de Wageningen. O sistema é composto por lâmpadas posicionadas nas regiões centro-laterais do equipamento e por uma câmera de alta resolução fixada na região superior central da câmara de análise, a *ca.* 45 cm da base da câmara. Todo o interior do equipamento é branco e a base é composta por material polimérico branco removível. As lentes da câmera não são fixas, podendo ser utilizados conjuntos distintos para diferentes necessidades.

Figura 6.1 - Sistema de olho eletrônico utilizado nas análises de cor. A placa no interior do sistema corresponde ao padrão para calibração do equipamento. Fonte. Imagem parcialmente adaptada de <https://www.norlab.com/library/brochure/10281>. Acesso em: 31 jul. 2021.

Para a aquisição das imagens, foi utilizado um sistema de lentes cuja abertura era de 5 mm. O sistema foi iniciado e aguardou-se *ca.* 10 min para estabilização da emissão de radiação pelas lâmpadas do equipamento. Em seguida, uma placa de Petri contendo canela foi inserida no interior do equipamento e centralizada, de modo que esta estivesse perpendicular à câmera, cujo foco foi ajustado para a posição +1.0. Após o ajuste do foco, o sistema foi calibrado utilizando uma placa de referência (Figura 6.1) e as imagens foram adquiridas em modo individual manual (*single snapshot*), configuradas para a condição de resolução de 2588 x 1942 *pixel* e com *threshold* de 1%. As imagens adquiridas foram pré-processadas, para remoção do background e posteriormente convertidas em canais do sistema RGB, utilizando o *software* disponível no próprio equipamento.

As amostras foram também analisadas utilizando sistema de imagens hiperespectrais (Specim IQ, Spectral Imaging Ltda., Finlândia), equipado com câmera com tecnologia CMOS, com visor de 5 megapixel. A câmera apresenta distância focal de 21 mm e abertura de lente de f/2.2. As imagens foram adquiridas na faixa espectral de 400 a 1000 nm, com 7 nm de resolução espectral (aquisição de imagens com resolução de 512 x 512 *pixel)*. A câmera foi fixada na posição superior de uma mesa contendo 6 lâmpadas halógenas (Philips, Países Baixos) com potência de 50 W (Figura 6.2).

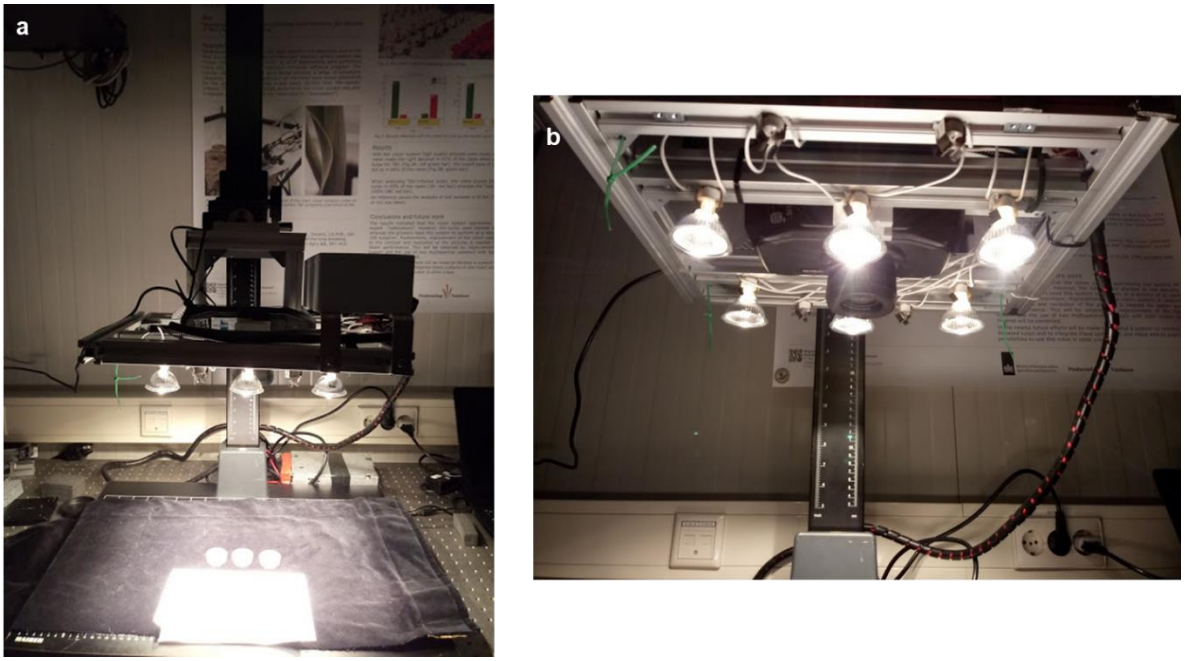


Figura 6.2 - Sistema utilizado para execução das análises hiperespectrais, sendo que em (a) observa-se a mesa com as amostras e em (b) a posição da câmera e o sistema de iluminação utilizado

A mesa utilizada permitia a movimentação da câmera, conforme mostrado na Figura 6.2, tanto em relação à altura em relação às amostras quanto à da sua posição lateral. Para a aquisição das imagens, adotou-se posição da câmera perpendicular às amostras, a uma distância de 55 cm, sendo que as últimas estavam centralizadas e distantes 3 cm entre si. Os espectros foram adquiridos com 10 ms de tempo de integração e 5 ms de tempo de atraso (tempo total de aquisição de 35 s). Anteriormente à aquisição dos espectros, uma placa branca de Teflon® foi utilizada para calibração da câmera, sendo que os dados espectrais obtidos para as amostras foram primeiramente corrigidos em função dos valores de referência para posterior registro do espectro. As análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de robótica TUPOLA, do departamento de *Plant Science* da Universidade de Wageningen, que possui um ambiente com iluminação controlada e vedado a qualquer entrada de luz.

6.2.2. Amostras

Neste estudo, 84 amostras comerciais vendidas como canela foram adquiridas em diferentes países de 5 continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania). O conjunto de amostras analisadas foi constituído por 7 amostras em bastão e por 77 amostras em pó. Em função das limitadas informações sobre o perfil químico destas espécies, todas as informações disponíveis nos rótulos foram coletadas e utilizadas para contribuir na identificação das amostras.

Em relação às amostras em bastão, observou-se que 5 delas correspondiam a *Cinnamomum zeylanicum* e 2 a *Cinnamomum cassia*. Neste caso, foi realizada análise visual para comparação e caracterização das amostras e, assim como descrito por Suriyagoda et al. (2021), notou-se que as amostras de cássia eram mais escuras, rígidas e apresentavam bastões de comprimento de *ca.* 8 cm e com interior oco. Já as amostras de canela apresentavam baixa rigidez, cor bege a marrom pálido e os bastões eram mais longos (*ca.* 12 cm) e com o interior preenchido por várias camadas com espessura fina. A Figura 6.3 ilustra a diferença visual observada nas amostras em bastão, enquanto a Figura 6.4 apresenta o aspecto visual de diferentes amostras em pó analisadas.

Canela em bastão **Cássia em bastão**

Figura 6.3 - Fotografias dos bastões de canela e de cássia

Figura 6.4 - Aspecto visual de amostras das especiarias em pó estudadas

Em relação às amostras em pó, foi observado que o termo “canela moída” é atribuído para as amostras de cássia em pó comercializadas no mercado europeu. Outro termo comum aos rótulos de cássia foi o termo “canela da China”, referindo-se à região de onde a C. *cassia* é nativa. Por outro lado, as amostras de canela (C. *zeylanicum*) comercializadas em pó são rotuladas como canela em pó e estas também são frequentemente associadas às suas regiões de origem, sendo Madagascar e Indonésia os países mais frequentemente citados nos rótulos. Observou-se também que as amostras catalogadas como cássia (ou sinônimos) registraram um preço médio de US$ 0,05 g^{-1}, enquanto amostras de canela registraram US$ 0,40 g^{-1}. Os dados de caracterização das amostras encontram-se relacionados na Tabela 6.1.

Amostras de canela (C. *zeylanicum*) em bastão (n = 3) e de cássia (C. *cassia*) em bastão (n = 3), do conjunto do RIKILT (*Institut of Food Safety* do governo dos Países Baixos), foram utilizadas como referência para comparar com o perfil espectral das amostras comerciais analisadas neste estudo. Estas amostras de referência foram analisadas previamente (utilizando procedimentos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) às análises hiperespectrais e possuem a garantia de pertencer à categoria informada. As amostras foram preparadas e analisadas nas mesmas condições das amostras comerciais.

Em todos os casos, as amostras foram codificadas e mantidas sob refrigeração em câmara fria (4ºC) e protegidas da luz, até o momento de análise.

Tabela 6.1 - Informações declaradas nos rótulos das amostras de canela adquiridas em mercados de diferentes países

n total	País de origem (número de amostras)	País em que foi adquirida (número de amostra)	Informação rotulada	Ingrediente	Forma	Outras informações relevantes
2	N.I.	Equador (2)*	Canela	Não informado	Bastão	Certificado Kosher
17	N.I.	Reino Unido (5), EUA (2), França (2) e Países Baixos (2), Espanha (1), Madagascar (1), Irlanda (1), Dinamarca (1), Austrália (1), Equador (1)	Canela moída	Canela da China e/ou Cássia e/ou *Cinnamomum cassia*	Pó	Fonte de alergênicos (pode conter gergelim e derivados)
5	N.I.	Equador (3) e Reino Unido (2)	Canela	*Cinnamomum zeylanicum*	Bastão	Certificado Kosher
27	Madagascar (10); Indonésia (10); N.I. (7)	Madagascar (7), Indonésia (7), Equador (3), França (2), Dinamarca (2), Reino Unido (2), Alemanha (2), Espanha (2)	Canela	*Cinnamomum zeylanicum*; 100 % *Cinnamomum zeylanicum*	Pó	Produto proveniente da agricultura biológica, não contém glúten, produto orgânico, certificado Halal
10	Indonésia	Austrália (2) e Indonésia (8)	Canela moída	*Cinnamomum* sp. (n = 6); *Cinnamomum camphora* (n = 2); *Cinnamomum burmanii* (n = 2)	Pó	_
23	N.I.	Brasil (10), Austrália (5) e EUA (5), Irlanda (3)	Canela	N.I.	Pó	Fonte de alergênicos (Pode conter aipo, gergelim, mostarda e/ou derivados); Contém glúten; Orgânico; Certificado Halal

* número de amostra proveniente de cada país. N.I. Não informado.

6.2.3. Tratamento de dados hiperespectrais

Após a aquisição das imagens hiperespectrais, utilizou-se o *software* de *machine learning* perClass Mira (versão 2.0, 2019, perClass BV, Países Baixos) para avaliação qualitativa dos dados obtidos, permitindo a identificação e reconhecimento de padrões entre diferentes amostras. Após a avaliação qualitativa das imagens no *software* da câmera, optou-se por trabalhar com a média dos espectros de cada imagem. Assim, uma área de interesse (ROI) 32 x 32 pixel foi selecionada utilizando o *software* ENVI (versão 5.3, 2017, Harris Geospatial Solutions INC, EUA) e os espectros foram extraídos utilizando o *software* The Unscrambler X (versão 10.4, 2016, CAMO Analytics, Noruega), tendo sido adotado o método de correção de dispersão multiplicativa (MSC) para correção do sinal de fundo. Em seguida, os sinais de reflectância foram transformados em sinais de absorção utilizando ferramenta de conversão do *software* Unscrambler. Em seguida, utilizou-se o *software* perClass Mira para identificação de regiões do espectro eletromagnético visível em que amostras de canela e cássia apresentavam diferenças. O padrão espectral das amostras de referência foi informado ao sistema, e por reconhecimento do padrão informado ao *software*, as amostras foram diferenciadas em canela ou cássia.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Caracterização das amostras baseadas na cor

A coloração é um atributo de qualidade importante para ser avaliado e medido nas amostras estudadas, uma vez que possuem relação com o tipo de especiaria, canela ou cássia, utilizada (THOMAS; KURUVILA, 2012; RAVINDRAN, 2017). Outro ponto de destaque é em relação aos pigmentos presentes nas amostras, uma vez que estes também apresentam atividade biológica e antioxidante e, quando oxidados, os pigmentos podem perder a capacidade de prevenir danos oxidativos e reduzir os efeitos benéficos que conferem a saúde (SILVIS et al., 2017; RAVINDRAN, 2017; CÖMERT; MOGOL; GÖKMEN, 2020). Portanto, além de um fator de precificação, a cor também pode indicar a qualidade destas amostras (RAVINDRAN; RAO, PATEL 2011).

Procedimentos voltados às aplicações industriais que objetivam a avaliação de atributos sensoriais (*e.g.*, cor, aroma e gosto) baseados em sensores eletrônicos vêm crescendo nos últimos anos, em função de permitirem uma análise rápida, simples e com maior precisão, não sendo sujeita a influências externas, como luminosidade e humor do analista, por exemplo (DELWICHE, 2012; MENOR-GARCÍA, 2021). Assim, o procedimento para a mensuração quantitativa de cor das amostras de canela e cássia objetivou a identificação de um padrão mais diverso e complexo das amostras (Tabela 6.2). Esta identificação complementa dados da literatura, que frequentemente associam a canela à faixa de cor de bege a marrom e a cássia à cor marrom avermelhado (RAVINDRAN, 2017; THOMAS, KURUVILA, 2012).

Tabela 6.2 - Cores identificadas para as amostras avaliadas e aspecto visual aproximado da cor de cada canal

Cor	R	G	B	Cor
2130	136	88	40	
2131	136	88	56	
2146	136	104	40	
2147	136	104	56	
2148	136	104	72	
2402	152	104	40	
2403	152	104	56	
2404	152	104	72	
2420	152	120	70	
2693	168	136	88	
2949	184	136	88	
2966	184	152	104	

Pode-se perceber, a partir da análise das medidas instrumentais individuais, que os canais B e G foi o que apresentou maior atenuação e, portanto, maior relação com a coloração das amostras. Observou-se também que existem 12 cores predominantes para explicar o padrão de cor observado nas amostras. Estes canais foram identificados pelo próprio *software* do equipamento, após a conversão das cores registradas nas amostras em histogramas de cor, considerando a contribuição (%) relativa a cada canal para a cor total observada.

Assim, quanto maior a contribuição (%) de um canal para explicar a resposta observada, maior a homogeneidade de coloração que uma determinada amostra possui. Observou-se que as amostras de referência de canela apresentaram registro de contribuição de 65% somente para o canal 2966 e as amostras de cássia de 63% para o canal 2131. Para as amostras comerciais utilizadas neste estudo (n = 84) esta distribuição não ocorreu tão concentrada em um único canal, entretanto, os canais com maior contribuição individual, para a maioria das amostras, foram e 2420, 2147, 2403 e 2148, registrando, em média, contribuições de 15%, 12%, 11 % e 8%, respectivamente. A contribuição total dos 12 canais para explicar o padrão de coloração observado nas amostras está representada na Figura 6.5.

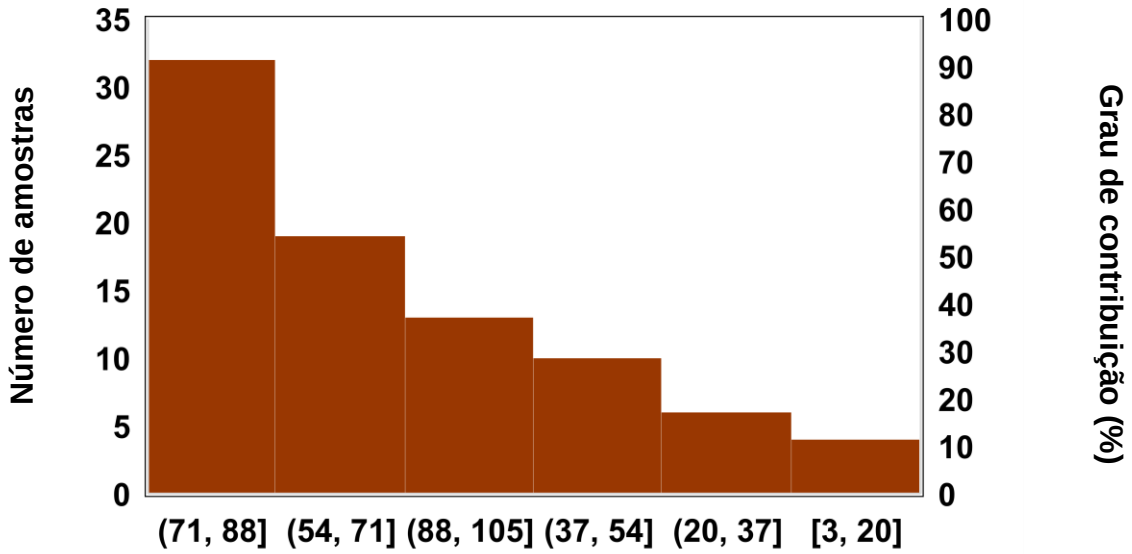


Figura 6.5 - Grau de contribuição (%) dos 12 canais identificados para a explicação dos resultados de cor das amostras. Canais com grau de contribuição inferior a 1% não foram computados.

Observa-se que para 20 amostras as 12 cores identificados apresentaram explicação igual ou inferior a 30% da variação de coloração observada. Isso ocorreu em função destas amostras registrarem sinais para muitos canais de cor, em *threshold* $\leq$ 1%. Esta alta variabilidade no padrão de cor pode estar associada a diversos fatores, especialmente pelo padrão irregular de granulometria. Além disso, foi possível perceber nestas amostras a presença de muitas partes estranhas, incluindo fragmentos de materiais vegetais e de outras matérias estranhas não identificadas (Figura 6.6). Outro fator observado foi o padrão de coloração diferente do esperado para amostras de canela e cássia (Figura 6.7), conforme mostrado na Figura 6.6.

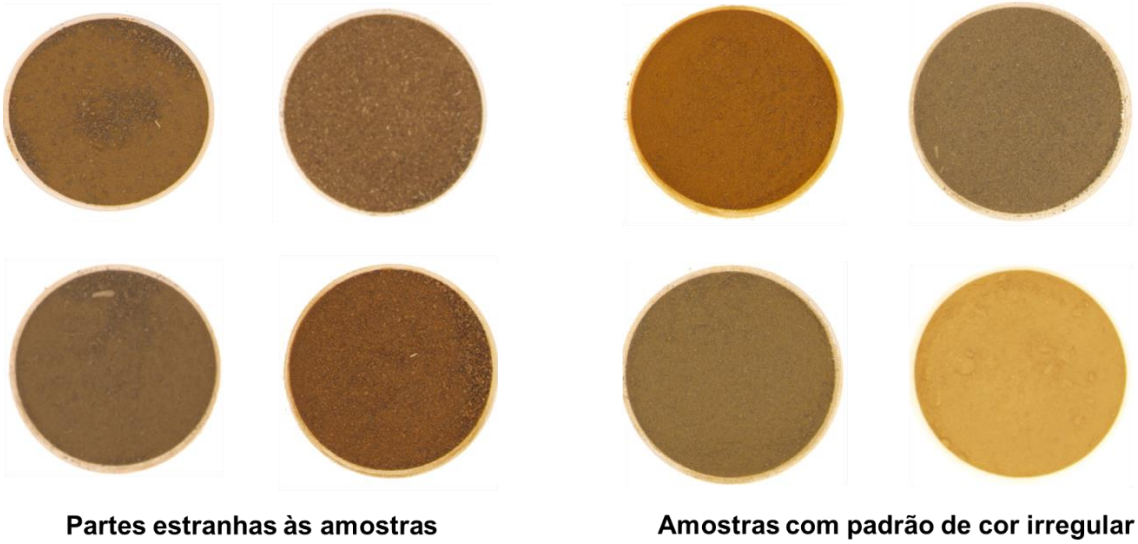


Figura 6.6 - Padrão visual de amostras que tiveram baixas contribuições dos 12 canais identificados como os principais relacionados à sua cor

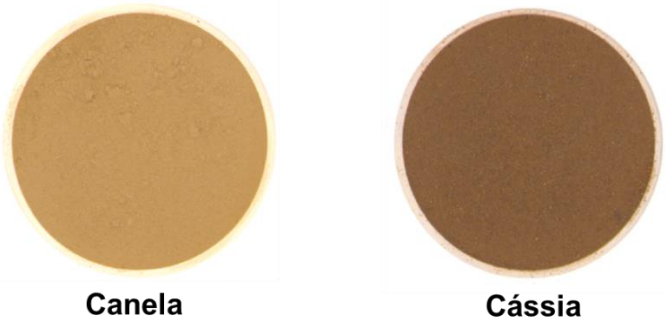


Figura 6.7 - Coloração de amostras de referência de canela e cássia

Portanto, fica evidente que a inspeção visual de cor não é suficiente para qualificar e precificar as amostras, uma vez que as adulterações anteriormente mencionadas não foram percebidas sem a contribuição da análise instrumental. Um exemplo disto foi a dificuldade para diferenciação visual de amostras produzidas a partir de cássia e produzidas a partir de *Cinnamomum* sp e C. *burmanii*. As amostras de cássia e as últimas citadas apresentam padrão semelhante de cor, porém, as amostras de cássia apresentaram maior relação com o canal 2131, enquanto as amostras de *Cinnamomum* sp e C. *burmanii* apresentaram maior relação com o canal 2404 (grau de contribuição, em média, de 35%). As amostras comerciais de canela (C. *zeylanicum*) apresentaram maiores contribuições dos canais 2693 (em média 22%) e 2966 (em média 25%), enquanto as amostras cuja origem não era conhecida

apresentaram menor homogeneidade de coloração e foram mais associadas aos canais 2420, 2146, 2147 e 2148 que apresentaram contribuições acumuladas, em média, de 40%.

Contudo, ainda existem limitações para serem superadas para utilização do olho eletrônico como procedimento de diferenciação destas amostras. A falta de um padrão de cor específico para canela e cássia é o principal fator limitante, uma vez que, para definição do padrão de cor, seria necessário um número maior de amostras de referência, de modo que as variações naturais de cor pudessem ser medidas (VIRTANEN; OLKKONEN; SAARELA, 2020). A partir do padrão quantitativo de cor seria possível definir outro valor de *threshold*, estabelecer padrões de cor esperados em cada caso, e, até, calibrar o equipamento para reconhecer amostras com este mesmo padrão. Com isso, poderia ser possível construir estratégias de classificação para diferenciação das espécies e, também, permitir a identificação de outras espécies de *Cinnamomum* sp. comercializadas como canela, como identificado neste estudo.

6.3.2. Perfil hiperespectral das amostras: tendências observadas

Após a determinação da cor das amostras foram realizadas as análises de imagens hiperespectrais e avaliou-se o perfil espectral registrado para cada *pixel* da imagem. Esta avaliação preliminar foi realizada utilizando o *software* Specim IQ Studio, que equipa a câmera utilizada, de modo síncrono à aquisição das imagens. Foi possível identificar que houve variações significativas do sinal analítico registrado em cada ponto da imagem. Assim, decidiu-se trabalhar com a média dos espectros registradas para cada amostra. Após a avaliação preliminar, os espectros de cada imagem foram extraídos utilizando os *softwares* ENVI e The Unscrumbler X. A Figura 6.8 registra os sinais espectrais brutos para as amostras (n = 84) utilizadas neste estudo e a Figura 6.9 mostra os espectros após a correção de sinais multiplicativa e transformação dos dados em sinais de absorbância. Os espectros obtidos para as amostras de referência de canela e cássia, após correção do sinal de fundo e conversão para absorbância, são mostrados na Figura 6.10.

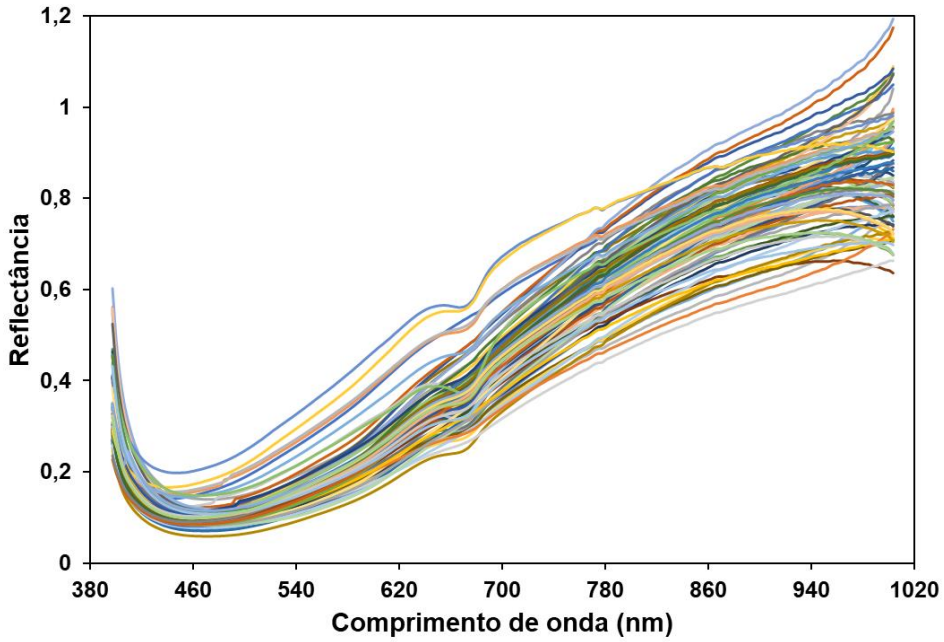


Figura 6.8 - Espectros brutos do conjunto de amostras analisado

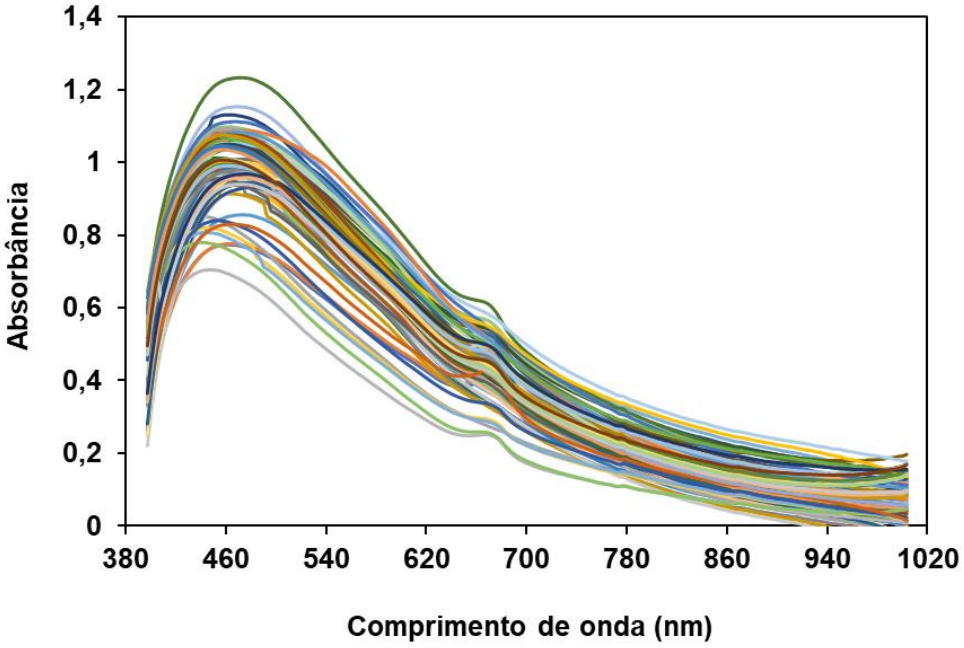


Figura 6.9 - Espectros após correção multiplicativa e conversão para absorbância

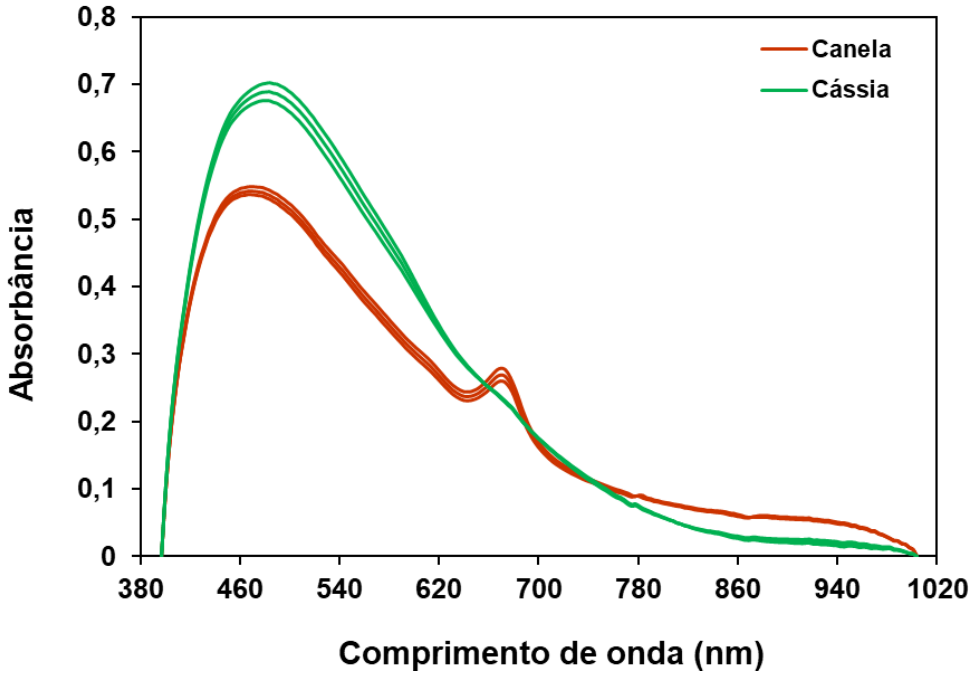


Figura 6.10 - Espectros de absorção para amostras de referência de canela e cássia

O perfil espectral observado para as amostras é coerente com o perfil observado para as amostras de referência. As amostras apresentaram um pico de absorção de radiação na região de 450 a 490 nm. Esta região do espectro possui relação com a cor das mesmas e, assim, as amostras de canela e cássia apresentaram máxima absorção de radiação em 470 nm e 485 nm, respectivamente. É possível observar que as amostras de canela apresentam uma segunda banda de absorção de radiação na região de 660 nm (Figura 6.10). As amostras de cássia e das outras espécies citadas de *Cinnamomum* sp não apresentaram esta segunda banda de absorção de radiação conforme indicado na Figura 6.11.

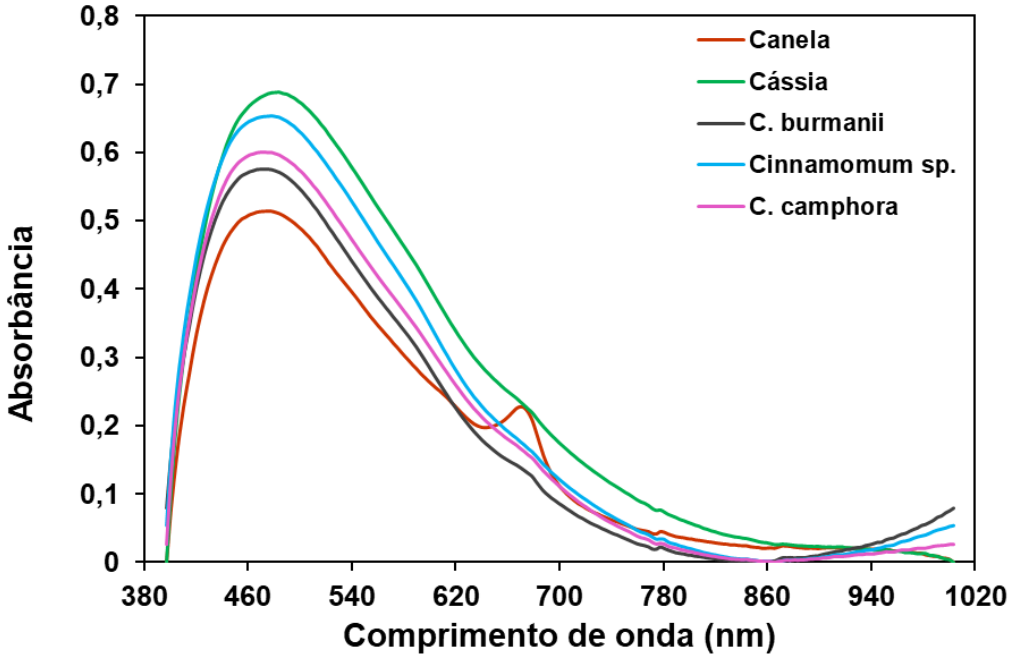


Figura 6.11 - Espectros de absorção de amostras selecionadas de canela, cássia, C. *burmanii*, C. *camphora*, *Cinnamomum* sp.

A região de absorção de radiação de 660 a 700 nm é atribuída às clorofilas e caracteriza a absorção da clorofila *a* (MILNE et al., 2015; ERGUN et al., 2004). Esta informação complementa dados disponíveis na literatura. Frequentemente é relatado que as amostras de canela apresentam maior diversidade e concentração de polifenóis e outros compostos antioxidantes do que as outras espécies de *Cinnamomum* sp. (MATEOS-MARTÍN et al., 2012; VETAL et al., 2013; RAVINDRAN, 2017). Nas plantas, estes compostos atuam como protetores da oxidação de clorofilas, já que este grupo de pigmentos é vital para o processo fotossintético e de modulação de outros aspectos metabólicos em plantas (ERGUN et al., 2004; MILNE et al., 2015). Estudos já demonstraram o efeito antioxidante das clorofilas e de seus derivados, além de identificarem que estes atuam como precursores de diversos outros compostos com atividade antioxidante descobertos recentemente (PÉREZ-GÁLVEZ; VIERA; ROCA, 2020; STREIT et al., 2005). Entretanto, a determinação quantitativa de clorofilas é complexa e possui limitações, sobretudo relacionadas ao preparo das amostras para análise (PÉREZ-GÁLVEZ; VIERA; ROCA, 2020; STREIT et al., 2005). Por este motivo, optou-se por explorar qualitativamente os dados obtidos associando a estratégia de reconhecimento de padrões, utilizando o *software* perClass Mira.

Primeiramente, as imagens das amostras foram inseridas no *software* e foi selecionado para monitoramento a identificação do padrão informado para as amostras analisadas, que considera os dados das medidas espectrais. Foi possível agrupar as amostras de acordo com 12 padrões espectrais identificados. Além disso, a presença de matérias estranhas e fragmentos e granulometria irregular também foi possível de ser identificada nas amostras (

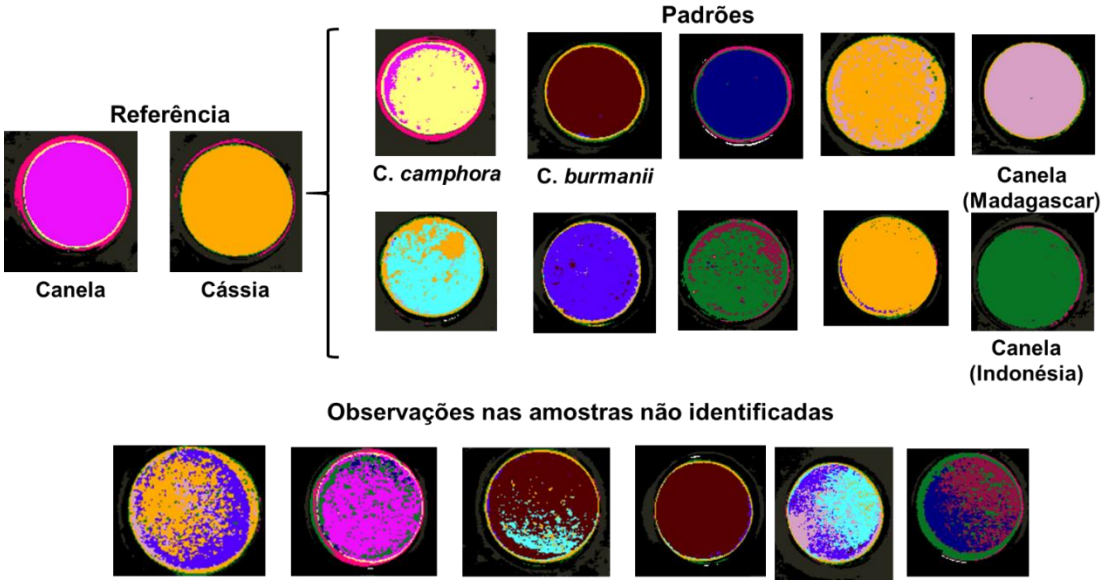


Figura 6.12). Não foi possível identificar a origem deste material, entretanto, houve identificação de semelhanças com materiais de origem vegetal. Esta medida confirma os casos relatados na literatura em relação a mistura de partes vegetais alheias às amostras, inclusive, considerando as amostras em bastão, já que 1 amostra de canela em bastão não teve o seu perfil reconhecido como canela (C. *zeylanicum*) (RAVINDRAN, 2017; THOMAS; KURUVILLA, 2012).

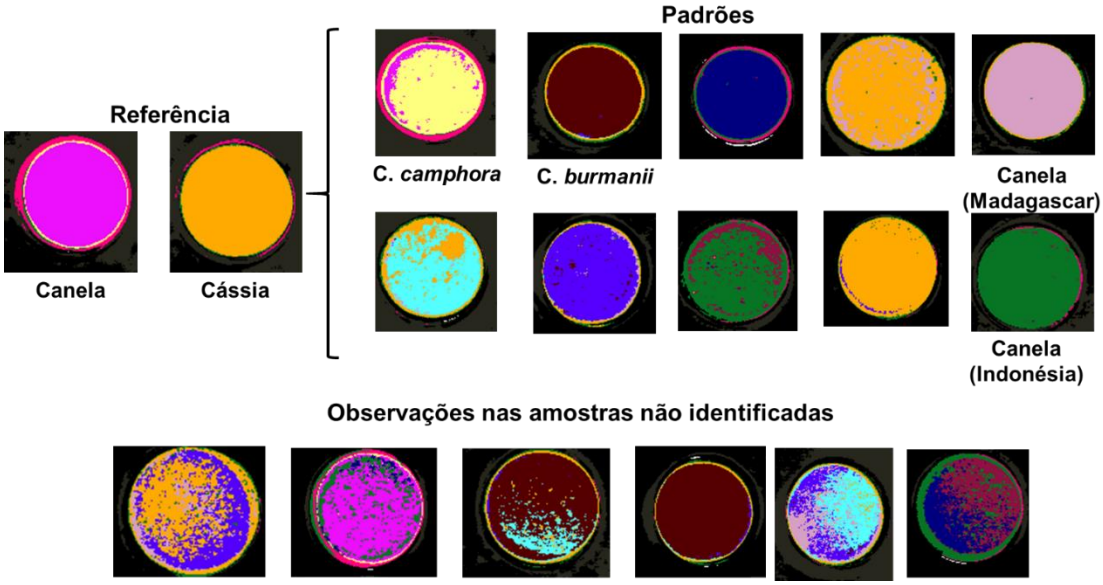


Figura 6.12 - Perfis identificados como padrão e observados para amostras comercializadas sem identificação quanto à espécie utilizada. Cores diferentes indicam diferenças quanto ao perfil espectral identificado pelo *software*

Pode-se perceber (

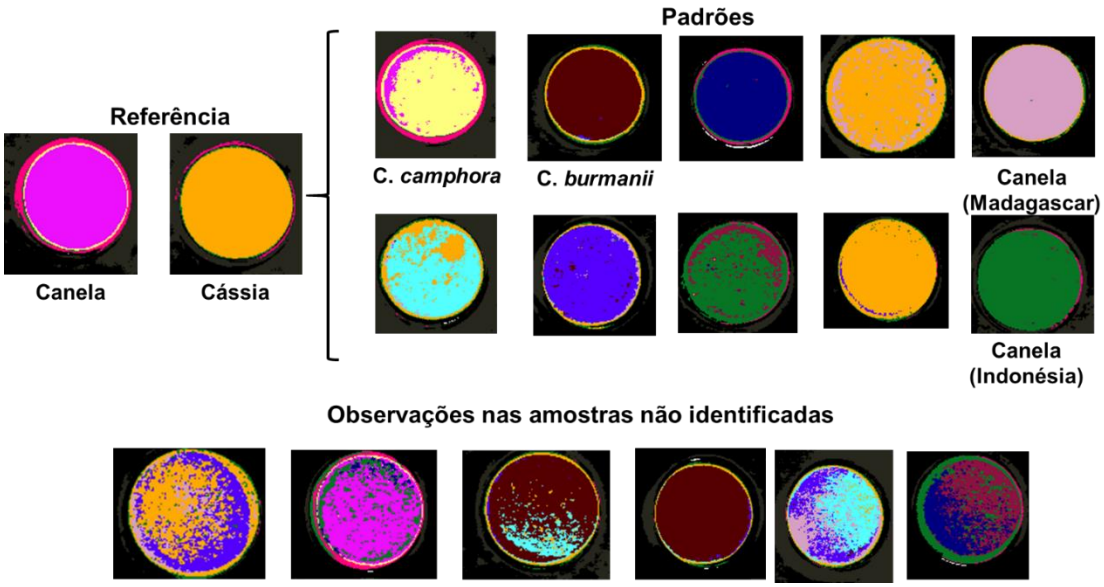


Figura 6.12) que amostras com informações não disponíveis apresentam grande variabilidade, o que demonstra que estas amostras estão mais sujeitas às adulterações, sendo estas intencionais ou não. Relatos de processos alérgicos moderados a graves via ingestão de especiarias adulteradas com vegetais alergênicos (*e.g.* resíduos do processamento de amendoim e gergelim) têm se tornado frequentes (CANTARELLI et al., 2020; FOOD AUTHENTICITY NETWORK,

2021). Portanto, ser capaz de reconhecer o perfil das especiarias não adulteradas e adulteradas torna-se fundamental para garantir a segurança destes alimentos.

Em relação à diferenciação das amostras considerando a região de absorção das clorofilas observou-se que amostras de C. *burmanii* e de outras espécies do gênero *Cinnamomum* sp. foram identificadas como apresentando um perfil semelhante às amostras de cássia e, portanto, não foram diferenciadas desta (Tabela 6.3). Amostras cuja espécie não foi informada não foram incluídas para avaliação do processo de eficiência devido à limitação de identificar quantas foram reconhecidas corretamente. A taxa de sensibilidade foi calculada a partir da relação entre as amostras totais para cada tipo e as amostras corretamente classificadas como pertencente àquele tipo. A taxa de especificidade foi calculada considerando a informação declarada no rótulo para estimar o número de falsos positivos e falsos negativos. Para estudos futuros, recomenda-se a inclusão de amostras de referência das outras espécies citadas como forma de melhorar o modelo de diferenciação e identificar outras possíveis diferenças espectrais destas em relação às amostras de cássia.

Tabela 6.3 - Eficiência do processo de reconhecimento de padrão para canela e cássia

Amostra	N	Amostras diferenciadas adequadamente (n)	Taxa de sensibilidade (%)	Taxa de Especificidade (%)
Canela	32	27	84,4	100
Cássia	17	17	100	100
Outras espécies de *Cinnamomum* sp.	10	0*	-	-

* Amostras identificadas como cássia.

Foi possível observar que o modelo estabelecido não reconheceu 5 amostras de canela, considerando apenas o sinal analítico registrado. Isto pode ter ocorrido em função destas amostras apresentarem menor intensidade no sinal e, por isso, podem ter sido confundidas com amostras de cássia. As amostras de canela cujas espécies não foram mencionadas nos rótulos não foram consideradas para determinação das taxas de especificidade e seletividade, uma vez que

não há como determinar um padrão para comparação e determinação da quão eficiente a técnica foi para diferenciação.

6.4. Conclusões e perspectivas futuras

O estudo desenvolvido neste capítulo demonstrou a complexidade para a diferenciação de amostras de canela e cássia, dadas a falta de informações disponíveis na literatura e informações controversas, além de casos frequentes de fraudes e adulterações. A classificação destas amostras com base na percepção visual e utilizando uma escala subjetiva pode ser apontada como uma estratégia limitada para diferenciação destas especiarias, o que foi identificado utilizando medidas instrumentais. A determinação da cor das amostras utilizando o olho eletrônico apresentou resultados concordantes com o observado nas imagens hiperespectrais, sendo possível observar 12 padrões de cor para estas amostras. Entretanto, a limitação de um padrão de cor específico para as amostras limita a capacidade de classificação e reconhecimento do padrão destas, utilizando o olho eletrônico.

A análise das imagens hiperespectrais permitiu identificar a contaminação das amostras com material vegetal estranho às mesmas, além de identificar regiões em que a granulometria do material não era uniforme. A transformação das imagens em sinais analíticos de absorbância permitiu a identificação de uma das bandas de absorção de clorofila, que foi associada às amostras de canela. O sistema de reconhecimento de padrão utilizado permitiu identificar corretamente 84,4% das amostras de canela e 100% das amostras de cássia, considerando que as informações rotuladas estão corretas. Entretanto, amostras de outras espécies do gênero *Cinnamomum* sp. não foram identificadas corretamente, pois seu padrão espectral foi confundido com as amostras de cássia.

Este é um capítulo que apresenta resultados preliminares e informações incrementais às disponíveis na literatura para ambas as especiarias. A complementação de informações utilizando outros métodos analíticos para contribuir com a caracterização destas amostras, bem como definir estratégias para a coleta de amostras de referência e incluir a determinação semiquantitativa de componentes destas amostras que podem contribuir para sua caracterização, como é o caso das clorofilas para canela e amido, para cássia, poderá contribuir para diferenciar as amostras de modo mais assertivo e, até, para finalidades quantitativas.

Referências do Capítulo 6 encontram-se ao final desta Tese.

7. Explorando o potencial do perfil mineral para diferenciação de amostras comerciais de canela[9]

Resumo

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma especiaria muito consumida em todo o mundo e que apresenta diversos benefícios à saúde em função do seu perfil de compostos bioativos. Apesar da alta relevância no cenário alimentar, ainda existem poucas informações sobre o perfil químico (*fingerprint*) destas amostras. O objetivo deste capítulo foi avaliar a possibilidade de utilizar o perfil mineral para identificar diferenças em amostras de canela. Assim, foi determinado o perfil mineral (P, S, Mg, Ca, K, Cu, Zn, B, Fe, Al, Mn e Si) de 56 amostras de canela e 12 amostras de cássia, adquiridas em diferentes regiões do Estado de São Paulo, pela técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. A análise de componentes principais foi explorada para identificar as diferenças entre os grupos de amostras. As componentes PC1 e PC2 foram responsáveis por explicar 58,7% da variância observada no estudo, a um nível de confiança de 95%. As concentrações de Zn, P, S e K não diferiram significativamente entre os conjuntos de amostras avaliadas. As amostras de cássia em bastão apresentaram maior relação com Ca, enquanto as amostras de canela de Madagascar apresentaram maior relação com os elementos envolvidos na síntese e disponibilidade de clorofila (Mg, Mn e Cu). As amostras adquiridas a granel e aquelas cujos rótulos declararam vestígios de grãos e/ou outras especiarias apresentaram a maior variabilidade (CV%), indicando a possibilidade de contaminação com matérias estranhas às amostras.

Palavras-chave: Microelementos; Macroelementos; Especiarias; ICP OES; Segurança de alimentos.

[9] Resultados parcialmente publicados no artigo: SILVA, A.F.S. et al. Can minerals be used as a tool to classify cinnamon samples? In: INTERNATIONAL ELECTRONIC CONFERENCE ON FOOD SCIENCE AND FUNCTIONAL FOODS, 1., Basel, Switzerland, 2021. **Proceedings…** p. 22. 2021. doi: https://doi.org/10.3390/foods_2020-07652.

Abstract

Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) is a spice largely consumed worldwide and that present several health benefits due to its bioactive compounds profile. Although the high relevance in the food scenario, there is still few information about its chemical profile (fingerprint). This chapter aimed to evaluate if the mineral composition could be used as a marker to identify differences in cinnamon samples. So that, the mineral profile (P, S, Mg, Ca, K, Cu, Zn, B, Fe, Al, Mn, and Si) of 56 samples of cinnamon and 12 samples of cassia acquired in different regions of the State of São Paulo, Brazil, was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), after microwave-assisted sample digestion. Principal component analysis was exploited to identify the sample differences and PC1 and PC2 explained 58.7% of the observed variance at 95% confidence level. Zn, P, S, and K concentrations did not differ significantly among the groups of samples analyzed. Cassia barks showed high correlation with Ca, while Madagasgar samples presented higher correlation with the elements related to the synthesis and availability of chlorophyll in plants (Mg, Mn, and Cu). Samples acquired in bulk and those that declared a possible cross contamination with grains and/or other spice(s) presented the highest variability (CV %), indicating the possibility of cross contamination with another foodstuff.

Keywords: Microelements; Macroelements; Spices; ICP OES; Food Safety.

7.1. Introdução

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma especiaria de origem asiática, mais especificamente do Sri Lanka, que historicamente vem sendo utilizada para fins medicinais, produção de cosméticos e para aplicações culinárias (BHAGYA; RAVEENDRA; LALITHYA, 2015; RAO; GAN, 2014; SURIYAGODA et al., 2021). Ao todo, são mais de 250 espécies conhecidas de *Cinnamomum* sp. embora apenas algumas delas (*i.e.*, C. *zeylanicum*, C. *cassia*, C. *burmannii*, C. *loureiroi*, C. *tamala*, C. *camphora*, C. *sintok*, C. *ineris* e C. *obtusifolium*) apresentem valor comercial (BARCELOUX, 2009; SURIYAGODA et al., 2021).

Quanto às aplicações na área de alimentos, as espécies que são mais utilizadas e que apresentam maior valor comercial são C. *zeylanicum* e C. *cassia*, que se referem, respectivamente, à “canela verdadeira” e à “canela cássia” ou simplesmente “cássia” (GHODKI; GOSWAMI, 2016; SURIYAGODA et al., 2021). Estudos recentes apresentam descrições dessas duas espécies, sob os aspectos botânicos e morfológicos, contribuindo para a sua caracterização, uma vez que as informações técnicas a respeito desta especiaria ainda são escassas na literatura (RAO; GAN, 2014; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017; SURIYAGODA et al., 2021).

Diversos benefícios à saúde, como efeitos antimicrobianos e anti-infecciosos, e efeito contra doenças crônicas e inflamatórias, como síndrome metabólica, dislipidemia e resistência à insulina já foram reportados a esta especiaria. Esses efeitos são relacionados ao seu perfil de compostos bioativos, com destaque para o ácido cinâmico, cinamato e cinamaldeído (GUL; SAFDAR, 2009; QIN; PANICKAR; ANDERSON, 2010; RAO; GAN, 2014; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017; SURIYAGODA et al., 2021).

Devido ao crescente interesse da indústria de alimentos em relação à utilização de especiarias em seus produtos, este grupo alimentício se encontra em uma categoria de alimentos que apresenta um risco médio de fraude (SILVIS et al., 2017). Este aspecto é agravado pela complexidade da cadeia agroindustrial, falta de informações sobre o perfil físico-químico do produto e distância entre os polos produtores (sobretudo Ásia e a ilha de Madagascar) e de consumo (sobretudo Europa Ocidental e Estados Unidos da América) destes produtos. As principais fraudes referem-se à rotulagem incorreta e à adulteração motivada por ganhos financeiros,

conhecida na classificação de fraudes de alimentos como EMA (em inglês, *Economically Motivated Adulteration*), e que ocorre utilizando matérias estranhas ao produto ou partes vegetais de menor valor comercial (GALVIN-KING; HAUGHEY; ELLIOT, 2018; SILVIS et al., 2017; SURIYAGODA et al., 2021; van RUTH et al., 2018).

Mais informação sobre a composição de alimentos também é necessária devido à discussão global sobre alergênicos e *sensitizers* em função das projeções de aumento de alergias alimentares, como recentemente demonstrado para certos gêneros alimentícios (TAYLOR et al., 2021). A canela e a cássia aparecem nesta discussão como *sensitizers*, uma vez que a cumarina, presente sobretudo na cássia, na ordem de concentração de pelo menos 1%, já foi relatada em diversos estudos clínicos como um gatilho de reações alérgicas, sendo os principais sintomas a dermatite de contato, alergias respiratórias e rino-conjuntitive (BLAHOVÁ; SVOBODOVÁ, 2012; SCHÖLL; JENSEN-JAROLIM, 2004).

Na União Europeia, o Regulamento CE nº 1334, de 16 de dezembro de 2008, recomenda a declaração da adição de canela e/ou cássia em produtos alimentícios e em bebidas, sendo que classes diferentes de alimentos apresentam diferentes concentrações máximas de tolerância à cumarina (POTTERING; LE MAIRE, 2008). Cabe destacar que a diferenciação e/ou quantificação de canela e cássia em gêneros alimentícios ainda não é feita em função de limitações sobre o conhecimento dos perfis químicos e pela limitação de procedimentos analíticos para sua caracterização. Nesse contexto, a diferenciação limita-se à inspeção visual das cascas, quando estas estão com o bastão intacto, realizada em algumas empresas do setor[10] (POTTERING; LE MAIRE, 2008).

O conceito de autenticidade é essencial para definir e classificar os alimentos de acordo com o seu padrão físico-químico, além de garantir a segurança dos consumidores, assegurar a qualidade dos alimentos e mitigar fraudes ao longo das cadeias de alimentos (KAMILOĞLU, 2019). Assim, muitas estratégias são utilizadas para compor a política de garantia da qualidade dos alimentos, o que pode envolver desde práticas educacionais até abordagens mais objetivas, como a utilização de métodos instrumentais de análise.

As medidas instrumentais podem envolver a mensuração quali-quantitativa de propriedades químicas e/ou físicas das amostras, que podem ser combinadas às

[10] Informação pessoal obtida junto a empresas de especiarias e multinacional de alimentos.

ferramentas quimiométricas para seleção e triagem destas em relação à conformidade de acordo com um padrão pré-estabelecido. As estratégias podem ser subdividas em duas classes: aquelas que não apresentam analitos alvo, usualmente envolvendo espectroscopias no infravermelho, Raman e imagens hiperespectrais, e aquelas que apresentam um ou mais analitos alvo, usualmente baseadas em procedimentos de biologia molecular, separações cromatográficas e espectrometria atômica (BLAHOVÁ; SVOBODOVÁ, 2012; KAMILOĞLU, 2019; OLIVERI; DOWNEY, 2012).

O interesse em técnicas não alvo vem crescendo em função das vantagens no contexto de produção e de necessidades industriais atuais, como rapidez e facilidade de execução da análise, relação custo-benefício e possibilidade de portabilidade, permitindo que sejam feitas análises *in-situ*. Entretanto, limitações relacionadas a estes procedimentos ainda precisam ser superadas, como dificuldades para calibração, falta de materiais de referência para utilização como padrões e a complexidade no tratamento de dados. Essas limitações podem dificultar processos de autenticação de amostras com alta complexidade ou que possuam poucas informações químicas disponíveis, como é o caso das especiarias, particularmente da canela (LIU et al., 2021; MCGRATH et al., 2018; ANSE/CIQUAL, 2020).

A determinação da composição elementar pode representar uma estratégia viável para distinguir a canela da cássia, uma vez que esta abordagem já foi amplamente explorada como marcador de origem alimentar (conceito *terroir*) e para a rastreabilidade de produtos com denominação de origem, como azeites espanhóis (BELTRÁN et al., 2015) e cebolas (ARIYAMA et al., 2007). Também foi utilizado como um marcador de autenticidade de alimentos, como *heritage food* (KOKHAR et al., 2012), mel (CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010) e café (POHL et al., 2013).

Embora determinações elementares para canela e cássia já tenham sido realizadas em estudos anteriores (AL-NUMAIR et al., 2007; GUL; SAFDAR, 2009), a possibilidade de diferenciação das espécies baseada nesta abordagem ainda não foi investigada. Os estudos anteriores forneceram informações iniciais sobre a composição centesimal, o perfil mineral e a concentração de compostos bioativos nessas espécies, utilizando, entretanto, poucas amostras para condução dos estudos

(AL-NUMAIR et al., 2007; GUL; SAFDAR, 2009; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017; SURIYAGODA et al., 2021).

O objetivo deste capítulo é avaliar a composição elementar visando distinguir amostras de canela e cássia. Foram considerados 12 elementos (P, S, Mg, Ca, K, Cu, Zn, B, Fe, Al, Mn e Si) com base no papel que desempenham na nutrição humana. A análise de componentes principais foi realizada para identificar diferenças entre as amostras avaliadas.

7.2. Materiais e métodos

7.2.1. Amostras e soluções

Neste estudo, foram adquiridas 68 amostras de especiarias comercializadas como canela, em diferentes mercados do Estado de São Paulo. Mediante informações declaradas nos rótulos, as amostras foram divididas nos grupos: *Cinnamomum zeylanicum* em pó (n = 18, origem: Ceilão), *Cinnamomum zeylanicum* em pó (n = 10, origem: Madagascar), *Cinnamomum cassia* em pó (n = 8, origem China), *Cinnamomum cassia* em bastão (n = 12, sem origem especificada) e amostras à granel, cujas origens e espécies utilizadas não foram informadas (n = 20). O preço das amostras adquiridas variou de US$ 0,02 a US$ 0,14/g.

Para as amostras de cássia, optou-se pela aquisição de amostras na forma de bastão, para garantir que este conjunto de amostras era, de fato, cássia.

Na avaliação de rotulagem das amostras comercializadas em pó (n = 36), observou-se que treze destas foram declaradas como passíveis de contaminação cruzada com fontes alergênicas reguladas por legislação nacional (pode conter glúten) e internacional (pode conter aipo e/ou mostarda). Os rótulos também apresentavam a informação de que poderia conter outras especiarias, conforme sugerido por órgãos reguladores da área de alimentos da União Europeia (EFSA, 2021). Todas as amostras de canela em pó industrializadas apresentaram informações sobre dados nutricionais, receitas e benefícios à saúde relacionados ao seu consumo regular.

As amostras foram codificadas, armazenadas sob refrigeração (8ºC) e protegidas da luz até que a determinação elementar fosse realizada.

Soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de padrões comerciais dos elementos a serem determinados, utilizando água ultra-pura (resistividade > 18,2 MΩ cm).

7.2.2. Instrumentação

A composição elementar foi determinada por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), após moagem e decomposição das amostras. A moagem foi realizada em um moinho criogênico (Freezer Mill 6870, SPEX, EUA), que possibilita obter partículas inferiores a 100 µm e melhorar a homogeneidade das amostras. O programa de moagem teve duração total de 20 min, distribuídos em uma etapa de pré-congelamento (5 min), 5 ciclos de moagem com duração 2 min a uma taxa de moagem de 30 cps, intercalados com 5 ciclos de recongelamento com duração de 1 min. Durante todo o processo de moagem, as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido (-196 ºC).

Após a moagem, as amostras foram solubilizadas por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, seguindo o procedimento proposto por Peruchi et al. (2014). Assim, 500 mg de cada amostra foram transferidos para frascos TFM®, nos quais foram adicionados 6,0 mL de HNO_3 2,0 mol L^{-1} e 2,0 mL de H_2O_2 30% v/v (em ambos os casos, Merck, Alemanha). Após serem fechados, os frascos foram submetidos a aquecimento em forno de micro-ondas (ETHOS 1600, Milestone, Itália) seguindo o programa mostrado na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 - Programa de aquecimento para digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Em todas as etapas, foi aplicada potência máxima de 1000W

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Condição de aquecimento
1	3	120	Rampa
2	2	120	Patamar
3	3	160	Rampa
4	2	160	Patamar
5	5	220	Rampa
6	20	220	Patamar

Após a digestão, a solução resultante foi resfriada e, em seguida, o volume foi ajustado para 25 mL utilizando água ultra-pura (resistividade > 18,2 MΩ cm). A

determinação elementar foi realizada em um ICP OES (iCAP 7400, Thermo, EUA), sob condições otimizadas, descritas na Tabela 7.2. As concentrações dos analitos foram determinadas utilizando calibração externa.

Tabela 7.2 - Condições instrumentais para a determinação elementar por ICP OES

Parâmetro analítico	Condição otimizada
Potência de rádio-frequência	1,2 kW
Vazão do gás do plasma	12,0 L min^{-1}
Vazão do gás auxiliar	0,50 L min^{-1}
Vazão do gás nebulizador	0,60 L min^{-1}
Taxa de aspiração da amostra	1,5 mL min^{-1}
Elemento	Comprimento de onda (modo de detecção)
P	213,618 nm (Radial)
S	182,034 nm (Radial)
Mg	280,270 nm (Radial)
Ca	422,673 nm (Radial)
K	766,490 nm (Radial)
Cu	324,754 nm (Axial)
Zn	324,754 nm (Axial)
B	249,773 nm (Axial)
Fe	259,940 nm (Radial)
Al	396,152 nm (Radial)
Mn	257,610 nm (Axial)
Si	251,611 nm (Radial)

Para a avaliação da exatidão, o mesmo procedimento (preparo de amostra e determinações analíticas) foi executado utilizando o material de referência certificado (CRM) NIST 1515 - Folhas de Maçã (Gaithersburg, EUA) (NIST, 2019). A escolha desse CRM foi realizada em função de apresentar a composição mais semelhante às amostras utilizadas neste estudo. Para isto, as informações sobre a composição do CRM foram comparadas com aquelas presentes nas tabelas de composição dos alimentos, de referência do Brasil (TBCA, 2021), dos Estados Unidos da América (USDA *FoodData Central*, 2020) e da França (ANSE/CIQUAL, 2020).

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados de acordo com as Equações (1) e (2), respectivamente, seguindo as recomendações da

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (LONG; WINEFORDNER, 1983).

$$LOD = 3{,}3 \times (sd_b/m) \quad (1)$$

$$LOQ = 3 \times LOD \quad (2)$$

Em que:

sd_b = estimativa de desvio padrão de 10 medidas do branco;

m = inclinação da curva de calibração para cada elemento.

7.2.3. Análises estatísticas

As amostras foram separadas de acordo com informações declaradas pelos fabricantes nos seguintes grupos: *Cinnamomum zeylanicum* (origem: Madagascar, forma: em pó), *Cinnamomum zeylanicum* (origem: Ceilão, forma: em pó), Cássia (origem: não declarada, forma: em bastão), Cássia (origem: China, forma: em pó). Além disso, 20 amostras da especiaria em pó não apresentavam a informação quanto à fonte do produto (*i.e.*, tipo de planta) ou quanto à origem geográfica da mesma e foram consideradas em um único grupo, como amostras com informações não declaradas.

As concentrações de minerais foram avaliadas estatisticamente de acordo com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (1952), considerando nível de confiança de 95%. Em seguida, a dispersão das amostras foi avaliada utilizando análise de componentes principais (PCA) com a finalidade de prospectar as diferenças entre os grupos. As análises foram realizadas pelo *software* The Unscrambler X (versão 10.4, 2016, CAMO Analytics, Noruega) e, como pré-processamento, os dados foram auto-escalados.

7.3. Resultados e Discussão

7.3.1 Determinação elementar

O procedimento de preparo de amostra utilizado, envolvendo decomposição ácida assistida por micro-ondas em sistema fechado é considerado o estado da arte entre os procedimentos disponíveis visando à determinação elementar (KORN et al.,

2008; GARITTA et al., 2021). Particularmente, foi usada solução ácida diluída, o que minimiza valores de branco e gera digeridos mais compatíveis com a determinação por ICP OES. Nos digeridos obtidos foi possível determinar P, S, Mg, Ca, K, Cu, Zn, B, Fe, Al, Mn, e Si por ICP OES. A Tabela 7.3 apresenta os LOD e LOQ estimados para cada elemento, que indicam que a técnica de detecção escolhida é apropriada para a determinação dos elementos de interesse, cuja concentração nos grupos de amostras avaliadas é muito superior aos limites do procedimento (ANSE/CIQUAL, 2020; USDA *FoodData Central*, 2020; TBCA, 2021). A exatidão do método foi verificada com a análise do CRM NIST 1515. Os valores determinados por ICP OES não diferiram dos valores de referência, de acordo com o teste t (Tabela 7.4), à exceção do Fe. A Tabela 7.5 apresenta os resultados das determinações elementares para os conjuntos de amostras analisados. Em todos os casos, os valores das incertezas relativas foram inferiores a 8%.

Tabela 7.3 - Limites de detecção e quantificação (mg kg^{-1}) determinados experimentalmente para cada elemento

Elemento	LOD	LOQ
Cu	0,04	0,12
Zn	0,04	0,12
B	0,02	0,06
Fe	0,01	0,03
Al	0,10	0,30
Mn	0,02	0,06
Si	0,6	1,8
P	0,03	0,09
S	0,05	0,15
Mg	0,06	0,18
Ca	0,34	1,02
K	0,32	0,96

Tabela 7.4 - Indicadores de exatidão do procedimento analítico utilizado para determinação elementar (CRM NIST 1515). Valores médios de frações de massa (mg kg^{-1}) seguidos pelas respectivas incertezas (n=3)

Elemento	Valor determinado	Valor certificado[1]	t calculado[3]
Cu	5,5±0,1	5,69±0,13	2,351
Zn	12±3	12,45±0,43	0,236
B	27,9±0,2	27,6±2,8	2,598
Fe	65,0±1,1	82,7±2,6	25,548
Al	296±34	284,5±5,8	0,563
Mn	55,1±0,6	54,1±1,1	2,916
Si	551±7	N.A.[2]	-
P	1610±20	1593±68	1,472
S	1707±13	(1800)*	-
Mg	2767±122	2710±120	0,809
Ca	15260±300	15250±100	0,058
K	16100±200	16080±210	0,173

[1] Informação disponível em: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/1515.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2021.
[2] N.A. Informação não disponível.
[3] t crítico = 4,303, considerando nível de confiança de 95%.
* Para S, não foram reportadas as incertezas, devido ser uma medida de referência, conforme indicado no Relatório Técnico do material de referência NIST 1515.

Tabela 7.5 - Concentrações (mg kg^{-1}) elementares determinadas por ICP OES para os grupos de amostras analisados. Médias seguidas pelas respectivas incertezas (n=3)

Elemento	C. *zeylanicum* (Ceilão)		C. *zeylanicum* (Madagascar)		Cássia (bastão)		Cássia (pó)		Amostras com informações não declaradas	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.
Cu	3,42±0,01	7,7±0,5	3,8±0,1	8,6±0,1	2,70±0,05	3,43±0,05	2,55±0,03	8,2±0,1	2,96±0,04	10,5±0,1
Zn	6,75±0,03	16±1	10,3±0,7	16,2±0,1	4,9±0,2	14,2±0,1	5,4±0,1	26±4	8,96±0,04	22±1
B	11,43±0,05	16,6±0,6	10,1±0,1	12,7±0,1	10,2±0,2	17,1±0,2	11,5±0,2	15,1±0,3	9,34±0,04	16,3±0,3
Fe	24±2	224±14	29,0±0,5	400±15	8,8±0,8	34±2	18±0,5	788±18	63±4	1994±49
Al	36±3	204±13	44,0±0,5	689±21	4,8±0,7	35,62±2,02	28,4±0,4	1367±5	82±4	2142±13
Mn	218±1	309±1	137,9±0,3	273±12	70±1	242±2	143,0±0,5	293±4	180±2	367±2
Si	57,3±0,3	291±23	88,0±0,6	891±31	11±1	99±1	40,4±0,9	1988±45	118±4	2743±52
P	5,2±0,1	1189,05±0,02	5,2±0,1	1227±22	353±9	555±192	5,55±0,03	709±6	6,7±0,1	1223±22
S	8,5±0,1	1681±16	9,4±0,2	1083±4	568±5	865±16	8,9±0,1	1210±9	8,5±0,1	1681±16
Mg	645±7	1241±13	645±7	1263±6	244±2	579,6±0,7	704,5±6,1	1140±10	752±1	1263±6
Ca	6640±500	11646±167	5903±67	10919±127	9725±95	18128±350	5299,7±29,6	13225±48	6629±72	11105±109
K	4275±37	6900±423	4229±41	5211±69	2647±7	11620±62	4373,6±71,3	6213±133	3877±27	7183±75

As concentrações de minerais determinadas neste estudo foram superiores aos valores reportados na literatura para canela e cássia (AL-NUMAIR et al., 2007; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017), inclusive em relação às reportadas nas tabelas nutricionais (ANSE/CIQUAL, 2020; TBCA, 2021; USDA, 2020), conforme demonstrado na Tabela 7.6.

Tabela 7.6 - Concentrações (mg kg^{-1}) de elementos em amostras comercializadas como canela, de acordo com informações de tabelas nutricionais de diferentes países

Elemento	Tabela Nutricional		
	CIQUAL[a] (França)	TBCA (Brasil)	USDA[b] (EUA)
Cu	3,4 [2,7 e 3,8]	4,0	3,39 [2,71 e 3,84]
Zn	18,3 [13,4 e 27,6]	18,3	18,3 [13,4 e 27,6]
B	N.A.	N.A.	N.A.
Fe	83,2 [11,5 e 183]	83,2	83,2 [11,5 e 183]
Al	N.A.	N.A.	N.A.
Mn	175 [160 e 187]	N.A.	175 [160 e 187]
Si	N.A.	N.A.	N.A.
P	640 [400 e 830]	640	640 [490 e 830]
S	N.A.	N.A.	N.A.
Mg	600 [470 e 870]	600	600 [470 e 870]
Ca	10000 [9030 e 12700]	10002	10000 [9030 e 12600]
K	4310 [3040 e 5120]	4310	4310 [3040 e 5120]

N.A. Informação não disponível.
[a,b] Valores médios reportados. O menor e o maior valor registrado para os elementos nas amostras de canela disponíveis naquele mercado, encontram-se indicados entre colchetes.
[b] Última atualização dos dados para canela foi em 2007.

Observou-se nas tabelas nutricionais que não há registro de informações para cássia, apenas para a canela. Amostragem pouco representativa (n < 10, como indicado nos planos de amostragem das tabelas) pode ser citado como o principal fator que explica as diferenças observadas entre os valores determinados e aqueles reportados nas Tabelas.

A Tabela francesa é a única que menciona uma escala, ainda que subjetiva, do grau de representatividade dos resultados registrados para as amostras de alimentos disponíveis no mercado daquele país. A escala varia de A à D, sendo A altamente confiável e D muito pouco confiável. Esta escala é resultado da análise de diversos parâmetros, como a frequência de determinação do analito, existência de um protocolo oficial de análise, amostragem, comparação dos resultados com informações de referência, entre outros. No caso da canela, os resultados foram reportados como C (*i.e.*, baixa confiabilidade) e as explicações para isto referem-se ao reconhecimento da limitação de informações disponíveis na literatura sobre a especiaria e à alta variabilidade do perfil químico registrado no mercado francês. A baixa confiabilidade nos resultados também se deve a possíveis limitações do método analítico aplicado, que consiste em digestão com ácidos concentrados em sistema aberto, sem menção à técnica de detecção (ANSE/CIQUAL, 2020).

Os resultados também foram confrontados a outros reportados na literatura. Ribeiro-Santos et al. (2017) destacam em seu trabalho de revisão bibliográfica que parte das diferenças observadas na literatura entre canela e cássia podem ser atribuídas à origem geográfica das amostras, às condições edafoclimáticas em que estas foram cultivadas, bem como a distância temporal em que as amostras foram analisadas, já que poucos estudos sobre o tema estão disponíveis.

Outro estudo realizado por Gul e Safdar (2009) comparou o perfil mineral de amostras de canela e cássia. As concentrações de Zn, Mn, Mg, K e P determinadas pelos autores foram superiores às obtidas nesta Tese para ambas canela e cássia. Por outro lado, a concentração de Ca reportada nesta tese é superior à reportada por Gul e Safdar (2009). No caso do Fe, a concentração determinada neste estudo para cássia foi comparável às determinadas anteriormente. Comparações com relação às demais fontes de variabilidade das amostras não podem ser realizadas, uma vez que o estudo de Gul e Safdar (2009) não informa as incertezas das medidas, não apresenta o número de amostras coletadas, nem uma caracterização detalhada destas.

Uma importante contribuição do presente estudo foi a confirmação da informação incialmente reportada por Al-Numair et al. (2007), de que as amostras de cássia apresentam maior teor de cálcio. Isso ocorre porque a estrutura vegetal que compõe o tronco das árvores de *Cinnamomum* sp. possui pequenas reservas de amido, que se encontram dispostas na forma de grânulos. O amido encontra-se associado a íons de Ca, o que favorece a sua dispersão nos grânulos de amido (inferiores a 10 µm de diâmetro) em sua forma cristalina. No caso das amostras de C. *zeylanicum*, a concentração do carboidrato de reserva (amido) é baixa. No caso da C. *cassia*, o amido está disperso em sua forma amorfa, apresentando grânulos superiores a 10 µm de diâmetro, e neste caso os íons de Ca encontram-se dispersos na estrutura intergranular, sendo necessária maior concentração de Ca para estabilizar esta estrutura intergranular (RAO; PATEL, 2011). Portanto, o teor de Ca pode ser associado ao teor amido presente no vegetal e, por consequência, contribuir para diferenciar amostras de cássia e canela. O conjunto das amostras de cássia em pó apresentou teor de Ca semelhante ao observado para as amostras de canela em pó, o que pode representar um indício da prática de adulteração das amostras de canela com cássia (AL-NUMAIR et al., 2007; RAVINDRAN, 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Quando comercializadas em pó, amostras de cássia também podem ser adulteradas com partes vegetais de canela sem valor comercial de canela, como já foi relatado na literatura (AL-NUMAIR et al., 2007; RAVINDRAN, 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017). Possíveis contaminações cruzadas em indústrias de beneficiamento de especiarias, conforme indicado nos rótulos de algumas amostras, também podem contribuir para alteração deste padrão, já que o controle para evitar contaminação não é garantido, nestes casos.

As amostras de origem e fonte desconhecidas (n = 20), adquiridas a granel, apresentaram concentrações muito superiores de alumínio, ferro e silício em relação aos demais grupos. Quando em concentrações muito elevadas, como o que foi observado no estudo, estes elementos são reconhecidos como fontes de contaminação e podem estar associados à adulteração de especiarias, uma vez que podem ser provenientes de matérias estranhas (*e.g.* areia), de outros gêneros alimentícios (*e.g.* açúcar), ingredientes não permitidos (*e.g.* aromas) a serem adicionados ao produto, ou mesmo que não sejam próprios ao consumo alimentar (*e.g.*, corantes) (ERASMUS et al., 2021). Amostras comercializadas a granel estão

mais sujeitas às fraudes e adulterações, uma vez que o produto é comercializado na forma de pó e não há informações claras quanto a sua origem disponíveis. Por serem embaladas na presença do consumidor, estas podem ser dispensadas de veiculação na sua embalagem, conforme previsto em Legislação.

7.3.2 Características das amostras: tendências observadas

As amostras de canela e de cássia foram comparadas estatisticamente, considerando as concentrações dos elementos determinados, com o objetivo de identificar possíveis semelhanças e diferenças entre as amostras. Para esse estudo foram consideradas apenas as amostras com origem e matéria prima conhecidas. Assim, somente as amostras pertencentes aos grupos: *Cinnamomum zeylanicum* (Ceilão, n = 18), *Cinnamomum zeylanicum* (Madagascar, n = 10), Cássia (bastões, n = 12) e Cássia em pó (*Cinnamomum cassia*, n = 8) foram avaliadas.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (1952) foi utilizado para comparar os conjuntos de amostras em relação à concentração dos elementos determinados e os resultados são mostrados na Figura 7.1. Optou-se por este teste em função das amostras não apresentarem distribuição normal nem homogeneidade das variâncias e dos resíduos. Pode-se observar que os conjuntos de amostras não apresentam diferenças estatísticas significativas em relação aos elementos Zn, P, S e K e, portanto, estes elementos não permitem identificar diferenças, quanto à origem e espécie, entre os conjuntos estudados. Esta informação difere do que foi reportado no estudo realizado por Al-Numair et al. (2007), em que os autores concluíram que no conjunto de amostras utilizadas, as cássias apresentavam maior concentração de P que nas amostras de canela, enquanto as amostras de canela apresentavam teores de K superiores às de cássia. De acordo com os autores, os teores de Zn não diferem entre canela e cássia. Os autores não reportaram valores de concentração de S.

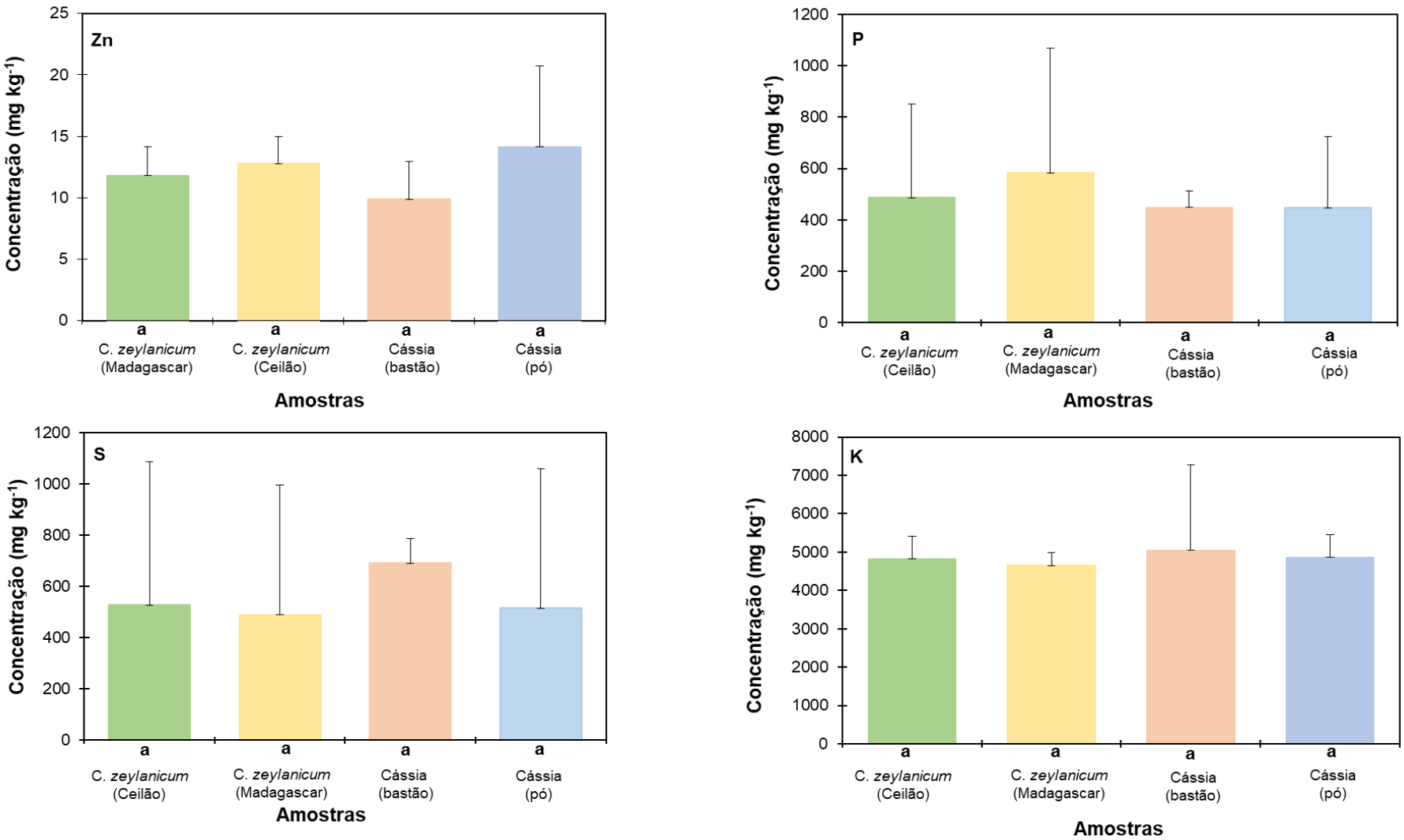


Figura 7.1 - Representação gráfica do teste de Kruskal-Wallis realizado entre os conjuntos de amostras avaliados. Amostras indicadas com as mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas significativas, considerando 95% de confiança. As barras representam o desvio padrão do conjunto avaliado

De acordo com os dados apresentados na Figura 7.2 é possível verificar que a concentração dos elementos Cu, Fe, Al e Si das amostras de cássia em bastão diferem dos demais grupos. Os grupos de amostras de *C. zeylanicum* (Ceilão e Madagascar) e de cássia em pó não apresentaram diferenças entre si, mas diferem do perfil mineral das amostras de cássia em bastão. O processo de obtenção das especiarias (i.e., canela e cássia) pode ser a possível explicação para o que foi observado (RAVINDRAN, 2017). A camada que foi extraída do tronco das árvores de *Cinnamomum* sp. e utilizada no processamento industrial são reportados como fatores que afetam a qualidade da canela (RAVINDRAN, 2017; RAO; PATEL, 2011). Assim, mesmo cascas de qualidade inferior das árvores de *Cinnamomum zeylanicum* e outras partes do mesmo vegetal, e.g. folhas, podem ser utilizadas para adulterar o produto em pó, com a finalidade de aumentar ganhos econômicos e dificultar a identificação da adulteração, uma vez que se trata de partes da mesma espécie vegetal ou de uma espécie muito semelhante (EU-CHINA SAFE, 2021; YAN et al., 2018).

Alterações no perfil mineral esperado em cada grupo podem ser atribuídas à possibilidade de contaminação cruzada com outras especiarias e/ou fontes de alergênicos declaradas no rótulo destas amostras. Esta possibilidade pode comprometer a distinção das amostras de *C. zeylanicum* em pó das amostras de cássia em pó, sendo que situação similar já foi reportada em estudo que determinava a origem de alimentos étnicos x *heritage food* provenientes da cultura alimentar árabe (KOKHAR et al., 2012).

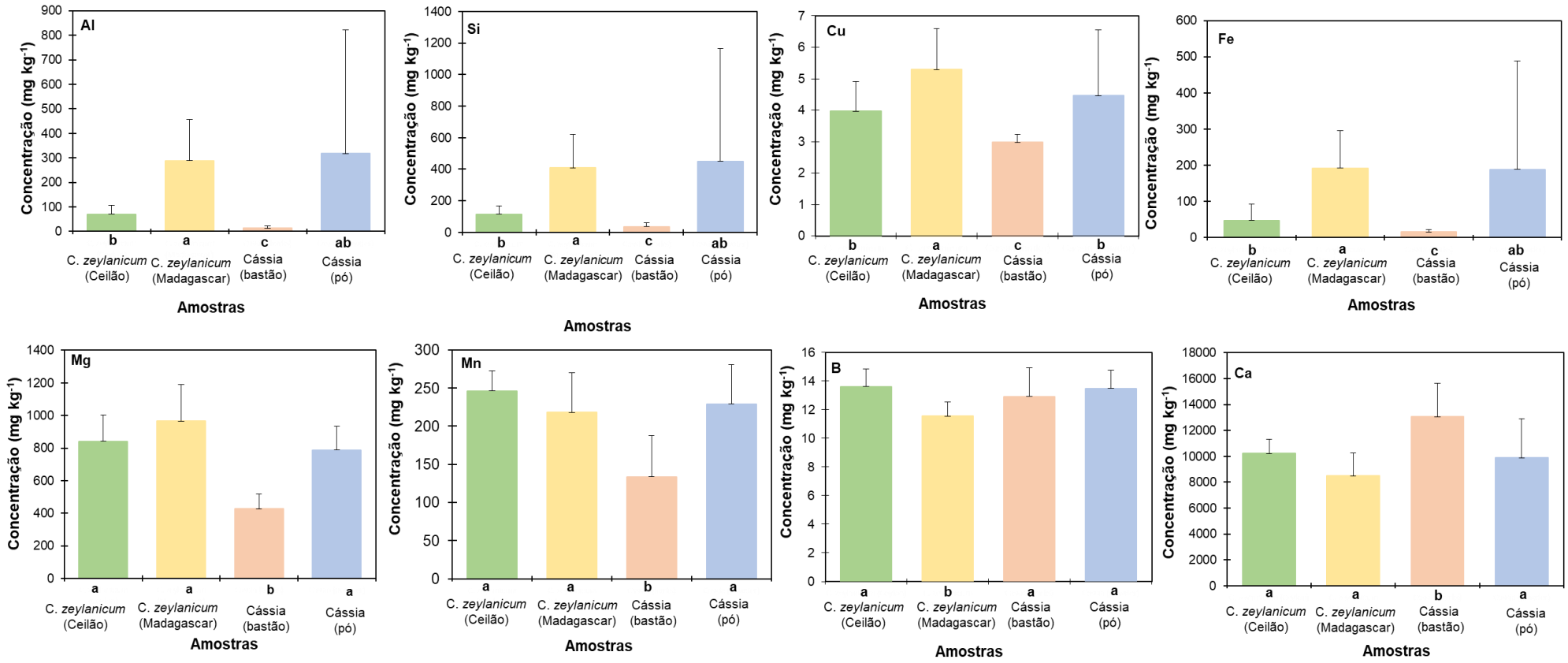


Figura 7.2 - Representação gráfica do teste de Kruskal-Wallis realizado entre os conjuntos de amostras avaliados. Amostras indicadas com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas, considerando 95% de confiança. As barras representam o desvio padrão do conjunto avaliado

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para explorar padrões de semelhança e de diferenças entre o conjunto de amostras analisado, considerando elementos que apresentaram concentrações diferentes nos conjuntos de amostras (i.e., todos à exceção de Zn, P, K e S). A variabilidade acumulada é mostrada na Figura 7.3. Nota-se que as PC1 e PC2 explicam a maior parte da variabilidade observada no estudo (74%), o que pode ser considerado suficiente para a explicar a variação dos dados, sem perda significativa de informação (LYRA et al., 2010). A Figura 7.4 apresenta o mapa perceptual das variáveis avaliadas, enquanto a Figura 7.5 apresenta a distribuição espacial das amostras.

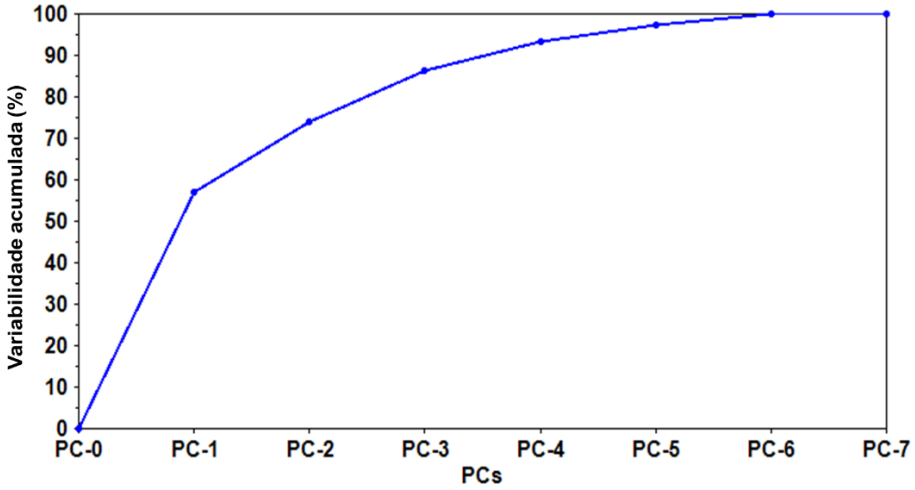


Figura 7.3 - Contribuição das componentes principais para a variabilidade observada no presente estudo

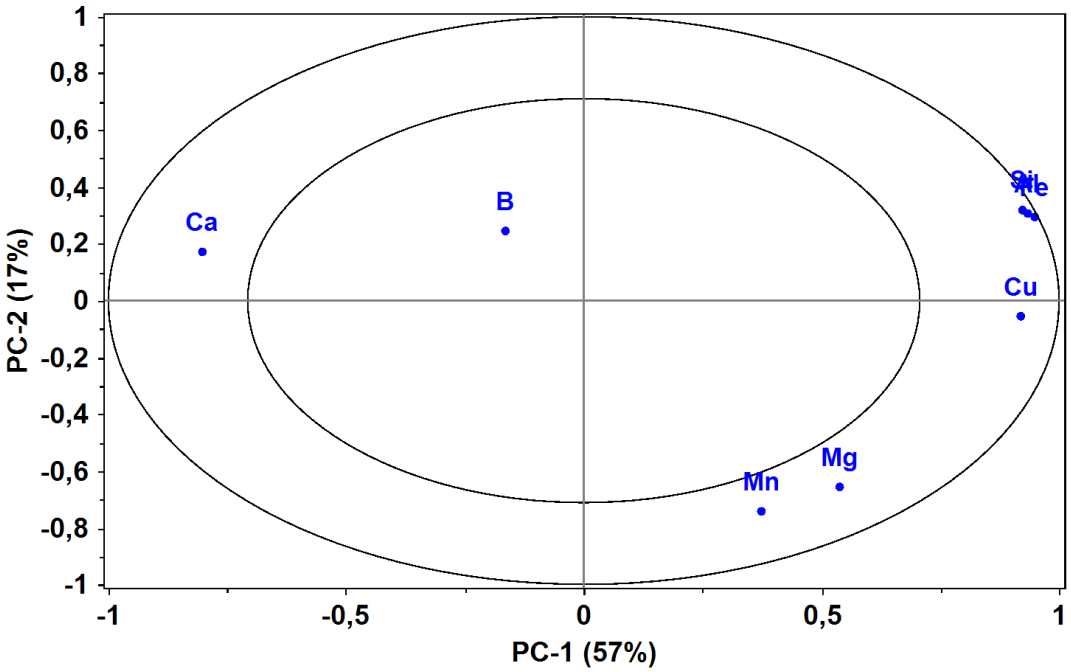


Figura 7.4 - Mapa perceptual considerando nível de confiança de 95%, mostrando a distribuição espacial dos elementos determinados

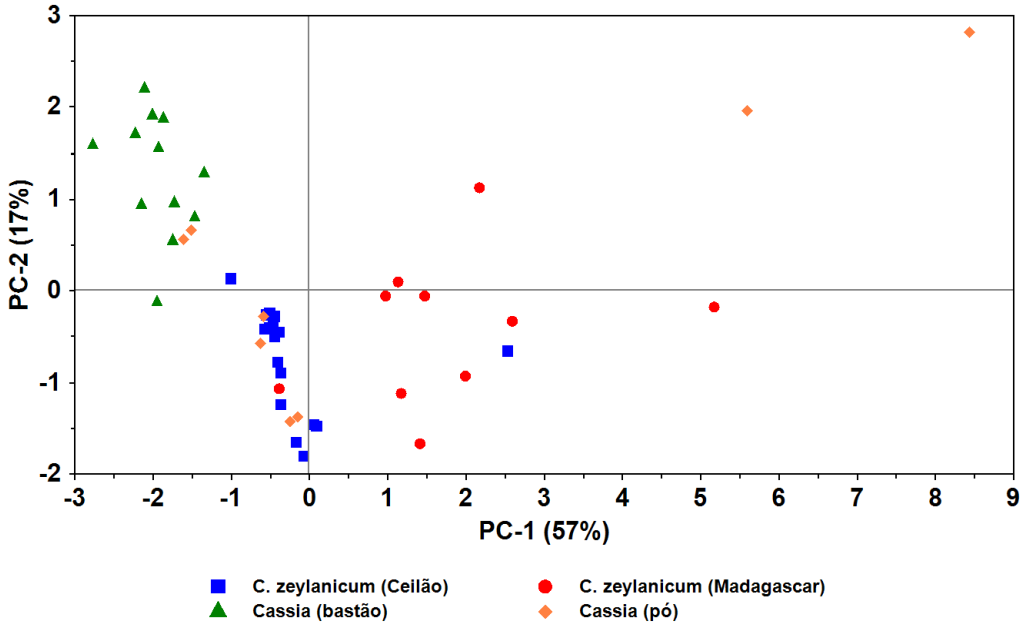


Figura 7.5 - Distribuição espacial das amostras pela análise de componentes principais, considerando as amostras dos grupos canela do Ceilão, canela de Madagascar, cássia em bastão e cássia em pó

Conforme observado na Figura 7.5, a diferenciação das amostras em grupos distintos não foi observada, à exceção das amostras de cássia em bastão, que apresentaram maior relação com o teor de Ca e B. As amostras de canela de Madagascar apresentaram maior relação com os elementos Mg, Mn e Cu. Estes elementos desempenham um papel relevante no processo de síntese de clorofila em plantas e, como observado no Capítulo 6, amostras de canela apresentaram uma banda de absorção de radiação referente à clorofila (SOETAN; OLAIYA; OYEWOLE, 2010; TAIZ et al., 2013).

Entretanto, as amostras de canela do Ceilão apresentaram, em geral, padrão semelhante àquele observado para cássia em pó. Isto pode ser resultante da prática de adulteração de amostras de canela do Ceilão em pó com cássia em pó, com outras partes vegetais, como folhas por exemplo, ou até mesmo com partes de outras espécies de baixo valor comercial. Esta prática foi relatada ser muito frequente na região do Ceilão (atual Sri Lanka), de onde estas amostras são procedentes (RAVINDRAN, 2017). O principal objetivo desta prática é aumentar os ganhos financeiros ao misturar um produto de qualidade inferior com a C. *zeylanicum*, que apresenta alto valor comercial. Um benefício adicional deste tipo de prática é dificultar a distinção das espécies (CANTARELLI et al., 2020; RAVINDRAN, 2017).

Além da questão da adulteração intencional, a adulteração não intencional (contaminação cruzada) parece não ser um fator negligenciável neste caso, pois as amostras em pó não puderam ser adequadamente diferenciadas. Apesar da limitação para separação das amostras em grupos, foi possível identificar tendências entre cada categoria de amostra. Os elementos que se relacionam com a concentração de clorofila (Mg, Mn, Cu) e com a concentração e distribuição do amido (Ca) nestas plantas, são aqueles que apresentam maior potencial para distinção entre as amostras.

7.4 Conclusão

O presente estudo apresenta uma estratégia analítica pioneira para a diferenciação química entre C. *zeylanicum* e C. *cassia*, utilizando a composição mineral como marcadores analíticos. A principal vantagem associada à proposta de diferenciação refere-se ao fato de os marcadores utilizados não serem passíveis de volatilização e/ou transformação em outros componentes (*e.g.* conversão do ácido

cumárico em cumarina e perda de compostos voláteis como o cinamaldeído), o que pode limitar a capacidade de diferenciação das amostras.

Destaca-se que este trabalho apresentou uma maior quantidade de informações sobre minerais para as amostras analisadas e, de modo geral, reportou maiores concentrações dos elementos, quando comparado às tabelas nutricionais. Este trabalho também foi o primeiro a apresentar as concentrações de B e Si para canela e cássia. Além de contribuir com informações para a caracterização química de canela, este estudo demonstrou que amostras de canela e cássia não apresentaram diferenças estatísticas significativas para os elementos P, S, Zn e K. As amostras de cássia em bastão apresentaram as maiores concentrações de cálcio, enquanto as amostras de canela de Madagascar apresentaram relação com os elementos relacionados à síntese de clorofila (Mg, Mn e Cu). Observou-se que amostras de C. *zeylanicum* provenientes do Ceilão apresentam perfil semelhante ao observado para amostras de cássia em pó, o que reforça relatos existentes de que nesta região, amostras de canela em pó são frequentemente adulteradas.

O presente estudo apresenta caráter exploratório e permitiu identificar que elementos associados aos marcadores amido e clorofila são os que apresentam maior potencial para distinguir as amostras em categorias específicas. Foi possível identificar que as amostras comercializadas em pó podem apresentar adulteração (intencional ou não), o que foi reforçado com dados experimentais e irregularidades observadas em certos rótulos. Fica evidente a necessidade de desenvolvimento de estratégias analíticas que permitam distinguir estas amostras, já que além do dano financeiro ao consumidor, esta contaminação representa riscos para a segurança dos alimentos. Para isto, uma amostragem mais representativa e inclua amostras de origem e fonte conhecidas permitirá a construção de classes e a classificação das amostras disponíveis no mercado.

Referências do Capítulo 7 encontram-se ao final desta Tese.

8. Conclusão Geral

Esta Tese apresentou estratégias analíticas, baseadas em diferentes técnicas, alinhadas às demandas do setor de alimentos por métodos mais rápidos, de simples execução, seletivos, de baixo custo e compatíveis com a digitalização que o setor vem vivenciando.

Os procedimentos desenvolvidos para aplicação em leite apresentam estratégias simples, eficientes e com baixa geração de resíduos para a detecção de fraudes baseadas no teor de proteínas e determinação simultânea de proteínas e gorduras, assim como para a determinação quantitativa de formaldeído e de pH, permitindo a rápida predição da qualidade microbiológica do leite. Os procedimentos desenvolvidos exploram estratégias inovadoras e não requerem instrumentação (determinação do teor de gordura) ou exploram instrumentos portáteis e acessíveis, como a câmera de um telefone celular. Os resultados obtidos em todos os métodos desenvolvidos foram concordantes com métodos de referência (NIR, HPLC-UV e potenciometria com eletrodo de vidro) utilizados para determinação de tais parâmetros. Os procedimentos desenvolvidos podem ser aplicados em qualquer etapa da cadeia de produção do leite, o que viabiliza uma estratégia de rastreabilidade mais eficiente. Além disso, por serem de baixo custo, os procedimentos podem ser adotados por produtores, cooperativas, transportadores e indústrias de qualquer porte, o que democratiza o acesso à digitalização e desenvolvimento de políticas de *compliance* direcionadas aos setores agropecuário e de alimentos.

Com relação aos estudos com canela, pode-se identificar uma grande limitação na literatura em relação às informações relacionadas à caracterização química destas amostras, ao seu processo de produção, ao padrão esperado para uma canela autêntica e, também, às metodologias analíticas para controle de qualidade e classificação deste produto. Os estudos realizados são de caráter preliminar, mas já apresentam contribuições explorando os perfis espectrais (visível e infravermelho) e mineral do produto, especialmente a diferenciação da cássia, que é uma das espécies mais utilizadas para adulterar canela. Embora também possa ser utilizada como especiaria, informações sobre a cássia são ainda mais limitadas e não constam em Tabelas nutricionais de referência. Outra contribuição relevante foi a possibilidade de distinguir amostras de canela e cássia a partir da banda de absorção de radiação de

clorofila. Os estudos apontam para um problema de segurança destes alimentos, já que os dados experimentais obtidos comparados às informações rotuladas indicam práticas irregulares (*e.g.*, indução do consumidor ao engano, pois canela moída corresponde à utilização de outra espécie de *Cinnamomum* sp.) até práticas de adulteração e fraude por *mislabeling* (C. *burmanii* sendo comercializada como canela em pó) e por adição de componentes estranhos às amostras, como materiais vegetais e outros fragmentos não identificados e outras substâncias proibidas (*e.g.* antiumectantes). Todas estas más práticas alteram o perfil químico das amostras e dificultam a definição de processos de diferenciação e classificação. Como contribuição mais significativa, ambos os capítulos apontam potenciais marcadores que podem viabilizar esta diferenciação, requerendo a coleta de dados de mais amostras e de amostras de referência.

Os procedimentos analíticos desenvolvidos nesta Tese de doutorado demonstram potencialidades para serem aplicados em rotinas industriais para a finalidade de controle de qualidade e como ferramenta complementar à área de *compliance*, que vêm contribuindo para a definição de estratégias para controle de autenticidade e fraude nas indústrias, garantindo a segurança dos alimentos consumidos pela população.

REFERÊNCIAS

ABDULRAHMAN, A. et al. Differential effects of camel milk on insulin receptor signaling - Toward understanding the insulin-like properties of camel milk. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, 2016.

ACEVEDO, M. S. M. S. F. et al. A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 259-263, 2018.

AGARWAL, R.; GUPTA, M. N. Copper affinity precipitation as an initial step in protein purification. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 9, p. 655–658, 1994.

L'AGENCE NATIONALE DE SECURITE SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL – ANSES. **Cinnamon, powder**. Cedex, France: ANSE/CIQUAL, 2020. Disponível em: <https://ciqual.anses.fr/#/aliments/11025/cannelle-poudre>. Acesso em: 4 jul. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 429, de 8 de outubro de 2020. Dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 195, 09 out. 2020. Seção 1, p. 106. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-429-de-8-de-outubro-de-2020-282070599>. Acesso: 15 mar. 2021.

AGROURBANO COMUNICAÇÃO. **Pagamento por sólidos totais pode ajudar o pequeno produtor de leite**. Porto Alegre, 2019. Disponível em: <https://www.agrourbano.com.br/release/149/pagamento-por-solidos-totais-pode-ajudar-o-pequeno-produtor-de-leite>. Acesso em: 8 maio 2021.

AIELLO, A. et al. A new method to distinguish the milk adulteration with neutralizers by detection of lactic acid. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 11, p. 2555–2561, 2019.

ÅKERSTEDT, M. et al. Protein degradation in bovine milk caused by Streptococcus agalactiae. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 3, p. 297–303, 2012.

AL-NUMAIR, K. S. et al. Nutritive value, levels of polyphenols and anti-nutritional factors in Sri Lankan cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and Chinese cinnamon (*Cinnamomum cassia*). **Research Bulletin of the Food Science & Agriculture Research Center**, n. 154, p. 5–21, 2007.

AL-SARAYREH, M. et al. Potential of deep learning and snapshot hyperspectral imaging for classification of species in meat. **Food Control**, v. 117, art. 107332, 2020.

AMELIN, V.G.; SHOGAH, Z.A.C.; BOL'SHAKOV, D.S. Using a smartphone for determining tetracyclines in water and milk by the sensitized solid state fluorescence of europium on its hydroxide. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 76, p. 1211–1216, 2021.

ARAÚJO, G. C. L. et al. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 2121–2132, 2002.

ARIYAMA, K. et al. Determination of the geographic origin of onions between three main production areas in Japan and other countries by mineral composition**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 347-354, 2007.

ATKINS, P. J. Sophistication detected: Or, the adulteration of the milk supply, 1850-1914. **Social History**, v. 16, n. 3, p. 317-339, 1991.

AWASTHI, J. P. et al. Qualitative analysis of lipid peroxidation in plants under multiple stress through schiff's reagent: a histochemical approach. **Bio-Protocol**, v. 8, n. 8, e2807, 2018.

AZAD, T.; AHMED, S. Common milk adulteration and their detection techniques. **International Journal of Food Contamination**, v. 3, art. 22, 2016.

BALDWIN, R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 4, p. 2056–2063, 1996.

BARCELOUX, D. G. Cinnamon (*Cinnamomum* Species). **Disease-a-Month**, v. 55, n. 6, p. 327-335, 2009.

BELTRÁN, M. et al. Geographical traceability of virgin olive oils from south-western Spain by their multi-elemental composition. **Food Chemistry**, v. 169, p. 350–357, 2015.

BEST, M.; NEUHAUSER, D. Walter A Shewhart, 1924, and the Hawthorne factory. **Quality and Safety in Health Care**, v. 15, n. 2, p. 142-143, 2006.

BHAGYA, H. P.; RAVEENDRA, Y. C.; LALITHYA, K. A. Multibenificial uses of spices: A brief review. **Acta Scientific Nutritional Health**, v. 1, n. 1, p. 3–6, 2017.

BLAHOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, Z. Assessment of coumarin levels in ground cinnamon available in the Czech retail market. **The Scientific World Journal**, v. 2012, art. 263851, 2012.

BÖCK, F. C. et al. PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones. **Journal of Chemometrics**, v. 34, n. 12, p. 1–19, 2020.

BORAD, S. G.; KUMAR, A.; SINGH, A. K. Effect of processing on nutritive values of milk protein. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3690–3702, 2017.

BORGES, M. S. et al. Quality of human milk expressed in a human milk bank and at home. **Jornal de Pediatria**, v. 94, n. 4, p. 399-403, 2017.

BOTARO, B. G.; GAMEIRO, A. H.; SANTOS, M. V. Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: An econometric analysis. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 1, p. 21–26, 2013.

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

BOUZEMBRAK, Y.; MARVIN, H. J. P. Prediction of food fraud type using data from Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) and Bayesian network modelling. **Food Control**, v. 61, p. 180–187, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl**. Brasília, DF: MAPA/SDA/CGAL, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa N° 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 230, 30 nov. 2018a. Seção 1, p. 9. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN 76>. Acesso: 15 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria Nº 38, de 19 de abril de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 80, 26 abr. 2018b. Seção 1, p. 17. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-38-de-19-de-abril-de-2018-11983361>. Acesso: 15 mar. 2021.

BUCKLEY, K. E.; FISHER, L. J.; MACKAY, V. G. Electron capture gas chromatographic determination of traces of formaldehyde in milk as the 2,4-dinitrophenylhydrazone. **Journal of the AOAC**, v. 69, n. 4, p. 655–657, 1986.

BUND, R. K.; PANDIT, A. B. Rapid lactose recovery from buffalo whey by use of ‘anti-solvent, ethanol’. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 333-341, 2007.

CALVANO, C. D. et al. Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 9, p. 1141–1149, 2012.

CANTARELLI, M. A. et al. Low-cost analytic method for the identification of Cinnamon adulteration. **Microchemical Journal**, v. 159, art. 105513, 2020.

CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE - CBQL. Laboratórios lRBQL.. 2021. Disponível em: <https://cbql.com.br/>. Acesso em: 19 fev. 2021.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

CENTRE NATIONAL INTERPROFESSIONNEL DE L'ECONOMIE LAITIERE - CNIEL. **La qualité** : au coeur de la filière laitière. Paris, France, 2021. Disponível em: <http://www.filiere-laitiere.fr/fr/filiere-laitiere/qualite-au-coeur-filiere-laitiere>. Acesso em: 29 jan. 2021.

CERDÁN, J. F. et al. Automation of the determination of hydrogen peroxide, dichromate, formaldehyde and bicarbonate in milk by flow injection analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 344, n. 3, p. 123–127, 1992.

CHANG, S.; COHEN, T.; OSTDIEK, B. What is the machine learning? **Physical Review D**, v. 97, n. 5, art. 056009, 2018.

CHAUHAN, S. L.; MANDAL, K. D.; PAUL, B. R. Adulteration of Milk: A Review. International **Journal of Chemical Studies**, v. 7, n. 1, p. 2055-2057, 2019.

CHEN, Q. et al. Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 261–274, 2013.

CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 284–290, 2010.

CÖMERT, E. D.; MOGOL, B. A.; GÖKMEN, V. Relationship between color and antioxidant capacity of fruits and vegetables. **Current Research in Food Science**, v. 2, p. 1-10, 2020.

COPPA, M. et al. Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 3, p. 182–189, 2010.

COSTA, R. A. et al. Quantification of milk adulterants (starch, H_2O_2, and NaClO) using colorimetric assays coupled to smartphone image analysis. **Microchemical Journal**, v. 156, art. 104968, 2020.

CREW, S. Food authenticity vulnerability in the pandemic. **Food Science and Technology**, 2021. doi: 10.1002/fsat.3510_8.x

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L**. Fennema's Food Chemistry**. 5. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.

DAPSON, R. W. Schiff and pseudo-Schiff reagents: the reactions and reagents of Hugo Schiff, including a classification of various kinds of histochemical reagents used to detect aldehydes. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 91, n. 8, p. 522–531, 2016.

DAS, S.; GOSWAMI, B.; BISWAS, K. Milk adulteration and detection: A review. **Sensor Letters**, v. 14, n. 1, p. 4-18, 2016.

DAY, L. et al. Probing the internal and external micelle structures of differently sized casein micelles from individual cows milk by dynamic light and small-angle X-ray scattering. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 150–163, 2017.

DE KRUIF, C. G et al. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171–172, p. 36–52, 2012.

DE KRUIF, C.; HUPPERTZ, T. Casein Micelles: Size Distribution in Milks from Individual Cows. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4649–4655, 2012.

de VRIES, J. W. et al. Non-protein nitrogen determination: A screening tool for nitrogenous compound adulteration of milk powder. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 46–51, 2017.

DECERNIS. A Foodchain ID Company. Tech-enabled global compliance management. Washington, DC, 2021. Disponível em: <https://decernis.com/products/>. Acesso em: 1 jun. 2021.

DELWICHE, J. F. You eat first with your eyes. **Physiology and Behaviour**, v. 107, n. 4, p. 502-504, 2012.

DEMING, W. E. **Quality:** the management revolution. Rio de Janeiro: Marques Saraiva, 1990.

DOS SANTOS PEREIRA, E. V. et al. In-situ authentication of goat milk in terms of its adulteration with cow milk using a low-cost portable NIR spectrophotometer. **Microchemical Journal**, v. 163, art. 105885, 2021.

DRAAIYER, J et al. **Milk testing and payment systems**. Resource book: a practical guide to assist milk producer groups. Rome: FAO, 2009.

EBNER, P. et al. Milk quality and safety testing manual for Afghanistan. Purdue: Purdue University, 2016. (Purdue University Extension Publication ID-AS631).

EFSA. European Food Safety Authority. Guidance for applications for labelling exemption. **EFSA Journal**, v. 19, n. 3, art. 6543, 2021.

ELIONORA, H. Z.; MALKA, H. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162–7168, 2007.

ELLIS, D. I. et al. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 17, p. 5706-5727, 2012.

ELLIS, K. A. et al. Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1938–1950, 2006.

EL-MASRY, G.; SUN, D. W. Principles of Hyperspectral Imaging Technology. In: SUN, D. W. (Ed.). **Hyperspectral imaging for food quality analysis and control**. Amsterdam: Elsevier, 2010. chap. 1, p. 3-43.

ERASMUS, S. W. et al. Real or fake yellow in the vibrant colour craze: Rapid detection of lead chromate in turmeric. **Food Control**, v. 121, art. 107714, 2021.

ERGUN, E. et al. Simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by derivative spectrophotometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, p. 803–811, 2004.

ESKIN, N. A. M.; GOFF, H. D. Chapter 4 - Milk. In: ESKIN, N. A. M.; SHAHIDI, F. (Org.). **Biochemistry of Foods**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2013. p. 187–214.

ESSLINGER, S.; RIEDL, J.; FAUHL-HASSEK, C. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. **Food Research International**, v. 60, p. 189-204, 2014.

ESTEKI, M.; REGUEIRO, J.; SIMAL-GÁNDARA, J. Tackling Fraudsters with Global Strategies to Expose Fraud in the Food Chain. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 2, p. 425-440, 2019.

EU-CHINA SAFE. **Delivering an Effective, Resilient and Sustainable EU-China Food Safety Partnership**. Brussels, 2021. Disponível em: <euchinasafe.eu>. Acesso em: 15 jul. 2021.

FAO. **Enabling sustainable food systems**. Rome: FAO/INRAE, 2020. (Innovators' Handbook).

FDA. **BAM Media M121**: Phenol Red Carbohydrate Broth. Washington, DC, 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-media-m121-phenol-red-carbohydrate-broth>. Acesso em: 14 jun. 2021.

FERRARIS, Q. et al. Phospholipid analysis in whey protein products using hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection in an industry setting. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 11079–11085, 2020.

FISHER, J. F.; HALL, J. L. Polarographic Study of Complexes of Copper(II) Ion with Ammonia and Various Ethyl, Ethanol, and Ethylethanolamines. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 13, p. 1550–1556, 1962.

FOOD AUTHENTICITY NETWORK. **Spices**. London, 2021. Disponível em: <www.foodauthenticity.global>. Acesso em: 1 jul. 2021.

FOSS ANALYTICAL. MilkScan FT1. São Paulo, 2019. Disponível em: www.fossanalytics.com. Acesso em: 19 ago. 2019.

FOX, P. F. et al. **Dairy chemistry and biochemistry**. 2. ed. Heidelberg: Springer International, 2015.

FUCHS, B. et al. Lipid analysis by thin-layer chromatography - A review of the current state. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 19, p. 2754–2774, 2011.

GALVIN-KING, P.; HAUGHEY, S. A.; ELLIOTT, C.T. Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. **Food Control**, v. 88, p. 85–97, 2018.

GARITTA, J. et al. Microwave-assisted acid digestion: evaluation of reaction vessel design and performance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 702–711, 2021.

GAUR, V.; SCHALK, J.; ANEMA, S. G. Sedimentation in UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 92–102, 2018.

GHODKI, B. M.; GOSWAMI, T. K. Optimization of cryogenic grinding process for cassia (*Cinnamomum loureirii* Nees L.). **Journal of Food Process Engineering**, v. 39, n. 6, p. 659–675, 2016.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1949.

GROLLMAN, A. The Combination of Phenol Red and Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 141–160, 1925.

GUELI, A. M. et al. Effect of particle size on pigments colour. **Color Research & Application**, v. 42, n. 2, p. 236–243, 2017.

GUIDO, L. F. Sulfites in beer: Reviewing regulation, analysis and role. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 2, p. 189-197, 2016.

GUILLOU, H.; PELISSIER P., J; GRAPPIN, R. Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. **Lait**, v. 66, n. 2, p. 143–175, 1986.

GUINATI, B.G.S. et al. Simultaneous analysis of multiple adulterants in milk using microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Methods**, v. 13, p. 5383–5390, 2021.

GUL, S.; SAFDAR, M. Proximate Composition and Mineral Analysis of Cinnamon. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 9, p. 1456–1460, 2009.

GUPTA, V.; AULAKH, R.; TOMAR, S. Novel method for the determination of preservative (formaldehyde) in bovine milk through smart phone-based colorimetric technology. **Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 30-33, 2019.

HANDFORD, C. E.; CAMPBELL, K.; ELLIOTT, C. T. Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 130–142, 2016.

HEWEDI, M. M.; MULVIHILL, D. M.; FOX, P. F. Recovery of milk protein by ethanol precipitation. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 11–23, 1985.

HLADOVÁ, M. et al. Review of spectrophotometric methods for determination of formaldehyde. **Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology**, v. 27, n. 44, p. 105–120, 2019.

HOEGG, J.; ALBA, J. W. Taste perception: more than meets the tongue. **Journal of Consumer Research**, v. 33, n. 4, p. 490-498, 2007.

HORNE, D. S. Ethanol stability and milk composition. In: McSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. (eds.). **Advanced Dairy Chemistry**. v. 1B: Proteins: Applied aspects. 4. ed. Cork: Springer, 2015. p. 225–246.

HUANG, L. et al. Rapid detection of Total Viable Count (TVC) in pork meat by hyperspectral imaging. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 821-828, 2013.

HUBBARD, M.R. **Statistical quality control for the food industry**. 3. ed. New York: Springer US, 2003.

HUPPERTZ, T.; DE KRUIF, C. G. Ethanol stability of casein micelles cross-linked with transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 5, p. 436–441, 2007.

ISO. **ISO 21543:2020**: Lait et produits laitiers - Ligne directrices pour l'application de la spectrométrie dans le proche infrarouge (NIR). Genève, Suisse, 2020. 25 p.

IYIOLA, S.; AREMU ADEGOKE; ADELEKE, Samuel. The Use of One Normal Hydrochloric Acid as a Background Cleaner for Periodic Acid–Schiff Staining Technique. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 152, art. 2019, 2019.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2157–2162, 2001.

JEONG, H. S. et al. Validation and determination of the contents of acetaldehyde and formaldehyde in foods. **Toxicological Research**, v. 31, n. 3, p. 273–278, 2015.

JEREMIĆ, K. et al. Morphological characterization of cinnamon bark and powder available in the Serbian market. **Biologia Serbica**, v. 41, n. 1, p. 89–93, 2019.

JOSHI, V. K.; KUMAR, S. Meat Analogues: Plant based alternatives to meat products-A review. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, v. 5, n. 2, p. 107, 2015.

KAMILOGLU, S. Authenticity and traceability in beverages. **Food Chemistry**, v. 277, p. 12–24, 2019.

KAMINSKI, J.; ATWAL, A. S.; MAHADEVAN, S. Determination of formaldehyde in fresh and retail milk by Liquid Column Chromatography**. Journal of AOAC International**, v. 76, n. 5, p. 1010–1013, 1993.

KASTEN, F. H. The chemistry of Schiff's reagent. In: BOURNE, G. H.; DANIELLI, J. F. (Org.). **International review cytology**. 10. ed. New York: Academic Press, 1960. p. 1–100.

KHOKHAR, S. et al. Mineral composition of commonly consumed ethnic foods in Europe. **Food and Nutrition Research**, v. 56, n. 1, p. 17665, 2012.

KIANI, S. et al. Hyperspectral imaging as a novel system for the authentication of spices: A nutmeg case study. **LWT**, v. 104, p. 61-69, 2019.

KLUNGSÖYR, L. Quantitative estimation of protein: Separation of alkaline protein-copper complex from excess copper on Sephadex G-25. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 1, p. 91–98, 1969.

KORN, M. G. A. et al. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 67–92, 2008.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952.

KUCHERYAVSKIY, S.; MELENTEVA, A.; BOGOMOLOV, A. Determination of fat and total protein content in milk using conventional digital imaging. **Talanta**, v. 121, p. 144–152, 2014.

LEBERMAN, R. The Hofmeister series and ionic strength. **FEBS Letters**, v. 284, n. 2, p. 293–294, 1991.

LEDO, J. et al. A tailored food safety and hygiene training approach for dairy farmers in an emerging dairy chain. **Food Control**, v. 124, p. 107918, 2021.

LEDO, J. et al*.* Persistent challenges in safety and hygiene control practices in emerging dairy chains: The case of Tanzania. **Food Control**, v. 105, p. 164–173, 2019.

LEDO, J. et al. A customized assessment tool to differentiate safety and hygiene control practices in emerging dairy chains. **Food Control**, v. 111, p. 107072, 2020.

LI, C. et al. A simple and sensitive method for the determination of melamine in milk by first derivative UV spectrophotometry coupled with the H-point standard addition method. **Analytical Methods**, v. 5, n. 20, p. 5760–5766, 2013.

LIM, S. A. H. et al. A systematic review of statistical process control implementation in the food manufacturing industry. **Total Quality Management & Business Excellence**, v. 28, n. 1–2, p. 176–189, 2017.

LIMA, M. J. A. et al. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105042, 2020.

LINDMARK MÅNSSON, Helena. Fatty acids in bovine milk fat. **Food & Nutrition Research**, v. 52, n. 1, p. 1821, 2008.

LIU, D. et al. Combination of spectra and texture data of hyperspectral imaging for prediction of pH in salted meat. **Food Chemistry**, v. 160, p. 330-337, 2014.

LIU, N. et al. Evaluation of portable near-infrared spectroscopy for organic milk authentication. **Talanta**, v. 184, p. 128–135, 2018.

LIU, Z. et al. Fraud detection of herbal medicines based on modern analytical technologies combine with chemometrics approach: A review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2021. doi: 10.1080/10408347.2021.1905503

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection: a closer look at IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712-724, 1983.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 265–275, 1951.

LU, M. Y et al. A Smartphone-Based Whole-Cell Array Sensor for Detection of Antibiotics in Milk. **Sensors**, v. 19, n. 18, p. 3882, 2019.

LU, X. et al. Identification of authenticity, quality and origin of saffron using hyperspectral imaging and multivariate spectral analysis. **Spectroscopy Letters**, v. 53, n. 2, p. 76-85, 2020.

LUTHER, J. L.; FRAHAN, V. H.; LIEBERMAN, M. Paper test card for detection of adulterated milk. **Analytical Methods**, v. 9, n. 38, p. 5674–5683, 2017.

LYRA, W. S. et al. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1594-1597, 2010.

MACEDO DOS SANTOS, P.; PEREIRA-FILHO, E. R. Digital image analysis - An alternative tool for monitoring milk authenticity. **Analytical Methods**, v. 5, n. 15, p. 3669–3674, 2013.

MACHADO, J. J. B.; COUTINHO, J. A.; MACEDO, E. A. Solid-liquid equilibrium of α-lactose in ethanol/water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 173, n. 1, p. 121–134, 2000.

MAJD, F.; NICKERSON, T. A. Effect of alcohols on lactose solubility. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 6, p. 1025–1032, 1976.

MARINHO, O. R. et al. A greener, fast, and cost-effective smartphone-based digital image procedure for quantification of ethanol in distilled beverages. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 437–443, 2019.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. Papel indicador colorimétrico para detecção de formol em produtos lácteos e produtos de higiene pessoal. **Química Nova**, v. 40, n. 8, p. 946–951, 2017.

MARTINS, L. C. et al. A greener and faster approach for determination of phenolic compounds by smartphone-based colorimetry. In: INTERNATIONAL ELECTRONIC CONFERENCE ON FOOD SCIENCE AND FUNCTIONAL FOODS, 1., Basel, Switzerland, 2021. **Proceedings…** Basel, 2021.

MASAWAT, P.; HARFIELD, A.; NAMWONG, A. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. **Food Chemistry**, v. 184, p. 23–29, 2015.

MASSON, P. L.; HEREMANS, J. F. Lactoferrin in milk from different species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 1, p. 119–129, 1971.

MATEOS-MARTÍN, M. L. et al. New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 3, p. 1327-1336, 2012.

MCDOWALL, F. H.; McDOWELL, A. K. R. The determination of casein by formol titration after precipitation with acid. **Analyst**, v. 61, n. 723, p. 387–390, 1936.

MCGRATH, T. F et al. What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be addressed? - Spectroscopy case study. **Trends in Food Science and Technology**, v. 76, p. 38–55, 2018.

MENOR-GARCÍA, L. **AI-Driven sensing applications contributing to food quality and safety control in the food industry**. 2021. 145p. Dissertation (M.Sc. - Food Quality Management) – Wageningen University and Research, Wageningen, Netherlands, 2021.

MEZDOUR, S.; BRULÉ, G.; KOROLCZUK, J. Physicochemical analysis of casein solubility in water-ethanol solutions. **Lait**, v. 86, n. 6, p. 435–452, 2006.

MILKPOINT. Inédito: **Verde Campo lança sistema de pagamento por sólidos do leite**. Piracicaba, 2020. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/inedito-verde-campo-lanca-programa-de-pagamento-por-solidos-221455/>. Acesso em: 18 jan. 2021.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5. ed. London: Pearson Education, 2005.

MILNE, B. F. et al. Unraveling the intrinsic color of chlorophyll. **Angewandte Chemie**, v. 54, n. 7, p. 2170-2173, 2015.

MONTGOMERY, H.; HAUGHEY, S. A.; ELLIOTT, C. T. Recent food safety and fraud issues within the dairy supply chain (2015–2019). **Global Food Security**, v. 26, art. 100447, 2020.

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

MUÑIZ, R.; CUEVAS-VALDÉS, M.; ROZA-DELGADO, B. Milk quality control requirement evaluation using a handheld near infrared reflectance spectrophotometer and a bespoke mobile application. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 86, p. 103388, 2020.

MUSCOGIURI, G. et al. Nutritional recommendations for CoVID-19 quarantine. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 6, p. 850–851, 2020.

NASCIMENTO, C. F. et al. Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid–liquid microextraction: Spectrophotometric determination of formaldehyde in milk. **Talanta**, v. 144, p. 1189–1194, 2015.

NASCIMENTO, C. F. et al. Recent advances on determination of milk adulterants. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1232–1244, 2017.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY - NIST. Certificate of Analysis – Standard Reference Material® 1515. Gaithersburg, MA, 2019. Disponível em: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/1515.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2021.

OLIVEIRA. M. M.; CRUZ-TIRADO, J.P.; BARBIN, D. Nontargeted analytical methods as a powerful tool for the authentication of spices and herbs: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 3, p. 670-689, 2019.

OLIVERI, P.; DOWNEY, G. Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 74–86, 2012.

OSBORNE, T. B.; LEAVENWORTH, C. S. Protein Copper Compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 109–123, 1916.

PANTONE. **How do we see color?** Carlstadt, NJ 2021. Disponível em: <https://www.pantone.com/articles/color-fundamentals/how-do-we-see-color>. Acesso em: 26 jul. 2021.

PASCHE, S. et al. Effects of Ionic Strength and Surface Charge on Protein Adsorption at PEGylated Surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 37, p. 17545–17552, 2005.

PAUL, A. A. et al. Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 18, p. 3005–3023, 2020.

PAVAN, F. A.; MAZZOCATO, A. C.; GUSHIKEM, Y. Removal of methylene blue dye from aqueous solutions by adsorption using yellow passion fruit peel as adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3162–3165, 2008.

PEI, X. et al. The China melamine milk scandal and its implications for food safety regulation. **Food Policy**, v. 36, n. 3, p. 412–420, 2011.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 505, 2020.

PERUCHI, L. C. et al. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 100, p. 129–136, 2014.

POHL, P. et al. Determination of the Elemental Composition of Coffee Using Instrumental Methods. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 598–613, 2013.

POONIA, A. et al. Detection of adulteration in milk: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 1, p. 23-42, 2017.

POTTERING, H. G.; LE MAIRE, B. Regulation (EC) Nº 1334/2008 of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Union**, n. 1334, p. 34–50, 2008. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1334&from=DE>. Acesso em: 10 jun. 2021.

POWER, M.; FELL, G.; WRIGHT, M. Principles for high-quality, high-value testing. **Evidence Based Medicine**, v. 18, n. 1, p. 5-10, 2013.

RATA, E. R. B. A. et al. Statistical quality control in the food industry: a risk-based approach. **International Journal of Quality and Reliability Management**, v. 38, n. 2, p. 437–452, 2021.

PUBCHEM. Explore Chemistry: Fatty acids. Bethesda, MD, 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Fatty%20acids>. Acesso em: 03 mar. 2021.

PUNYAPORNWITHAYA, V. et al. Application of statistical process control for monitoring bulk tank milk somatic cell count of smallholder dairy farms. **Veterinary World**, v. 13, n. 11, p. 2429–2435, 2020.

PYNE, G. T. The determination of milk-proteins by formaldehyde titration. **The Biochemical Journal**, v. 26, n. 4, p. 1006–1014, 1932.

RADJENOVIĆ, D. et al. The Effect of Grinding on the Apparent Colour of the Powder. **American Journal of Engineering Research**, v. 7, n. 12, p. 97–100, 2018.

RAHMAN, A.; FAQEERZADA, M. A.; CHO, B. K. Hyperspectral imaging for predicting the allicin and soluble solid content of garlic with variable selection algorithms and chemometric models. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 12, p. 4715-4725, 2018.

RANI, R.; SRIVASTAVA, M. M. Development and Validation of HPTLC Method for the Estimation of Formaldehyde in Milk. **National Academy Science Letters**, v. 39, n. 1, p. 21–24, 2016.

RAO, B. R.; PATEL, R. P. An overview of Cinnamon with reference to Northeast India. In:__BARUAH, A.; NATH, S. C. **Aromatic and spice plants:** Utilisation and Conservation. 1. ed. Jaipur, India: Aavishkar Publishers, 2011. chap. 6, p. 69-100.

RAO, P. V.; GAN, S. H. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, art. 642942, 2014.

RAVINDRAN, P.N. **The Encyclopedia of Herbs & Spices**. 1. ed. Wallingford: CABI International, 2017. v. 1, 1128p.

REJEB, A. et al. Blockchain technology in the food industry: A review of potentials, challenges and future research directions. **Logistics**, v. 4, n. 4, 27, 2020.

REMEL. **Phenol red broth base**. Lenexa, KS, 2011. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU454271.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2021.

REZENDE, F. B. F. et al. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 383–389, 2017.

REZENDE, P. S.; CARMO, G. P.; ESTEVES, E. G. Optimization and validation of a method for the determination of the refractive index of milk serum based on the reaction between milk and copper(II) sulfate to detect milk dilutions. **Talanta**, v. 138, p. 196–202, 2015.

RIBADEAU-DUMAS, B.; GRAPPIN, R. Milk protein analysis. **Lait**, v. 69, n. 5, p. 357–416, 1989.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 154–169, 2017.

RIU, J. et al. Rapid Analysis of Milk Using Low-Cost Pocket-Size NIR Spectrometers and Multivariate Analysis. **Foods**, v. 9, n. 8, 1090, 2020.

ROCHA, D. L.; ROCHA, F. R. P. A flow-based procedure with solenoid micro-pumps for the spectrophotometric determination of uric acid in urine. **Microchemical Journal**, v. 94, n. 1, p. 53–59, 2010.

MEAD, R.; CURNOW, R. N.; HASTED, A. M. **Statistical methods in agriculture and experimental biology**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002.

ROY, D. et al. Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk from Different Species-A Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 577759, 2020.

RYAN, J. J. et al. Detection of Penicillin, Cephapirin, and Cloxacillin in Commingled Raw Milk by the Spot Test1. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 6, p. 1510–1517, 1986.

SAHA, D.; MANICKAVASAGAN, A. Machine learning techniques for analysis of hyperspectral images to determine quality of food products: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 28-44, 2021.

SAMIEY, B.; ASHOORI, F. Adsorptive removal of methylene blue by agar: effects of NaCl and ethanol. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 14, 2012.

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.

SCHAARSCHMIDT, S. Public and private standards for dried culinary herbs and Spices. Part I: Standards defining the physical and chemical product quality and safety. **Food Control**, v. 70, p. 339-349, 2016.

SCHÖLL, I.; JENSEN-JAROLIM, E. Allergenic Potency of Spices: Hot, Medium Hot, or Very Hot. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 135, n. 3, p. 247–261, 2004.

SHANKAR, M. U. et al. The influence of color and label information on flavor perception. **Chemosensory Perception**, v. 2, p. 53–58, 2009.

SHEPPARD, S. E.; GEDDES, A. L. Effect of solvents upon the absorption spectra of dyes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, n. 12, p. 1995–2002, 1944.

SHEWHART, W. A. The Application of statistics as an aid in maintaining quality of a manufactured product. **Journal of the American Statistical Association**, v. 20, n. 152, p. 546–548, 1925.

SILVA, A. F. S.; GONÇALVES, I. C.; ROCHA, F. R. P. Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. **Food Control**, v. 125, art. 107956, 2021.

SILVA, A. F. S.; ROCHA, F. R P. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. **Food Control**, v. 115, art. 107299, 2020.

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

SILVIS, I. C. J. et al. Assessment of food fraud vulnerability in the spices chain: An explorative study. **Food Control**, v. 81, p. 80–87, 2017.

SIMONIAN, M. H.; SMITH, J. A. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 10, 2006. doi: 10.1002/0471142727.mb1001as76.

SINGH, P.; GANDHI, N. Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. **Food Reviews International**, v. 31, n. 3, p. 236–261, 2015.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SOARES, S. et al. A novel spot test based on digital images for determination of methanol in biodiesel. **Talanta**, v. 195, p. 229–235, 2019.

SOARES, S. et al. A spot test for total esters determination in sugarcane spirits exploiting smartphone-based digital images. **Analytical Methods**, v. 12, n. 31, p. 3918–3923, 2020.

SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Green volumetric procedure for determining biodiesel content in diesel blends or mixtures with vegetable oils exploiting solubility differences in an ethanol:water medium. **Fuel**, v. 276, art. 118042, 2020.

SOETAN, K.O.; OLAIYA, C.O.; OYEWOLE, O.E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5, p. 200-222, 2010.

SONG, W. et al. Use of smartphone videos and pattern recognition for food authentication. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 304, art. 127247, 2020.

SOON, J. M. et al*.* Food fraud vulnerability assessment tools used in food industry. **Food Control**, v. 101, p. 225–232, 2019.

SPINK, J. et al. Food fraud prevention shifts the food risk focus to vulnerability. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 215–220, 2017.

STREIT, N. M. et al*.* As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p.748-755, 2005.

SUAREZ, W. T. et al. In situ determination of urea in milk employing a portable and low-cost led photometer. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 4, p. 1149–1154, 2018.

SURIYAGODA, L. et al. “Ceylon cinnamon”: Much more than just a spice. **Plants, People, Planet**, v. 3, n. 4, p. 319–336, 2021.

SWAISGOOD, H. E. Características do leite. In:_DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 15, p. 689-717.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; BRISKIN, D.; BLOOM, A. Nutrição mineral. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 107-130.

TAYLOR, S. L. et al. The population threshold for soy as an allergenic food – Why did the Reference Dose decrease in VITAL 3.0? **Trends in Food Science and Technology**, v. 112, p. 99–108, 2021.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS - TBCA. **Canela, em pó** - Composição química. São Paulo, 2021. Disponível em: <http://www.tbca.net.br/base-dados/int_composicao_estatistica.php?cod_produto =C0778B>. Acesso em: 4 jul. 2021.

TEIXEIRA, J. L. P. et al. Vibrational spectroscopy and chemometrics tools for authenticity and improvement the safety control in goat milk. **Food Control**, v. 112, art. 107105, 2020.

THOMAS, J.; KURUVILA, K. M. Cinnamon. In: THOMAS, J.; KURUVILA, K. M.; PETER, K. V. (Eds.). **Handbook of Herbs and Spices**. 2. ed. Cambridge: Wood Head Publishing, 2012. chap. 10, p. 182-196.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137–145, 2004.

URAPEN, R.; MASAWAT, P. Novel method for the determination of tetracycline antibiotics in bovine milk based on digital-image-based colorimetry. **International Dairy Journal**, v. 44, p. 1–5, 2015.

USDA. **Spices, cinnamon, ground**. Washington, DC, 2020. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171320/nutrients>. Acesso em: 4 jul. 2021.

van LIESHOUT, G. A. A. et al. How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 14, p. 2422–2445, 2020.

van RUTH, S. M. et al. Differences in fraud vulnerability in various food supply chains and their tiers. **Food Control**, v. 84, p. 375–381, 2018.

VÁZQUEZ-ROMÁN, S. et al. Determination of Dornic Acidity as a Method to Select Donor Milk in a Milk Bank. **Breastfeeding Medicine**, v. 8, n. 1, p. 99–104, 2012.

VERÍSSIMO, M. I. S. et al. A new formaldehyde optical sensor: Detecting milk adulteration. **Food Chemistry**, v. 318, art. 126461, 2020.

VETAL, S. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of Cinnamomum zeylanicum in rats. **Food Science and Human Wellness**, v. 2, n. 2, p. 59-67, 2013.

VIRTANEN, L. S.; OLKONEN, M.; SAARELA, T. P. Color ensembles: Sampling and averaging spatial hue distributions. **Journal of Vision**, v. 20, n. 5, p. 1-14, 2020.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. chap. 6, p. 129-161: Techniques of protein and nucleic acid purifications.

WANG, Q. et al. Blockchain for the IoT and industrial IoT: A review. **Internet of Things**, v. 10, art. 100081, 2020.

WHEELER, A. S. Food adulteration. **Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society**, v. 21, n. 4, p. 135-144, 1905.

WHO. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 4. ed. Geneva, 2017. E-book.

WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, 2021. doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13.

WONG, S. Y.; HARTEL, R. W. Crystallization in Lactose Refining - A Review. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 3, p. R257–R272, 2014.

XIE, M. et al. A novel method for detection of lipid oxidation in edible oil. **LWT**, v. 123, art. 109068, 2020.

YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 1, p. 137–142, 2004.

YANG, Y. et al. Fraud vulnerability in the Dutch milk supply chain: Assessments of farmers, processors and retailers. **Food Control**, v. 95, p. 308–317, 2019.

YANG, Y. et al*.* Opportunities for fraudsters: When would profitable milk adulterations go unnoticed by common, standardized FTIR measurements? **Food Research International**, v. 136, art. 109543, 2020a.

YANG, Y. et al. Prevalence of milk fraud in the Chinese market and its relationship with fraud vulnerabilities in the chain. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 709, 2020b.

YE, R.; HARTE, F. Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl2 on the particle size of reconstituted casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 2, p. 799–805, 2013.

ZHANG, C.; SUSLICK, K. S. Colorimetric sensor array for soft drink analysis**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 237–242, 2007.

ZHANG, L. G. et al*.* Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 145, p. 342–348, 2014.

ZOU, X. et al. Lipid Composition analysis of milk fats from different mammalian species: potential for use as human milk fat substitutes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 29, p. 7070–7080, 2013.