

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL

FLÁVIA SANTANA MORAES

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-ELSD-LTII
PARA SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
MALTODEXTRINA EM LEITE CRU

NITERÓI
2015

FLÁVIA SANTANA MORAES

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-ELSD-LTII PARA SEPARAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE MALTODEXTRIAN EM LEITE CRU

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof. Dr^a. Adriana Cristina de Oliveira Silva

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Adam Conte Junior

Niterói
2015

FLÁVIA SANTANA MORAES

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CLAE-ELSD-LTII PARA SEPARAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE MALTODEXTRIAN EM LEITE CRU

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em: 23 junho de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Cristina de Oliveira Silva – Orientadora - UFF

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Junior – UFF

Prof. Dr. Sergio Borges Mano - UFF

Profa. Dr^a. Carla da Silva Carneiro

Niterói
2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sergio Barros Moraes e Darlene Aparecida Felício Santana, pelo amor incondicional, a quem devo tudo o que sou e conquistei.

Ao Pedro Henrique Morse da Rocha Mandarinino Florito, por todo companheirismo, incentivo, paciência, ajuda e por acreditar tanto em mim.

A toda a minha equipe, Marion Pereira da Costa; Rodrigo Vilela de Barros; Raphael Ferreira de Barros e Vitor Luiz de Melo, por toda paciência, ajuda e determinação. Sem eles não teria sido possível a finalização deste trabalho.

A todos os amigos fora da faculdade, pela torcida e por entenderem os momentos de ausência.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Adriana Cristina de Oliveira Silva, pelos ensinamentos e por cooperar no andamento do trabalho mesmo com a dificuldade da distância.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Adam Conte Junior, que muito cooperou com seus ensinamentos, sempre disposto a ajudar. Continuamente cobra o melhor de seus alunos e se hoje, concluo este trabalho foi porque ele acreditou mais em mim do que eu mesma.

Aos membros do Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem animal, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida, o qual viabilizou a execução do referido estudo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Aos secretários do Programa de Pós-graduação em Higiene.

RESUMO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos por apresentar vários elementos importantes para a nutrição. Entretanto, a prática de fraudes envolvendo os laticínios é bastante recorrente, comprometendo dessa forma, o valor nutritivo desse produto. Neste sentido, um novo tipo de fraude que vem sendo empregada para mascarar a adição de água é a utilização de maltodextrina, dosada de forma a restaurar valores analíticos adequados para certos índices de qualidade física ou química do leite. Essas formulações precisas adicionadas pelos fraudadores, muitas vezes não são detectadas pelas técnicas empregadas e previstas para análises físico-químicas de rotina aplicadas ao leite fluído. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo validar uma metodologia por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificar e quantificar maltodextrina em leite cru. Foi utilizado cromatógrafo líquido da marca Shimadzu LC/20 acoplado ao detector evaporativo com espalhamento de luz (ELSD-LTII). Parâmetros de validação apresentaram linearidade adequada, com valores de desvio padrão relativo entre 0,74 e 2,16% (n = 10) para a repetitividade e 0,11% a 19,39% (n = 5) para precisão intermédia. Limites de detecção e quantificação foram 0,78 e 1,56 mg/mL, respectivamente, e as taxas de recuperação foram entre 91 e 93% para os três níveis. A aplicação deste método mostra que as concentrações encontradas em amostras adulteradas por maltodextrina são mais baixas do que o esperado, o que pode estar relacionado com a qualidade da maltodextrina comercial utilizada. O método proposto mostrou ser simples e adequado para a determinação de maltodextrina em leite cru, com detecção para níveis de adulteração de 1%.

Palavras chave: Leite de vaca. Fraude. Maltodextrina. CLAE. Validação.

ABSTRACT

Milk is considered one of the most complete foods for presenting several important elements for nutrition. However, the practice of fraud involving dairy products is recurrent, compromising thus the nutritional value of the product. In this respect, a new type of fraud, which has been used to mask the addition of water, is to use maltodextrin, dosed in order to restore adequate analytical values for certain levels of quality in milk. These precise formulations added by fraudsters often are not detected by the techniques employed and planned to routine physical-chemical analysis applied to fluid milk. Thus, the present study aimed to validate a methodology by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to identify and quantify maltodextrin in raw milk. Liquid chromatograph used was a Shimadzu LC brand / 20 coupled to evaporative light scattering detection (ELSD LTII). Validation parameters exhibited adequate linearity, with relative standard deviation values between 0.74 and 2.16% (n = 10) for repeatability and 0.11 to 19.39% (n = 5) for intermediate precision. Limits of detection and quantification were 0.78 and 1.56 mg.mL⁻¹, respectively, and recovery rates were between 91 and 93% for three levels. The application of this method shows that maltodextrin concentrations found in adulterated samples are lower than expected, which may be related to the quality of the commercial maltodextrin used. The method proposed proved to be simple and appropriate for determination of maltodextrin in raw milk, with detection down to adulteration levels of 1%.

Keywords: Cow Milk. Fraud. Maltodextrin. HPLC. Validation.

SUMÁRIO

RESUMO, p. 5

ABSTRACT, p. 6

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 9

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 11

1 INTRODUÇÃO, p. 12

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, p. 15

2.1 Fraude em Leite Fluido, p. 15

2.2 Fraude com Maltodextrina, p.16

2.3 Cromatografia, p. 17

2.3.1 Conceito Histórico, p. 17

2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), p. 18

2.4 Validação de Métodos Cromatográficos, p. 19

2.4.1 Seletividade, p. 20

2.4.2 Linearidade, p. 20

2.4.3 Precisão, p. 21

2.4.4 Limite de Detecção, p. 22

2.4.5 Limite de Quantificação, p. 22

2.4.6 Recuperação, p. 22

2.4.7 Robustez, p. 23

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 24

3.1 Obtenção e transporte das amostras, p. 24

3.2 Preparo das Amostras, p. 24

3.3 Preparo do Padrão, p. 24

3.4 Extração da Maltodextrina, p. 25

3.5 Condições Cromatográficas, p. 25

3.6 Parâmetros de Validação, p. 25

3.7 Análise Estatística, p. 28

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 29

4.1 Análises do Leite Cru, p. 29

4.2 Desenvolvimento do Processo de Extração e Separação da Maltodextrina, p. 29

4.3 Validação do Método, p. 29

4.4 Aplicabilidade do Método, p. 35

5 CONCLUSÃO, p. 37

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1. Valor Bruto da Produção no Brasil em 2014. p.12
- Figura 1. Crescimento relativo das atividades agropecuárias em relação ao Valor Bruto da Produção. p.12
- Figura 2. Desenho esquemático do sistema de cromatografia líquida. p.19
- Figura 3. Cromatograma característico da maltodextrina - A (padrão de maltodextrina na concentração de 6,25mg/mL), B (leite cru) e C (leite cru adicionado de 6,26mg/mL de maltodextrina). p.30
- Figura 4. Curva de calibração do padrão de maltodextrina e do leite adicionado do padrão de maltodextrina. p.31
- Figura 5. Curva de calibração da maltodextrina obtida através do método cromatográfico, utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20µ. p.32
- Tabela 1. Recuperação do método cromatográfico, utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20µ. p.33
- Tabela 2. Resultados da precisão (repetitividade) para o método de cromatografia utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20µ, com três concentrações diferentes de padrão maltodextrina. p.33

Tabela 3. Resultado da precisão (precisão intermédia) do método cromatográfico utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20µ, avaliado com solução de padrão de maltodextrina, em três diferentes dias por três diferentes analistas. p.34

Tabela 4. Robustez do método cromatográfico utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20µ. Para determinação de maltodextrina em leite cru em relação a variação da concentração da fase móvel e do fluxo. p.34

Tabela 5. Resultado da quantificação do composto maltodextrina em amostra de leite através do método cromatográfico, utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20µ. p.35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
DE	Dextrose Equivalente
UAT	Ultra Alta Temperatura
UHT	Ultra High Temperature
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
US-FDA	United States-Food and Drug Administration
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DP	Desvio Padrão
CV	Coeficiente de Variação

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento completo, tradicional na dieta do homem e importante fonte de macro e micronutrientes na nutrição (BRASIL, 2005).

A produção de leite encontra-se como uma das mais importantes cadeias do agronegócio brasileiro. Analisando o Valor Bruto da Produção, calculado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), dentre todas as atividades agropecuárias do país, é a sexta mais importante (Quadro 1), atrás da soja, do bovino de corte, da cana-de-açúcar, do frango e do milho (CARVALHO, 2014). O país saiu de uma produção de 7,3 bilhões de litros de leite na década de 70 para atuais 35 bilhões de litros em 2014 (VIEIRA, 2014).

Quadro 1. Valor Bruto da Produção no Brasil em 2014 - estimativa (MAPA, 2014).

Cadeia	R\$ anual
Soja (grão)	94,299 bilhões
Bovinos de corte	68,416 bilhões
Cana-de-açúcar	46,552 bilhões
Aves	42,064 bilhões
Milho	34,728 bilhões
Leite	26,010 bilhões

Percebe-se ainda que a produção de leite vem apresentando evolução contínua e mais estável ao longo dos anos se comparado aos demais produtos da cadeia agrícola (Figura 1).

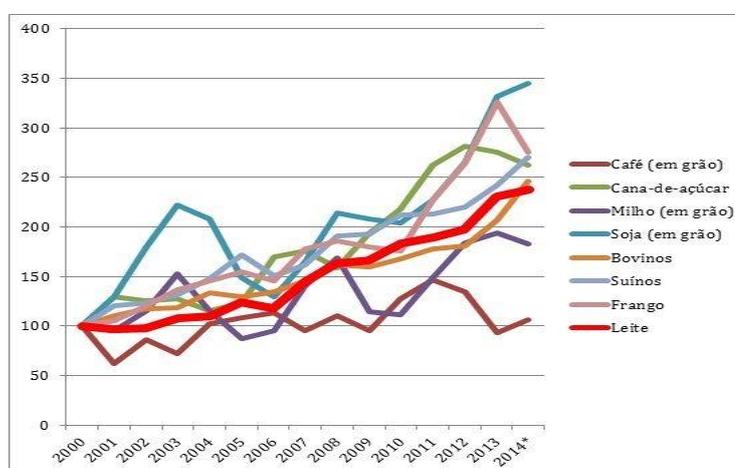


Figura 1: Crescimento relativo das atividades agropecuárias em relação ao Valor Bruto da Produção (MAPA, 2014).

Estes dados refletem apenas a produção primária. Se analisarmos a cadeia de processamento e distribuição, os números são ainda mais robustos. Estima-se uma movimentação de cerca de R\$ 140,2 bilhões em 2014, ou quase 3% do PIB nacional (CARVALHO, 2014), sem contar a importância na geração de empregos e no desenvolvimento regional, notadamente nas pequenas propriedades. Quando comparado com outras atividades melhor classificadas em valor bruto da produção, o leite tem o seu potencial. São gerados cerca de 4 milhões de empregos, além da atividade existir na maior parte dos quase 6.000 municípios do país, refletindo a relevância da atividade (CARVALHO, 2014).

No entanto, quando se trata de imagem, o leite não tem reputação ou *status* compatível com sua importância socioeconômica e geradora de renda por área produzida. As notícias envolvendo o leite são geralmente negativas, principalmente por questões de fraude, cada vez mais recorrentes (SPINK et al., 2011; MOORE et al., 2012; CARVALHO, 2014).

Qualquer artifício usado sem o consentimento oficial resulta na modificação do produto e lucro ilícito das indústrias em detrimento dos interesses do consumidor, que adquire produtos sem a qualidade esperada (KROETZ, 2008). Um fator de relevância é que as estratégias de fraude afetam pouco as características sensoriais dos alimentos, tornando difícil para o consumidor a sua identificação, porém comprometendo seu valor nutritivo (VELLOSO, 2003).

Dentre as principais fraudes destaca-se a adição de substâncias não autorizadas, denominadas “reconstituintes da densidade”, tais como as dextrinas, o cloreto de sódio e a sacarose, empregadas normalmente para dissimular ou ocultar a adição de água, na qual o principal objetivo é o ganho econômico pelo aumento do volume. A adição destes reconstituintes dificulta a identificação de aguagem pelos métodos físico-químicos oficiais (FILHO et al., 2009).

A adição de maltodextrina ao leite vem ganhando espaço dentre os compostos adicionados nas fraudes por aguagem, por ser uma substância solúvel em água, de difícil visualização, além de não possuir sabor adocicado como a sacarose (FERRÃO et al., 2007).

Atualmente, os laboratórios oficiais do MAPA adotam a cromatografia em camada delgada (CCD) (BRASIL, 2007) para a detecção desse composto. No entanto, de acordo com Sanvido (2009), essa técnica muitas vezes é demorada e

também não é totalmente confiável, produzindo muitos resultados falso negativos, fazendo-se necessário o estudo de métodos mais eficazes.

Nesse sentido, para a identificação e quantificação de compostos de estrutura químicas muito semelhantes e devido a sua comprovada acurácia e rapidez na identificação simultânea de mono, di e oligossacarídeos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de destaque.

Para garantir que essa metodologia desenvolvida por meio da cromatografia líquida de alta eficiência seja adequada para detecção do composto maltodextrina no leite, se faz necessário a validação, processo este utilizado para autenticar o procedimento analítico.

Por essa razão, o objetivo deste trabalho foi a validação de método de CLAE para a determinação de maltodextrina em leite cru.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FRAUDE EM LEITE FLUIDO

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2008) estabelece que o produto “leite” não pode ser adicionado de substâncias não permitidas, caracterizando a sua adulteração intencional como fraude.

A prática de adulteração é comum em parte dos estabelecimentos industriais envolvidos com a produção, beneficiamento e/ou envase do leite, podendo ser caracterizada em dois tipos: sanitária, por meio da adição de substâncias estranhas ao leite com o intuito de mascarar e/ou evitar alterações do produto, o que pode ocasionar prejuízos à saúde do consumidor, e econômica, através da adição de substâncias “inócuas”, que visam aumentar o volume do leite e mascarar a aguagem (ABLV, 2007).

A fraude de natureza econômica é uma prática histórica, e os primeiros registros datam de 1880, relatando a fraude por adição de água. Outras formas praticadas incluem também a adição de soro de queijo e adição de leiteiro (KARTHEEK et al., 2011; CASSOLI, 2012). Com o intuito de recompor ou manter a densidade do leite cujo volume foi aumentado de forma fraudulenta, substâncias ditas reconstituintes são adicionadas, incluindo amiláceos, cloretos, açúcares e maltodextrina. No entanto, nem sempre os métodos analíticos usuais utilizados em estabelecimentos de processamento de leite e nos Laboratórios Oficiais conseguem detectar estes componentes (FILHO et al., 2009; KARTHEEK et al., 2011; SINGH et al., 2015).

No Brasil, dentre as principais substâncias adicionadas ao leite que podem causar danos à saúde do consumidor, constituindo assim fraude sanitária encontram-se: cloro, água oxigenada, álcool, bicarbonato, dentre outras (WANDERLEY et al., 2012).

Em 2007 a Polícia Federal brasileira deflagrou a “Operação Ouro Branco”, em 2008 a “Operação Lactose” e mais recentemente, em 2013, a “Operação Leite

Compensado”, havendo a prisão de vários envolvidos nas fraudes do leite e a interdição dos estabelecimentos envolvidos.

Como exemplo de um fato gravíssimo de adulteração do leite, pode ser citado o que ocorreu na China em 2008, em um estabelecimento produtor de leite em pó que adicionou a substância melamina, derivada do petróleo, cujo objetivo era aumentar o teor de proteína, mascarando a adição de água, o que provocou a morte de algumas crianças e idosos que consumiram o produto (FONSECA et al., 2014). Mundialmente, o impacto econômico gerado foi a proibição em diversos países da importação de leite e derivados lácteos da China.

Wanderley et al. (2012), verificaram a qualidade de leite pasteurizado e UAT (Ultra Alta Temperatura) comercializados no estado do Rio de Janeiro e observaram que a fraude mais frequentemente encontrada foi a adição de água ou de outras substâncias não identificadas que ocasionaram a diminuição dos sólidos totais do leite, seguida pela fraude da adição de substâncias alcalinas que visa impedir a acidificação do leite.

Outros trabalhos também têm demonstrado a existência de fraudes em leite fluído em outros estados do Brasil (DAHMER, 2006; BORGES et al., 2007; SILVA et al., 2008; MARTINS et al., 2013; JÚNIOR et al., 2013), indicando que uma grande quantidade do leite produzido possui algum tipo de adulteração.

2.2 FRAUDE COM MALTODEXTRINA

Um tipo de fraude que vem sendo utilizado é a adição de maltodextrina, dosada de forma a restaurar valores analíticos considerados adequados para certos índices de qualidade física ou química do leite normal (FERRÃO et al., 2007).

“Maltodextrinas são biopolímeros originados da hidrólise parcial do amido e são classificadas pelo seu grau de hidrólise, expresso em dextrose equivalente (DE), que é a porcentagem de açúcares redutores calculados como glicose em relação ao peso seco do amido” (COUTINHO, 2007). Em geral, as maltodextrinas são carboidratos de baixa densidade, totalmente solúveis em água e não possuem aroma de amido (KEARSLEY et al., 1995).

Como cada unidade de açúcar da cadeia tem a capacidade de reter moléculas de água, a maioria se hidrata facilmente quando ela está disponível. Portanto, em

sistemas aquosos, passam por dissolução parcial ou completa (DAMODARAN et al., 2010); isso explica o fato dessa fraude não ser facilmente identificada, como no caso da fraude com o amido.

A maltodextrina não é nociva à saúde do ser humano, entretanto altera as características físico-químicas do leite e é acrescentada a este no intuito de mascarar outros tipos de fraude, como a fraude por aguagem (CHRONAKIS, 1998; SINGH et al., 2015). Martins et al., (2013), ao avaliarem a composição, a qualidade físico-química e a ocorrência de adulterações em leite UHT, confirmaram a adulteração por sacarose e maltodextrina em duas marcas de leite UHT. Em 2008, na Operação Lactose, foram encontrados fraude por adição de maltodextrina no leite em pó.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2007 através da Instrução Normativa nº 14 o método de detecção de maltodextrina utilizando a Cromatografia em Camada Delgada (BRASIL, 2007). Esta técnica por sua vez, não é totalmente confiável produzindo muitos resultados falso negativos (SANVIDO, 2009).

2.3 CROMATOGRAFIA

2.3.1 Conceito histórico

Atribuída ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, a descoberta da cromatografia como técnica analítica ocorreu em 1906, quando este descreveu sua experiência na separação dos componentes de extrato de folhas. Neste estudo o botânico usou uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, ocorrendo a separação de pigmentos de cloroplastos em folhas verdes de plantas. Este fato deu origem ao nome de cromatografia (*chrom* = cor e *grafie* = escrita) embora o processo não dependa da cor (LANÇAS, 1993; DEGANI et al., 1998).

A técnica cromatográfica foi praticamente ignorada até a década de 30 quando foi redescoberta por Kuhn e Lederer que aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo, utilizando um experimento semelhante ao de Tswett. Apartir daí a cromatografia foi aperfeiçoada e em conjunto

com os avanços tecnológicos esta foi levada a um alto grau de sofisticação que resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas (LANÇAS, 1993; COLLINS,1997).

2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos diversos métodos cromatográficos para separação e análise de misturas químicas, sendo considerada uma técnica excepcional pois sua aplicabilidade é praticamente universal, possui uma precisão notável e muitos laboratórios que trabalham com análises de misturas químicas são equipados com cromatógrafo, se enquadrando como a primeira opção de técnica para essas análises (SNYDER et al., 2010). Devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica amplamente aplicada em análises para pesquisa, testes clínicos e diagnósticos (HAYES et al., 2014).

O método cromatográfico fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa que tem uma grande área superficial chamada fase estacionária, e a outra um fluido que se move através da fase estacionária sendo chamada de fase móvel (DEGANI et al., 1998; SNYDER et al., 2010).

Os componentes essenciais de um sistema de cromatografia líquida são apresentados na Figura 2. A fase móvel é extraída de um reservatório para uma bomba, que controla a taxa de fluxo e gera pressão suficiente para acionar a fase móvel através da coluna. Um injetor automático é usado para colocar a amostra sobre a coluna sem parar o fluxo da bomba. A separação realiza-se na coluna (fase estacionária), que geralmente reside no interior de um forno de coluna. Conforme os componentes vão se separando vão sendo eluídos com posterior detecção. O detector responde a alterações na concentração do analito durante a corrida. Um sistema de dados monitoriza a saída do detector e fornece dados processados, tanto para produção gráfica como para tabulação de dados. Um controlador de sistema (muitas vezes combinado com o sistema de dados) dirige as funções dos vários módulos (SNYDER et al., 2010).

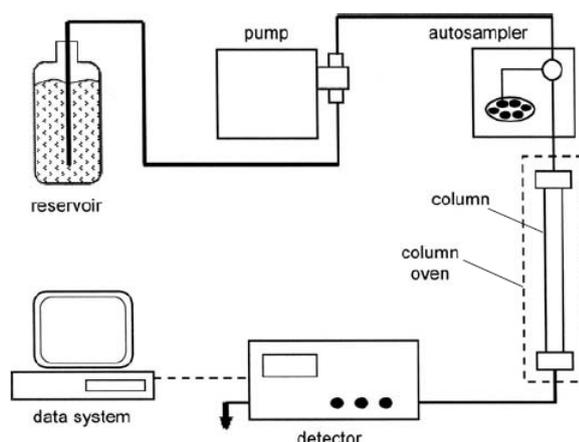


Figura 2: Desenho esquemático do sistema de cromatografia líquida (SNYDER et al., 2010).

A identificação dos componentes de uma amostra é feita através da comparação dos cromatogramas obtidos por meio de padrões. Nestes padrões o componente em questão é eluído nas mesmas condições da amostra a ser analisada, tendo a formação de um pico em um determinado tempo chamado de tempo de retenção, sendo assim, os componentes são identificados pelo tempo de retenção (CHIM, 2008; SNYDER et al., 2010).

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou a implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que irá estimar sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação (BRITO et al., 2003; BANSAL et al., 2007).

É essencial empregar métodos analíticos bem caracterizados e completamente validados para produzir resultados confiáveis que possam ser interpretados de forma satisfatória (SHAH, 2007).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Órgãos Reguladores do Brasil e de outros países têm estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (RIBANI et al., 2004; SHAH, 2007).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de julho/2007 (INMETRO, 2007).

No âmbito internacional, a IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”) também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos, a norma internacional ISO/IEC 17025, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração, apresenta a “validação de métodos” como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio. O US-FDA (“United States-Food and Drug Administration”) também tem proposto guias sobre validação de métodos (FDA, 2013).

Vários trabalhos na literatura descrevem os parâmetros que devem ser avaliados na validação de um método analítico e, geralmente há uma concordância que estes parâmetros devem incluir: seletividade, curva de calibração (linearidade), precisão, limite de quantificação, limite de detecção, eficiência de extração (recuperação) e robustez (BANSAL et al., 2007; SHAH, 2007; PAULI et al., 2011; ACQUARO JR et al., 2013; LÁZARO, 2013).

2.4.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004)

A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (CASSIANO et al., 2009).

2.4.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie pode ser expressa mediante a equação da reta ($x = ay + b$) chamada *curva analítica*. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

2.4.3 Precisão

A precisão de um método bioanalítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Este é um importante parâmetro que possibilita decidir se o método bioanalítico é confiável ou não para o objetivo da análise (CASSIANO et al., 2009).

A precisão é avaliada, pelo desvio padrão absoluto (S) que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (S) (RIBANI et al., 2004).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. Mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um) (CASSIANO et al., 2009).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. O objetivo da validação da

precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

A reprodutividade é o termo utilizado para demonstrar a precisão entre laboratórios. Os resultados são obtidos usando o mesmo método e mesmas amostras em diferentes laboratórios, diferentes analistas e equipamentos (CASSIANO et al., 2009).

2.4.4 Limite de Detecção

O limite de detecção (LOD, do inglês "Limit Of Detection") representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada.

Para determinar é feita a comparação entre medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1 (RIBANI et al., 2004).

2.4.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ, do inglês "Limit Of Quantitation") representa a menor concentração da substância em exame que pode ser mensurada, utilizando um determinado procedimento experimental.

Os mesmos critérios de LOD podem ser adotados para o LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual ou a relação sinal-ruído (RIBANI et al., 2004).

2.4.6 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento das amostras. Este parâmetro é calculado comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente e, conseqüentemente, não extraídas, as quais representam 100% (CASSIANO et al., 2009).

A percentagem de recuperação pode ser estabelecida pela seguinte formula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3}$$

onde:

C1 = concentração determinada na amostra adicionada.

C2 = concentração determinada na amostra não adicionada.

C3 = concentração adicionada

2.4.7 Robustez

Um método é robusto quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez é avaliada pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, tempo de extração, temperatura da coluna. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporados ao procedimento (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Amostras de leite cru (10 L) foram coletados em cinco dias diferentes (n=5) em uma propriedade privada, na cidade de São Gonçalo, Rio de Janeiro. Após a ordenha, o leite foi imediatamente arrefecido (4 ± 1 ° C) e levado à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em Niterói, no estado do Rio de Janeiro.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

A fim de verificar a qualidade do leite, as amostras foram submetidas às análises oficiais de densidade, gordura, acidez titulável, crioscopia e sólidos totais (Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 2012).

Após a verificação de conformidade amostras de leite cru (500 mL) foram adulteradas com água destilada e maltodextrina (Max Titanium®, São Paulo, Brasil) obtendo-se cinco grupos experimentais: leite cru sem adulteração (**C**); leite cru adicionado de 5% de água (**W**); leite cru adicionado de 5% de água e 1% de maltodextrina (**M 1,0**); leite cru adicionado de 5% de água e 1,25% de maltodextrina (**M 1,25**) e leite cru adicionado de 5% de água e 1,5% de maltodextrina (**M 1,5**). As amostras dos grupos experimentais foram mantidas sob refrigeração (4 ± 1 °C) sob as mesmas condições até o momento da análise.

A necessidade da adição de água para formação dos grupos experimentais se baseia no fato da fraude com maltodextrina estar diretamente ligada à adição de água (LUIZ et al., 2010; WANDERLEY et al., 2012; MARTINS et. al., 2013). Foi determinada a adição de 5% de água, baseada na quantidade mínima detectável quando se combina as análises oficiais de rotina (CRUZ et al., 2008; WANDERLEY et al., 2012).

3.3 PREPARO DO PADRÃO

O padrão de maltodextrina foi obtido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, SA). Solução estoque de padrão maltodextrina na concentração final de 50mg/mL foi

preparada em água Milli-Q (Simplicity UV, Millipore, Molsheim, France) e estocada a 4 ± 1 °C. Várias concentrações (3,125; 6,25; 10; 12,5; 15; 25 mg/mL) da solução estoque de padrão maltodextrina foram obtidas a partir da diluição com leite cru para cada fase de validação.

3.4 EXTRAÇÃO DA MALTODEXTRINA

A extração da maltodextrina foi realizada de acordo com Gaze et al., (2015) com algumas modificações. Para a sua extração, 1 mL de amostra foi transferida para um tubo cônico, onde foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 45mM (Merck Millipore®, Darmstadt, Germany) e homogeneizado por 1 minuto no vórtex (Certomat® MV B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany), em seguida os tubos cônicos foram colocados por 1h em mesa agitadora (TS – 2000 A VDRL shaker, Biomixer®, São Paulo, Brasil) e após esse tempo foram homogeneizados novamente por 1 minuto no vórtex. Posteriormente foram centrifugados $5000 \times g$ por 30 min a 4 ± 1 °C (Sorvall ST16R, Thermo Scientific, São Paulo, Brasil). Após a centrifugação foram filtrados em papel Whatman n°. 1 e estocados a 4 ± 1 °C até serem analisados.

3.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Foi utilizado o Cromatógrafo líquido modelo LC/20 AT acoplado ao detector ELSD-LTII, com integrador CBM-20^a (modelo Shimadzu, Kyoto, Japan), empregando-se uma coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. A fase móvel empregada foi uma mistura de acetonitrila (Tedia®, Rio de Janeiro, Brasil) e água Mili-Q (Simplicity UV, Millipore®, Molsheim, France) 68:32 (v/v). O fluxo foi de 1 ml/min, o volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura da coluna foi mantida a temperatura ambiente. As injeções foram realizadas utilizando uma seringa de 50 µL (Hamilton Microlitro TM 700), sendo o tempo de corrida de 40 min. Uma injeção de acetonitrila 100% durante 30 min foi usada a cada três amostras injetadas para lavar o sistema de HPLC.

A maltodextrina foi identificada pelo tempo de retenção e quantificada pela área do pico.

3.6 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

O método para a identificação de maltodextrina em leite cru foi validado em termos dos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, recuperação e robustez. Para isso, protocolos convencionais de diretrizes internacionais foram utilizados (ICH, 1995; AOAC, 2012). A maltodextrina foi identificada pela comparação do tempo de retenção cromatográfico com o respectivo padrão, enquanto que a quantificação foi realizada com base no método padrão externo utilizando o detector evaporativo de espalhamento de luz.

A seletividade foi realizada injetando diferentes concentrações (3,125; 6,25; 10; 12,5; 15; 25 mg/mL) da maltodextrina padrão comparando-se com os cromatogramas do leite adicionado do padrão de maltodextrina nas mesmas concentrações com o cromatograma do leite cru. Foram avaliados os tempos de retenção e a separação da lactose e da maltodextrina.

A linearidade foi determinada injetando sete concentrações (50; 25; 15; 10; 6,25; 3,125; 1,56 mg/mL) do padrão de maltodextrina, em triplicata. De forma que estas fossem uniformemente espaçadas no intervalo de concentração de interesse e cerca de $\pm 50-150\%$ da concentração provável de ser encontrada (IUPAC, 2002). A curva foi construída e a equação de regressão e o coeficiente de regressão (r^2) foi calculado.

A determinação do Limite de Detecção (LD) e quantificação (LQ), foi baseada na avaliação visual, dividindo a relação sinal-ruído por 3 e por 10, respectivamente. Para este fim, a maior concentração da curva de calibração da maltodextrina foi injetada em ordem decrescente (50; 25; 15; 10; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 mg/mL) até o sinal cromatográfico atingir uma área que pôde ser visualmente diferenciada do sinal ruído (linha de base) com a menor atenuação. Quando esta área foi identificada, três injeções dessa concentração foram realizadas para confirmação. O Limite de Quantificação (LQ) foi calculado da mesma maneira como LD.

A precisão foi considerada em dois níveis: (1) Repetitividade e (2) Precisão Intermédia: (1) Repetitividade foi estabelecida através de três concentrações diferentes de padrão maltodextrina (10; 12,5 e 15 mg/mL) escolhidas dentro da faixa da fraude realizada experimentalmente e injetadas 10 vezes cada uma e expressas como a

média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV); (2) Precisão Intermédia: injeção de três concentrações (10; 12,5 e 15mg/mL) de padrão maltodextrina, cada uma em triplicata, durante três dias consecutivos e por três analistas diferentes e expressos da mesma forma que a repetitividade.

A recuperação foi testada pelo procedimento de adição do padrão em três concentrações de maltodextrina distintas (10; 12,5 e 25mg/mL). A equação $R = (B/A) \times 100$ foi usada com maltodextrina padrão (A) e leite adicionado do padrão maltodextrina (B), injetando-se em triplicata.

A robustez foi determinada através de pequenas variações em dois parâmetros: fase móvel, alterando a proporção de acetonitrila e água (65:35, 68:32 e 70:30) e o fluxo (0,9; 1,0 e 1,1 mL/min). Para esta finalidade três diferentes concentrações (15; 12,5 e 6,25 mg/mL) de padrão maltodextrina foram utilizados.

3.7 ANALISE ESTATÍSTICA

Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias ($P < 0,05$) foram realizadas utilizando o software XLSTAT (versão 2013/02/03; Addinsoft, Paris, França).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DO LEITE CRU

O leite cru apresentou os seguintes resultados para a composição físico-química (média \pm desvio padrão): proteína (% w/w) $3,33\pm 0,02$; gordura (% w/w) $3,80\pm 0,04$; sólidos totais (% w/w) $9,15\pm 0,02$; densidade a 15°C $1,031\pm 0,01$ e crioscopia ($^{\circ}\text{H}$) $-0,533\pm 0,02$.

A partir destes resultados pode-se concluir que o leite utilizado no experimento estava dentro dos padrões físico-químicos estabelecidos. Desta forma, permitiu-se o uso dessa amostra neste estudo.

4.2 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DA MALTODEXTRINA

O primeiro passo no desenvolvimento da metodologia consiste na avaliação preliminar de diferentes formas de extrair a maltodextrina.

Três soluções diferentes de extração foram testadas: (1) água a 70°C ; (2) 1% de ácido nítrico e (3) 45 mM de H_2SO_4 .

A melhor recuperação foi obtida utilizando-se a solução de 45 mM de H_2SO_4 . Os resultados para recuperação obtida com a solução de 1% de ácido nítrico e água a 70°C não se encontravam entre os valores recomendados de 70 e 120%.

Da mesma forma diferentes proporções de acetonitrila e água foram testadas para melhor separar a maltodextrina da lactose. Inicialmente foi testada a proporção 75:25 (v/v) respectivamente. No entanto a melhor separação foi obtida com 68:32 (acetonitrila/água, v/v). Tal separação foi eficaz, podendo ser explicada também pela capacidade de separação da coluna utilizada (SULPELCOSILTM LC-NH2 $5\mu\text{m}$, 25cm X 4.6mm), devido a interação de grupos hidroxilas dos carboidratos com o grupo amina da fase estacionária e da fase móvel empregada (acetonitrila:água), a mesma usada por Schuster-Wolff-Bühning et al., (2011).

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os cromatogramas do leite cru, padrão de maltodextrina e do leite adicionado do padrão maltodextrina, podem ser visualizados na Figura 3 onde verifica-se picos individuais e seus respectivos tempos de retenção. Este resultado confirma a seletividade do método proposto (FDA, 2013; GUIA EURACHEM, 2014).

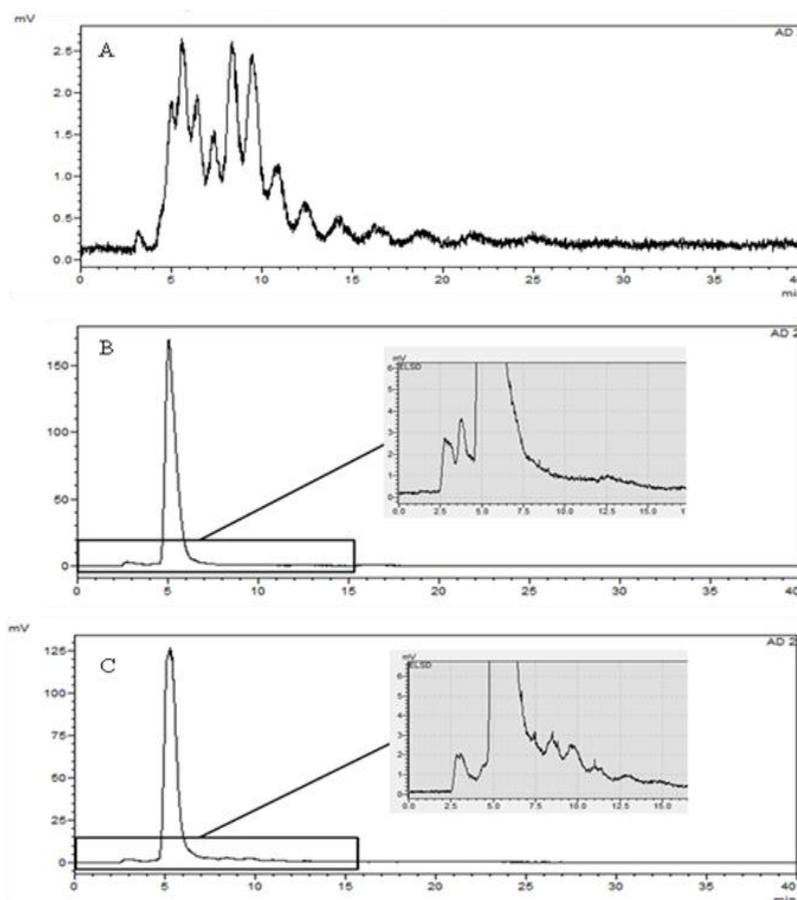


Figura 3: Cromatograma característico da maltodextrina - A (padrão de maltodextrina na concentração de 6,25mg/mL), B (leite cru) e C (leite cru adicionado de 6,26mg/mL de maltodextrina).

Além disso, as curvas de calibração do padrão de maltodextrina e do leite adicionado do padrão maltodextrina (figura 4) foram praticamente paralelas, com coeficiente de regressão bastante ajustado, sugerindo que não houve interferência relevante de matriz. Assim sendo, conforme SIGMA-ALDRICH (1997) os carboidratos concorrem com a água para formar ligações de hidrogênio com o grupamento amino. Devido ao fato do composto lactose possuir menor quantidade de hidroxilas que o composto maltodextrina, esse foi capaz de eluir primeiramente.

Ainda segundo Boqué et al., (2002), pequenas variações não significativas podem ocorrer em virtude de o leite conter componentes que interferem com a medição de desempenho podendo aumentar ou diminuir o detector de sinal.

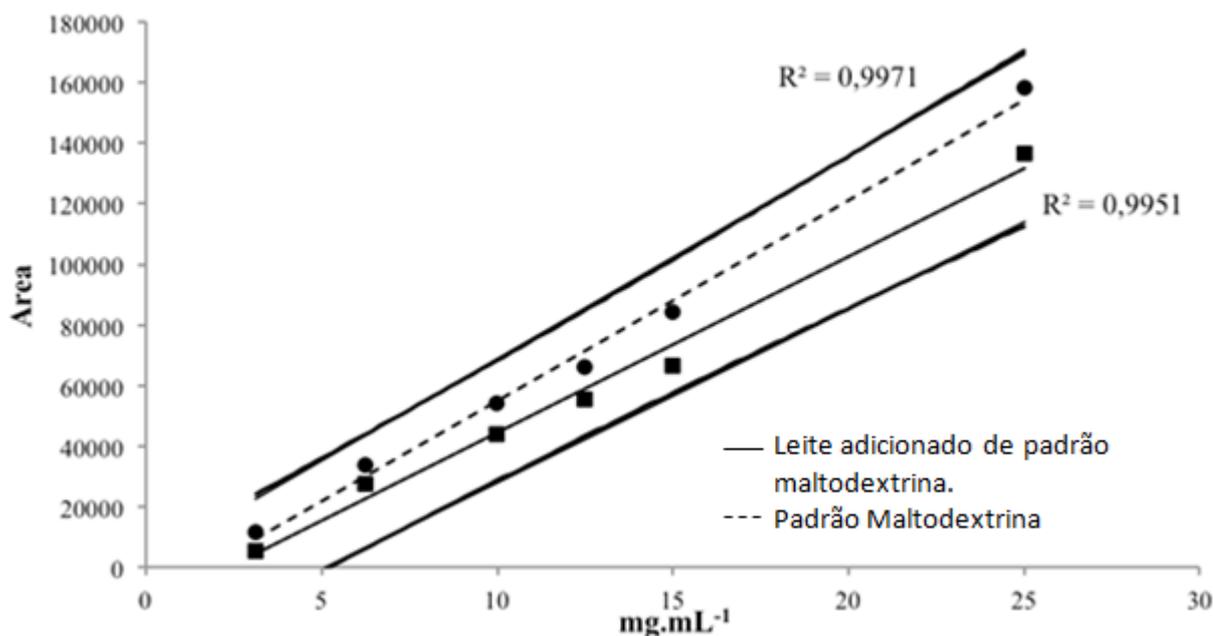


Figura 4: Curva de calibração do padrão maltodextrina e do leite adicionado do padrão maltodextrina.

A equação de regressão linear obtida foi: $y = 12767x - 1013,2$ e o coeficiente de regressão (r^2) 0,997 sendo compatível com uma configuração ideal e foi possível devido à utilização de sete concentrações diferentes para a construção da curva de calibração (Figura 5), que mostrou um modelo de regressão linear bastante ajustado.

A maltodextrina apresentou um excelente coeficiente de regressão linear ($r^2 > 0,995$) (FDA, 2013).

A legislação brasileira, Anvisa (2003) e Inmetro (2003) recomendam pelo menos cinco níveis de concentração para a construção da curva de calibração, e coeficiente de regressão linear $r^2 = 0,99$ e $r^2 = 0,90$, respectivamente. No entanto, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry/Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories - IUPAC, 2002) recomenda seis ou mais níveis de concentração. Portanto, os resultados são consistentes com a legislação brasileira e com todos os

protocolos convencionais de guias internacionais (ICH, 1995; AOAC, 2012; FDA, 2013).

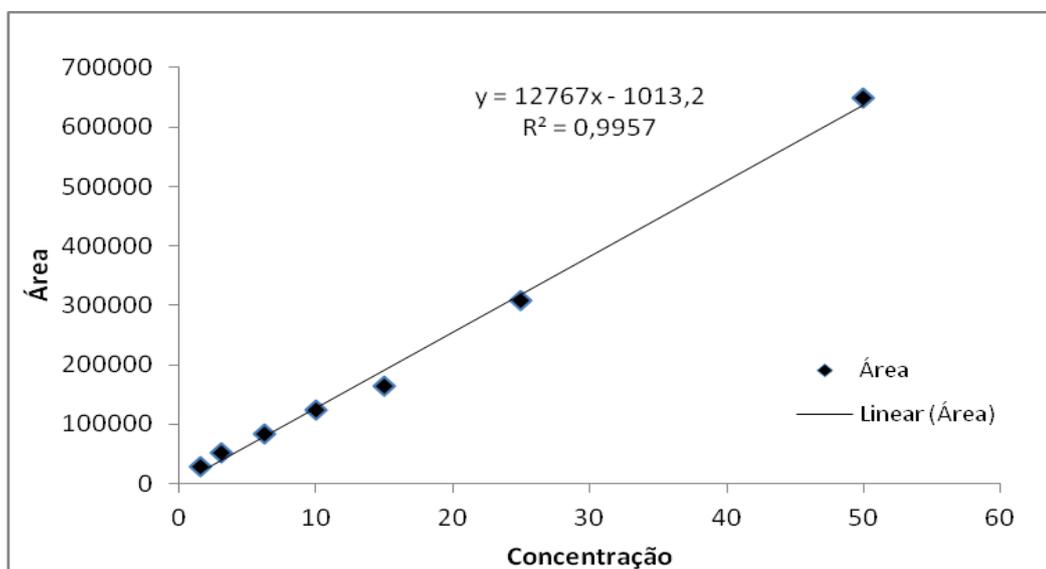


Figura 5: Curva de calibração da maltodextrina obtida através do método cromatográfico, utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetoneitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20 µL.

Valores do LD e LQ foram determinados pela injeção de diluições em série a partir da maior concentração de maltodextrina utilizada na linearidade (FDA, 2013). Dessa forma, foi possível determinar um valor de 0,78 mg/mL para o LD e 1,56 mg/mL para o LQ. Ambos os resultados indicaram que o método proposto foi suficientemente sensível para a análise de maltodextrina em leite cru. No entanto, outros estudos poderiam ser realizados na tentativa de melhorar esses parâmetros.

A recuperação nas soluções preparadas foi melhor conforme o aumento das concentrações de padrão maltodextrina (Tabela 1), sendo que o menor valor foi de 91%. De acordo com Ribani, et al. (2004) os valores aceitáveis estão entre 70 e 120%. De acordo com Shah et al. (2000), FDA (2013) e Anvisa (2003), embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva.

As variações na recuperação podem estar relacionadas a mudanças na metodologia e processo de extração (LÁZARO et al., 2013), no entanto, neste caso, a mesma metodologia foi utilizada para todas as determinações.

Tabela 1: Recuperação do método cromatográfico, utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20 µL.

Concentração do padrão maltodextrina	Recuperação (%)
10mg/mL	91
12,5mg/mL	92
25mg/mL	93

Em relação à repetitividade, valores inferiores a 2,5% foram obtidos para CV de cada concentração injetada (Tabela 2). Segundo a AOAC (2012), dependendo da concentração do analito na amostra, valores de coeficiente de variação são determinados. Para amostras com concentração de 1 a 10% do analito, os valores aceitáveis são de 2 e 1,5% respectivamente. Já para a Anvisa (2003), valores inferiores a 5% são aceitáveis para métodos bioanalíticos. Portanto os valores encontrados estão dentro do limite de concordância das medições sucessivas do padrão de maltodextrina, efetuadas sob as mesmas condições de repetitividade, como mesmo local, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo procedimento de medição em um curto espaço de tempo.

Tabela 2: Resultados da precisão (repetitividade) para o método de cromatografia utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20 µL. Com três concentrações diferentes de padrão maltodextrina.

Maltodextrina	CV (%)	RT (min)
10mg/mL	2,165	7,637
12,5mg/mL	0,739	7,665
15mg/mL	1,340	7,661

Para a precisão intermédia é possível observar na tabela 3 que não houve diferença ($P > 0.05$) para a média calculada nos três dias pelos três diferentes analistas. Alguns valores obtidos para o CV foram inferiores a 5%, conforme preconiza a Anvisa (2003) porém outros foram superiores a 5% e inferiores a 20%,

conforme estabelecido por alguns guias internacionais (AOAC, 2012; FDA, 2013). Coeficiente de Variação de até 20% podem ser aceitos, tendo em vista a complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004; GUILHEN et al., 2010). E em se tratando da maltodextrina, esta pode ser considerada uma amostra complexa, pois consistem de uma mistura de sacarídeos com uma ampla distribuição do peso molecular entre polissacarídeos e oligossacarídeos (CHRONAKIS, 1998).

Tabela 3: Resultado da precisão (precisão intermédia) do método cromatográfico utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetoneitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20 µL. Avaliado com solução de padrão de maltodextrina, em três concentrações diferentes, em três dias consecutivos e por três diferentes analistas.

Concentração (mg/mL)	Analista	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
		Média	CV	Média	CV	Média	CV
10,0	1	5,225±0,110 ^a	2,121	5,492±0,634 ^a	11,558	5,725±0,431 ^a	7,543
	2	5,012±0,473 ^a	9,456	4,584±0,084 ^a	1,851	4,996±0,497 ^a	9,964
	3	5,090±0,153 ^a	3,023	5,059±0,088 ^a	1,741	5,024±0,086 ^a	1,719
12,5	1	8,063±0,580 ^a	7,204	8,530±0,210 ^a	2,463	7,537±0,869 ^a	11,531
	2	7,003±0,007 ^a	0,113	6,844±1,280 ^a	18,068	7,774±0,060 ^a	1,041
	3	8,610±0,153 ^a	1,787	6,744±0,959 ^a	14,229	7,044±1,163 ^a	16,523
15,0	1	12,195±0,259 ^a	2,127	12,059±0,148 ^a	1,229	12,244±0,310 ^a	2,537
	2	10,011±0,014 ^a	0,113	10,200±1,242 ^a	12,182	10,975±2,347 ^a	19,387
	3	13,033±0,915 ^a	7,020	12,028±0,359 ^a	2,985	13,060±1,448 ^a	11,091

*Médias com letras iguais em uma mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)
CV: coeficiente de variação

A robustez é um importante parâmetro para garantir a boa performance do método analítico na rotina do laboratório (González et al., 2014).

Neste estudo os resultados da robustez podem ser visualizados na tabela 4. Modificações na concentração da fase móvel não provocaram mudanças na determinação da maltodextrina. Entretanto, a alteração de fluxo provocou diferenças significativas ($P < 0,05$) para valores do fluxo de 0, 9 e 1,1 mL/min. Dessa forma, na aplicação desta metodologia, deve-se manter a atenção sobre possíveis alterações no fluxo, uma vez que podem provocar alterações nos resultados.

Tabela 4: Robustez do método cromatográfico utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELICOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20 µL, para determinação de maltodextrina em leite cru em relação a variação da concentração da fase móvel e do fluxo.

Parâmetros	Concentração (mg/mL)		
	15*	12,5*	6,25*
Acetonitrila/água			
65:35	9,822±0,166 ^a	6,001±0,312 ^a	2,477±0,112 ^a
68:32	9,632±0,195 ^a	5,667±0,369 ^a	2,021±0,105 ^a
70:30	9,734±0,045 ^a	5,796±0,196 ^a	2,132±0,087 ^a
Fluxo (mL/min)			
0,9	8,534±0,236 ^a	4,908±0,042 ^b	2,001±0,039 ^a
1,0	8,466±0,095 ^a	5,245±0,168 ^a	2,118±0,012 ^a
1,1	8,640±0,371 ^a	4,965±0,015 ^b	1,712±0,063 ^b

* Resultados expressos como a média ± CV (Coeficiente de variação).

^{a-b} Letras diferentes representam diferença significativa na média ($P < 0.05$)

Todos os parâmetros avaliados apresentaram resposta satisfatória. Neste caso, a metodologia pode ser usada para detecção de fraude por adição de maltodextrina em leite cru. Para tanto, outros estudos são necessários para expandir a aplicação do método, como por exemplo para leite em pó, no qual a fraude também tem apresentado expressivo crescimento (CAPUANO et al., 2015).

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método proposto foi utilizado nos cinco grupos experimentais anteriormente mencionados (C; W; M1,0; M1,25 e M1,5). As três diferentes concentrações de maltodextrina empregadas na fraude (M1,0; M1,25 e M1,5) foram baseadas na tentativa de se mascarar a adição de 5% de água. Portanto, variações na composição do leite podem influenciar a quantidade de maltodextrina adicionada.

Os valores encontrados estão representados na tabela 5. As diferenças entre as concentrações de amostras adulteradas e conteúdo de maltodextrina variou de 1,28 para 2,88 mg/mL.

Tabela 5: Resultado da quantificação do composto maltodextrina em amostra de leite através do método cromatográfico utilizando-se cromatógrafo líquido acoplado ao detector ELSD-LTII, empregando-se coluna SULPELCOSIL™ LC-NH2 5µm (25cm X 4.6mm; 5µm), em condições isocráticas. Fase móvel acetonitrila: água Mili-Q (68:32 v/v). Fluxo de 1 ml/min e volume de injeção de 20 µL

Amostra	TR	Concentração da	Concentração de	Diferença*
		Fraude (mg/mL)	Maltodextrina (mg/mL)	
C	-	-	ND	-
W	-	-	ND	-
M 1,0	7,579	10,0	12±0,127	2,88
M 1,25	7,678	12,5	11,22±0,716	1,28
M 1,5	7,745	15,0	13,63±0,057	1,37

*Diferença entre a concentração da amostra manipulada e a concentração calculada

ND: Não Detectado

TR: Tempo de Retenção

As diferenças encontradas na quantificação de maltodextrina podem ser explicadas pela composição da maltodextrina utilizada para fraudar as amostras de leite, sendo esta comercial, onde o perfil de carboidratos pode variar, quando comparada com o padrão de maltodextrina; outras variações na composição da maltodextrina podem ocorrer dependendo da fonte botânica de onde foi obtida. Isso irá refletir no teor de açúcares solúveis totais que por sua vez está relacionada com o processo de hidrólise do amido (COUTINHO, 2007).

Diferenças nos perfis de sacarídeos afetam as características físico-químicas das maltodextrinas. Sacarídeos de alto peso molecular afetam a solubilidade e a estabilidade da solução, enquanto que sacarídeos de baixo peso molecular afetam a fermentabilidade, viscosidade e cristalização (LUMDUBWONG et al., 2001).

5 CONCLUSÃO

A metodologia validada proposta para determinação de maltodextrina em leite cru empregando a HPLC- ELSD-LTII mostrou-se adequada por ser linear em uma ampla faixa dinâmica, seletiva, precisa e com recuperação dentro dos limites aceitáveis. Como a adição de maltodextrina é considerada fraude, a sua simples detecção já condenaria o leite e, para esta finalidade, a metodologia é eficaz. No entanto, para se determinar quantitativamente a maltodextrina no leite, testes utilizando-se outros processos de extração seriam válidos, a fim de melhorar a recuperação, visto que a maltodextrina é um analito complexo e que pode sofrer variação no perfil de sacarídeos dependendo da fonte botânica da qual é extraída e do processo de hidrólise ao qual é submetida, que por sua vez está relacionado ao fabricante.

No entanto, a maltodextrina em leite cru foi detectada a partir de valores de adulteração inferiores a 1%.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUARO, Vinicius Ricardo Junior; MADEIRA, Tiago Bervelieri; CASTILHO, Drielle Caroline; WATANABE, Lycio Shinji; BOVOLENTA, Yuri Renan; NIXDORF, Suzana Lucy. Desenvolvimento e validação de Método para Extração e Quantificação através de HPLC com Índice de Refração para Lactose em Leite Pasteurizado. *Scientia Chromatographica*, v. 5, n. 2 p. 137–145, 2013.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis, ed. 19, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LONGA VIDA - ABLV. Leite longa vida. Disponível em: < <http://www.ablv.org.br> > Acesso em 22 mar 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 236p

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 30691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 mar. 2008.

_____. Instrução Normativa Nº 14, de 27 de abril de 2007. Aprova os Métodos Analíticos Físico-Químicos para Detecção da Maltodextrina em Leite, em conformidade com o Anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, Página 5, de 03/05/2007.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BANSAL, Surendra; DESTEFANO, Anthony. Key Elements of Bioanalytical Methods Validation for Small Molecules. *The AAPS Journal*, v. 9, n. 1, 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751299/pdf/12248_2008_Article_91109.pdf> Acesso 13 jul 2013.

BOQUÉ, Ricard; MAROTO, Alicia; RIU, Jordi; RIUS, Xavier F. Validation of Analytical Methods. *Grasas y Aceites*, v.1, n. 53, p. 128-143, 2002.

BORGES, K. A.; PINTO, A. T. Variações no Índice Crioscópico de Amostras de Leite Recebidas na Plataforma de Um Laticínio, no Período de Janeiro a Agosto de 2007. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2007, Gramado. Trabalhos... do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado: 2007.

BRITO, Natilne Mesquita; JUNIOR, Ozelito Possidônio de Amarante; POLESE, Luciana; RIBEIRO, Maria Lucia. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.13, p.129-146, 2003.

CAPUANO, Edoardo; BOERRIGTER-EENLING, Rita; KOOT, Alex; VAN RUTH, Saskia. M. *Targeted and Untargeted Detection of Skim Milk Powder Adulteration by Near-Infrared Spectroscopy*. *Food Analytical Methods*, p. 1–10, 2015.

CARVALHO, Marcelo Pereira. 2014. Leite, a cadeia que nós mesmos esquecemos. Em < <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/editorial/leite-a-cadeia-que-nos-mesmos-esquecemos-92155n.aspx>> Acesso 10 jan 2015.

CASSIANO, Neila Maria; BARREIRO, Juliana Cristina; MARTINS, Lúcia Regina Rocha; OLIVEIRA, Regina Vincenzi; CASS, Quezia Bezerra. Validação em Métodos Cromatográficos para Análises de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas. *Quimica Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CASSOLI, Laerte Dagher. Fraudes na cadeia do leite: como monitorá-las?. MilkPoint, São Paulo, 04 out. 2012. Disponível em: < <http://www.milkpoint.com.br/cadeiado-leite/espaco-aberto/fraudes-na-cadeia-do-leite-como-monitoralas-80839n.aspx>>

Acesso em: 29 jun 2014.

CHIM, Josiane Freitas. *Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (Rubus sp.) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e light*. Pelotas, 2008. 86p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

CHRONAKIS, Ioannis S. *On the molecular characteristics, composition properties, and structural – functional mechanisms of maltodextrins: a review*. Critical Reviews in Food Science, v.38, n.7, p.599-637, 1998.

COLLINS, Carol H. Introdução a métodos cromatográficos. 7 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. 11-27 p.

COUTINHO, Ana Paula Cerino. *Produção e caracterização de maltodextrinas a partir de amidos de mandioca e batata-doce*. Botucatu, 2007. 151 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita, Botucatu, 2007. Disponível em: <<http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0164.pdf>> Acesso em 22 mar 2013.

CRUZ, Eliel Nunes; SANTOS, Esmeralda Paranhos. Aguagem do leite: métodos básicos de identificação. XI Encontro de Iniciação à Docência. Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias/Departamento de Tecnologia Rural/MONITORIA. UFPB-PPG. 2008.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk. L; FENNEMA, Owen R. Química de Alimentos de Fennema. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAHMER, Alice Maria. *Avaliação da gestão da qualidade na indústria de leite do estado de Mato Grosso do Sul*. Campo Grande, 2006. 218 p. Dissertação (Mestrado em Economia e Administração) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso. 2006. Disponível em: <<http://www.seprotur.ms.gov.br/control/ShowFile.php?id=119947>> Acesso em 6 abr 2013.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. *Cromatografia: um breve ensaio*. *Atualidades em Química*, n.7, p.21-25, 1998.

EURACHEM GUIDE. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2014.

FERRÃO, Marco F.; MELLO, Cesar; BORIN, Alessandra; MARETTO, Danilo A.; POPPI, Ronei J. *LS-SVM: Uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR*. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 852-859, 2007.

FILHO, João Rufino de Freitas; FILHO, João Silva de Souza; GONÇALVES, Tiago Marques; SOUZA, José Johnathan Ferreira de; SILVA, Adriano Henrique Izidoro da; OLIVEIRA, Heraldo Bezerra de; BEZERRA, Janieire Dorlamis Cordeiro. *Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns – PE*. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. 2, p. 38-46, 2009.

FONSECA, Maria; FONTES, Marina. *Melamina*. Disponível em: <http://melaminaffup.blogspot.com.br/> Acesso em 29 jun 2014.

GAZE, Leonardo Van; COSTA, Marion Pereira; MONTEIRO, Maria Lúcia G., LAVORATO, J. A. A., JÚNIOR, Carlos Conte; RAICES, R. S. L.; CRUZ, Adriano Gomes; FREITAS, Mônica Queiroz. *Dulce de Leche, a typical product of Latin*

America: Characterisation by physicochemical, optical and instrumental methods. Food Chemistry, v.169, p. 471–477, 2015.

GONZÁLEZ, Oscar; BLANCO, Maria Encarnación; IRIARTE, Gorika; BARTOLOMÉ, Luis; MAGUREGUI, Miren Itxaso; ALONSO, Rosa M. *Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect.* Journal of Chromatography A, v. 1353, p. 10–27, 2014.

GUILHEN, Sabine Neusatz; PIRES, Maria Aparecida Faustino; DANTAS, Elizabeth Sonoda Keiko; XAVIER, Fernanda Vilibor. *Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Mercúrio total em Amostras de Urina por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CV-AAS).* Estudo de caso. Química Nova, v. 33, n. 6, p. 1285-1290, 2010.

HAAYES, Richard; AHMED, Aadham; EDGE, Tony; ZHANG, Haifei. *Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography, v. 1352, p. 36-52, 2014. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.010> > Acesso em 12 jul 2014.

INSTITUTO NACIONAL de METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO e QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Guideline for Industry Q2A: Validation of Analytical Procedure, 1995.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION; General Requirements for the competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis. Pure Appl. Chem., vol. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

JÚNIOR José Carlos Ribeiro; BELOTI, Vanerli; SILVA, Livia Cavaletti Corrêa; TAMANINI, Ronaldo. *Avaliação da qualidade microbiológica e físicoquímica do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná*. Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, v. 68, n. 392, p. 5-11, 2013.

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

KEARSLEY, M. W.; DZIEDZIC, S. Z. *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*. Molecular Nutrition and Food Research, v. 40, n. 6, p. 349-350, 1995.

KROETZ, Inácio. Combate à fraude no leite: mudança na fiscalização. Milkpoint, 2008. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/combate-a-fraude-no-leite-mudanca-na-fiscalizacao-49089n.aspx>> Acesso em 18 mai 2013.

LANÇAS, F. M. Cromatografia em fase gasosa. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.

LÁZARO, César A., CONTE-JÚNIOR, Carlos A., CUNHA, Fernanda L., MÁRSICO, Eliane T., MANO, Sergio B., FRANCO, Robson M. *Validation of na HPLC Methodology for the Identification and Quantification of Biogenic Amines in Chicken Meat*. Food Analytical Methods, v. 6, n. 4, p. 1024-1032, 2013.

LUIZ, Domareski Jackson; SIMÕES, Bandiera Nataly; TAMOSTU, Sato Rafael; CASALE, Aragon-Alegro Lina; SANTANA, Elsa Helena Walter de. *Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai)*. ALAN, v. 60, n.3 p. 261-269, 2010. Disponível em: http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222010000300008&lng=es&nrm=iso

LUMDUBWONG, Namfone; SEIB, Paul A. Low-and medium-DE maltodextrins from waxy wheat starch: preparation and properties. *Starch/Starke*, v.53, n.12, p. 605-615, 2001.

MARTINS, Fabiana de Oliveira; SILVA, Cláudia Aparecida de Oliveira; CAMPOS, Maria Emilene Martino; ANTUNES, Veridiana de Carvalho; MILAGRES, Maria Patricia; BRANDÃO, Sebastião César Cardoso. *Avaliação da composição, da qualidade físico-química e ocorrência de adulterações em leite UHT*. Disponível em: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p043>> Acesso em: 6 abr 2013

MOORE, Jeffrey C.; SPINK, John; LIPP, Markus. *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.

PAULI, Elis Daiane; CRISTIANO, Valderi; NIXDORF, Suzana Lucy. *Método para Determinação de Carboidratos Empregado na Triagem de Adulterações em Café*. *Quimica Nova*, v. 34, n. 4 p. 689–694, 2011.

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; MELO, Lúcio Flavio Costa. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. *Quimica Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SANVIDO, Gustavo. Pesquisadores desenvolvem metodologias que constataam adulteração no leite em pó. *Jornal da Unicamp*, 2009. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2009/ju439_pag05.php> Acesso em 21 nov 2013.

SINGH, Parminder; GANDHI, Neeraj. *Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues*. *Food Reviews International*. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2014.994818>. Acesso em 13 ago 2015

SCHUSTER-WOLFF-BUHRING, Regina; MICHEL, Ronnie; HINRICHS, Jorg. *A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk*. Dairy and Science Technology, v. 91, n. 1, p. 27-37, 2011.

SHAH, Vinod P. *The History of Bioanalytical Metho Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Documento n Bioanalytical Methods Validation*. The AAPS Journal, v. 9, n. 1, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751303/pdf/12248_2008_Article_9143.pdf> Acesso 13 jul 2013.

SILVA, Maria Cristina Delgado; SILVA, Juliana Vasconcelos Lyra da; RAMOS, Alécia Cristinne Santos; MELO, Rossana de Oliveira; OLIVEIRA, Juliana Omena. *Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado de Alagoas*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n.1, 2008.

SIGMA-ALDRICH CO. *Analyses of Underivatized Sugars and Oligosaccharides by HPLC: Application note 126*, 1997.

SNYDER, Lloyd R; KIRKLAND, Joseph.J; DOLAN, John W. *Introduction to Modern Liquid Chro-matography*, 3 ed., John Wiley & Sons, 2010.

SPINK John.; MOYER Douglas C. *Defining the Public Health Threat of Food Fraud*. Journal of Food Science. V. 76, n. 9, p. 157-163, 2011.

UNITED STATES FOOD and DRUG ADMINISTRATION (US-FDA); *Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation*, 2013.

VELLOSO, C. Celso: *As ações do Ministério para o combate à fraude de leite no Brasil*. Milkpoint, 2003. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/entrevistas/celso-velloso-as-aco-es-do-ministerio-para-o-combate-a-fraude-de-leite-no-brasil-8435n.aspx>>. Acesso em: 22 mar 2013.

VIEIRA, Larissa. Brasil deve subir no ranking mundial de produção de leite em 2014.

Disponível em: <

<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=30457&secao=Not%EDcias>> Acesso em: 10 jan 2015.

VOGEL, Arthur. Análise Química Quantitativa. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2002. 462 p.

WANDERLEY, Carolina Hood; SILVA, Adriana Cristina de Oliveira; SILVA, Flavia Emily Rodrigues da; MÁRSICO, Eliane Teixeira Mársico; CONTE-JUNIOR, Carlos Adam. *Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido*. Revista de Ciências da Vida. v.32, n.2, p. 34-42, 2012.