



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE
ANÁLISE EM FLUXO-BATELADA EMPREGANDO
DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO EM LEITE**

Joicy Bianca de Souza Costa

Recife

Fevereiro/2018

Joicy Bianca de Souza Costa*

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE
ANÁLISE EM FLUXO-BATELADA EMPREGANDO
DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO EM LEITE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: André Fernando Lavorante

Co-orientador: Gustavo Campelo Silva de Souza

*** Bolsista CAPES**

Recife

Fevereiro/2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C837d Costa, Joicy Bianca de Souza.
Desenvolvimento de um sistema de análise em fluxo-batelada empregando
detecção espectrofotométrica para a determinação de ácido siálico em leite /
Joicy Bianca de Souza Costa. – Recife, 2018.
80 f.: il.

Orientador(a): André Fernando Lavorante.
Coorientador(a): Gustavo Campelo Silva de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Química, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Análise em fluxo-batelada 2. Multicomutação 3. Espectrofotometria UV-VIS
4. Leite 5. Ninidrina I. Lavorante, André Fernando, orient. II. Souza, Gustavo
Campelo Silva de, coorient. III. Título

CDD 540

Joicy Bianca de Souza Costa

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE ANÁLISE
EM FLUXO-BATELADA EMPREGANDO DETECÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO
DE ÁCIDO SIÁLICO EM LEITE**

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

27/02/2018

Prof. Dr. André Fernando Lavorante (Departamento de Química - UFRPE)

Orientador

Dr. Gustavo Campelo Silva de Souza (Secretaria de Educação de Pernambuco - SEDUC)

Co-orientador

Prof.^a Dr.^a Fernanda Araújo Honorato (Departamento de Engenharia Química - UFPE)

1º Examinadora

Prof.^a Dr.^a Maria José de Figueira Gomes (Departamento de Química - UFRPE)

2º Examinadora

Aos meus avós maternos,
José Lourenço e Maria Izolina.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ser minha fortaleza e refúgio, por renovar a minha força e alegria e por permitir que eu viva tudo isso.

Aos meus familiares, em especial, aos meus pais, Jobson da Silva Costa e Joseane Maria de Souza Costa, por todo amor e apoio incondicional. Da mesma maneira, aos meus avós maternos, José Lourenço de Souza e Maria Izolina de Souza, por serem meus maiores incentivadores. A minha irmã e amiga Ana Beatriz de Souza Costa, por ter me ouvido e aconselhado todas as vezes que precisei.

Ao meu marido, Thiago Silva de Sena, por ser meu amigo, conselheiro, companheiro de laboratório e de vida.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao corpo docente, direção e administração do Programa de Pós-Graduação em Química e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Professor Doutor André Fernando Lavorante, pela paciência e boa vontade, e por todos os ensinamentos e apoio oferecidos incondicionalmente ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor Boaventura Freire dos Reis pela colaboração e parceria.

Ao Doutor Gustavo Campelo Silva de Souza, por ter contribuído imensamente para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Doutor Paulo Alberto Bezerra da Silva por toda ajuda oferecida e conhecimento compartilhado.

Aos colegas do Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores – LAQIS/UFRPE pela ajuda e companhia, em especial a Nattany de Paula e Arthur Araújo.

Aos colegas discentes da Pós-Graduação em Química, pela amizade, em especial a minha amiga, Bruna Martins Guimarães, que além de companheira de estudos, é uma inspiração pessoal.

Eis que faço uma coisa nova, agora sairá à luz;
porventura não a percebeis? Eis que porei um caminho
no deserto, e rios no ermo.

(Isaías 43:19)

RESUMO

COSTA, J.B. S. **SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO-BATELADA COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO EM LEITE**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Química. Programa de pós-graduação em química. Recife, 2018.

Neste trabalho, é proposto um sistema de análise em fluxo-batelada com aquecimento e detecção espectrofotométrica acoplados na cela reacional para a determinação quantitativa de ácido siálico em amostras de leite. O procedimento analítico proposto para a determinação de ácido siálico foi baseado na reação com a ninidrina ácida, em meio ácido, monitorada em 470 nm. A determinação da concentração de ácido siálico em amostras de leite permite avaliar a ocorrência de fraudes de adição de soro de queijo, não permitida pela legislação vigente. O sistema proposto é constituído por uma bomba peristáltica, três válvulas solenoide de três vias, três válvulas solenoide de estrangulamento, uma cela de reação/detecção e um espectrofotômetro multicanal (UV/VIS). O controle do sistema foi realizado empregando o programa LabVIEW® interfaceado por um sistema eletrônico baseado no circuito integrado (CI) ULN2803A conectado a uma interface USB6009. O sistema proposto possibilitou a obtenção de respostas lineares entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ de ácido siálico (R = 0,99, n = 7) com desvio padrão relativo menor que 2% (n = 10) e limites de detecção e quantificação estimados em 0,239 mg L⁻¹ e 0,726 mg L⁻¹, respectivamente. O sistema apresentou frequência analítica de 7 determinações por hora, consumo de solução de reagentes e de amostra de 200 µL e 466,66 µL respectivamente. Comparado ao método oficial de determinação de ácido siálico em leite, o sistema proposto apresentou significativa diminuição de 90% de consumo de soluções, e conseqüentemente, diminuição dos efluentes gerados. Estudos de potenciais interferentes demonstraram a seletividade do método proposto. O procedimento foi aplicado em amostras de leite UHT, leite em pó e composto lácteo adquiridas nos mercados locais da região metropolitana do Recife. Testes de adição e recuperação foram realizados para validação do procedimento, obtendo-se variação entre 92,5 e 104 %, demonstrando a eficiência do método proposto na detecção de adulteração em amostras de leite com soro de queijo.

Palavras Chave: Análise em fluxo batelada, Multicomutação, Espectrofotometria UV-VIS, Leite, Ninidrina ácida.

ABSTRACT

COSTA, J.B. S. **SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO-BATELADA COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO EM LEITE**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Química. Programa de pós-graduação em química. Recife, 2018.

In this work, it is proposed a batch-flow analysis system with heating and spectrophotometric detection coupled in the reaction cell for the determination of sialic acid in milk samples. The analytical procedure proposed for the determination of sialic acid was based on the acid ninhydrin acid reaction monitored at 470 nm. The determination of the concentration of sialic acid in milk samples allowed to evaluate the occurrence of frauds of addition of cheese whey, not allowed by current legislation. The composition of the proposed system consists of a peristaltic pump, three solenoid three-way valves, three pinch solenoid valves, a reaction/detection cell and a multichannel (UV/VIS) spectrophotometer. The control of the system was performed using the LabVIEW® program, interfaced by an electronic system based on the integrated circuit (IC) ULN2803A connected to a USB6009 interface. The proposed system made it possible to obtain linear responses between 1.0 and 10.0 mg L⁻¹ sialic acid (R = 0.99, n = 7) with relative standard deviation less than 2% (n = 10) and limits of detection and quantification estimated at 0.239 mg L⁻¹ and 0.726 mg L⁻¹, respectively. The system presented analytical frequency of 7 determinations per hour, consumption of reagent solution and sample of 200 µL and 466.66 µL respectively. Compared to the official method of determination of sialic acid in milk, the proposed system showed a significant decrease of 90% in solution consumption and, consequently, decrease of the generated effluents. Studies of potential interferents demonstrated the selectivity of the proposed method. The procedure was applied to samples of UHT milk, milk powder and milk compound purchased in the local markets of the metropolitan region of Recife. Addition and recovery tests were performed to validate the procedure, obtaining a variation between 92.5 and 104%, demonstrating the efficiency of the proposed method in the detection of adulteration in milk samples with cheese serum.

Keywords: flow batch analysis, multicommutation, spectrophotometry UV-VIS, milk, acidic ninhydrin.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Leite.....	3
2.1.1. Composição do leite.....	3
2.1.2. Propriedades sensoriais e físico-químicas do leite.....	4
2.1.3. Adulteração em leite.....	5
2.2. Adulteração em leite com soro de queijo.....	7
2.2.1. Soro de queijo	7
2.3. Detecção de soro de queijo em leite	9
2.3.1. Glicomacropéptido	9
2.3.2. Ácido siálico	10
2.3.3. Detecção espectrofométrica de ácido siálico em leite	11
2.3.4. Método da ninidrina ácida	13
2.4. Análise por injeção em fluxo e multicomutação.....	16
2.5. Análise em fluxo- batelada	21
3 OBJETIVOS.....	24
3.1. Geral.....	24
3.2. Específicos.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Soluções.....	25
4.1.1. Solução estoque.....	25

4.1.2.	Soluções de trabalho.....	25
4.1.3.	Amostras	26
4.2.	Descrição geral do sistema de análise em fluxo-batelada.....	27
4.2.1.	Sistema de controle.....	27
4.2.2.	Cela em fluxo-batelada.....	29
4.3.	Método espectrofotométrico oficial para determinação de ácido siálico em leite	30
4.4.	Método em fluxo-batelada proposto para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite	30
4.5.	Avaliação do sistema em fluxo-batelada proposto	31
4.5.1.	Influência das variáveis químicas.....	31
4.5.1.1.	Estudo de natureza do ácido.....	31
4.5.1.2.	Estudo de concentração do ácido	31
4.5.1.3.	Estudo de concentração da ninidrina ácida.....	31
4.5.2.	Influência das variáveis físicas	32
4.5.2.1.	Estudo de razão volumétrica	32
4.5.2.2.	Estudo de temperatura.....	32
4.5.2.3.	Estudo de tempo de reação	33
4.5.3.	Figuras de mérito.....	33
4.5.4.	Teste de interferentes.....	33
4.5.5.	Teste de adição e recuperação e análise de amostras	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1.	Testes preliminares	36
5.2.	Avaliação do sistema em fluxo-batelada proposto	38
5.2.1.	Estudo de natureza do ácido.....	38
5.2.2.	Influência de concentração do ácido	39
5.2.3.	Influência de concentração da ninidrina ácida.....	42
5.2.4.	Estudo de razão volumétrica	44

5.2.5. Estudo de temperatura	46
5.3. Figuras de mérito.....	49
5.4. Teste de adição e recuperação	52
5.5. Teste de interferentes.....	53
6 CONCLUSÃO	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição média do leite de vaca.

Tabela 2. Comparação da composição do soro doce e soro ácido.

Tabela 3. Valores de classificação para análise de adulteração de leite por adição de soro de queijo a partir da quantificação de ácido siálico.

Tabela 4. Acionamento das válvulas do sistema de análise em fluxo-batelada proposto.

Tabela 5. Comparação entre variáveis otimizadas para o sistema de análise em fluxo-batelada proposto e variáveis determinadas pelo método oficial.

Tabela 6. Coeficientes lineares, coeficientes angulares e coeficientes de correlação obtidos a partir da construção de curvas analíticas no sistema de análise em fluxo-batelada em dias diferentes.

Tabela 7. Figuras de mérito do sistema de análise em fluxo-batelada proposto para determinação quantitativa de ácido siálico.

Tabela 8. Teste de adição e recuperação para determinação de ácido siálico em amostras de leite utilizando o sistema de análise em fluxo-batelada proposto.

Tabela 9. Avaliação dos possíveis interferentes na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os principais ácidos siálicos encontrados nos mamíferos.

Figura 2. Mecanismo da reação da ninidrina com aminoácidos em meio ácido.

Figura 3. Classificação dos métodos de análise em fluxo.

Figura 4. Principais componentes de um sistema de análise de fluxo-batelada (FBA).

Figura 5. Cella em fluxo-batelada desenvolvida por Brasil e Reis (2016) e empregada no sistema proposto.

Figura 6. Espectro do produto da reação entre ninidrina ácida e ácido siálico seguindo metodologia oficial.

Figura 7. Diagrama de fluxo do sistema em fluxo-batelada proposto empregando bomba peristáltica.

Figura 8. Diagrama de fluxo do sistema em fluxo-batelada proposto empregando minibombas solenoide.

Figura 9: Curvas analíticas em função da natureza do ácido utilizado na reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico para soluções de referência de 0 a 10 mg L^{-1} de ácido siálico.

Figura 10. Curvas analíticas em função da concentração do ácido clorídrico utilizado na reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico para soluções de referência de 0 a 10 mg L^{-1} de ácido siálico.

Figura 11. Curvas analíticas em função da concentração da ninidrina ácida utilizada na reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico para soluções de referência de 0 a 10 mg L^{-1} de ácido siálico.

Figura 12. Estudo da influência do volume da ninidrina ácida $0,160 \text{ mol L}^{-1}$ na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.

Figura 13. Estudo da influência do volume do ácido clorídrico $0,100 \text{ mg L}^{-1}$ na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.

Figura 14. Estudo da influência do volume do ácido siálico $6,00 \text{ mg L}^{-1}$ na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.

Figura 15. Estudo da influência de temperatura na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.

Figura 16. Estudo da influência do tempo de aquecimento na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.

Figura 17: Curva analítica para reação entre ninidrina ácida $0,160 \text{ mg L}^{-1}$ e ácido siálico na faixa de 1 a 10 mg L^{-1} , em meio a ácido clorídrico $0,100 \text{ mg L}^{-1}$, obtida no sistema de análise em fluxo-batelada a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ após 5 minutos de aquecimento.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABLV	Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CFA	Continuous Flow Analysis
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FBA	Flow Batch Analysis
FIA	Flow Injection Analysis
GMP	Glicomacropéptido
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NANA	Ácido N-acetil-neuramínico
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido N-glicolneuramínico
PTFE	Politetrafluoretileno
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UHT	Ultra High Temperature
USB	Universal Serial Bus
USP	Universidade de São Paulo
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento natural formado pela emulsão de glóbulos de gordura e pela suspensão de micelas de caseína, em uma fase aquosa que contém moléculas de lactose, proteínas do soro do leite e alguns minerais solubilizados (Behmer, 1999).

A alta qualidade nutricional, o sabor e aroma característicos e o custo relativamente baixo fazem do leite um alimento amplamente consumido pela população em geral (Ribeiro, 2008).

Como é sabido, o leite é fonte de matéria prima para diferentes segmentos da cadeia produtiva, assim sendo está sujeito a sofrer diferentes tipos de adulterações que podem ocorrer desde a sua produção até a fase de comercialização (Tronco 2010).

Substâncias adulterantes são adicionadas ao leite com diferentes objetivos, tais como a adição de água para conferir um maior volume ao produto, a adição de substâncias conservadoras e/ou inibidoras com a finalidade de evitar a ação de micro-organismos, a adição de substâncias redutoras da acidez para mascarar o aumento de acidez do leite observado quando ele está em estágio de deterioração e a adição de substâncias reconstituintes de densidade, que mascara a adição de água ao leite, mantendo a densidade inicial (Lisbôa, 1997).

O soro de queijo é um exemplo de adulterante reconstituente de densidade e a sua adição corresponde a uma das fraudes econômicas mais comumente aplicadas ao leite fluido e em pó (Velloso, 2003).

O soro do queijo é um coproduto da fabricação de queijos, por isso possui custo reduzido ou nulo e sua detecção é relativamente difícil. Por estas razões, o soro de queijo tem sido uma opção economicamente atrativa para adulteração de leite (Carvalho, 2007).

A adulteração do leite por adição de soro de queijo gera dano econômico, prejudicando diretamente o consumidor e os concorrentes que obedecem à legislação, além da redução do valor nutricional do produto, uma vez que a cada 10% de soro adicionado, o teor de proteínas do leite é reduzido em 8% (Felício, 2007).

Este tipo de fraude pode ser indicado através da análise do índice de glicomacropéptido (GMP), uma porção da molécula de κ -caseína solúvel no soro

que se apresenta ligado ao ácido N-acetilneuramínico (ácido 5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-non-2ulopiranosônico-Neu5ac), também conhecido como ácido siálico, que é o componente mais comum existente no soro doce de queijo. Desse modo, a determinação de ácido siálico tem sido usada para determinar adulteração de leite com adição de soro de queijo (Fukuda, 2003).

Atualmente, no Brasil, existem dois métodos oficiais para a determinação de GMP em amostras de leite, segundo a Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. O primeiro método é baseado na determinação do índice de GMP utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e o segundo é o método da ninidrina ácida, baseado na determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico ligado ao glicomacropéptídeo com detecção em 470 nm (Brasil, 2006). A metodologia baseada em CLAE requer operador qualificado e alto custo de instrumentação e operação, em contrapartida, a metodologia baseada no método da ninidrina ácida apresenta-se laboriosa e com alto consumo de solução de amostra e de reagente, conseqüentemente, elevada geração de efluentes.

Neste sentido, é proposto o desenvolvimento de um procedimento analítico baseado em um sistema de análise em fluxo-batelada com aquecimento e detecção acoplados na cela de reação para a determinação de ácido siálico em amostras de leite. A metodologia espectrofotométrica da ninidrina ácida foi adaptada visando o aumento da sensibilidade com redução significativa no consumo de reagentes e na geração de resíduos, aumento frequência analítica e baixo limite de detecção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite

A importância nutricional, funcional e econômica do leite e de seus derivados justifica a necessidade de garantir a qualidade destes alimentos e o controle de possíveis fraudes. Assim o estudo da química do leite desempenha papel crucial na garantia do controle de qualidade e no desenvolvimento de produtos.

O leite pode ser considerado um dos alimentos naturais mais nobres, devido ao seu rico teor de nutrientes. O artigo 475 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) define que “leite é denominado, sem outra especificação, o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta” (Brasil, 1998).

2.1.1. Composição do leite

A qualidade nutricional do leite e a adequação para processamento e consumo humano podem ser indicadas através da sua composição. Os principais componentes do leite além de água e gordura são proteínas caseína e albumina, glicídios como a lactose, minerais e vitaminas (Jensen, 1995). Na Tabela 1 é apresentado o teor aproximado de alguns componentes do leite de vaca (Walstra, 1984).

Tabela 1: Composição média do leite de vaca

Constituinte	Teor (g/kg)	Varição (g/kg)
Água	873	855-887
Lactose	46	38-53
Gordura	39	24-55
Proteínas	32,5	23-44
Substâncias minerais	6,5	5,3-8,0
Ácidos orgânicos	1,8	1,3 – 2,2
Outros	1,4	-

Fonte: Adaptado de Walstra, 1984.

A lactose é o principal glicídio presente no leite, é um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos D-glicose e D-galactose, ligados por ponte glicosídica β -1,4, que desempenha importante papel na síntese do leite. Outra característica importante da lactose é que a mesma se apresenta como a principal fonte de glicose, importante no fornecimento de energia. Os principais minerais encontrados no leite são cálcio e fósforo, que tem importância para o crescimento de ossos e o desenvolvimento de tecidos macios de animais neonatos. Uma parte do cálcio, do magnésio e do fósforo se encontra em forma solúvel e a parte insolúvel se encontra ligada a caseinato, citrato ou fosfato. As principais enzimas presentes no leite são a peroxidase e a catalase que podem ser usadas como métodos diagnósticos de mastite, já que suas concentrações aumentam nos processos inflamatórios. Outras enzimas presentes no leite incluem fosfatases, xantino-oxidase e redutases (Gonzalez, 2001).

Os triglicerídeos são os componentes mais importantes da complexa mistura lipídica do leite (98%), compostos por três ácidos graxos ligados covalentemente a uma molécula de glicerol por pontes éster (Durr, 2000).

Na gordura do leite são encontradas vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, porém com limitadas quantidades de vitamina K. A caseína é a proteína do leite mais importante, corresponde a cerca de 85% das proteínas lácteas. Os vários tipos de caseínas (α , β , γ e κ) possuem importância diferente para qualidade do leite, apesar de possuírem estruturas similares. As caseínas apresentam estrutura de micelas granulares multimoleculares, compostas por água, minerais e algumas enzimas, além da própria caseína. Outras proteínas do leite apresentam-se na forma solúvel (González e Noro, 2011).

Entretanto a composição do leite pode sofrer uma variação causada por fatores como a alimentação da vaca, doenças, período de lactação, ordenhas, condições de estocagem e transporte e ocorrência de adulterações.

2.1.2. Propriedades sensoriais e físico-químicas do leite

O sabor do leite é determinado pela relação entre lactose e cloretos, podendo haver variações devido fatores como a ocorrência de infecções, a alimentação e o ambiente de ordenha. A cor branca do leite é determinada pela dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de

fosfato de cálcio. A viscosidade do leite é maior que a viscosidade da água, devido à presença de proteínas e lipídios. A leve acidez do leite fresco é justificada pela presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos, porém o aumento da acidez ocorre devido à transformação da lactose em ácido láctico, por ação de enzimas microbianas. O pH do leite pode variar entre 6,6 e 6,8, valores de pH levemente alcalino pode ocorrer quando os animais apresentam mamite. O leite apresenta um efeito tamponante, especialmente em pH entre 5 e 6, devido a presença de dióxido de carbono, proteínas, citratos, lactatos e fosfatos (Silva, 1997).

As características físico-químicas do leite devem estar de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado contido na Instrução Normativa nº 62 do MAPA, que determina que o leite integral deve atender os parâmetros mínimos de gordura de 3 g/100 g, densidade relativa a 15 °C variando entre 1,028 e 1,034, acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/100 mL, teor mínimo do extrato seco desengordurado de 8,4 g/100 g, índice crioscópico entre -0,512 °C e -0,53 °C e teor mínimo de proteína de 2,9 g / 100 g (Brasil, 2011).

Fatores como a ação de micro-organismos, fase de lactação, intervalo entre as ordenhas, alimentação, fatores genéticos do animal e fraudes do produto, podem causar alterações nesses parâmetros físico-químicos do leite (Oliveira, 2010).

2.1.3. Adulteração em leite

A Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida classifica a prática de adulteração do leite em dois tipos: adulteração sanitária, que consiste na adição de substâncias adulterantes ao leite com o intuito de mascarar deficiências do produto, podendo tais substâncias causar mal à saúde, e adulteração econômica, que consiste na adição de substâncias inócuas, que aumentam o volume de leite, mas não causam mal à saúde (ABLV, 2007).

A ocorrência de fraudes em leite tem graves consequências, como diminuição do valor nutricional, alteração da qualidade dos produtos beneficiados, diminuição da vida de prateleira, além de representar alto risco à saúde dos consumidores pela possível presença de determinadas substâncias potencialmente perigosas (Cortez, 2010).

Com o objetivo de aumentar o lucro, os praticantes de fraudes causam o aumento do volume e do prolongamento da vida útil do produto, através de artifícios

danosos à saúde e a economia popular. Essas adulterações podem ocorrer desde a fonte de produção até a fase de comercialização. São consideradas substâncias adulterantes todas as espécies que não estejam descritas no rótulo de uma embalagem ou na composição do leite (Pires, 2000).

Baseado na finalidade do uso da substância adulterante é possível classificar as adulterações em substâncias conservadoras e/ou inibidoras, substâncias redutoras da acidez ou ainda de substâncias reconstituintes da densidade. Adulterantes conservantes inibem o desenvolvimento e proliferação de microrganismos. Dentre as substâncias mais empregadas estão o ácido bórico, ácido salicílico, água oxigenada, dicromato de potássio, formaldeído, cloro e hipoclorito. Adulterantes redutores de acidez geralmente mascaram o processo fermentativo do leite e o conseqüente aumento da acidez do leite, causado pela ação de bactérias lácticas que fermentam a lactose e produzem ácido láctico e outros compostos. A presença de substâncias neutralizantes no leite é proibida pela legislação brasileira. As substâncias mais usadas para esse fim são bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, cal virgem e hidróxido de sódio ou soda (Tronco, 2010).

Adulterantes reconstituintes de densidade são adicionados ao leite para recompor ou manter a densidade do leite cujo volume foi aumentado fraudulentamente e assim mascarar outro tipo de fraude. São exemplos deste tipo de adulterantes, substâncias como cloretos, urina de gado, açúcares, etanol, amido modificado, dextrina e soro de queijo (Velloso, 2003).

2.2. Adulteração em leite com soro de queijo

Conforme o Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal “a adição de soro de queijo em leite é considerada infração contra o consumidor, pois altera as características nutricionais do leite” (Brasil, 1997).

No Brasil, a adição de soro proveniente da fabricação de queijo ao leite de consumo é proibida pela legislação vigente. Porém, devido à disponibilidade do soro de queijo, que é um coproduto de custo reduzido ou nulo, esta fraude torna-se atrativa economicamente, sendo considerada uma das fraudes econômicas mais comumente aplicadas ao leite fluido e em pó (Velloso, 2003; Carvalho, 2007).

Alguns derivados do leite como creme de leite, leites fermentados, e alguns tipos de queijo podem conter soro de queijo em suas formulações, no caso de produtos como bebidas lácteas, a sua utilização é permitida desde que conste em rotulagem específica e os limites sejam obedecidos, de maneira que este tipo de bebida não pode ser considerado leite (Brasil, 2007; Dracz, 1996).

A qualidade do leite quando sofre adição de soro de queijo é comprometida, uma vez que existem importantes diferenças entre a composição dos sólidos não-gordurosos do soro de queijo e a dos sólidos não-gordurosos do leite, além dos aspectos nutricionais e presença de resíduos de determinados aditivos usados na fabricação de alguns tipos de queijo, como nitratos e nitritos (Carvalho, 2007).

2.2.1. Soro de queijo

O Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal define soro de queijo como o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite, destinado à fabricação de queijos e caseína (Brasil, 2007).

Com relação ao aspecto visual, o soro de queijo é um líquido verde-amarelado. Dependendo do tipo de queijo processado, o volume do soro pode corresponder a aproximadamente 90% do volume do leite (Camargo, 2000).

O soro de queijo pode ser classificado como soro ácido ou soro doce, dependendo do seu grau de acidez. O soro doce, que possui baixa acidez, resulta da fabricação de queijos coagulados principalmente pelo uso de renina, este tipo de coagulação ocorre no pH natural em torno de 6,6. O soro ácido é obtido na fabricação de queijos que utilizam acidificação como importante parte do processo de coagulação e fabricação de caseínas. A coagulação ácida ocorre com o

abaixamento de pH ao ponto isoelétrico da caseína, em torno de 4,6 (Lobato, 2014; Oliveira, 2009).

O soro é composto basicamente por água, que contém algumas substâncias solúveis, como a lactose, proteínas solúveis, sais minerais e traços de gordura, e algumas variações ocorrem de acordo com o tipo do soro (Lobato, 2014; Zadow, 1997).

O soro doce possui maior teor de sólidos totais, mais lactose e mais proteína que o soro ácido, que possui maior concentração de nitrogênio não protéico e de ácido láctico e maior teor de cinzas, conforme descrito na Tabela 2 (Carvalho, 2007).

Tabela 2: Comparação da composição do soro doce e soro ácido.

Componente	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
Água	93 - 94	94 - 95
Sólidos Totais	6 - 7	5 - 6
Lactose	4,5 - 5	3,8 - 4,2
Nitrogênio não protéico (% do N total)	22	27
Proteína (N x 6,38)	0,8 - 1	0,6 - 1
Ácido Láctico	0,1 - 0,2	0,7 - 0,8
Cinzas	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8

Fonte: Adaptado de Carvalho (2007).

A produção de soro no Brasil é constituída basicamente de soro doce, resultante da fabricação de queijos por coagulação enzimática, por exemplo, mussarella, prato, minas frescal e meiacura, que são prioritariamente comercializados no país. O soro ácido, obtido da fabricação de queijos de coagulação ácida, como ricota e requeijão, e da fabricação de caseína (Carvalho, 2007).

2.3. Detecção de soro de queijo em leite

A detecção deste tipo de adulteração é relativamente difícil, uma vez que utiliza um derivado do próprio leite e, geralmente, é mascarada com a adição de outros adulterantes como sacarose e cloreto de sódio, que restabelecem os valores analíticos normais obtidos a partir da análise de densidade do leite (Felício, 2007).

A detecção da adição fraudulenta de soro de queijo no leite pode ser realizada através da determinação quantitativa do glicomacropeptídeo (GMP), pois este é um componente específico do soro, resultante da ação proteolítica de enzimas (Fukuda, 1994).

Segundo a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, existem dois métodos oficiais para a determinação de glicomacropeptídeo no leite, um dos métodos determina GMP utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e o outro realiza a determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico ligado ao glicomacropeptídeo que é liberado da κ -caseína, baseado na reação com ninidrina ácida, na região visível do espectro (470 nm) (Lasmar, 2011; Fukuda, 1994).

Outros métodos de detecção de soro em leite estão disponíveis, incluindo os métodos imunquímicos (Hernández, 2009), espectroscópicos (Borin, 2006) e cromatográficos (Carvalho, 2007).

2.3.1. Glicomacropeptídeo

O glicomacropeptídeo (GMP) é um peptídeo do soro, derivado da coagulação do queijo devido à digestão da κ -caseína pela ação da quimosina. O GMP possui alto teor de aminoácidos essenciais (47%), apresenta resistência ao calor, à digestão e à mudança de pH. Como possui alta carga negativa favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal (Haraguchi, 2006).

Ao adicionar uma mistura de enzimas, conhecida como coalho, ao leite para a fabricação de queijos, ocorre à clivagem inicial por ação da quimosina, levando a formação de dois peptídeos, um é composto pelos resíduos de aminoácidos 1 a 105, chamado de para- κ -caseína e o outro do resíduo 106 a 169, o glicomacropeptídeo (GMP) que carrega todos os açúcares da κ -caseína, dentre os açúcares ligados ao GMP está o ácido siálico (Guinee, 1992).

2.3.2. Ácido siálico

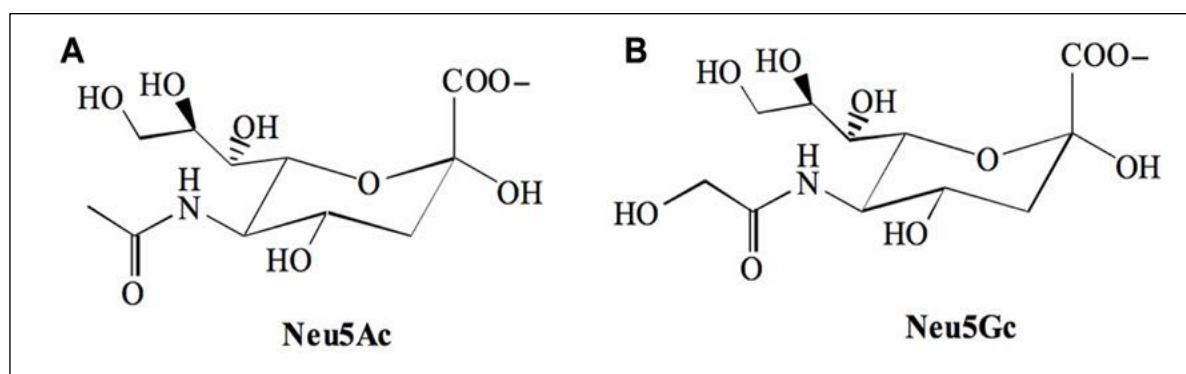
O ácido siálico, N-acetilneuramínico (NANA), é o principal componente da k-caseína, que é a principal glicoproteína do leite. A k-caseína contém aproximadamente 6 - 10% de carboidratos, entre eles ácido siálico, galactose e N-acetilgalactosamina (Fukuda, 1994).

A k-caseína corresponde à fração proteica que é mais afetada pela presença da enzima quimosina, o qual compõe os coalhos utilizados na indústria dos queijos (Jollès e Fiat, 1979).

Os ácidos siálicos são monossacarídeos com nove carbonos, que possuem baixo peso molecular (309,28 Daltons), encontrados em posições terminais das cadeias de açúcar dos glicoconjugados presentes nas membranas celulares ou secrecionados no meio extracelular. Os membros mais comuns da família dos ácidos siálicos são o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) e seu derivado o ácido N-glicolneuramínico (Neu5Gc), que é diferente do Neu5Ac no carbono da posição 5, que é substituído por um acetamido ou um hidroxiacetamido, conforme apresentado na Figura 1 (Freire-de-Lima, 2012).

Figura 1: Os principais ácidos siálicos encontrados nos mamíferos.

(A) ácido N-acetilneuramínico [Neu5Ac] e, (B) ácido N-glicolilneuramínico [Neu5Gc].



Fonte: Freire-de-Lima (2012)

O ácido siálico possui grande importância para o funcionamento do organismo, pois estão envolvidos intimamente em processos biológicos fundamentais à manutenção da vida. Esta família de monossacarídeos desempenha funções diferentes daquelas normalmente atribuídas a carboidratos, como

armazenadores de energia ou como componentes de blocos estruturais. Em sistemas biológicos, estes ácidos se encontram ligados a glicoconjugados e desempenham importantes funções como a de mediadores na adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovadores celulares, receptores para bactérias e vírus. Outra importante função do ácido siálico é relacionada à detecção de processos inflamatórios, câncer e infecção viral (Fátima, 2005).

2.3.3. Detecção espectrofométrica de ácido siálico em leite

A determinação espectrofométrica do GMP a partir do ácido siálico é um método apropriado para indicar adulteração de leite por adição de soro de queijo, pois o leite possui um nível de GMP muito inferior aos soros de queijos, além de não demandar mão-de-obra especializada, nem equipamentos muito sofisticados (Fukuda, 1994).

Estudos realizados por Warren em 1959 baseavam-se na reação do ácido siálico com resorcinol para determinação quantitativa do soro de queijo, empregando detecção espectrofotométrica em 549 nm. Warren fez adaptações no teste do ácido tiobarbitúrico para determinar ácido siálico a partir da oxidação do periodato com solução ácida forte e extração (Warren, 1959).

Em 1985 o método desenvolvido por Warren (1959) foi modificado por Wolfchoon-Pombo e Pinto, empregando o reagente de Erlich (p-dimetilaminobenzaldeído) em substituição ao agente complexante resorcionol proposto por Warren. O método modificado permitiu a detecção da adulteração de leite fresco pasteurizado com, no mínimo, 2% de soro de queijo. As desvantagens do método Ehrlich são além da demanda excessiva de tempo de análise, a interferência causada por proteases oriundas de bactérias psicrófilas e de leite proveniente de animais com mamite (Wolfchoon-Pombo e Pinto, 1985). Em 1991, o método desenvolvido por Wolfchoon-Pombo e Pinto (1985) passou a ser um método de triagem utilizado para pesquisa de soro de queijo em laticínios no Brasil adotado pelo MAPA (Brasil, 1991).

No ano de 1987 Yao e Ubuka desenvolveram um método para a determinação do ácido siálico baseado na reação com reagente 2 de Gaitonde, também conhecido como ninidrina ácida. Esta reação produz um composto estável de coloração violeta que possui absorvância máxima em 470 nm. Uma vantagem

deste método é a especificidade desta reação frente a vários açúcares testados, e embora tenha sido notada a interferência pela cisteína, cistina e triptofano, suas absorvâncias máximas foram observadas em regiões diferentes do ácido siálico, 560 nm, 489 nm e 385 nm, respectivamente (Yao e Ubuka, 1987).

Posteriormente, o método desenvolvido por Yao e Ubuka (1987) foi adaptado em 1994 por Fukuda, sendo proposta a padronização do método da ninidrina ácida para a determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico livre ou ligado à glicoproteína de leite fluido e soro, na região do visível do espectro, a 470nm. O método adaptado mostrou-se exato, preciso e sensível a pequenas variações, além de apresentar fácil execução e não necessitar de materiais e equipamentos sofisticados ou mão de obra qualificada. Também dispensa a etapa da hidrólise a quente e reduz o tempo de execução quando comparado com outras metodologias (Fukuda, 1994).

Em 1996, o método da ninidrina ácida desenvolvido por Fukuda (1994) foi proposto como um teste de “*screening*” para a classificação do leite recebido pelas indústrias de laticínios quanto à possível fraude por adição de soro. Fukuda (1996) propôs a classificação do leite quanto à adulteração com soro de queijo como negativo (absorvância a 470nm $\leq 0,300$ ou $\leq 5,14$ mg de NANA/L de leite), suspeito (absorvância a 470nm entre 0,300 e 0,600 ou entre 5,14 a 10,64 mg de NANA/L de leite) ou positivo (absorvância a 470nm $> 0,600$ ou $> 10,64$ mg de NANA/L de leite) (Fukuda, 1996).

O método de Fukuda (1994) não foi usado apenas para determinar a adição de soro de queijo em leite, mas também para monitorar alterações precoces da k-caseína durante o armazenamento de leite UHT comercial e sob a ação da plasmina e de extratos de pseudomonas. A atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite UHT foi estudada através do método da ninidrina ácida e concluiu-se a eficiência e sensibilidade deste método para detectar modificações proteolíticas sob a k-caseína (Gomes,1995).

O mesmo método de Fukuda também foi empregado para estudar as variações dos teores de GMP livre e total durante a lactação e concluiu que as formas livre e total do GMP variam de acordo com o período da lactação e as condições sanitárias da glândula mamária do animal e sua concentração é inversamente proporcional à produção do leite. O teor de GMP livre é mais alto quando mais próximo do período colostrar e durante o final da lactação. O GMP

liberado pela renina mostra um comportamento similar, porém com teor dez vezes maior que o GMP livre (Furlanetti & Prata, 2003).

Os valores sugeridos por Fukuda (1996) de quantificação de ácido siálico presente no leite nas diversas categorias foram alterados em 2002 por Prata e colaboradores, ampliando o universo amostral e constatando que o método da ninidrina ácida é eficiente na detecção de fraudes por adição de soro. A nova classificação determina que negativo (absorbância a 470nm $\leq 0,300$ ou $\leq 5,14$ mg de NANA/L de leite), suspeito (absorbância a 470nm entre 0,300 e 0,450 ou entre 5,15 a 7,89 mg de NANA/L de leite) e positivo (absorbância a 470nm $\geq 0,451$ ou $> 7,89$ mg de NANA/L de leite) (Prata, 2002), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de classificação para análise de adulteração de leite por adição de soro de queijo a partir da quantificação de ácido siálico.

Resultado	Absorbância (470nm)	[Ácido siálico] (mg/litro de leite)
negativo	$A \leq 0,300$	$[AS] \leq 5,14$
suspeito	$0,300 > A < 0,450$	$5,15 > [AS] < 7,89$
positivo	$A \geq 0,451$	$[AS] > 7,89$

A Instrução Normativa nº 22 de 14/04/2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da regulamentação dos Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos homologou a técnica da ninidrina ácida para a determinação quantitativa de ácido siálico como metodologia oficial no Brasil (Brasil, 2003).

2.3.4. Método da ninidrina ácida

Em 1952, o método da ninidrina ácida foi proposto para determinação fotométrica dos aminoácidos prolina e ornitina. A ninidrina ácida era preparada sob aquecimento a 70 °C a partir da mistura de 0,4 mL de ácido fosfórico 6,0 mol L⁻¹ e 0,6 mL de ácido acético glacial p.a., onde eram dissolvidos 25 mg de ninidrina por mL da mistura ácida. Seguindo esta metodologia, a ninidrina ácida apresentou-se

estável apenas após as primeiras 24 horas, exigindo longo tempo de preparo (Chinard, 1952).

Posteriormente, no ano de 1967, Gaitonde propôs modificações na preparação da ninidrina ácida que viabilizaram a determinação espectrofotométrica de cisteína em meio a outros aminoácidos naturais. A ninidrina ácida, agora também chamada de reagente 2 de Gaitonde, passou a ser preparada à temperatura ambiente, substituindo o ácido fosfórico 6 mol L^{-1} usado na mistura ácida por ácido clorídrico p.a.. Estas alterações permitiram o emprego do reagente 2 de Gaitonde logo após o preparo, devido a estabilidade alcançada mais rapidamente (Gaitonde, 1967).

Para a determinação de ácido siálico, o reagente 2 de Gaitonde foi usado pela primeira vez em 1987 por Yao e Ubunka baseada na determinação espectrofotométrica em 470 nm (Yao e Ubuka, 1987). Em seguida, este método sofreu sucessivas alterações (Fukuda, 1994; Fukuda, 1996; Prata, 2002) e em 2003 tornou-se o método oficial para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite no Brasil (Brasil, 2003).

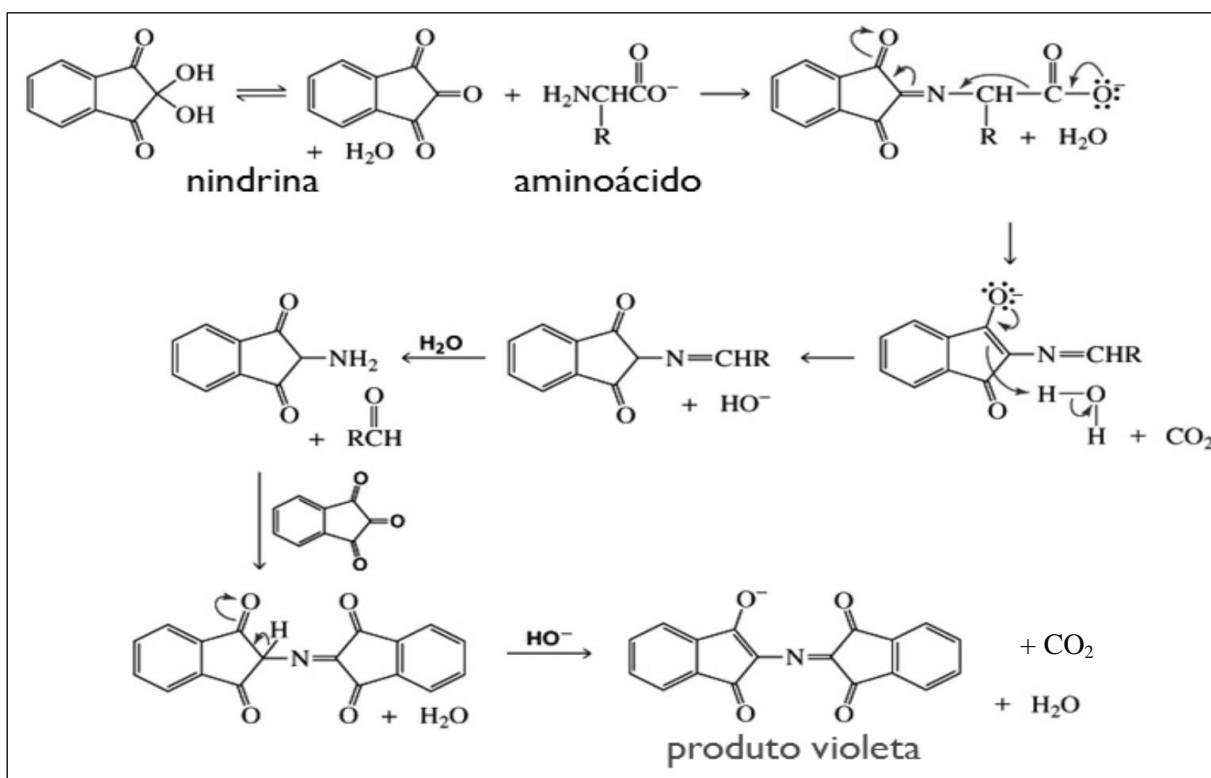
A determinação quantitativa de ácido siálico por espectrofotometria na região visível do espectro (470 nm) baseada no método da ninidrina ácida mostrou-se eficiente para a detecção de adição de soro de queijo ao leite, além de ser útil na monitoração da atividade proteolítica do leite por quantificar, indiretamente, a liberação de glicomacropéptido (GMP). O método da ninidrina ácida pode substituir as demais metodologias de detecção da adição de soro em leite (Fukuda, 2003).

Esse método detecta a presença do grupo α -amino livre dos aminoácidos, do grupo amino terminal de peptídeos e proteínas e do grupo ϵ -amino da lisina. No mecanismo da reação da ninidrina ácida (2,2-di-hidroxi-1,3-indandiona) com aminoácidos ocorre a geração de uma imina, causada pela descarboxilação do grupo carboxilato ligado ao C- α , que hidrolisa formando um derivado da ninidrina aminado, que em seguida adiciona à outra molécula de ninidrina ácida formando como produto uma imina de coloração violeta, a intensidade da cor é proporcional à concentração, conforme descrito na Figura 2 (Bruce, 2006). Os produtos desta reação entre aminoácidos e ninidrina são um aldeído (RCHO), o cromóforo púrpura e CO_2 (Friedman, 2004).

Cineticamente, esta reação tem ordem geral dois, por depender das concentrações da ninidrina ácida e do aminoácido estudado (Bottom, 1978). A etapa determinante na velocidade da reação envolve o deslocamento nucleofílico do grupo hidroxila por um grupo amino não protonado na primeira etapa da reação. Logo, a descarboxilação não é a etapa determinante, pois espera-se que descarboxilação seja uma etapa unimolecular e não esteja sujeita ao impedimento estérico (Friedman, 2004).

A reação da ninidrina ácida com o ácido siálico ocorre através do grupo NH_2 acetilado, à quente em pH 1,6. Isso garante a especificidade da reação, uma vez que em pH superior a 4, não ocorre formação do produto colorido. O produto formado desenvolve uma coloração que varia entre amarelo e marrom (Fukuda, 1994).

Figura 2: Mecanismo da reação da ninidrina com aminoácidos em meio ácido.



Fonte: Adaptado de Bruice (2006).

2.4. Análise por injeção em fluxo e multicomutação

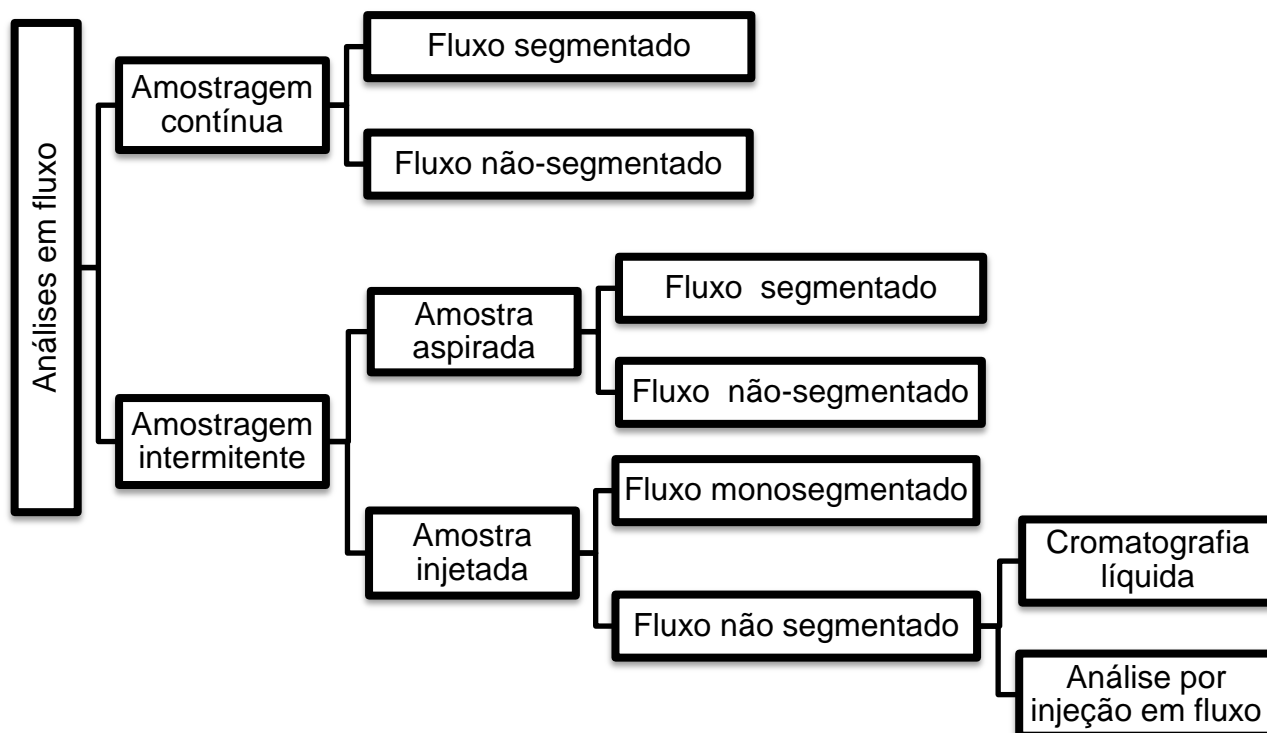
Análise em fluxo é o nome genérico recomendado para todos os métodos de análise baseados na introdução e processamento de amostras em fluxo (Zagatto, 1999). A alta frequência analítica, o emprego de pequenas quantidades de reagentes e a conseqüente redução significativa na geração de efluentes fazem dos sistemas automáticos de análise em fluxo alvo de muitas pesquisas. Além disso, esse processo de análise química tem grande aceitação por possuir grande versatilidade e facilidade operacional, podendo ser projetado de várias formas. O sistema de análise em fluxo geralmente é dividido em quatro partes: propulsão dos fluídos, injeção da amostra, reação e detecção (Reis, 1989).

O desenvolvimento dos sistemas de análise em fluxo iniciou-se em 1957, quando Skeggs propôs a análise em fluxo contínuo (Continuous Flow Analysis - CFA), um sistema baseado na ocorrência da reação química durante o percurso analítico até o detector, onde soluções de amostra e reagentes são bombeados através de uma bobina de reação, para que ocorra a mistura e a reação completa, seguida da detecção colorimétrica. Bolhas de ar foram inseridas para separar as porções de fluido e favorecer a mistura. O desenvolvimento de sistemas CFA permitiu a revolucionária execução de análises de forma rápida e precisa, minimizando a possibilidade de erro humano, favorecendo a mistura e o aumento da frequência de análise (Skeegs, 1957).

Sistemas CFA apresentam grande versatilidade, pois admitem a inclusão de etapas de aquecimento, diálise, filtração e coluna de reação, em configurações abertas e fechadas. Em configurações CFA abertas, a amostra é descartada após passar pela detecção e em configurações CFA fechada a amostra retorna ao sistema monitorado após a passagem através do detector. As principais desvantagens de CFA são o tempo de detecção, a impossibilidade de explorar a cinética química e a cinética de mistura (técnicas de gradiente), além de que a presença de bolhas de ar prejudicam determinados sistemas de detecção (Mckelvie, 2008).

Sistemas de análises em fluxo devem ser caracterizados conforme o tipo de fluxo (segmentado, não-segmentado) e conforme a amostra é introduzida (aspiração, injeção). A Figura 3 detalha essa classificação proposta por Zagatto em 1999.

Figura 3: Classificação dos métodos de análise em fluxo



Fonte: Adaptado de Zagatto, 1999.

A análise por injeção em fluxo (Flow Injection Analysis – FIA) é uma ferramenta analítica desenvolvida por Ruzicka e Hansen em 1975, denominada inicialmente como Análise de Fluxo Contínuo Não-Segmentado (Ruzicka e Hansen, 1975). Foi implantada no Brasil em 1976 por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) (Ruzicka, 1976).

A análise por injeção em fluxo é o processo de automatização de procedimentos analíticos, onde a mistura de amostra e reagentes e o fluido carregador confluem continuamente até a detecção. Durante o percurso analítico, a amostra pode receber reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, concentração, entre outros (Reis, 1989).

Sistema FIA são compostos basicamente por uma bomba peristáltica usada para impulsionar a amostra e reagentes, um conjunto de tubos que conduz os líquidos para o detector e um dispositivo que realize inserção de amostras. O volume de amostra injetado é constante e intercalado com os reagentes necessários, em tempos de reação determinados pelo comprimento dos tubos e pela velocidade de rotação da bomba peristáltica. O fluxo em sistemas FIA é laminar, não turbulento e

não segmentado e equilíbrios físico ou químico não precisam ser alcançado. Além disso, dispensa o uso de bolhas de ar para separar as amostras (Trojanowicz, 2008).

A resposta em sistemas FIA apresentar-se em forma de pico, baseada na dispersão sofrida pela amostra em suas interfaces com a solução carregadora formando gradientes de concentração. O gráfico resultante do registro do sinal analítico em um sistema FIA recebe o nome de fiagrama (Reis, 1989).

Em sistemas FIA as medidas são realizadas em estado não-estacionário, a dispersão é bem controlada e os tempos de reação são pequenos, o que permite alta frequência de amostragem. A quantidade de reagentes deve obedecer à razão estequiométrica da reação para que favoreça a ocorrência da reação, bem como usar a menor quantidade possível visando à economia dos reagentes. O número de ciclos e sinais também contribui para a otimização do consumo de reagentes. O diâmetro requerido do tubo causa influência na frequência analítica e no tempo de residência, assim quanto maior o tempo de permanência desejado, menor o raio do tubo. Estes parâmetros influenciam muito o desenvolvimento do design do sistema, pois através deste controle é possível melhorar a interação da amostra com os reagentes, permitindo obter resultados analíticos precisos (Mckelvie, 2008).

Inicialmente, em sistemas FIA, as soluções de amostras eram injetadas em uma corrente transportadora usando uma seringa com uma agulha hipodérmica. Neste processo ocorria o aumento brusco da pressão hidrodinâmica do sistema e a reprodutibilidade das medidas dependia da precisão da tomada das alíquotas e da constância do tempo de injeção. Outro problema desse tipo de injeção é que a vida útil deste tipo de dispositivo é curta, pois após algumas injeções ocorrem vazamentos no septo de borracha (Ruzicka, 1976).

A superação desses problemas ocorreu quando foi desenvolvido por Bergamin e colaboradores o injetor proporcional, que dispensava o uso da agulha e o septo de borracha, atuava com uma válvula que após a aplicação de uma pressão externa, cedia, liberando o acesso ao percurso analítico (Bergamin, 1978). Este injetor é composto pela alça de amostragem e por duas placas externas fixas e uma barra central móvel, mantidas juntas por parafusos com molas. A comutação da posição de amostragem para a posição de injeção não gera variação de pressão e a reprodutibilidade do dispositivo não depende da habilidade do operador. Na posição de preenchimento, um canal do sistema de propulsão movimenta a amostra por um loop seguindo para o descarte; ao mesmo tempo, o fluido transportador circula em

outro canal para ser conduzido à célula de fluxo do detector e, posteriormente, ao descarte. Na posição da injeção, a alça de inserção da solução de amostra é colocada na posição inserção e a solução de amostra é inserida no sistema sendo transportada para o detector, simultaneamente, o canal presente no bloco móvel é colocado na posição da alça de amostragem de solução de amostra onde transporta a solução para o descarte. O volume injetado é definido pelo comprimento e pelo diâmetro interno da alça de amostragem (Reis, 1989).

Em seguida, houve o desenvolvimento da válvula rotativa, também conhecida como válvula de seis vias ou válvula rotativa hexagonal. Este dispositivo está entre os mais utilizados, em combinação com uma bomba peristáltica, para introduzir soluções em sistemas FIA. Uma válvula de injeção rotativa consiste em seis portas internamente conectadas em pares, três agindo como entradas e três como saídas, as portas são externamente conectadas aos tubos do coletor. O funcionamento da válvula rotativa ocorre em duas posições, numa é feita a amostragem e na outra é feita a inserção da amostra. O volume da alíquota de amostra é definido pelo furo transversal do rotor, de forma que para variar o volume da alíquota, é necessário trocar o rotor do injetor. As válvulas rotativas são estáveis e reprodutíveis na injeção de um volume de solução, porém, a sua configuração fixa, limita sua aplicação (Reis, 1993). Outros tipos de válvula desenvolvidos são as válvulas solenoides de três vias e as válvulas de estrangulamento, que permitem maior flexibilidade aos sistemas FIA, pois podem ser acionadas em tempos diferentes por um computador.

A injeção da amostra pode ser realizada após um processamento prévio, onde a amostra é tratada de alguma forma antes de ser inserida no sistema de fluxo. O desenvolvimento dessa forma de injeção viabilizou a determinação multiparamétrica em sistemas FIA que operam de forma sequencial e que não requerem alteração em ordem para realizar as análises planejadas. Além disso, o pré-tratamento da amostra pode aumentar a seletividade, diluir o analito em amostras concentradas e expandir a análise de campo para amostras de gás (Trojanowicz, 2008).

As vantagens dos sistemas FIA são alta produtividade, devido a frequência analítica alta que reduz significativamente o tempo de análise quando comparada com análises em batelada, uso reduzido de vidrarias, já que análise ocorre dentro do sistema FIA, redução dos custos da análise, já que não exige o uso de equipamentos de alto custo e sua estrutura modular que lhe garante versatilidade.

Além disso, sistemas FIA tem baixo consumo de reagentes e a boa precisão e envolvem baixa participação dos analistas, o que diminui a ocorrência de erros (Mckelvie, 2008).

A multicomutação em sistemas FIA consiste no gerenciamento independente das soluções de amostra e de reagentes e está associada à amostragem binária que consiste na introdução de soluções de amostra e de reagentes de forma alternada, empregando válvulas solenoide controladas por computador (Reis, 1994). Estes processos viabilizam a otimização da mistura reacional devido a maior interpenetração das interfaces amostra/reagente e como a reação se inicia durante a formação da zona de amostragem, conseqüentemente gera mais rapidamente o produto a ser detectado, ocorre à diminuição no tempo de reação e o aumento da frequência analítica. A multicomutação e amostragem binária permitem a manipulação de volumes na ordem de μL com boa precisão, além disso, empregam apenas um canal para a propulsão para a inserção das soluções no percurso analítico, já os sistemas FIA convencionais necessitam de mais de um canal para o gerenciamento de cada solução (Reis, 1994; Kronka, 1996).

2.5. Análise em fluxo- batelada

A Análise em fluxo- batelada (Flow-batch Analysis - FBA) foi proposta por Honorato e colaboradores em 1999, como uma alternativa para realizar titulações em sistemas de fluxo. A concepção de sistemas FBA ocorreu para melhorar o processo de mistura entre as soluções de amostra e reagentes e evitar a formação de zonas de dispersão peculiar aos sistemas FIA. Além disso, sistemas FBA permitem o controle completo do processo, desde direcionamento dos fluxos e amostragem até etapas de mistura, detecção e limpeza da câmara reacional. Por combinar a comutação programável e a reação da amostra e reagentes na câmara reacional, seguida da detecção, os sistemas FBA possuem grande vantagem operacional (Honorato, 1999; Diniz, 2012).

Portanto, analisadores FBA são sistemas híbridos de análise que combinam as vantagens inerentes a sistemas de fluxo, como alta taxa de amostragem, baixo consumo de amostra e reagente, baixo custo e facilidade de automação com a vasta gama de aplicações sistemas em batelada e a robustez própria aos sistemas em batelada (Lima, 2004).

Em sistemas FBA, as soluções de reagentes e de amostra são bombeadas para uma câmara reacional onde a reação se desenvolve em condições semelhantes às encontradas em sistemas em batelada. A solução presente na câmara reacional só é bombeada em direção ao detector após uma completa adição das soluções de reagentes e de amostra e a completa homogeneização. Este arranjo que funciona apenas sob um rigoroso controle via computadores, permite mistura, reação, preparação de soluções de calibração, adições de padrão, geração de gradientes de concentração e muito mais. Também por ser controlado por computadores viabiliza a implementação de diferentes processos analíticos sem alterar as configurações físicas do sistema, mudando-se apenas o software de controle (Oliveira, 2005).

As principais vantagens de sistemas FBA são robustez, simplicidade, baixo custo de análise e manutenção, baixo consumo, manipulação das soluções de amostras e de reagentes, baixa geração de resíduos para o meio ambiente e baixa contaminação. Além de que as medidas podem ser realizadas com sensibilidade máxima, pois o equilíbrio físico e químico do processo analítico pode ser alcançado e a dispersão da zona de amostragem não ocorre (Visani, 2009).

O processamento da amostra é feito de maneira discreta, o que permite explorar gradiente linear de concentração das amostras e/ou dos reagentes e como as amostras podem residir no analisador por longo tempo, estes sistemas podem ser adequados para metodologias analíticas que envolvem reações de cinética lenta. O sistema FBA é universal, o que significa que uma única montagem atende a qualquer determinação analítica, ao contrário dos sistemas FIA (Oliveira, 2005).

Os principais componentes dos sistemas FBA são sistema de propulsão, sistema de transporte, sistema de multicomutação, câmara reacional e sistema de detecção, conforme apresentado mais detalhadamente na Figura 4. A bomba peristáltica é tipicamente usada nos sistemas de propulsão para impulsionar os fluidos no sistema, porém podem ser usados outros tipos de propulsores. O sistema de transporte bombeia ou conduz os fluidos no sistema, geralmente são usados tubos de polietileno de diâmetro variando entre 0,2 e 2,0 mm. O sistema de multicomutação é composto por válvulas, normalmente válvulas solenoide de três vias que direcionam os fluidos para a câmara de mistura ou para outro destino, como o descarte. A câmara de mistura é o principal componente dos sistemas FBA, nela as soluções podem ser adicionadas ou removidas com controle completo. Um sistema de loop permite que amostras e reagentes sempre retornem aos seus recipientes, permitindo a amostragem intermitente e menor geração de efluentes. O sistema de detecção é responsável por monitorar uma propriedade específica da amostra, produto ou matriz analítica. Após a detecção, o conteúdo da cubeta é descartado (Barreto, 2012; Diniz, 2012).

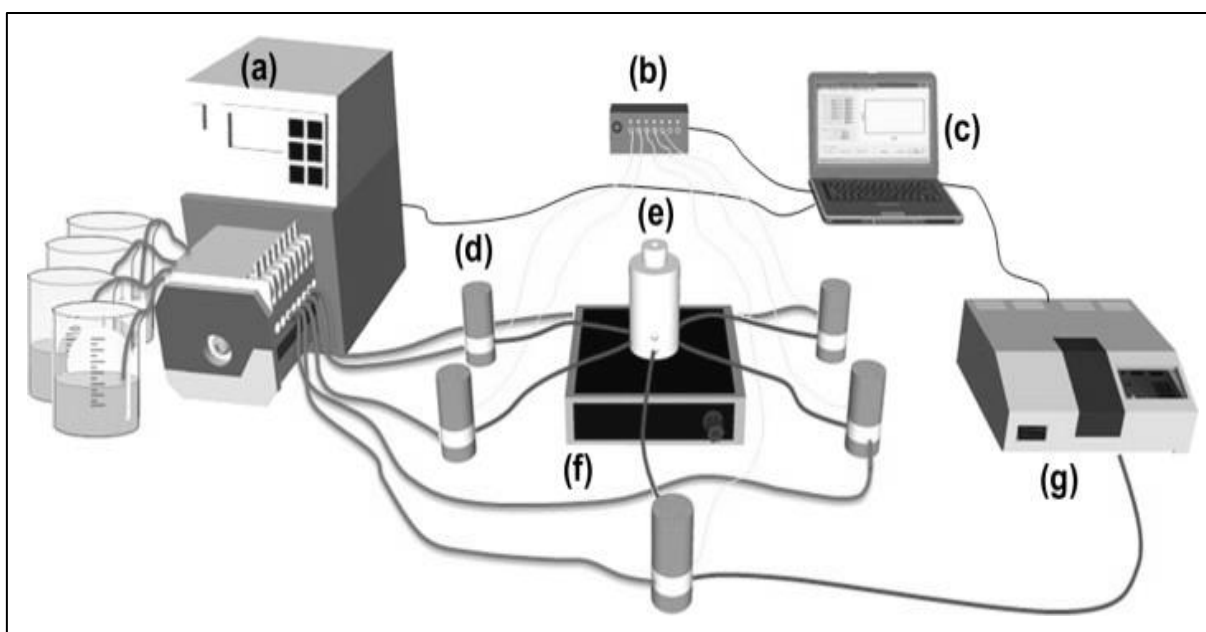
Geralmente, as soluções ou as misturas preparadas na câmara reacional são movidas até o detector, mas há vários trabalhos desenvolvidos são baseados em sistemas de detecção como parte da câmara de mistura (Zagatto, 2009; Carneiro, 2002; Honorato, 2001; Carneiro, 2000).

A versatilidade apresentada pelos sistemas FBA permitiu o desenvolvimento de vários procedimentos analíticos e métodos diferentes que viabilizaram uma ampla gama de aplicações. Os analisadores FBA já foram empregados para estudar titulações (Oliveira, 2006; Medeiros, 2004; Honorato, 2000; Honorato, 1999), pré-tratamento de amostras (Lima, 2012; Silva, 2008; Carneiro, 2002; Honorato, 2001; Carneiro, 2000), adição de padrão (Nascimento, 2010; Silva, 2006; Almeida, 2003a; Almeida, 2003b), análise screening (Nascimento, 2011; Nascimento, 2010; Lima, 2004), análise simultânea de componentes múltiplos (Visani, 2009; Grunhut, 2008),

gradientes de concentração (Souza, 2010; Medeiros, 2004), quimioluminescência (Grunhut, 2011) e fluorescência (Lima, 2012).

Outra aplicação dos sistemas FBA foi descrita no trabalho desenvolvido por Brasil e Reis em 2016, onde foi proposto um dispositivo fluxo-batelada que possui um sistema de aquecimento acoplado à câmara reacional para permitir aquecimento direto da amostra, sem usar um banho termostatizado. O dispositivo proposto foi confeccionado em uma peça cilíndrica de aço inoxidável que apresenta alta resistência à corrosão, liberação de metal insignificante a alta temperatura, alta condutividade térmica e baixa reatividade química (Brasil e Reis, 2016). Este mesmo dispositivo fluxo-batelada foi empregado para a determinação fotométrica de açúcares redutores em vinhos, baseada na reação de açúcares redutores com hexacianoferrato de potássio (III) em meio alcalino. Um fotodiodo foi acoplado ao dispositivo fluxo-batelada e permitiu a realização da detecção sem uma etapa de resfriamento da solução (Brasil e Reis, 2017).

Figura 4: Principais componentes de um sistema de análise de fluxo-batelada (FBA). (a) bomba peristáltica; (b) acionador das válvulas; (c) computador; (d) válvula solenoide de três vias; (e) câmara de mistura; (f) agitador magnético; (g) detector.



Fonte: Adaptado de Diniz, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver um método analítico baseado em um sistema em fluxo-batelada com detecção espectrofotométrica para determinação de ácido siálico em amostras de leite.

3.2. Específicos

- Montar sistema de análise em fluxo-batelada com aquecimento e detecção acoplados na cela de reação;
- Desenvolver o programa para controle do módulo de análise e aquisição de dados;
- Otimizar parâmetros químicos e físicos do sistema em fluxo-batelada proposto;
- Realizar análise de interferentes;
- Realizar teste de adição e recuperação;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Soluções

Na preparação de todas as soluções usou-se água deionizada obtida através do sistema Milli-Q (Millipore[®]), reagentes de alto grau analítico e vidrarias calibradas.

4.1.1. Solução estoque

A solução estoque de ácido siálico foi preparada a partir do padrão (Sigma Aldrich[®]) com pureza 95%. Foram pesados 0,0294 g do padrão e dissolveu-se em 100 mL de água deionizada, obtendo a concentração final de 294 mg L⁻¹. A solução estoque foi mantida sob refrigeração.

4.1.2. Soluções de trabalho

As soluções de trabalho de ácido siálico foram preparadas a partir de diluições da solução estoque. Inicialmente foi preparada uma solução de trabalho de concentração final de 100 mg L⁻¹ e partir desta foram preparadas soluções com as concentrações de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg L⁻¹.

As soluções de ninidrina ácida foram preparadas nas concentrações de 0,100, 0,120, 0,140, 0,160 e 0,180 mol L⁻¹ dissolvendo-se 0,714, 0,857, 1,000, 1,142 e 1,285 g de ninidrina p.a. (Sigma Aldrich[®]), respectivamente, em 16 mL de ácido clorídrico p.a. (Sinth[®]) e 24 mL de ácido acético glacial p.a. Estas soluções foram preparadas de acordo com a necessidade diária e apresentaram uma estabilidade de até 30 dias (Gaitonde, 1967).

As soluções de ácido clorídrico 0,025, 0,050, 0,1, 0,125 e 0,150 mol L⁻¹, assim como as soluções de ácido nítrico (Dinâmica[®]) 0,1 mol L⁻¹ e ácido sulfúrico (Dinâmica[®]) 0,1 mol L⁻¹ foram preparadas a partir da diluição dos respectivos ácidos concentrados.

A solução de ácido tricloroacético foi preparada a partir da dissolução de 24 g de ácido tricloroacético p.a. (Sigma Aldrich[®]) em 100 mL de água deionizada, resultando numa solução de concentração 24% (m/v).

A solução de ácido fosfotungstico 20% (m/v) foi preparada a partir da dissolução de 20 g de ácido fosfotungstico p.a. (Sigma Aldrich[®]) em 100 mL de água deionizada.

A solução de etanol 95% (v/v) foi preparada a partir da adição de 5 mL de água deionizada em 95 mL de etanol p.a (Emsure[®]).

As soluções de ácido siálico, ácido tricloroacético e ácido fosfotungstíco foram mantidas em frascos âmbar e sob refrigeração.

4.1.3. Amostras

As amostras de leite UHT, leite em pó e composto lácteo foram obtidas em mercados locais da região metropolitana do Recife. As amostras de leite UHT foram estocadas sob refrigeração e analisadas após a abertura de suas respectivas embalagens. As amostras de leite em pó e composto lácteo foram preparadas dissolvendo-se 11 g de pó em 100 mL de água deionizada (Wolfschoon-Pombo, 1984).

O preparo das amostras para análise foi realizado a partir da adição de 10,0 mL de ácido tricloroacético 24% (m/v) a 10,0 mL de leite, que permaneceu em repouso por 30 minutos, com objetivo de precipitar as proteínas do leite. Em seguida a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo de porosidade 125 mm (Unifil[®]) e a 10,0 mL do filtrado foi adicionado 1,0 mL de ácido fosfotúngstico 20% (m/v), a mistura resultante foi homogeneizada e, posteriormente, centrifugada a 3.500 rpm/10 min, para a precipitação do ácido siálico. Em seguida, desprezou-se, cuidadosamente, o sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 4,0 mL de etanol 95% (v/v), homogeneizou-se e procedeu-se a uma nova centrifugação por 3.500 rpm/10 min, para remover possíveis resíduos das etapas anteriores. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi solubilizado em 10,0 mL de água deionizada e levado ao banho ultrassônico por 60 minutos. Posteriormente, a amostra de leite foi levada para a análise.

4.2. Descrição geral do sistema de análise em fluxo-batelada

O sistema de análise em fluxo-batelada proposto é constituído por uma bomba peristáltica (Ismatec[®]) com vazão constante de 2,0 mL min⁻¹, três válvulas solenoide de três vias (Nresearch[®]), três válvulas solenoide de estrangulamento (Nresearch[®]), uma cela de reação/detecção (cela em fluxo-batelada) (Brasil e Reis, 2016) e um espectrofotômetro multicanal (UV/VIS) tipo CCD modelo USB 4000 (Ocean Optics[®]). Também foram utilizados tubos de bombeamento (Tygon[®]), tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno e confluências de PTFE que compunham as linhas de fluxo. A necessidade de empregar dois tipos diferentes de válvulas solenoide é justificada pela acidez das soluções bombeadas pela V₂, V₃, V₅ (ácido clorídrico, ninidrina ácida e mistura reacional) que causa o desgaste da válvula, diminuindo seu tempo de vida útil.

No sistema de análise em fluxo-batelada proposto todas as soluções reagentes, amostra e água são bombeadas continuamente pela bomba peristáltica e o uso de válvulas solenoide de três vias e de válvulas de estrangulamento com dois caminhos (sempre aberto ou sempre fechado) permitiu a reciclagem dos fluidos quando estes não são direcionados a câmara reacional ou ao descarte.

O uso de dois tipos de válvulas é justificado pela acidez das soluções de ácido clorídrico, ninidrina ácida e da mistura reacional, que causa desgaste das válvulas e diminui seu tempo de vida útil, deste modo, para bombeamento dessas soluções foram empregadas válvulas de estrangulamento, onde as soluções não entram em contato com as partes internas da válvula (partes metálicas e principalmente o diafragma). As válvulas solenoides de três vias foram utilizadas apenas para o controle da inserção da amostra e da água que tem a função de transporte da zona de amostragem até a cela reacional e a limpeza do sistema.

4.2.1. Sistema de controle

O controle do sistema proposto foi realizado por um microcomputador notebook (Acer[®]) através de um programa desenvolvido no software Lab View 8.5 (National Instruments[®]). O programa desenvolvido permite o controle das variáveis do sistema, viabilizando os estudos de otimização do método proposto, as etapas de lavagem do sistema e a aquisição de dados.

A interface eletrônica foi desenvolvida em laboratório usando o circuito integrado ULN2803A conectado a uma interface USB6009 (National Instruments®) alimentado por uma fonte externa de corrente contínua de 12 V/1 A.

A sequência de acionamento das válvulas é descrita detalhadamente na Tabela 4. O acionamento de uma válvula é representado pelo código 1 e o código 0 significa que a válvula permaneceu desligada na etapa descrita.

Tabela 4: Acionamento das válvulas do sistema de análise em fluxo-batelada proposto.

	V₁	V₂	V₃	V₄	V₅	V₆	Tempo (s)	Ciclos
Enchimento do	1	0	0	0	0	0	15	1
percurso analítico	0	1	0	0	0	0	15	1
	0	0	1	0	0	0	15	1
	0	0	0	1	0	0	15	1
Amostragem	1	0	0	0	1	0	6	1
	0	1	0	0	1	0	6	1
	0	0	1	0	1	0	7	1
	0	0	0	1	1	0	6	1
Deteção	0	0	0	0	0	0	300	1
Limpeza	0	0	0	0	0	1	30	3
	0	0	0	1	0	0	30	
	0	0	0	0	0	1	30	
Troca de amostra	1	0	0	0	0	0	15	3
	0	0	0	1	0	0	15	

A análise é iniciada com a etapa de enchimento do percurso analítico, o acionamento ocorre na ordem V₁, V₂, V₃ e V₄, que corresponde ao bombeamento das soluções de amostra, ácido acético, ninidrina ácida e água, respectivamente, durante 15 segundos, nesta etapa os fluidos são direcionados ao primeiro lixo. Em seguida, com a mesma ordem de acionamento de válvulas e tempos pré-determinados, foi realizada a etapa de amostragem, onde o fluxo é direcionado para a cela em fluxo-batelada, onde permanece até a deteção do sinal analítico. Na etapa de limpeza ocorrem o esvaziamento e a lavagem com água da câmara

reacional, os resíduos gerados nesta etapa são direcionados para o segundo lixo.

Após a limpeza ocorre a etapa de troca de amostra, onde são acionadas V_1 e V_4 para preencher o percurso analítico com a nova amostra a ser estudada. O tempo total de uma análise é de 8 minutos e 30 segundos.

4.2.2. Cella em fluxo-batelada

O sistema proposto combina aquecimento, reação e detecção em um mesmo componente. A cela em fluxo-batelada empregada é uma peça cilíndrica de aço inoxidável, que possui alta resistência à corrosão, insignificante liberação de metal a alta temperatura, alta condutividade térmica e baixa reatividade química, conforme apresentado na Figura 5 (Brasil e Reis, 2016).

Figura 5: Cella em fluxo-batelada desenvolvida por Brasil e Reis (2016) e empregada no sistema proposto.



A massa da cela em fluxo-batelada é de 944 g e o calor específico de $0,117 \text{ calorias } ^\circ\text{C}^{-1}$, produzindo uma capacidade térmica de $113 \text{ calorias } ^\circ\text{C}^{-1}$, o que permite um rápido aquecimento das soluções inseridas (Brasil e Reis, 2016).

A detecção ocorre dentro da cela fluxo-batelada, usando um espectrofotômetro multicanal (UV/VIS) modelo USB4000 (Ocean Optics®) que controlado através de uma conexão com um microcomputador. A fonte de radiação usada modelo LS-1 (Ocean Optics®) possui uma lâmpada de tungstênio-halogênio e alimentação por uma fonte de 12 V. A condução da radiação emitida pela fonte até o detector, passando pela cela fluxo-batelada foi realizada por cabos de fibra óptica 0,6 mm d.i. (Ocean Optics®).

4.3. Método espectrofotométrico oficial para determinação de ácido siálico em leite

Foi preparada uma solução estoque de ácido siálico contendo 294 mg L^{-1} , que por diluição, obteve-se uma solução de 98 mg L^{-1} . A partir dessa solução foram tomadas 10 alíquotas, sendo inicial de $0,001 \text{ mL}$ e a final de 1 mL , resultando concentrações que variaram de $9,8$ a 98 mg L^{-1} completando-se os volumes das alíquotas para $1,0 \text{ mL}$ com água destilada.

Adicionou-se em cada tubo $2,0 \text{ mL}$ de ácido acético glacial e $2,0 \text{ mL}$ de solução de ninidrina ácida $0,140 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, os tubos foram aquecidos a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria por 10 min , em seguida foram esfriados em banho de gelo e realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 470 nm , obtendo-se assim a curva analítica (Brasil, 2003). Para as amostras de leite foi realizado o mesmo procedimento, substituindo a solução de referência de ácido siálico pela amostra preparada.

4.4. Método em fluxo-batelada proposto para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite

Foi preparada uma solução estoque contendo 294 mg L^{-1} , que por diluição, obteve-se uma solução de trabalho com concentração de 98 mg L^{-1} , dessa solução foram preparadas soluções de referência nas concentrações entre $1,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$.

No sistema em fluxo-batelada, foram bombeadas com auxílio de uma bomba peristáltica, as soluções referência de ácido siálico/amostra, ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ninidrina ácida $0,160 \text{ mol L}^{-1}$ e água, respectivamente, para a cela em fluxo-batelada, onde a mistura permaneceu durante 5 minutos (300 segundos), sob aquecimento, a $75 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, realizou-se a leitura no espectrofotômetro monitorada em 470 nm .

Para o cálculo das concentrações de ácido siálico nas amostras reais, os resultados de absorvâncias foram aplicados na curva analítica obtida pelas soluções de referência (absorvância vs concentração de ácido siálico) gerando resultados de concentração de ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico expressos em mg L^{-1} .

4.5. Avaliação do sistema em fluxo-batelada proposto

4.5.1. Influência das variáveis químicas

As condições iniciais do sistema foram estabelecidas após ensaios preliminares em batelada. A temperatura inicial foi de 75 °C, o tempo de reação de 5 minutos e a razão volumétrica foi de 1:1:1, empregando ácido siálico 5,0 mg L⁻¹, ácido acético p.a. e ninidrina ácida 0,140 mg L⁻¹.

4.5.1.1. Estudo de natureza do ácido

O estudo da natureza do ácido foi realizado devido à rápida deterioração dos tubos de bombeamento causado pelo uso ácido acético glacial, tornando-se inviável o emprego do ácido acético glacial neste tipo de sistema de análise em fluxo. Assim sendo, foram estudados os ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico na concentração molar de 0,1 mol L⁻¹. Para cada ácido estudado foi obtida uma curva analítica entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ de ácido siálico, empregando ninidrina ácida 0,140 mol L⁻¹ e 5 minutos de reação a 75 °C.

4.5.1.2. Estudo de concentração do ácido

Após a definição do ácido, avaliou-se a concentração do ácido clorídrico variando-se entre 0,025 e 0,150 mol L⁻¹. Para cada concentração do ácido estudado foi construída uma curva analítica de 1,0 a 10,0 mg L⁻¹ de ácido siálico, usando ninidrina ácida 0,140 mol L⁻¹, 5 minutos de reação a 75 °C.

4.5.1.3. Estudo de concentração da ninidrina ácida

Após a escolha do ácido e de sua concentração, a influência da concentração da ninidrina ácida foi estudada. Além da concentração de 0,140 mol L⁻¹ empregada na metodologia oficial e nos testes anteriores, foram estudadas as concentrações de 0,100 mol L⁻¹, 0,120 mol L⁻¹, 0,160 mol L⁻¹ e 0,180 mol L⁻¹.

Para cada concentração de ninidrina ácida estudada foi obtida uma curva analítica entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ de ácido siálico, empregando ácido clorídrico 0,100 mol L⁻¹, 5 minutos de reação a 75 °C.

4.5.2. Influência das variáveis físicas

4.5.2.1. Estudo de razão volumétrica

O estudo da razão volumétrica deve ser realizado para avaliar a influência da quantidade de amostra em relação à magnitude do sinal analítico. Para o estudo de razão volumétrica empregou-se o método univariado. O volume de água foi fixado em 200 μL para todos os experimentos, pois a água tem a função de conduzir a mistura reacional até a cela em fluxo-batelada. A variação dos volumes foi controlada pelo programa desenvolvido através da variação dos tempos de acionamento das válvulas estudadas.

Primeiramente, variou-se o volume da ninidrina ácida enquanto os volumes de ácido clorídrico e de amostra foram mantidos constantes. Em seguida, fixou-se o volume da ninidrina ácida e da amostra e variou-se o volume do ácido clorídrico. Por fim o volume da amostra foi variado, e o volume da ninidrina ácida e do ácido clorídrico foram fixados.

Para as soluções de reagentes e de amostra foram estudados os volumes entre 66 μL e 300 μL . As leituras de absorbância a 470 nm foram realizadas em triplicata, usando as condições otimizadas nos estudos anteriores, 5 minutos de reação a 75 °C. A escolha dos volumes otimizados foi baseada na intensidade do sinal analítico, sendo escolhido o que obteve maior intensidade.

4.5.2.2. Estudo de temperatura

Como o rendimento da reação estudada possui relação direta com a temperatura realizou-se o estudo da temperatura para a obtenção de uma resposta analítica mais significativa. Estudos preliminares mostraram a impossibilidade de trabalhar com a temperatura sugerida no método oficial (100 °C) devido à intensa formação de bolhas que atrapalha drasticamente a detecção da reação. Neste sentido, foram estudadas as temperaturas de 60 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C e 90 °C.

4.5.2.3. Estudo de tempo de reação

O tempo de reação é outra variável que está relacionada ao rendimento reacional. Neste estudo foram avaliados os tempos de reação de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 minutos, mantendo fixas as condições estabelecidas na otimização do sistema proposto.

4.5.3. Figuras de mérito

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir das equações Eq.(1) e Eq.(2), respectivamente. Onde sA = desvio padrão do coeficiente linear e B = coeficiente angular (Ribani, 2004; Gonzalez, 2007).

$$LD = \frac{3,3 \times sA}{B} \quad \text{Eq.(1)} \quad LQ = \frac{10 \times sA}{B} \quad \text{Eq.(2)}$$

A precisão do método foi calculada a partir do desvio padrão relativo (DPR), obtido a partir de 10 determinações consecutivas da solução de referência de 4 mg L⁻¹, calculado a partir da Eq. (3). Onde s = desvio padrão e X = valor médio de absorvância.

$$DPR = \frac{s \times 100}{X_{\text{média}}} \quad \text{Eq.(3)}$$

4.5.4. Teste de interferentes

O estudo de possíveis interferentes foi realizado empregando solução de referência de ácido siálico 5,0 mg L⁻¹ contendo cistina, cisteína, triptofano e amônia, separadamente, em diferentes concentrações. Os compostos estudados são aminoácidos que compõem as proteínas do leite, exceto a amônia que é parte do nitrogênio não proteico do leite (Viapiana, 2017). Estas espécies podem reagir com a ninidrina ácida nas condições estudadas, porém as absorções máximas da cisteína (560 nm), cistina (489 nm) e triptofano (385 nm) são diferentes da absorção máxima do ácido siálico (470 nm) (Yao e Ubuka, 1987; Fukuda, 1994).

Foram preparadas soluções com concentrações iguais de ácido siálico e do possível interferente e foi estudado o efeito da concentração do interferente, à medida que não foi observada alteração no sinal analítico. A concentração do interferente foi duplicada até o ponto de causar efeito na intensidade da absorvância de $\pm 5\%$ (Amatatongchai, 2015).

4.5.5. Teste de adição e recuperação e análise de amostras

O teste de adição e recuperação foi realizado com 5 amostras diferentes, sendo uma amostra de leite UHT tipo integral, uma amostra de leite UHT tipo semidesnatado, uma amostra de leite UHT tipo desnatado, uma amostra de leite em pó integral e outra de composto lácteo.

As concentrações de 2 e 5 mg L⁻¹ de ácido siálico foram adicionadas as amostras de leite e, posteriormente, realizou-se o método de preparo das amostras (extração do GMP) conforme descrito no item 4.1.3.

Em seguida, as amostras foram analisadas no sistema proposto empregando as variáveis otimizadas e os resultados obtidos foram processados aplicando-se a expressão matemática descrita na Eq.(4).

$$R\% = \left(\frac{C_{amas} - C_{am}}{C_{as}} \right) * 100 \quad \text{Eq.(4)}$$

Onde R% = porcentagem de recuperação; C_{amas} = Concentração da amostra tratada com adição de ácido siálico; C_{am} = Concentração da amostra tratada; C_{as} = Concentração do ácido siálico adicionado.

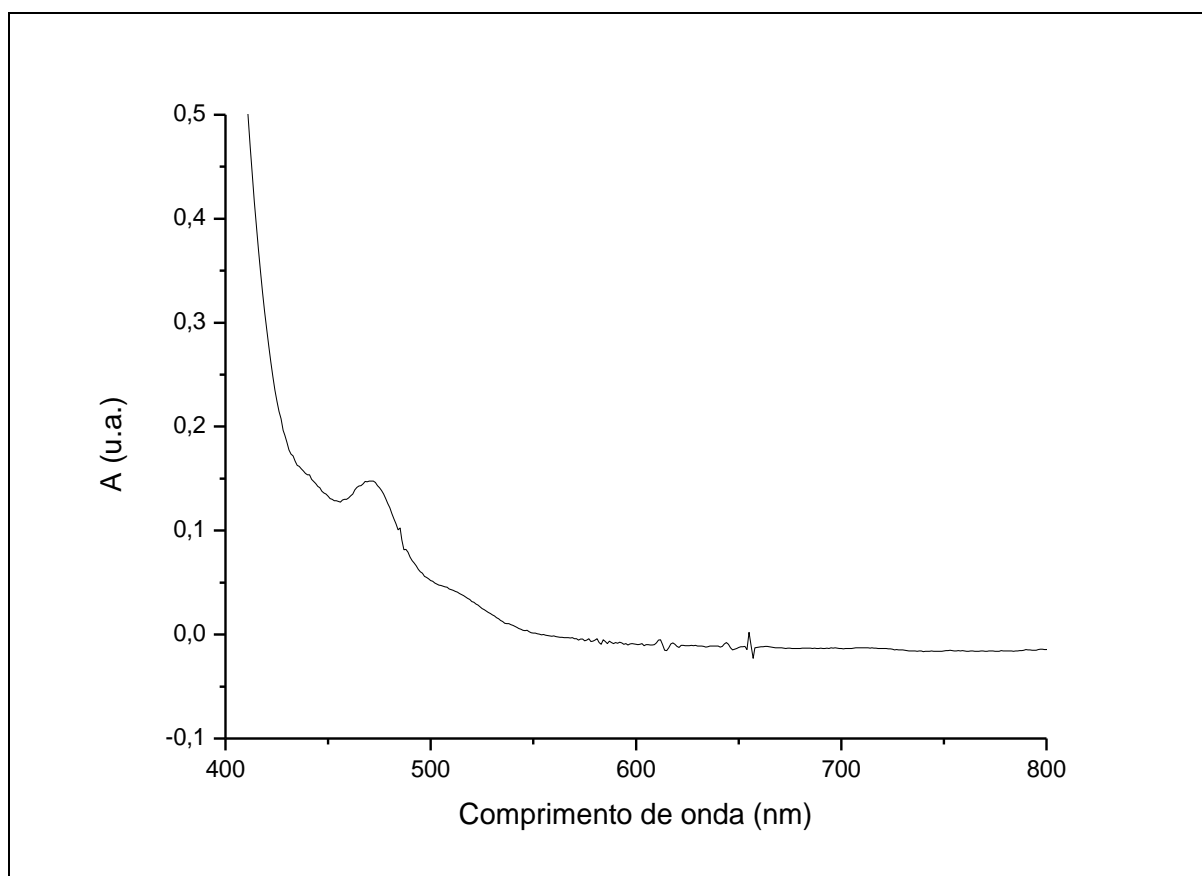
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico em meio a ácido acético glacial concentrado proposta pela metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003) foi reproduzida e o espectro obtido é apresentado na Figura 6.

Em um balão volumétrico foram colocados 2 mL de ácido siálico $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, 2 mL de ácido acético p.a. e 2 mL ninidrina ácida $0,14 \text{ mol mL}^{-1}$ (1: 1: 1), sob aquecimento constante a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Em seguida, uma alíquota de 2 mL foi resfriada até temperatura ambiente e analisada na faixa de 400 – 800 nm.

Na Figura 6 é observada a presença de um pico de absorbância máxima em 470 nm, que corresponde à região do visível de cor azul, que é complementar a de cor amarela, justificando a formação do produto colorido amarelo.

Figura 6: Espectro do produto da reação entre ninidrina ácida e ácido siálico seguindo metodologia oficial.



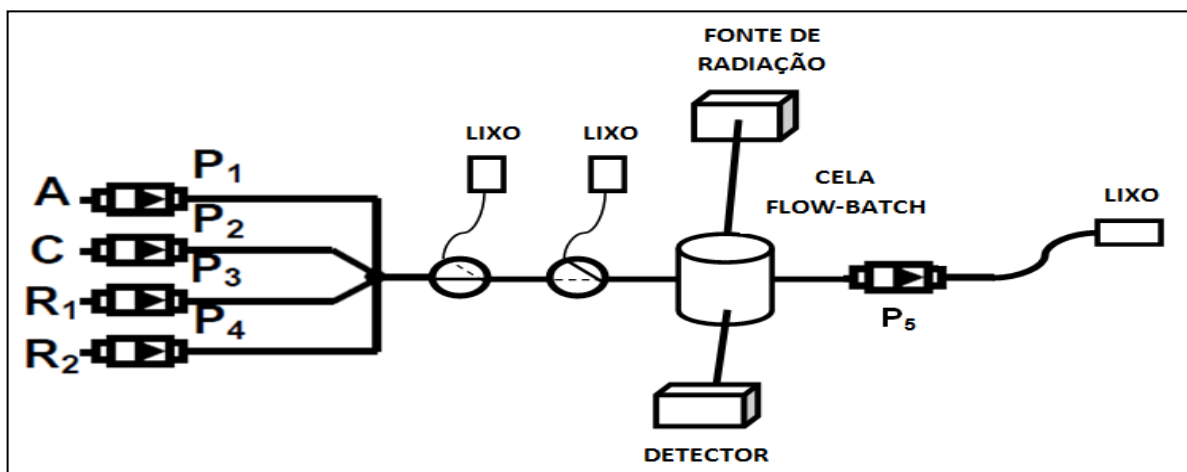
5.1. Testes preliminares

Estudo de razão volumétrica em batelada indicou melhores resultados quando empregada à relação volumétrica (1: 1: 2) de ácido siálico 100 mg L⁻¹: ácido acético concentrado : ninidrina ácida 0,14 mol L⁻¹, avaliou-se o desenvolvimento da reação monitorando em 470 nm durante 60 minutos e a reação apresentou formação estável do produto a partir dos primeiros minutos e por isso optou-se por fixar o tempo de reação em 5 minutos.

A composição do sistema de análise em fluxo-batelada proposto empregando minibombas solenoide para a inserção das soluções é apresentada na Figura 7, foram utilizados cinco minibombas solenoide, duas válvulas solenoide de três vias, uma cela reacional e um sistema de detecção.

Figura 7: Diagrama de fluxo do sistema de análise em fluxo-batelada proposto empregando minibombas solenoide.

A = amostra, C = Fluido Carregador (água), R1 = ácido acético, R2 = ninidrina ácida; P1, P2, P3, P4, P5 = minibombas solenoide.

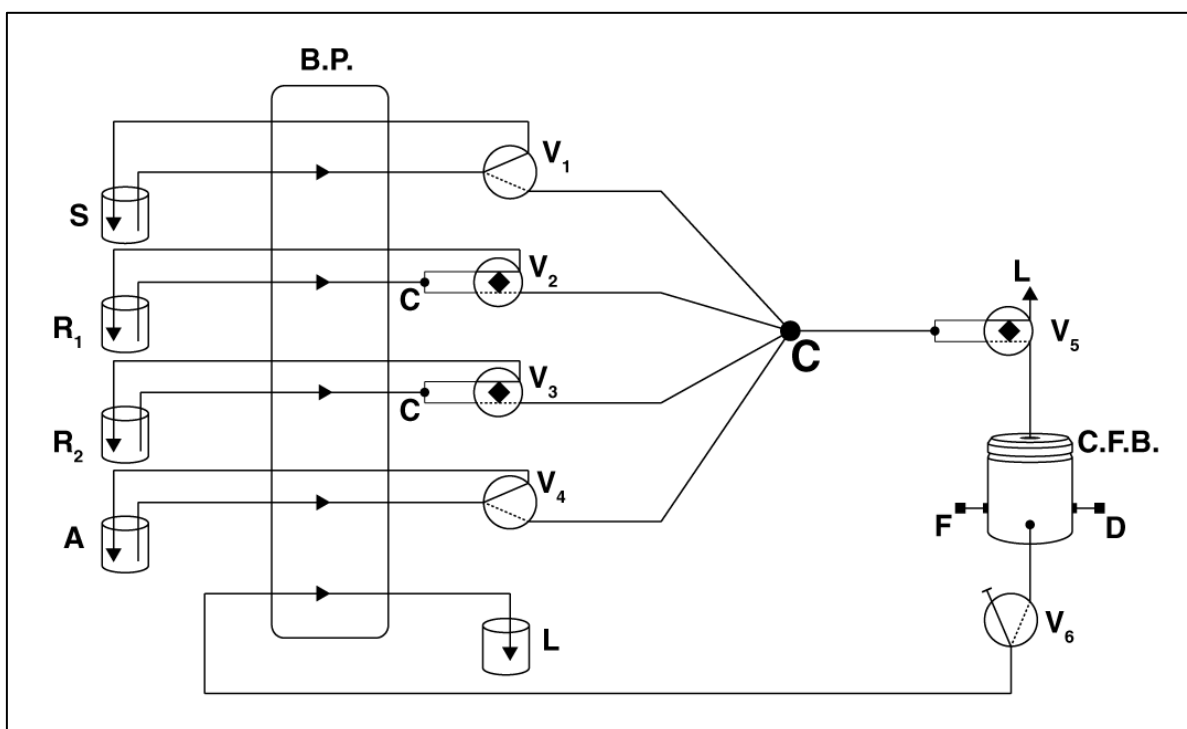


Devido às condições muito drásticas de reação (ácido acético p.a. e ácido clorídrico p.a.) houve o rápido desgaste das minibombas e válvulas solenoide. Assim, não foi possível dar continuidade ao desenvolvimento do sistema empregando este tipo de propulsão de fluidos.

Então foi proposto novo arranjo de sistema em fluxo-batelada empregando uma bomba peristáltica, três válvulas solenoide de três vias, três válvulas de estrangulamento, que não mantêm contato entre as soluções reagentes, uma cela reacional e um sistema de detecção, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8: Diagrama de fluxo do sistema em fluxo-batelada proposto empregando bomba peristáltica.

V_1, V_4, V_6 = Válvulas solenoide de três vias; V_2, V_3, V_5 = Válvulas solenoide de estrangulamento; S = Amostra; R_1 = ácido clorídrico; R_2 = Ninidrina ácida; A = água deionizada; L = Lixo; D = Detector; F = Fonte de radiação UV; BP = Bomba peristáltica; C = Confluência; C.F.B. = Cella em Fluxo-Batelada.



A realização da reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico no sistema de análise em fluxo aplicando as condições reacionais empregadas na metodologia oficial apresentou problemas operacionais. A utilização da temperatura 100 °C gerou intensa formação de bolhas, o que prejudicou a detecção. Neste sentido, a temperatura foi reduzida para 75°C e foi observada menor formação de bolhas e o sinal analítico obtido apresentou maior estabilidade.

O uso de ácido acético concentrado no sistema de análise em fluxo-batelada foi inviável, pois causou o desgaste rápido dos tubos de bombeamento utilizados para conduzir o ácido acético até a câmara de reação. Alternativamente, foram empregados tubos de bombeamento do tipo AcidFlex[®], indicados especificamente para trabalhos com ácidos, porém estes também apresentaram deterioração. Então foi realizado um estudo da influência da natureza do ácido para substituir o ácido acético concentrado, descrito no item 5.2.

5.2. Avaliação do sistema em fluxo-batelada proposto

A influência das variáveis químicas no sistema foi avaliada através do estudo da influência da natureza de ácido, do estudo de concentração da solução do ácido e concentração da solução de ninidrina.

Através dos estudos de razão volumétrica, de temperatura e de tempo de reação foi avaliada a influência das variáveis físicas no sistema.

5.2.1. Estudo de natureza do ácido

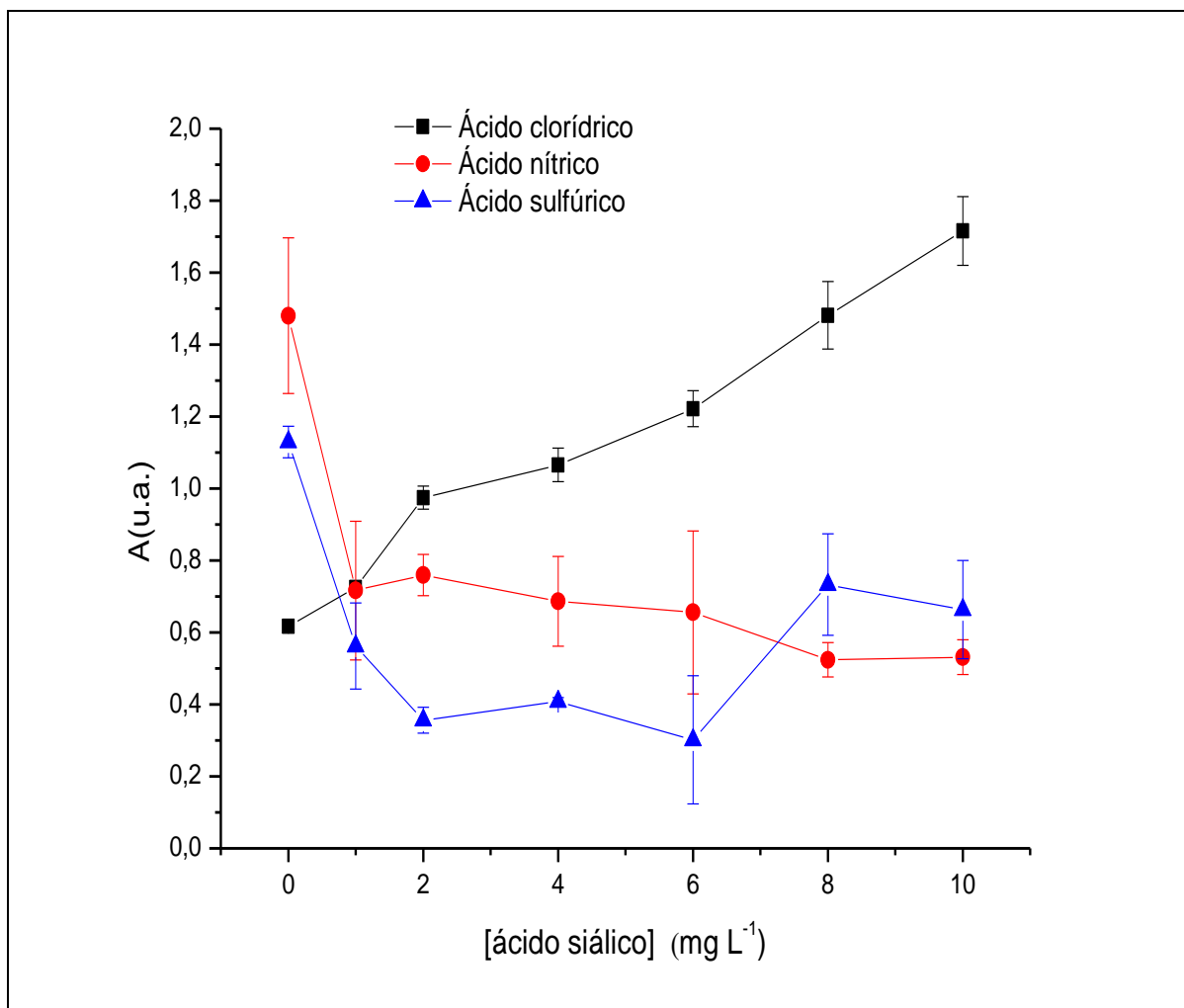
O estudo a natureza do ácido utilizado na reação para a determinação do ácido siálico foi crucial para o desenvolvimento do sistema proposto, pois a substituição do ácido acético p.a. era necessária para a continuidade do trabalho.

Assim sendo, foi avaliada a influência do ácido clorídrico, nítrico e sulfúrico na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ mantendo-se as condições pré-estabelecidas do sistema proposto (ninidrina ácida $0,140 \text{ mol L}^{-1}$ e razão volumétrica 1:1:2) e variando-se a concentração do ácido siálico entre $1,0$ a 10 mg L^{-1} para a obtenção da curvas analíticas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 9.

Observou-se que as respostas analíticas empregando o ácido nítrico e o ácido sulfúrico não apresentaram respostas expressivas, provavelmente devido à natureza altamente oxidante destes ácidos, que não contribuem para as condições necessárias para o desenvolvimento da reação.

Contudo, a resposta apresentada pelo ácido clorídrico foi expressiva, obtendo-se uma equação $Y = (0,110 \pm 0,007) * X + (0,62 \pm 0,02)$, $R = 0,99105$. O ácido clorídrico faz parte da mistura ácida que é empregada no preparo da ninidrina ácida. Desse modo, além de garantir o pH ácido da reação, não possui nenhum íon que possa interferir no desenvolvimento da reação. Assim sendo, conforme os resultados obtidos, o ácido clódrodrico foi selecionado para a continuidade da otimização no sistema proposto em substituição do ácido acético p.a.

Figura 9: Curvas analíticas em função da natureza do ácido utilizado na reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico para soluções de referência de 0 a 10 mg L⁻¹ de ácido siálico.



5.2.2. Influência de concentração do ácido

Após a seleção do ácido clorídrico, determinada no estudo anterior, realizou-se o estudo da concentração do ácido clorídrico. Para tanto, avaliaram-se as concentrações do ácido clorídrico em 0,025 mol L⁻¹, 0,050 mol L⁻¹, 0,1 mol L⁻¹, 0,125 mol L⁻¹ e 0,150 mol L⁻¹, variando-se a concentração do ácido siálico entre 1,0 a 10,0 mg L⁻¹, mantendo-se as condições químicas e físicas do sistema fixas (ninidrina ácida 0,140 mol L⁻¹ em ácido clorídrico p.a, volumes das soluções 200 µL cada, tempo e temperatura da reação de 5 minutos e 75 °C, respectivamente). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 10.

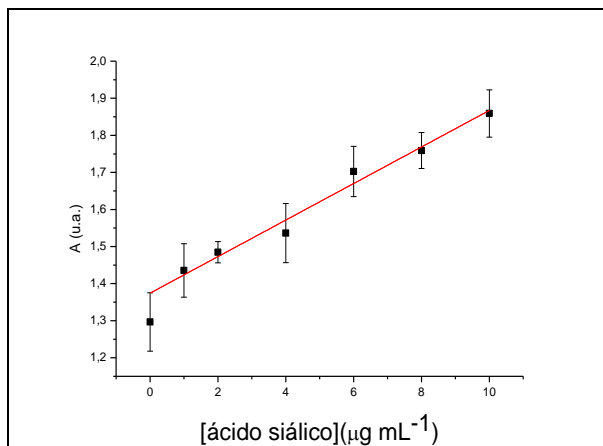
As curvas analíticas obtidas usando ácido clorídrico $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido clorídrico $0,050 \text{ mol L}^{-1}$, (Figura 10 (a) e Figura 10 (b)), indicam que mesmo empregando concentrações mais baixas de ácido clorídrico, é observada a ocorrência da reação variando as concentrações analíticas de ácido siálico, obtendo-se linearidade ($R = 0,987$ e $R = 0,998$, respectivamente), porém nota-se um desvio significativo entre as repetições das medidas, onde possivelmente poderá influenciar no limite de detecção e de quantificação.

O resultado obtido para a concentração de ácido clorídrico de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 10 (c)) apresentou sensibilidade (coeficiente angular = $0,110$) e linearidade boa ($R = 0,991$) quando comparada as concentrações de $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,050 \text{ mol L}^{-1}$. As curvas analíticas obtidas para o ácido clorídrico $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,150 \text{ mol L}^{-1}$ apresentadas na Figura 10 (d) e na Figura 10 (e), proporcionaram sensibilidades estatisticamente semelhantes (coeficiente angular = $0,113$ e coeficiente angular = $0,113$, respectivamente) à obtida para o ácido clorídrico $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, porém houve uma perda de linearidade das curvas ($R = 0,988$ e $R = 0,982$, respectivamente). Assim sendo, a concentração $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para a continuidade da otimização do sistema proposto.

Figura 10: Curvas analíticas em função da concentração do ácido clorídrico utilizado na reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico para soluções de referência de 0 a 10 mg L⁻¹ de ácido siálico.

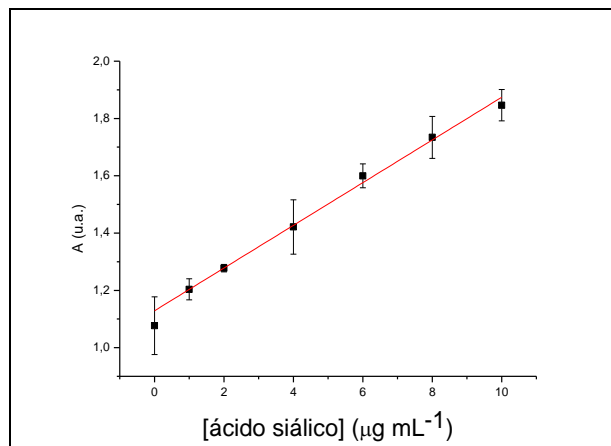
(a) Ácido clorídrico 0,025 mol L⁻¹

$$Y = (0,049 \pm 0,003) * X + (1,37 \pm 0,02) \quad R = 0,987$$



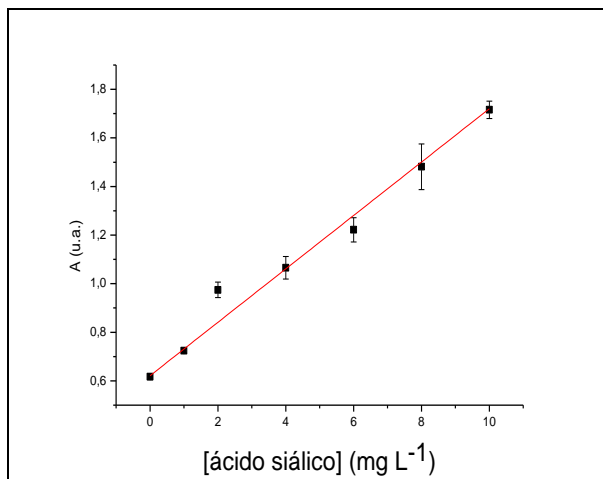
(b) Ácido clorídrico 0,050 mol L⁻¹

$$Y = (0,075 \pm 0,002) * X + (1,13 \pm 0,02) \quad R = 0,998$$



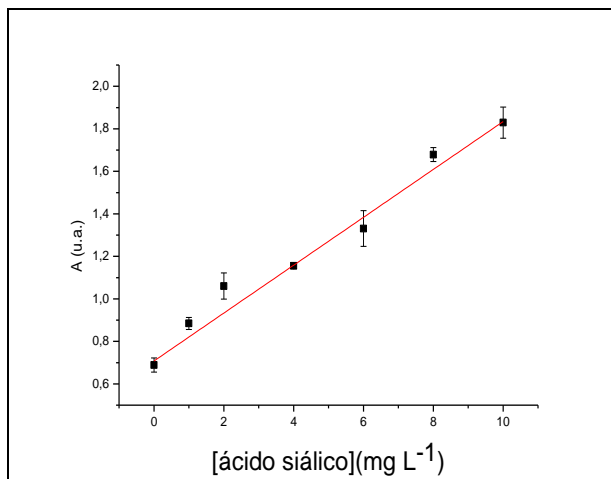
(c) Ácido clorídrico 0,100 mol L⁻¹

$$Y = (0,110 \pm 0,007) * X + (0,62 \pm 0,02) \quad R = 0,991$$



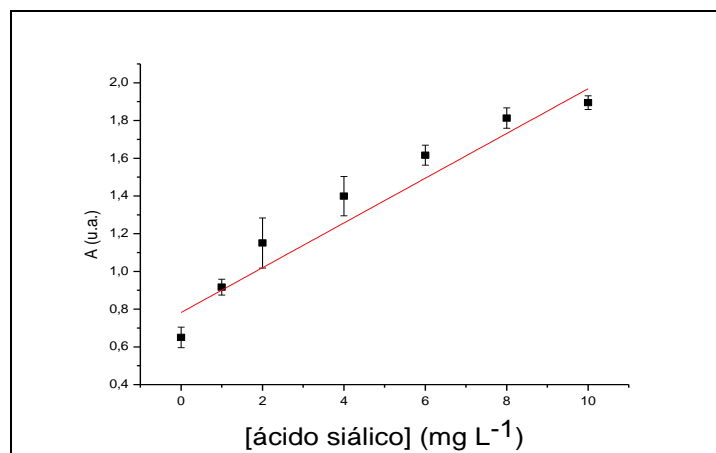
(d) Ácido clorídrico 0,125 mol L⁻¹

$$Y = (0,113 \pm 0,009) * X + (0,71 \pm 0,03) \quad R = 0,988$$



(e) Ácido clorídrico 0,150 mol L⁻¹

$$Y = (0,113 \pm 0,011) * X + (0,78 \pm 0,07) \quad R = 0,982$$



5.2.3. Influência de concentração da ninidrina ácida

O estudo da influência da concentração da ninidrina ácida foi realizado com o objetivo de melhorar a intensidade da absorvância do produto da reação estudada. A metodologia oficial utiliza ninidrina ácida com concentração de $0,140 \text{ mol L}^{-1}$, contudo, também foram estudadas as concentrações de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, $0,120 \text{ mol L}^{-1}$, $0,160 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,180 \text{ mol L}^{-1}$. Para tanto, foram obtidas curvas analíticas, para cada variação da concentração da ninidrina, empregando soluções de referência de ácido siálico entre $1,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, com tempo de reação de 5 minutos a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ e os resultados estão apresentados na Figura 11.

Na Figura 11 (a) é apresentada a curva analítica com a ninidrina ácida $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, onde é percebida uma tendência de estabilização da absorvância a partir da concentração de 4 mg L^{-1} de ácido siálico, o que indica que nesta condição, a concentração da ninidrina ácida é menor do que o que a reação necessita, logo seu uso não é recomendado. Para a concentração a ninidrina ácida de $0,120 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 11 (b)), observa-se a mesma tendência de notada para a concentração de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$, indicando que esta concentração também não é indicada para a continuidade da otimização do método proposto.

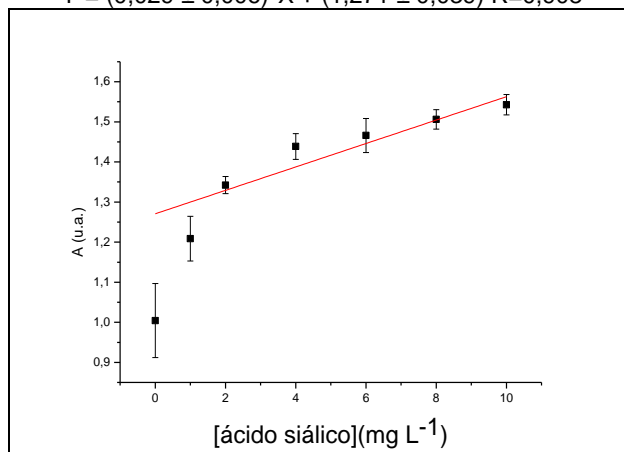
A concentração de ninidrina ácida sugerida pela metodologia oficial, $0,140 \text{ mol L}^{-1}$, foi estudada e sua curva analítica está apresentada na Figura 11 (c). Esta condição apresentou linearidade ($R = 0,995$), e sensibilidade (coeficiente angular = $0,096$). Entretanto, a condição de concentração de ninidrina ácida de $0,160 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 11 (d)), apresentou linearidade ($R = 0,997$) e sensibilidade (coeficiente angular = $0,109$), mais concordantes em relação à concentração de $0,140 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a concentração de ninidrina ácida $0,180 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 11 (e)) e foi observada um discreto aumento na sensibilidade (coeficiente angular = $0,110$), porém nota-se a diminuição da linearidade ($R = 0,976$) da curva analítica. Desde modo, foi selecionado a concentração de $0,160 \text{ mol L}^{-1}$ para a continuidade da otimização do método proposto.

Figura 11: Curvas analíticas em função da concentração da ninidrina ácida utilizada na reação entre a ninidrina ácida e o ácido siálico para soluções de referência de 0 a 10 mg L⁻¹ de ácido siálico.

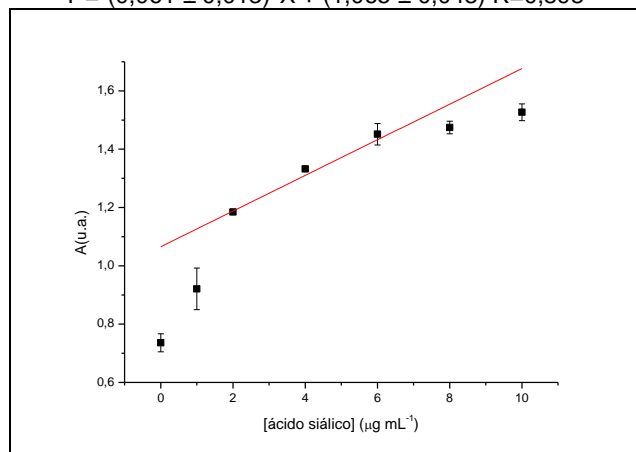
(a) Ninidrina ácida 0,100 mol L⁻¹

$$Y = (0,029 \pm 0,006)*X + (1,271 \pm 0,039) \quad R=0,908$$



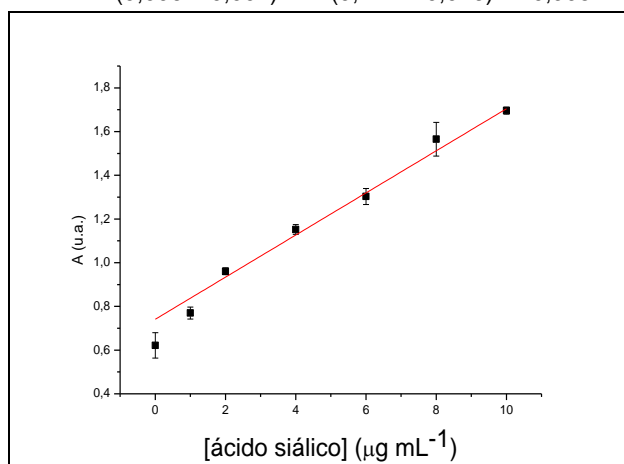
(b) Ninidrina ácida 0,120 mol L⁻¹

$$Y = (0,061 \pm 0,013)*X + (1,065 \pm 0,048) \quad R=0,898$$



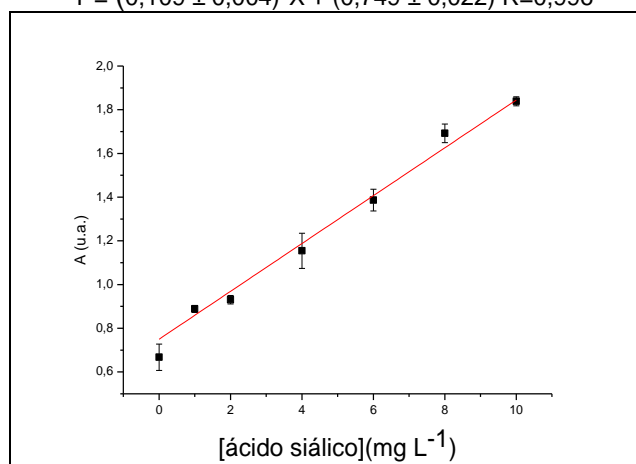
(c) Ninidrina ácida 0,140 mol L⁻¹

$$Y = (0,096 \pm 0,004)*X + (0,741 \pm 0,026) \quad R=0,995$$



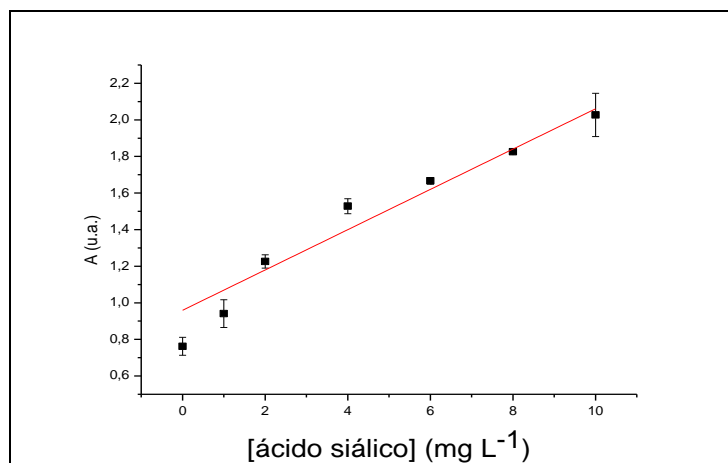
(d) Ninidrina ácida 0,160 mol L⁻¹

$$Y = (0,109 \pm 0,004)*X + (0,749 \pm 0,022) \quad R=0,996$$



(e) Ninidrina ácida 0,180 mol L⁻¹

$$Y = (0,110 \pm 0,011)*X + (0,959 \pm 0,079) \quad R=0,976$$



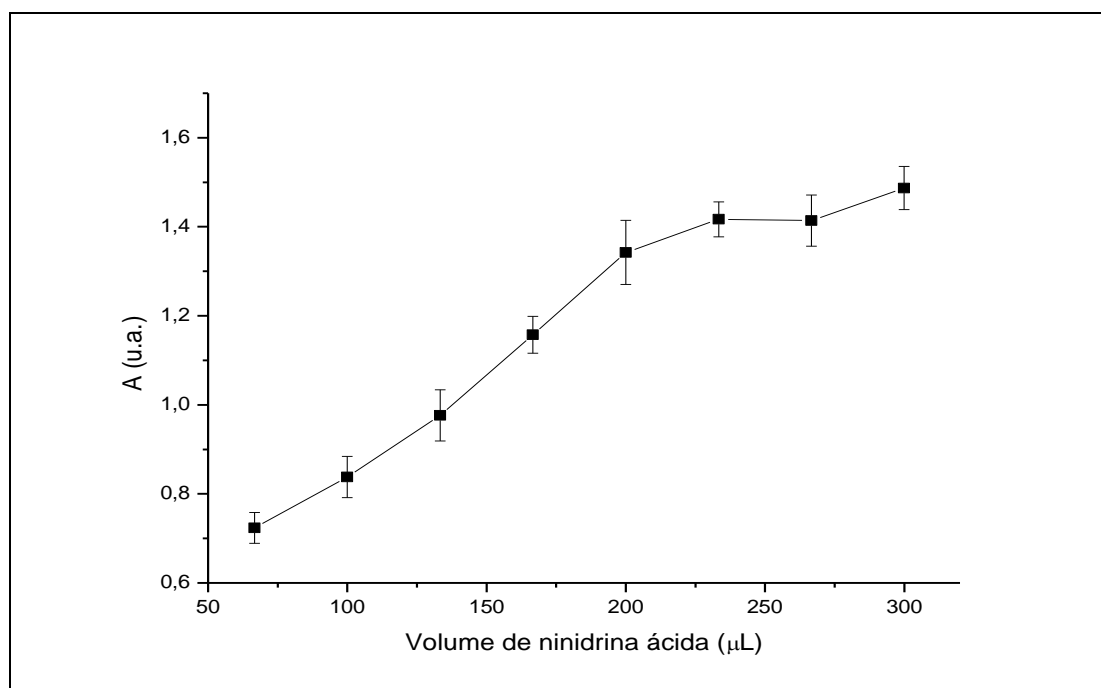
5.2.4. Estudo de razão volumétrica

A influência da razão volumétrica foi realizada aplicando-se o método de univariado para a definição da melhor resposta analítica em função da razão volumétrica entre as soluções de ninidrina, ácido clorídrico e ácido siálico $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ e os volumes foram selecionados baseado na intensidade do sinal analítico.

Inicialmente, realizou-se o estudo da influência do volume da ninidrina ácida, foram analisados os volumes entre $66 \mu\text{L}$ e $300 \mu\text{L}$ e os volumes de água, ácido siálico e ácido clorídrico foram mantidos em $200 \mu\text{L}$ cada. As leituras de absorbância foram monitoradas a 470 nm , em triplicata, usando as condições químicas otimizadas nos estudos anteriores, 5 minutos de reação a $75 \text{ }^\circ\text{C}$.

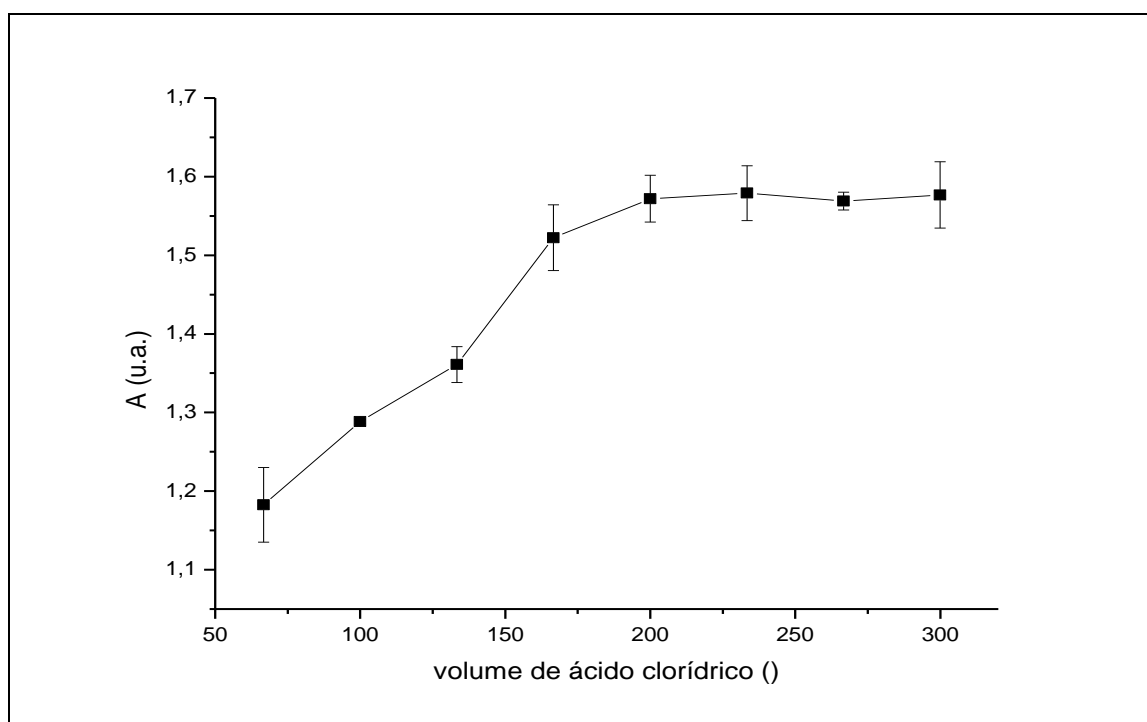
De acordo com os resultados apresentados na Figura 12, a absorbância aumentou até o volume de $233,3 \mu\text{L}$ e permaneceu constante com o volume de $266 \mu\text{L}$ e, posteriormente, nota-se uma estabilização na intensidade de absorbância e que volumes maiores não implicaram em um aumento significativo da intensidade do sinal analítico. Assim sendo, foi selecionado o tempo de acionamento de 7 segundos da válvula da ninidrina ácida equivalente ao volume de $233,3 \mu\text{L}$ para a continuidade da otimização da razão volumétrica.

Figura 12: Estudo da influência do volume da ninidrina ácida $0,160 \text{ mol L}^{-1}$ na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.



Posteriormente, o volume do ácido clorídrico foi avaliado sob as mesmas condições da ninidrina ácida, os volumes de água, ácido siálico foram mantidos em 200 μL , o volume de ninidrina ácida fixado em 233,3 μL e o volume de ácido clorídrico foi variado entre 66,7 μL e 299,9 μL . Na Figura 13 é apresentado o resultado obtido neste estudo, indicando que a partir do volume de 200 μL , a intensidade da absorbância se mantém estável, indicando que volumes maiores não necessitam ser utilizados. Logo o tempo de acionamento da válvula do ácido clorídrico equivalente ao volume escolhido é de 6 segundos (200 μL).

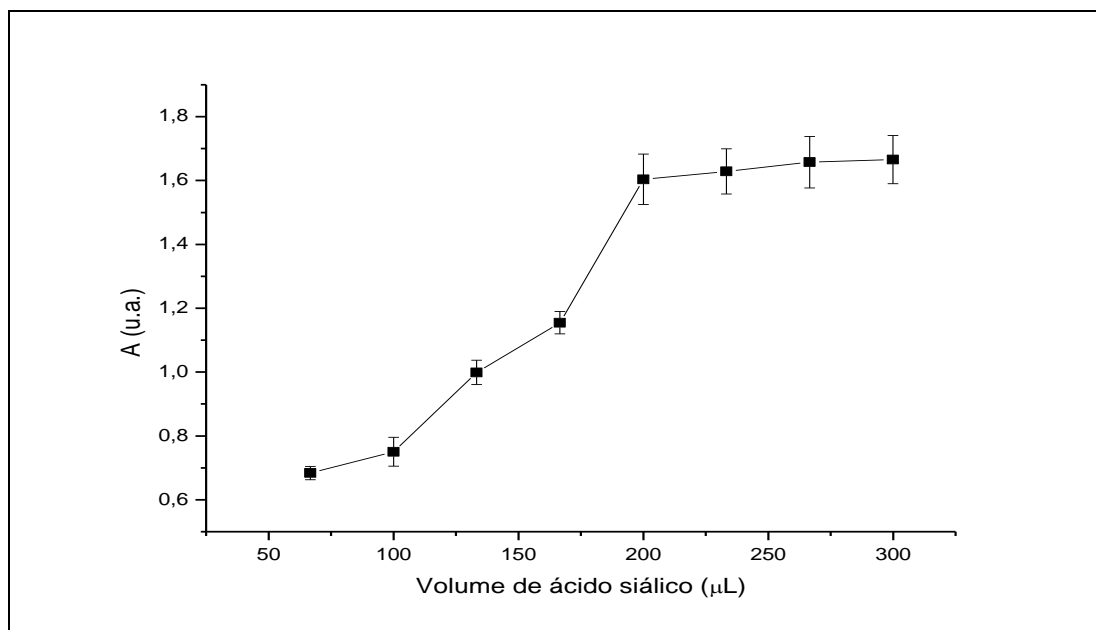
Figura 13: Estudo da influência do volume do ácido clorídrico $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.



Por fim, o volume de ácido siálico/amostra foi ajustado, sob as mesmas condições que os estudos volumétricos anteriores. O volume de ácido siálico foi variado entre 66 μL e 300 μL e os volumes de água, ninidrina ácida e ácido clorídrico foram mantidos em 200 μL , 233,3 μL e 200 μL , respectivamente e os resultados estão apresentados na Figura 14.

É possível observar um aumento na absorbância até o volume de 200 μL e para volumes maiores a intensidade da absorbância é mantida. Sendo assim, o volume de 200 μL foi selecionado, o qual corresponde ao tempo de acionamento da válvula de 6 segundos.

Figura 14: Estudo da influência do volume do ácido siálico $6,00 \text{ mg L}^{-1}$ na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.



Após a otimização dos tempos de acionamento de cada válvula para a inserção dos volumes de ninidrina ácida, ácido clorídrico e ácido siálico selecionou-se as melhores respostas de acordo com os resultados, obtendo-se 6 segundos para as soluções de ácido siálico e ácido clorídrico e 7 segundos para a solução de ninidrina ácida, que correspondem aos volumes de 200, 200 e 233,3 μL , respectivamente.

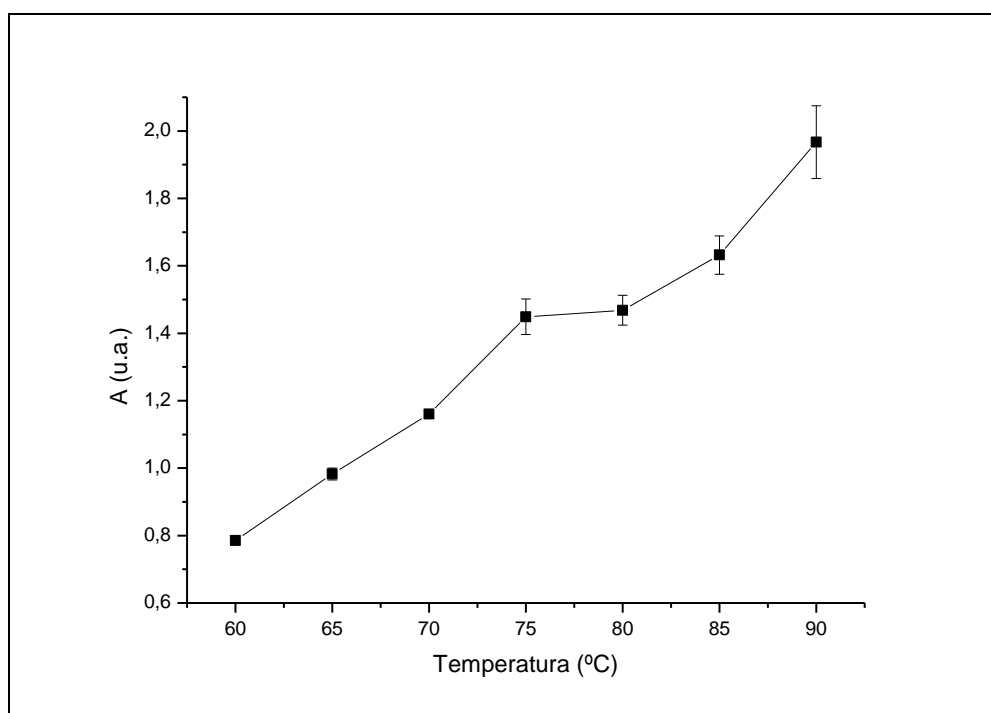
5.2.5. Estudo de temperatura

O efeito da temperatura influencia no aumento da intensidade da absorvância da reação, porém causa também o aumento da ocorrência de bolhas, fenômeno que interfere na leitura espectrofotométrica em sistemas de análise em fluxo-batelada com detecção na cela reacional.

Observou-se a inviabilidade de empregar a temperatura sugerida no método oficial ($100 \text{ }^\circ\text{C}$), devido à intensa formação de bolhas que influencia drasticamente a detecção do ácido siálico. Assim, foram realizadas leituras de absorvância monitoradas em 470 nm, em triplicata, empregando as condições químicas otimizadas nos estudos anteriores e concentração da solução de ácido siálico de 6 mg L^{-1} e 5 minutos de reação, estudando as temperaturas de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, $65 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \text{ }^\circ\text{C}$, $75 \text{ }^\circ\text{C}$, $80 \text{ }^\circ\text{C}$, $85 \text{ }^\circ\text{C}$ e $90 \text{ }^\circ\text{C}$.

Conforme apresentado na Figura 15, o intervalo entre 60 °C e 70 °C quase não há formação de bolhas (desvio padrão de 0,01), porém a intensidade de absorbância apresentada é muito baixa. Entre 75 °C e 80 °C ocorre a estabilização do sinal analítico e as bolhas formadas não causam interferência na repetibilidade do sinal analítico. O emprego de temperaturas superiores a 80 °C, apesar de registrar maiores intensidade de absorbâncias, não é recomendado em sistemas de análise em fluxo-batelada com detecção na cela reacional, pois a formação de bolhas é muito intensa, o que dificulta muito o registro do sinal influenciando na repetibilidade e reprodutibilidade no sistema proposto. Por esta razão, selecionou-se a temperatura de 75 °C devido ao fato de apresentar resposta analítica significativa sem perdas de sensibilidade para o sistema proposto.

Figura 15: Estudo da influência de temperatura na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.



5.2.6. Estudo de tempo de reação

Como é sabido, a cinética da reação, em função do tempo, influencia significativamente o rendimento reacional, conseqüentemente, na sensibilidade do método proposto. Neste sentido, a reação proposta foi monitorada durante 10

minutos, com leituras de absorvância em 470 nm a cada 1 minuto, empregando as condições otimizadas do sistema proposto.

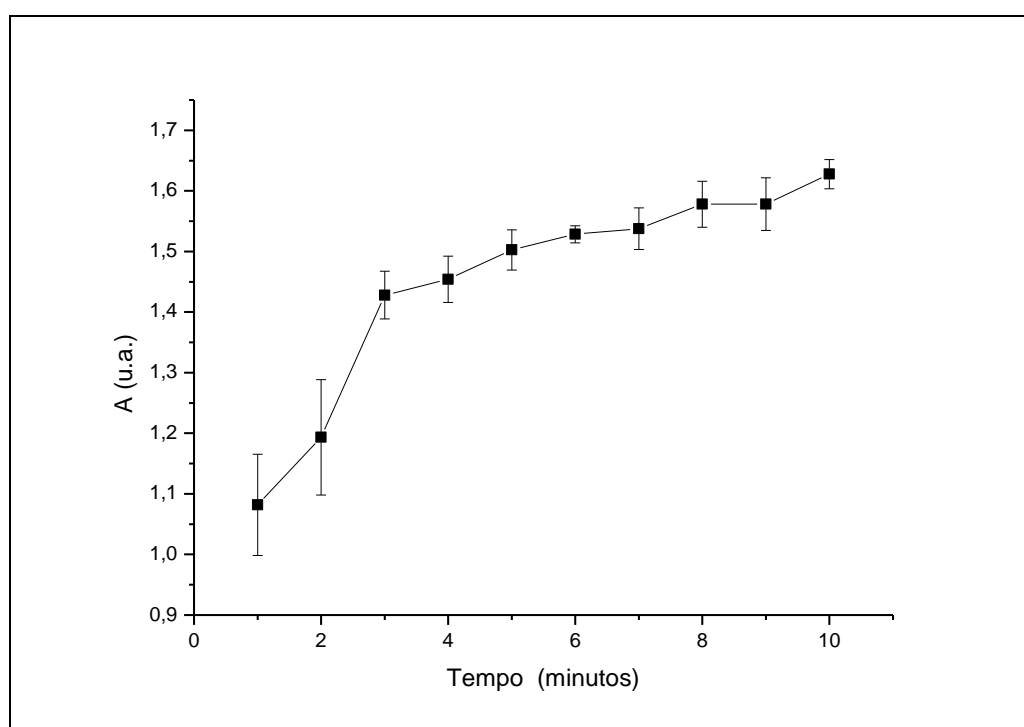
O tempo de reação ideal foi escolhido baseado na intensidade e estabilidade do sinal analítico. Os resultados obtidos no estudo de tempo de reação estão apresentados na Figura 16.

Observou-se que há um aumento significativo na intensidade da absorvância até o tempo de 3 minutos, posteriormente, entre 3 e 5 minutos tem-se um aumento de 5% e entre 5 e 10 minutos um aumento de 8% na intensidade da absorvância.

Nota-se também que a partir de 5 minutos de reação, o sinal analítico obtido possui intensidade correspondente a 92% da intensidade do sinal analítico obtido após 10 minutos de reação.

Então, foi selecionado o tempo de reação de 5 minutos, já que as intensidades de absorvância obtidas em tempos reacionais maiores não apresentaram ganhos altos o suficiente para justificar sua utilização, considerando também que tempos reacionais implicariam em perda de frequência analítica.

Figura 16: Estudo da influência do tempo de aquecimento na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico.



5.3. Figuras de mérito

Após estudos de otimização dos variáveis químicas e físicas do sistema, apresentadas resumidamente na Tabela 5, foi realizada a avaliação do sistema a partir de curva analítica com soluções de referência de ácido siálico com concentrações entre 1,0 a 10,0 mg L⁻¹, conforme apresentado na Figura 17 e na Tabela 6.

No método oficial, o volume total de reagentes utilizado é 6 mL, enquanto no sistema proposto, este volume é reduzido para 600 µL, o que significa a redução de volume em 90%. Além disso, o sistema proposto permitiu a redução da temperatura de reação de 100 °C para 75 °C e o tempo de reação de 10 minutos para 5 minutos. O sistema de análise em fluxo-batelada proposto permite a substituição do ácido acético glacial p.a. pelo o ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

Tabela 5: Comparação entre variáveis otimizadas para o sistema de análise em fluxo-batelada proposto e variáveis determinadas pelo método oficial.

Variável	Método proposto	Método oficial (Brasil, 2003)
Natureza do ácido	Ácido clorídrico	Ácido acético glacial
Concentração do ácido	0,10 mol L ⁻¹	17,33 mol L ⁻¹
Concentração da ninidrina ácida	0,160 mol L ⁻¹	0,140 mol L ⁻¹
Volume de solução		
ácido siálico	0,200 mL	2 mL
ácido clorídrico/acético	0,200 mL	2 mL
ninidrina ácida	0,233 mL	2 mL
Temperatura	75 °C	100 °C
Tempo	5 minutos	10 minutos

A curva analítica entre 1 a 10 mg L⁻¹ foi construída baseada no método de mínimos quadrados em dias diferentes, conforme a equação de regressão linear $Y = A + B * X$, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

O valor médio estimado de coeficiente de correlação linear (R) foi 0,99, coeficiente linear (A) foi 0,79 e coeficiente angular (B) foi 0,12, indicando que o sistema proposto apresenta sensibilidade para a determinação de ácido siálico. Aplicando-se o teste t, em nível de confiança de 95%, não foi observada diferença significativa entre as curvas obtidas em dias diferentes, demonstrando a reprodutibilidade do método proposto.

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados em 0,239 mg L⁻¹ e 0,726 mg L⁻¹, respectivamente. O desvio padrão relativo (DPR) foi estimado em 1,90 % empregando a solução de referência de 4,0 mg L⁻¹.

O tempo total de uma análise, incluindo etapas de enchimento do percurso analítico, amostragem, reação, detecção e lavagem, obtido foi de 8 minutos e 30 segundos e a frequência analítica foi de 7 determinações por hora, desconsiderando o tempo de preparo da amostra.

Figura 17: Curva analítica para reação entre ninidrina ácida 0,160 mg L⁻¹ e ácido siálico na faixa de 1 a 10 mg L⁻¹, em meio a ácido clorídrico 0,100 mg L⁻¹, obtida no sistema de análise em fluxo-batelada a 75 °C após 5 minutos de aquecimento.

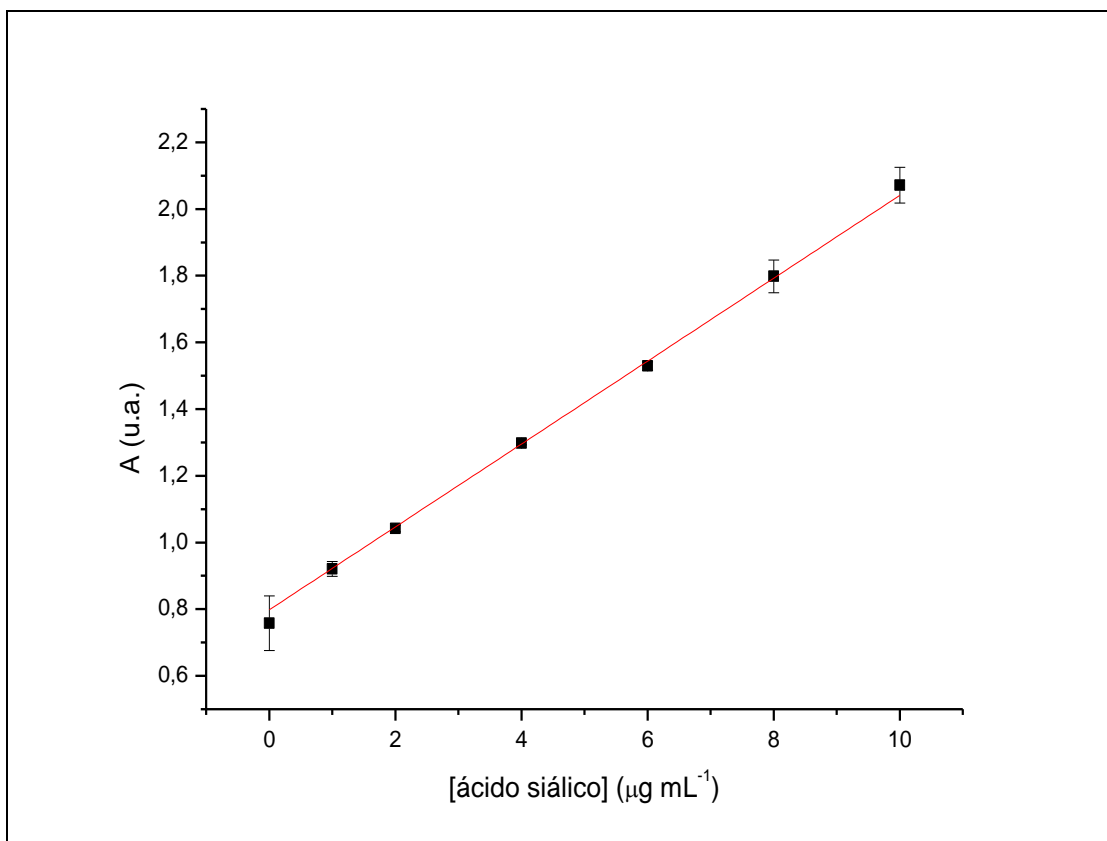


Tabela 6: Coeficientes lineares, coeficientes angulares e coeficientes de correlação (R) obtidos a partir da construção de curvas analíticas no sistema de análise em fluxo-batelada em dias diferentes.

Coeficiente linear (A)	Coeficiente angular (B)	Coeficiente de Correlação (R)	Número de pontos na curva
0,797 ± 0,015	0,128 ± 0,003	0,9988	7
0,798 ± 0,090	0,124 ± 0,002	0,9992	7
0,904 ± 0,039	0,116 ± 0,007	0,9910	7
0,741 ± 0,027	0,096 ± 0,004	0,9995	7
0,750 ± 0,022	0,109 ± 0,004	0,9966	7
0,621 ± 0,016	0,111 ± 0,006	0,9910	7

Os parâmetros analíticos obtidos no sistema de análise em fluxo-batelada proposto estão apresentados resumidamente na Tabela 7.

Tabela 7: Figuras de mérito do sistema de análise em fluxo-batelada proposto para determinação quantitativa de ácido siálico.

Parâmetro	Método Proposto
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	1 - 10
Coeficiente linear	0,9992
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,239
Limite de quantificação (mg L ⁻¹)	0,726
Exatidão (%)	92,5 - 104,0
Precisão (DPR) (%)	1,90
Consumo de amostra por determinação	200 µL
Consumo de reagentes por determinação	433 µL
Consumo de fluido carregador por determinação	200 µL
Geração de efluentes por determinação	833 µL

5.4. Teste de adição e recuperação

Após o tratamento das amostras, foram realizadas leituras no sistema em fluxo-batelada das amostras tratadas e das amostras tratadas adicionadas de ácido siálico nas concentrações de 2 e 5 mg L⁻¹.

Foram estudadas 5 amostras diferentes, sendo uma amostra de leite UHT tipo integral, uma de leite UHT tipo semidesnatado, uma de leite UHT tipo desnatado, uma de leite em pó e uma de composto lácteo em pó.

A exatidão foi avaliada empregando o teste de adição e recuperação e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8. Para análise de amostras de leite nos níveis de concentração de mg L⁻¹, valores de recuperação num intervalo entre 60 – 115%, são considerados satisfatórios (Brito, 2003; Ribani, 2004).

Na análise realizada foram obtidos valores de recuperação entre 92,5% e 104,0%, demonstrando que não houve efeito de matriz na determinação de ácido siálico nas amostras de leite e de composto lácteo estudadas.

Tabela 8: Teste de adição e recuperação para determinação de ácido siálico em amostras de leite utilizando o sistema de análise em fluxo-batelada proposto.

Tipo de amostra de leite	Método proposto (mg L⁻¹)	Valor adicionado (mg L⁻¹)	Valor recuperado (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
UHT integral	0,90 ± 0,08	2,0	2,84 ± 0,03	97,0
		5,0	5,75 ± 0,07	97,0
UHT semidesnatado	0,36 ± 0,01	2,0	2,41 ± 0,06	102,5
		5,0	5,56 ± 0,06	104,0
UHT desnatado	1,90 ± 0,08	2,0	3,87 ± 0,02	98,5
		5,0	6,66 ± 0,02	95,2
Leite em pó	1,35 ± 0,05	2,0	3,20 ± 0,10	92,5
		5,0	6,32 ± 0,09	99,4
Composto lácteo em pó	4,06 ± 0,02	2,0	6,10 ± 0,10	102,0
		5,0	8,99 ± 0,05	98,6

5.5. Teste de interferentes

Os resultados obtidos no teste de possíveis interferentes na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico estão apresentados na Tabela 9.

Observou-se que dentre as espécies estudadas, a cistina apresenta maior potencial de interferência, pois apresenta um limite menor de concentração que causa interferência. Mesmo assim, por possuir concentração média de 30,34 mg de cistina g⁻¹ de leite (Fani, 2014). Esta substância não causa efeito real neste método, pois a concentração média de ácido siálico em leite é 5,14 mg L⁻¹ de leite, o que representa uma razão volumétrica de 1:6, muito inferior ao limite encontrado de 1:25.

A cisteína apresentou alto limite de concentração de 500 mg L⁻¹, razão volumétrica 1:100 em relação ao ácido siálico. A concentração média de cisteína é de 5,6 mg g⁻¹ de leite (Viapiana, 2017), semelhante a concentração de ácido siálico em leite. Neste sentido, a cisteína não apresenta uma interferência significativa método proposto.

O triptofano é uma espécie que apresenta a concentração média de 46,3 mg g⁻¹ de leite (Viapiana, 2017), ou seja, tem concentração média aproximadamente 9 vezes maior que a concentração do ácido siálico. Como a razão volumétrica limite que pode causar interferência é de 1:50, este aminoácido não pode ser considerado um interferente significativo.

O mesmo foi observado para a amônia, que apresenta razão volumétrica limite de 1:100, indicando que esta não significa um interferente real neste método.

Tabela 9: Avaliação dos possíveis interferentes na reação entre ninidrina ácida e ácido siálico

Substância	Concentração do ácido siálico (mg L ⁻¹)	Concentração do interferente (mg L ⁻¹)	Razão Volumétrica	Varição de sinal (%)
Cistina	5	125	1:25	-3,54
Cisteína	5	500	1:100	1,26
Triptofano	5	250	1:50	4,02
Amônia	5	500	1:100	2,50

6 CONCLUSÃO

O sistema de análise em fluxo-batelada proposto é de arranjo simples, versátil e robusto e pode ser uma viável opção para determinar ácido siálico em leite e produto lácteo empregando a reação da ninidrina ácida com adaptações, ainda não descritas na literatura.

Comparado ao método oficial de determinação de ácido siálico, o sistema de análise desenvolvido permite que sejam empregadas condições reacionais menos corrosivas, através da substituição do ácido acético glacial concentrado pelo ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, com a utilização do sistema em fluxo-batelada desenvolvido, foram obtidos sinais analíticos de maior intensidade devido à alteração na concentração da ninidrina ácida para $0,160 \text{ mol L}^{-1}$.

O emprego do sistema de análise em fluxo-batelada com detecção na cela de reação proposto permitiu a redução de 50% no tempo de reação, de 30% na temperatura da reação e a frequência analítica de 7 determinações por hora. Além disso, a redução de 90% no consumo de soluções de amostras e de reagentes permitindo uma redução significativa na geração de resíduos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.F.; MARTINS, V.L.; SILVA, E.C.; MOREIRA, N.T.; ARAÚJO, M.C.U.; Implementation of automatic standard addition method in a flow-batch system: application to copper determination in alcoholic beverage by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 486, p. 143, 2003a.

ALMEIDA, L.F.; MARTINS, V.L.; SILVA, E.C.; MOREIRA, N.T.; ARAÚJO, M.C.U. An Automatic Flow-Batch Standard-Addition Method for Sodium Determination in Alcohol Fuel by Flame Photometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, p. 249, 2003b.

AMATATONGCHAI, M.; SROYSEE, W.; CHAIRAM, S.; NACAPRICHA, D. Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes–PDDA–gold nanoparticles. **Talanta**, V.133, p.134, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LEITE LONGA VIDA (ABLV). Leite longa vida, 2007. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/leiteLongaVida/index11.html>>. Acessado em 24/01/2017.

BARRETO, I. S. Monosegmented flow-batch system: Spectrophotometric determination of boron in plants. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 101 f., 2012.

BEHMER, M. I. L. A. **Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização e análise**. Ed. 13^a. São Paulo: Nobel, p.320, 1999.

BERGAMIN, F. H.; MEDEIROS, J.X.; REIS, B.F.; ZAGATTO, E.A.G. Solvent extraction in continuous flow injection analysis: Determination of molybdenum in plant material. **Analytica Chimica Acta**, v.101, p. 9, 1978.

BORIN, A.; FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; MARETTO, D.A.; POPPI, R.J. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, p.2, 2006.

BOTTOM, C.B.; HANNA, S.S.; SIEHR, D.J. Mechanism of the ninhydrin reaction. **Biochemistry and Molecular**, v.6, n.1, p.4, 1978.

BRASIL, M.A.S.; REIS, B. F. Development of a microcontrolled flow-batch device with directheating for analytical procedures that require a heating step forchemical reaction development. **Sensors and Actuators B**, v.226, p. 570, 2016.

BRASIL, M.A.S.; REIS, B. F. An Automated Multicommuted Flow Analysis Procedure for Photometric Determination of Reducing Sugars in Wine Employing a Directly Heated Flow-Batch Device. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.28, 2017.

BRASIL. Decreto nº 2244 de 04 de junho de 1997. Altera dispositivos do Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, alterado pelos Decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962, nº1.236, de 2 de setembro de 1994, e nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de junho de 1997, Seção I, p.11555.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**, artigo 475,1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**: RIISPOA: e outras legislações de interesse do DIPOA/SDA. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. 381 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dez. de 2006, aprova métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle

de leite e produtos lácteos – convenções. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2006

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária, n. 22, 14 de abril 2003. Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de mai. 2003, p.115.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria nº. 124 de 23 set. 1991. Aprova métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. In: **Diário Oficial da União**, 20 nov. p.262,1991.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129, 2003.

BRUCE, P. Y. **Química Orgânica. Vol. II**, 4ª. Ed. Pearson Prentice Hall, São Paulo – SP, 2006. Pg. 383.

CAMARGO, D. S.; ALVES, G.; GARCIA, S. Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado proteico de soja. **Semina**, v. 21, p. 45, 2000.

CARNEIRO, J.M.T.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G.; HONORATO, R.S. Spectrophotometric catalytic determination of Fe (III) in estuarine waters using a flow-batch system. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, p. 327, 2002.

CARNEIRO, J.M.T.; HONORATO, R.S.; ZAGATTO, E.A.G. Individual sample conditioning in flow analysis. Determination of N-total in plant materials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 368, p. 496, 2000.

CARVALHO, B. M. A.de; CARVALHO, L. M.de; ALCÂNTRA, L. A. P.; BONOMO, R. C. F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1695, 2007.

CHINARD, F. P. Photometric Estimation of Proline and Ornithine. **The Journal of Biological Chemistry**, v.199, p.91, 1952.

CORTEZ, M. A.S.; DIAS, V. G.; MAIA, R. G. *et al.* Características físico-químicas e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 65, n. 376, p.18-25, 2010.

DINIZ, P.H.G.D.; ALMEIDA, L. F.; HARDING, D. P.; ARAÚJO, M.C.U. Flow-batch analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35. P. 39, 2012.

DRACZ, S. Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de queijo em leite. Tese M.S.– Universidade Federal de Viosa, Minas Gerais. Viçosa, 57p.,1996.

DURR, J.W.; FONTANELLI, R.S.; BURCHARD, J.F. Fatores que afetam a composição do leite. In: KOCHANN, R.A.; TOMM, G.O.; FONTANELLI, R.S. **Sistemas de produção de leite baseado em pastagens sob plantio direto**. Passo Fundo: Embrapa, p.135, 2000.

FANI, M. Propriedades nutricionais das proteínas do soro de leite. **Aditivos & Ingredientes**, v.41. p.26, 2014.

FÁTIMA, A.; BAPTISTELLA, L. H. B.; PILLI, R. A.; MODOLO, L. V. Ácidos Siálicos da Compreensão do seu Envolvimento em Processos Biológicos ao Desenvolvimento de Fármacos Contra o Agente Etiológico da Gripe, **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 306, 2005.

FELÍCIO, P. E. Adulteração do leite mostra que é hora de investir no Sistema de Inspeção Sanitária Federal. **Revista Associação Brasileira de Criadores de Zebú**, n. 41, p. 77, 2007.

FREIRE-DE-LIMA, L.; OLIVEIRA, I. A.; NEVES, J. L.; PENHA, L. L.; ALISSON-SILVA, F.; DIAS, W. B.; TODESCHINI, A. R. Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Immunology**, v.3, p. 356, 2012.

FRIEDMAN, M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 52, p. 385, 2004.

FUKUDA, S. P. Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo. 149 f, 2003.

FUKUDA, S. P.; ROIG, S. M.; PRATA, L. F. Aplicação do método da ninidrina ácida como teste de “screening” de plataforma para a detecção da adição de soro ao leite. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos** – SBCTA, v.16, n.1, p.52, 1996.

FUKUDA, S.P. Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 142 f. 1994.

FURLANETTI, A.M.; PRATA, L. F. Free and total GMP (glicomacropéptide) contents of milk during bovine lactation. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p.121, 2003.

GAITONDE, M. K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. **Biochemical Journal**, v. 104, n. 2, p. 627, 1967.

GOMES, M. I. F. V. Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite esterilizado “longa vida”. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 112 p, 1995.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Analytical Chemistry**, v.26.3, p. 227, 2007.

GONZALEZ, F. H. D. ; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Porto Alegre, p. 72, 2001.

GONZALEZ, F. H. D.; NORO, G. Variações na composição do leite no subtropical brasileiro. In: GONZÁLEZ, F. D.; PINTO, A.T.; ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. **Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropical**. Editora UPF, p.190, 2011.

GRÜNHUT, M.; CENTURIÓN, M.E.; FRAGOSO, W.D.; ALMEIDA, L.F.; ARAÚJO, M.C.U.; BAND, B.S.F. Flow-batch technique for the simultaneous enzymatic determination of levodopa and carbidopa in pharmaceuticals using PLS and successive projections algorithm. **Talanta**, v. 75, p. 950, 2008.

GRÜNHUT, M.; MARTINS, V.L.; CENTURIÓN, M.E.; ARAÚJO, M.C.U.; BAND, B.S.F. Flow-Batch Analyzer for the chemiluminescence Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Preparations. **Analytical Letters**, v.44, p. 67, 2011.

GUINEE. T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.45, n.4, p.94, 1992.

HARAGUCHI, F. K. ; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Brazilian Journal of Nutrition**, Campinas, v.19, n.4, p.479, 2006.

HERNÁNDEZ, C. M., MUÑOZ. M., DAURY. C. Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. **International Dairy Journal**, v.19, p. 205, 2009.

HONORATO, R. S.. A flow-batch titrator exploiting a onedimensional optimisation algorithm for end point search. **Analytica Chimica Acta**, v. 396, p. 91,1999.

HONORATO, R.S.; CARNEIRO, J.M.T.; ZAGATTO, E.A.G. Spectrophotometric flow-batch determination of aluminum in plant tissues exploiting a feedback mechanism. **Analytica Chimica Acta**, v.441, p. 309, 2001.

HONORATO, R.S.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, R.A.C.; ARAÚJO, M.C.U. Prior assay as an approach to flow titrations. Spectrophotometric determination of iron in alloys and ores. **Analytica Chimica Acta.**, v.416, p. 231, 2000.

JENSEN, R.G. **Handbook of milk composition**. 1^a ed. San Diego: Academic Press, p. 919,1995.

JOLLES, P.; FIAT, A.M. The carbohydrate portions of milk glycoproteins. **Journal of Dairy Research** V. 46, p.187, 1979.

KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; KORN, M.; BERGAMIN FILHO, H. Multicommutation in flow analysis. Part 5: Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 334, p. 287, 1996.

LASMAR, M. M.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M. *et al.* Detection of cheese whey in raw milk preserved with bronopol through high performance liquid chromatography. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1553, 2011.

LIMA, M.B.; INSAUSTI, M.; DOMINI, C.E.; PISTONESI, M.F.; ARAÚJO, M.C.U.; BAND, B.S.F. Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. **Talanta**, v.89, p. 21, 2012.

LIMA, R.A.C.; SANTOS, S.R.B.; COSTA, R.S.; MARCONE, G.P.S.; HONORATO, R.S.; NASCIMENTO, V.B.; ARAÚJO, M.C.U. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 25, 2004.

LISBÔA, J. C. F.; BOSSOLANI, M. Experiências Lácteas. **Química Nova**, São Paulo, v.6, p. 30,1997.

LOBATO, P.R. Pesquisa da adição de soro de queijo ao leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais: determinação de GMP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLA) e comparação dos métodos imunoquímicos (Stick cGMP e BRW Elisa). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Belo Horizonte, 49 f, 2014.

MCKELVIE, I., KOLEV, S. **Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques**, Volume 54, Edição1, 2008.

MEDEIROS, E.P.; NASCIMENTO, E.C.L.; MEDEIROS, A.C.D.; VERASNETO, J.G.; SILVA, E.C.; ARAÚJO, M.C.U. Multicommutated generation of concentration

gradients in a flow-batch system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 113, 2004.

NASCIMENTO, E.C.L.; ARAÚJO, M.C.U.; GALVÃO, R.K.H. A flow-batch analyzer for UV-Vis spectrophotometric detection of adulteration in distilled spirits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1061, 2011.

NASCIMENTO, J.A.; DIONÍZIO, A.G.G.; NASCIMENTO, E.C.L.; FREITAS, S.K.B.; ARAÚJO, M.C.U. Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-Vis e quimiometria. **Química Nova**, v.33, p. 351, 2010.

NASCIMENTO, V.B.; SELVA, T.M.G.; COELHO, E.C.S.; SANTOS, F.P.; ANTÔNIO, J.L.S.; SILVA, J.R.; GAIÃO, E.N.; ARAÚJO, M.C.U. Automatic determination of chlorine without standard solutions using a biamprometric flow-batch analysis system. **Talanta**, v. 81, p. 609, 2010.

OLIVEIRA, E. N. A., SANTOS, D. C., OLIVEIRA, A. S. Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 409, 2010.

OLIVEIRA, G. B. Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 47p., 2009.

OLIVEIRA, S.C.B., Coelho, E.C.S., Selva, T.M.G., Santos, F.P., Araujo, M.C.U., Abreu, F.C., Nascimento, V.B. A coulometric flow cell for in-line generation of reagent, titrant or standard solutions. **Microchemical Journal**, v.82, p.220, 2006.

OLIVEIRA, S.C.B. Desenvolvimento e Aplicação de uma Célula de Fluxo para Geração Eletroquímica *In-Line* de Reagentes. Dissertação (Mestrado em Química). Centro De Ciências Exatas e Da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 59 p., 2005.

PIRES, A.S. Fraudes em leites de consumo: limites de detecção. **Jornal da Produção de Leite PDPL/RV**. Universidade Federal de Viçosa, 2000.

PRATA, L.F. Distribuição de GMP livre, em leites crus e pasteurizados, na definição da detecção de fraudes por adição de soro. Tese (Livre Docência em Inspeção de Alimentos de Origem Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. Jaboticabal, 104p., 2002.

REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 16, n. 6, p. 570, 1993.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. Análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**. 12, edição 1, 1989.

REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; ZAGATTO, E.A.G., LIMA, J.L.F.C., LAPA, R.A.; Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v.293, p.129, 1994.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771, 2004.

RIBEIRO M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade S.F., **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3ª ed. São Paulo: Roca, 936p., 2008.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H.; Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.78, p.145, 1975.

RUZICKA, J.; STEWART, J.W.B.; ZAGATTO, E.A.G. Flow injection analysis: Part IV. Stream sample splitting and its application to the continuous spectrophotometric determination of chloride in brackish waters. **Analytica Chimica Acta**. v.81, p. 387, 1976.

SILVA, J.E.; SILVA, F.A.; PIMENTEL, M.F.; HONORATO, R.S.; SILVA, V.L.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M.; ARAÚJO, A.N. A flow-batch internal standard procedure for iron determination in hydrated ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.70, p. 522, 2006.

SILVA, M.J.; ANJOS, E.V.; HONORATO, R.S.; PIMENTEL, M.F.; PAIM, A.P.S. Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.629, p. 98, 2008.

SILVA, P.H.F.; Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova Na Escola**, São Paulo, n. 6, p.3-5, Nov. 1997.

SKEGGS, L. T. Automatic method for colorimetric analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v.38, p.311, 1957.

SOUZA, M.C.; MARTINS, V.L.; ALMEIDA, L.F.; PESSOA NETO, O.D.; GAIÃO, E.N.; ARAÚJO, M.C.U. Kinetics independent spectrometric analysis using non-linear calibration modelling and exploitation of concentration gradients generated by a flow-batch system for albumin and total protein determination in blood serum. **Talanta**, v.82, p. 1027, 2010.

TROJANOWICZ, M. **Advances in Flow Analysis**. Edição 1, Editora Wiley-Vch Verlag GmbH & Co, Weinheim, p. 703, 2008.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção de qualidade do leite**. Edição 4, Editora UFSM, 225p., 2010.

VELLOSO, C. Celso Velloso: As ações do Ministério para o combate à fraude de leite no Brasil. Entrevista. Milkpoint, mai. 2003. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?actA=7&arealD=50&secaoID=126¬icialID=8435>>. Acessado em 23/01/2018.

VIAPIANA, I.V. Proteínas do soro do leite. **Food Ingredients Brasil**, v. 41, p. 26, 2017.

VISANI, V.; BARROS, S.R.R.C.; DANTAS FILHO, H.A.; ALMEIDA, L.F.; LIMA, R.A.C.; FRAGOSO, W.D.; SALDANHA, T.C.B.; ARAÚJO, M.C.U. Flow-batch analyser for preparation of calibration standard mixtures in simultaneous multicomponent spectrometric analysis. **Eclética Química**, v. 34, p. 37, 2009.

WALSTRA, P. & JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. 1ª ed. Nova York: John Wiley & Sons, p.467, 1984.

WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid. **J. The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n.8, p.1971, 1959.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & PINTO, A.P.E. DE F. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 5, n.2, p.111, 1985.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Adição de soro ao leite em pó - métodos para detecção. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, n.234, p.3-10, 1984.

YAO, K.; UBUKA, T.; MASUOKA, N.; KINUTA, M.; IKEDA, T. Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction. **Analytical Biochemistry**, v.179, p.332, 1989.

ZADOW, J.G., **Modern dairy technology: advances in milk processing**. London: Elsevier. V. 2,1997.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - Iupac 1994). **Química Nova**, v. 22, n.1, p.143, 1999.

ZAGATTO, E.A.G.; CARNEIRO, J.M.T.; VICENTE, S.; FORTES, R.; SANTOS, J..L.M.; LIMA, J.L.F.C. Mixing chambers in flow analysis: A review. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, p. 524, 2009.