



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM LEITE
UTILIZANDO SPOT TESTS EM PAPEL E PROCESSAMENTO
DE IMAGENS DIGITAIS**

JOSIELE APARECIDA MAGALHÃES CONRADO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UBERLÂNDIA/MG
2022

JOSIELE APARECIDA MAGALHÃES CONRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM LEITE
UTILIZANDO SPOT TESTS EM PAPEL E PROCESSAMENTO
DE IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci

UBERLÂNDIA/MG

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C754
2022
Conrado, Josiele Aparecida Magalhães, 1984-
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO
DE ÁCIDO SALICÍLICO EM LEITE UTILIZANDO SPOT TESTS EM
PAPEL E PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS [recurso
eletrônico] / Josiele Aparecida Magalhães Conrado. -
2022.

Orientador: João Flávio da Silveira Petrucci.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.418>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Petrucci, João Flávio da Silveira, 1984-
, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Química. III. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 348, PPGQUI				
Data:	Vinte de julho de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:50
Matrícula do Discente:	12012QMI005				
Nome do Discente:	Josiele Aparecida Magalhães Conrado				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de método analítico para determinação de ácido salicílico em leite utilizando spot tests em papel e processamento de imagens digitais				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Construção de plataformas ópticas portáteis, versáteis e de baixo custo para sensoriamento de vapores e gases em diferentes atmosferas				

Reuniu-se no Auditório Professor Manuel Gonzalo Hernández Terrones, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores Sidnei Gonçalves da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia; Vanessa Nunes Alves, da Universidade Federal de Catalão e João Flávio da Silveira Petrucci, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. João Flávio da Silveira Petrucci, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **João Flávio da Silveira Petrucci, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/07/2022, às 19:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sidnei Gonçalves da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/07/2022, às 08:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Nunes Alves, Usuário Externo**, em 26/07/2022, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3705815** e o código CRC **462A7FED**.

*Agradeço-Vos, ó Senhor, por me acompanhades nas
adversidades e labutas da vida: nada temo
quando Vos tenho no meu coração.*

“Tudo é possível com a Vossa graça.”

Diário de Santa Faustina

Quando eu contei meus sonhos para alguém
Me disseram: São grandes demais pra você
Quando falei onde queria chegar
Me disseram: Pare por aqui, não vá além
Mas com Deus foi bem diferente
Ele me disse: Vá em frente, eu contigo estou
Quando eu senti medo de seguir
Disse: Prossiga, eu te fiz pra ser um vencedor
Desde então eu nunca mais me limitei
Eu guardei no coração as palavras de Deus
Descobri que os planos Dele para mim
São muito maiores que os meus.

'Deus e Eu-Leandro Borges

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação ao meu bom Jesus e a minha amada Nossa Senhora, que em todos os momentos se fez presente, a me guiar, me iluminar e a me sustentar, ao meu pai José Heitor a minha mãe Beatriz Nazaré, ao meu esposo Daniel, minha irmã Jaciara e a minha sobrinha Maria Alice, a minha avó Antônia Augusta, ao Professor Dr. João Flávio e a todos os amigos que acompanharam e contribuíram nessa tão importante e especial etapa.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão é imensa por ti Jesus, por ter sido minha força, aquela o qual eu posso sempre contar mediante as adversidades que surgem, por me dar coragem, e a não me deixar desistir nas noites escuras e nos desafios quase sempre presentes na minha caminhada. Te agradeço Senhor pelo teu amor, pela tua graça, pela tua misericórdia, por tudo que Tu és e por tudo que fazes na minha vida. Sejas louvado, e adorado para sempre! Não posso deixar de expressar minha gratidão aquela que é minha grande intercessora, a Virgem Maria, que sempre zelou por mim em todos os momentos de ansiedade e em todas as minhas lutas.

À minha família, meus amados pais Beatriz e José Heitor que a distância geográfica que nos cerca nunca foram empecilhos para o apoio, a força, motivação, incentivos e pelas orações constantes. Mamãe e Papai, obrigada por tudo, amo vocês. A minha irmã Jaciara que nunca mediu esforços e amor por mim, e a minha sobrinha meio raio de sol Maria Alice, que me contagia e me faz feliz.

Ao meu sócio de vida, que sempre esteve ao meu lado, sendo eles de lutas e ou de glória, agradeço pelo seu apoio, paciência e pela força e por sempre acreditar que eu seria capaz de chegar onde almejo, Daniel Conrado (mô) obrigada pela dedicação diária, e a minha “companheirona de estudos” minha filha de quatro patas, Luna.

Aos meus avós e, em especial à Vó Fiinha e ao vô Cabo, pelo amor desde antes de eu nascer, por estar presente em todas as minhas atividades escolares do ensino médio, e pelo incentivo de vencer na vida pelos estudos. Aos meus tios (as) primos(as), por serem a melhor família que existe, pela credibilidade e amor em mim depositado, em especial dedico a minha prima Ana Beatriz a quem tenho muito amor.

Agradeço, em especial, ao meu Orientador Professor Dr. João Flávio, por toda confiança e parceria, por ter me acolhido e me ajudado nos momentos de dificuldade científica e pessoal. A sua proatividade, profissionalismo, competência, assistência, acessibilidade e compreensão se tornaram para mim uma referência muito positiva. Muito obrigada por tudo, João!

Aos membros da banca, Prof. Dra. Vanessa Nunes Alves e ao Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva, por aceitarem o convite em participar do meu exame de defesa do mestrado e por todas as contribuições para este trabalho concedidas.

Aos docentes e funcionários do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, pelo espaço físico concedido. À CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

Aos colegas de laboratório que compartilharam comigo de mesmo ideal e contribuíram para o meu processo de ensino aprendizagem. Em especial, Babi, Flávia, Dani, Vanderli, Caio, Geandre, Dalila, Raul, Arlene e Lais, aqueles os quais chamo de amigos e compartilhei dores e alegrias, sendo um o alicerce do outro, tornando a missão mais leve.

Por fim, ressalto que, mencionar nomes de todos os que contribuíram para fazer deste trabalho não é simples, pois indireta ou diretamente muitas pessoas contribuíram para o sucesso deste trabalho. Portanto, agradeço aos demais aos que não os mencionei aqui.

Gratidão.

RESUMO

O leite é um produto amplamente consumido em escala global e diferentes práticas de adulteração e fraudes são relatadas. A adição de Ácido Salicílico (AS) configura como adulteração pois é utilizada para diminuir o crescimento de microrganismos, resultando no aumento do valor agregado do leite. Entretanto, sua ingestão em excesso pode causar patologias gastrointestinais e, inclusive, levar ao óbito. Geralmente, os métodos analíticos oficiais são trabalhosos, demorados e caros, o que limita a utilização em análises de rotina. Em decorrência disso, o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para análise de leite é de grande relevância. A presente dissertação apresenta o desenvolvimento de um método analítico simples, rápido, miniaturizado, portátil e de baixo custo para determinação de ácido salicílico em leite. O método foi baseado na formação de um complexo colorido após a reação entre o analito e íons Fe(III) realizada em papel de filtro. A quantificação foi realizada pela técnica de processamento de imagens digitais em diferentes tipos de leite. O método desenvolvido apresentou linearidade de AS em função do parâmetro de escala de cinza em faixas de concentração de 100 a 1200 mg L⁻¹ para solução padrão de AS em etanol, 100 a 1500 mg L⁻¹ (R² = 0,9908) para leite cru, 300 a 2000 mg L⁻¹ (R² = 0,9916) para leite desnatado, 500 a 2000 mg L⁻¹ (R² = 0,991) para leite em pó, 100 a 2000 mg L⁻¹ (R² = 0,9917) para leite integral, e 100 a 1500 mg L⁻¹ (R² = 0,9937) para leite zero lactose. A exatidão do método foi obtida pela avaliação da porcentagem de recuperação e foi obtido valores entre 71 e 120%. A precisão do método foi avaliada com a determinação de AS em 12 amostras de leite desnatado fortificadas com concentração de 500 mg L⁻¹ e apresentou coeficiente de variação de 0,7%. As amostras de leite submetidas ao método desenvolvido foram adquiridas no comércio local e o leite cru foi coletado na zona rural de Iturama. A presença do AS não foi detectada em nenhuma das amostras avaliadas. A avaliação dos parâmetros analíticos obtidos e a aplicação em diferentes amostras de leite resultou em um método analítico simples, miniaturizado e sem etapa de preparo de amostras para determinação de AS em leite como ferramenta para identificação de práticas de adulteração.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido Salicílico, leite, reação colorimétrica, adulterações, RGB.

ABSTRACT

Milk is a widely consumed product on a global scale and different practices of adulteration and fraud are reported. The addition of Salicylic Acid (SA) configures as adulteration because it is used to reduce the growth of microorganisms, resulting in the increased added value of milk. However, its excessive intake can cause gastrointestinal pathologies and even lead to death. Generally, official analytical methods are laborious, time-consuming, and expensive, which limits their use in routine analysis. As a result, the development of alternative analytical methods for milk analysis is of great relevance. This dissertation presents the development of a simple, fast, miniaturized, portable, and low-cost analytical method for the determination of salicylic acid in milk. The method was based on the formation of a colored complex after the reaction between the analyte and Fe(III) ions performed on filter paper. The quantification was performed by the technique of processing digital images in different types of milk. The developed method showed linearity of SA as a function of the ash scale parameter in concentration ranges from 100 to 1200 mg L⁻¹ for standard solution of AS in ethanol, 100 to 1500 mg L⁻¹ ($R^2 = 0.9908$) for raw milk, 300 to 2000 mg L⁻¹ ($R^2 = 0.9916$) for skimmed milk, 500 to 2000 mg L⁻¹ ($R^2 = 0.991$) for powdered milk, 100 to 2000 mg L⁻¹ ($R^2 = 0.9917$) for whole milk, and 100 to 1500 mg L⁻¹ ($R^2 = 0.9937$) for zero lactose milk. The accuracy of the method was obtained by evaluating the percentage of recovery and values between 71 and 120% were obtained. The accuracy of the method was evaluated with the determination of SA in 12 samples of skimmed milk fortified with a concentration of 500 mg L⁻¹ and showed a coefficient of variation of 0.7%. The milk samples submitted to the developed method were acquired in the local trade and raw milk was collected in the rural area of Iturama. The presence of SA was not detected in any of the samples evaluated. The evaluation of the analytical parameters obtained and the application in different milk samples resulted in a simple analytical method, miniaturized and without sample preparation for determination of SA in milk as a tool for identification of adulteration practices.

KEYWORDS: Salicylic acid, milk, colorimetric reaction, adulterations, RGB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Química do Ácido Salicílico	20
Figura 2 - Representação dos modelos de cor RGB.....	29
Figura 2 - Cubo 3D de cores RGB, e representação da escala de cinza (EC), localizada entre as colorações pretas (0, 0, 0) e a coloração branca (1, 1, 1)	29
Figura 4 - Reação de formação do complexo ocorrendo entre o Fe(III) e o AS.	31
Figura 5 - Fluxograma da fabricação dos μ PADs	34
Figura 6 - Fluxograma do Tratamento da imagem usando software ImageJ	35
Figura 7 - Interface do software de obtenção dos valores de RGB	35
Figura 8 - Teste qualitativo da obtenção do complexo AS-Fe(III).....	36
Figura 9- Espectros de absorção obtidos entre os comprimentos de onda de 200 a 600 nm para (a) 400 a 600 nm (b) a formação de AS-Fe(III) nas concentrações de AS $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $5.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e de Fe(III) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$	38
Figura 10 - Estrutura química do ácido láctico.....	39
Figura 11 - Teste qualitativo da reação do ácido láctico com o Fe(III).....	40
Figura 12 - Teste da utilização do papel como substrato para a reação colorimétrica	41
Figura 13 - Avaliação qualitativa da ordem da adição dos reagentes Fe(III).....	41
Figura 14 - Estudo da variação do sinal analítico em função da concentração de Fe(III).....	44
Figura 15 – Estudo da variação do sinal analítico em função do tempo de escaneamento do μ PAD	45
Figura 16 - Curvas analítica da solução padrão.....	47
Figura 17 - Avaliação da interferência de matriz, pela relação da curva analítica do padrão de AS e pela amostra de leite zero lactose	47
Figura 18 - Curvas analíticas em amostras de leite (Integral, desnatado, em pó, zero lactose e cru)	48
Figura 19 - Estudo comparativo entre o método oficial para a análise de ácido salicílico em leite aplicado na Índia.....	54
Figura 20 - Estudo do comportamento do sinal analítico no período de 15 dias sobre a estabilidade do AS como conservantes no leite cru, leite zero lactose e leite em pó	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre alguns métodos já descritos na literatura para determinação de AS em amostras de alimentos.....	24
Tabela 2 – Avaliação quantitativa do sinal analítico (EC branco - EC sinal) pela ordem de adição do Fe(III)	42
Tabela 3 – Estudo do diâmetro do μ PADs por meio das linearidades e do LD	43
Tabela 4 - Influência da ordem da adição dos reagentes nas amostras de leite.....	46
Tabela 5 - Valores de recuperação obtidos para amostras de leites fortificadas	52
Tabela 6 - Estudo da estabilidade do sinal analítico do AS nas amostras de leite cru, leite zero lactose e leite em pó.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS - Ácido acetilsalicílico

AS - Ácido Salicílico

ASA - Aspirina

GLC – Cromatografia gás-líquido

CMY- Cyan, Magenta and Yellow (do português: Ciano, Magenta, Amarelo)

CMYK - Cyan, Magenta, Yellow and Black (do português: Ciano, Magenta, Amarelo e Preto)

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-EM - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

μPADs - Dispositivos Analíticos Microfluídicos à Base de Papel

EC - Escala de cinza

HTST - High Temperature and Short Time (do português: alta temperatura e curto tempo)

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (do português: Cromatografia líquida de alta performance)

HPLC-MS - High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (do português: Cromatografia líquida de alta performance - espectrometria de massa)

HSI - Hue, Saturation, Intensity (do português: Matiz, Saturação, Intensidade)

ICH - International Conference on Harmonization

Lab - Luminosidade, a e b

LD – Limite de Detecção

LTLT - Low Temperature Long Time (do português: Baixa Temperatura e Longo Tempo)

RGB - Red, Green and Blue (do português: Vermelho, verde e azul)

UHT - Ultra High Temperature (do português: Temperatura Ultra Alta)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	O CONSUMO E A QUALIDADE DO LEITE	17
1.2	ÁCIDO SALÍCILICO.....	19
1.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AS	21
1.4	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE PROCEDIMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DE AS MATRIZES DIVERSAS.	22
1.5	DISPOSITIVOS ANALÍTICOS MICROFLUÍDICOS À BASE DE PAPEL (μ PADS).....	26
1.5.1	<i>Detecção Colorimétrica</i>	27
1.5.2	<i>Uso de modelos de cores RGB para aplicações analíticas</i>	28
1.6	REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO DO FERRO (III) E AS.....	31
2	OBJETIVO GERAL	32
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	- MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1	INSTRUMENTAÇÃO E MATERIAIS.....	33
3.1.1	<i>Fabricação dos μPADs</i>	33
3.1.2	<i>Obtenção das imagens digitais e tratamento dos dados</i>	34
3.2	AMOSTRAS DE LEITE.....	35
3.3	PARÂMETROS ANALÍTICOS AVALIADOS	36
4	RESULTADOS.....	36
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REACIONAIS ENTRE Fe(III) E AS EM SOLUÇÃO ...	36
4.2	OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO 37	
4.3	ESTUDO QUALITATIVO DO ÁCIDO LÁCTICO COMO UM POSSÍVEL INTERFERENTE NA REAÇÃO	38
4.4	OTIMIZAÇÕES DOS μ PADS PARA UTILIZAÇÃO COMO SUBSTRATO DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA	40
4.4.1	<i>Influência da ordem da adição dos reagentes no padrão</i>	41

4.4.2	<i>Avaliação do diâmetro da zona circular reacional μPADs</i>	42
4.5	ESTUDO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO (III)	43
4.6	ESTUDO DA ESTABILIDADE DO SINAL ANALÍTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO	44
4.7	INFLUÊNCIA DA ORDEM DOS REAGENTES EM AMOSTRAS DE LEITE.....	45
4.8	OBTENÇÃO DAS FIGURAS ANALÍTICAS DO MÉTODO	46
4.8.1	<i>Linearidade</i>	46
4.8.2	<i>Exatidão</i>	51
4.8.3	<i>Precisão</i>	52
4.9	COMPARAÇÃO COM O MÉTODO OFICIAL QUALITATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE AS EM AMOSTRAS DE LEITE	53
4.10	ESTABILIDADE DO ÁCIDO SALICÍLICO EM AMOSTRAS DE LEITE	54
4.11	APLICAÇÃO NAS AMOSTRAS	56
	5- CONCLUSÕES	58
	6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 O consumo e a qualidade do leite

O leite é um produto de grande importância na alimentação diária devido ao seu elevado valor nutritivo e por ser fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas. O alto valor nutricional se deve a qualidade de suas proteínas, que são divididas em caseínas (α_1 , α_2 , β , γ e κ), proteínas do soro (albumina, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas e proteose-peptonas), além do teor elevado de cálcio, fósforo, magnésio, vitamina A, riboflavina e niacina ¹. O leite é definido como o produto derivado da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias bem alimentadas e descansadas.

A classificação do leite em tipos A, B ou C foi criada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e essa divisão não está relacionada com o valor nutricional de cada leite, mas a forma como o gado leiteiro é criado nas fazendas e como o leite é coletado e tratado depois da ordenha. Além disso, o impacto de cada etapa na qualidade sanitária, ou seja, na quantidade de bactérias lácticas presentes no produto final também é considerado na classificação². O tipo A é ordenhado, refrigerado e pasteurizado imediatamente a coleta e não há interferência do contato humano no processo, já que é todo mecanizado. O do tipo B também possui ordenha mecânica, porém o transporte do leite poderá ocorrer em um tempo maior e poderá ser transportado e envasado em outros locais, sendo assim, o leite do tipo B acaba tendo um número maior de bactérias do que o leite A quando se inicia a pasteurização. A produção do leite tipo C tem sido desestimulado pelo MAPA, uma vez que, o tempo permitido para o transporte é longo e a ordenha é manual, podendo sofrer maiores riscos de contaminação. O tipo C possui maior contagem microbiana dentre os tipos de leites reportados ^{2,3}.

Além de o leite ser consumido diretamente, a demanda do leite é elevada devido aos seus produtos derivados ⁵. O leite é uma das principais commodities agropecuárias mais importantes do mundo, sendo uma das indústrias mais expressivas no país ⁴. No Brasil, o mercado de derivados do leite é importante, porém, o maior consumo ocorre na forma de leites fluidos ⁶. No ano de 2018, o consumo de leite per capita no Brasil foi de 166,4L/hab, cujo valor está abaixo do consumo de países desenvolvidos que é de 250-300 L/hab. Este consumo coloca o leite como o segundo segmento mais importante da indústria de alimentos. Segundo os dados do IBGE, nos anos de 2019 e 2020 o consumo per capita de leite aumentou respectivamente, para 168,7 L/Hab e 171,6 L/Hab^{7,8}.

De acordo com órgãos oficiais do Brasil, o leite com a classificação “sob inspeção” é aquele que é liberado ao comércio mediante vistorias e fiscalizações. O leite que é inspecionado apresentou um aumento anual de consumo de 2,1% do ano de 2019 para o ano de 2020, sendo o maior aumento da última década. Alguns setores industriais foram prejudicados durante a pandemia, porém, o setor de laticínios não foi afetado consideravelmente. Foi obtido uma queda de 1,3% na comercialização de leite sem registo durante este período^{8,9}.

É importante ressaltar ainda que muitos produtores são considerados de pequeno porte, atuando no mercado informal, na forma *in natura* sem qualquer tipo de tratamento térmico e de fiscalização sobre o leite^{9,10}.

A produção de leite no Brasil tem a maior parte destinada ao mercado de leite fluido e a de seus derivados lácteos, principalmente os queijos, iogurtes e os doces. O leite fluido difere-se pelos tratamentos térmicos recebidos, podendo ser por pasteurização lenta (LTLT - “Low Temperature Long Time”) – com temperatura mantida em 63° durante 30 min – rápida (HTST - “High Temperature and Short Time”) – com aquecimento variando de 75-120°C durante 15 seg – ou muito rápida (UHT - “Ultra High Temperature”) com temperatura de 135° C por 4 seg. É necessário frisar que o leite UHT se difere do leite pasteurizado no processamento e não na origem^{11,12}.

A qualidade físico-química do leite é associada ao seu estado de conservação, tratamento térmico e integridade física, principalmente, aquela relacionada à adição ou remoção de substâncias próprias ou estranhas a sua composição¹³. A adição de alguns tipos de substâncias químicas não acarreta, necessariamente, em alterações significativas dos parâmetros físico-químicos do produto, portanto, os testes básicos de rotina são ineficazes para identificar se uma substância foi adicionada ao leite¹⁴.

De forma geral, a grande maioria dos alimentos são alvos da adição de diversos tipos de substâncias químicas com o propósito de adulterar a composição original do produto para benefício ilícito^{17,18}. No caso específico do leite, devido ao fato de se tratar de uma matéria-prima composta por uma grande variedade de substâncias, a modificação da sua composição por adição e/ou a substituição por outros ingredientes não lácteos é uma prática recorrente.^{19,20} Portanto, a legislação brasileira define como leite fraudado aquele que for adicionado ou subtraído de qualquer dos seus componentes ou se substâncias são adicionadas com objetivo de, por exemplo, aumentar o prazo

de validade do produto. Além disso, é considerado fraude se o leite for comercializado como sendo de uma categoria diferente ao rotulado ¹¹.

A adulteração de alimentos é uma prática comum para o azeite de oliva, peixes, produtos vegetais com denominações de orgânicos, leite, grãos, mel, café, chás, especiarias, vinho e sucos ²². Portanto, o cumprimento da legislação visa assegurar a qualidade do produto que chega ao consumidor, como alimento saudável e nutritivo, além de garantir as boas condições dos produtos derivados. A adulteração do leite é uma prática criminosa, negligente e abusiva. Ressalta-se que qualquer substância adicionada ou retirada do leite é considerada fraude, e a única substância que é permitida a sua retirada é a gordura. Essa retirada é permitida apenas se for realizada por indústrias, visto que a legislação não permite o desnate na propriedade rural. Esta prática é para que possam oferecer ao consumidor leites com diferentes porcentagens de gordura, ou seja, o leite integral, o semidesnatado e o desnatado²².

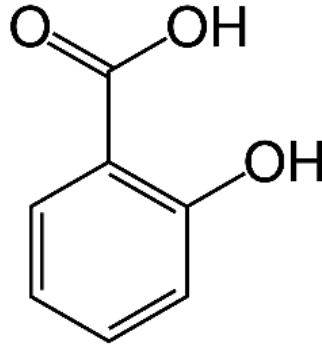
Um dos parâmetros importantes para o controle de qualidade do leite é a contagem de bactérias totais, uma vez que quanto menor o nível de contaminação microbiana maior será o valor agregado ao produtor pelo litro de leite. A adição de conservantes é uma forma de diminuir a contaminação e, por consequência, obter maior remuneração no leite produzido¹⁶. Define-se como conservante uma substância que tem a finalidade de inibir o crescimento de microorganismos durante a fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso¹⁵. As principais substâncias usadas como conservantes são formaldeído, água oxigenada, ácido bórico, ácido salicílico, hipocloritos e cloraminas, ácido benzoico e bissulfitos ¹⁴. O uso de alguns conservantes em alimentos é permitido, como por exemplo o sulfito, desde que dentro dos limites regulamentados pela ANVISA. A identificação dos conservantes pode ser realizada por métodos qualitativos oficiais descritos na Instrução Normativa Nº 68 do MAPA (2006). Estas substâncias podem causar efeitos adversos sérios à saúde e, além disso, interferem negativamente na produção de derivados lácteos na indústria, pois dificultam a coagulação do leite que é um processo utilizado por exemplo na fabricação dos queijos, requeijões entre outros.

1.2 Ácido Salicílico

O Ácido Salicílico – 2-hidroxibenzóico ou ácido o-hidroxibenzóico, Figura 1 – é um ácido orgânico com $pK_{a1} = 3,0$, e o $pK_{a2} = 13,0$, possui fórmula molecular $C_7H_6O_3$ e massa molar de

138,12 g/mol. É geralmente encontrado na forma de pó cristalino de cor branca, é pouco solúvel em água (2 g/L em 20 °C) e muito solúvel em etanol e éter^{25,101}.

Figura 1 - Estrutura Química do Ácido Salicílico



Fonte: A autora

Nas plantas, o AS atua na regulação de alguns processos fisiológicos como a germinação das sementes, fechamento dos estômatos²⁶. O AS é o composto pertencente aos salicilatos e³⁷ e atuam como uma molécula sinalizadora em respostas de defesa a resistência de vários patógenos em muitas espécies de plantas.

No setor de cosméticos e produtos de higiene pessoal, é bastante utilizado na fabricação de shampoos, sabonetes e cremes de rejuvenescimento facial, entre outros²⁹, bem como insumo base para a fabricação de salicilatos para a indústria química entre outras áreas³⁰. Também possui propriedade bacteriostática, ou seja, pode ser usado como desinfetante e conservante, porém, somente para uso tópico³¹. Em uso tópico, a dosagem em concentrações acima de 35 mg dL⁻¹ pode levar ao Salicilismo, uma intoxicação causada por ácido salicílico e seus derivados, que possuem os seguintes sintomas: náuseas, vômitos, vertigens ou tonturas, hiperatividade, aumento da temperatura e, por vezes, convulsões.

Na indústria farmacêutica, é usado para a síntese do fármaco ácido acetilsalicílico (AAS) que é um anti-inflamatório não esteroideal comumente utilizado pelas suas propriedades analgésicas e antitérmicas²⁷. O AS é o principal metabólito do medicamento AAS. Este é hidrolisado para salicilatos no estômago e, desta forma, é incorporado na circulação sanguínea. O AS pode ser introduzido na cadeia alimentar de animais em pequenas quantidades ($\mu\text{g kg}^{-1}$) acarretando na presença em níveis traços no leite³⁸. A utilização destes salicilatos, seja na forma de AS ou AAS,

nos animais que produzem leite para consumo humano é proibido pela legislação brasileira e internacional^{21,98,99}.

O ácido salicílico tem sido empregado em fraudes de produtos lácteos com o intuito de aumentar a vida útil do produto³⁹. Se ingerido por via oral, o ácido salicílico é absorvido rapidamente e pode atingir um valor de pico em cerca de 1 hora⁴⁰. Essa ingestão é prejudicial à saúde humana, pois pode provocar irritação gastrointestinal, tem efeito cumulativo no corpo e em elevadas doses pode danificar o revestimento do estômago e dos intestinos, causando úlceras no estômago e nos intestinos, pressão arterial baixa e choque⁴¹.

1.3 Métodos analíticos para determinação de AS

A adição de conservantes como o AS podem gerar efeitos negativos à saúde humana se ingeridos em grande quantidade. Portanto, a legislação que regula a presença dessas substâncias deve ser cumprida, é necessário o desenvolvimento de métodos para análise dessas adulterações. Diversos métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de AS em amostras de leite, sendo que as técnicas de separação (cromatografia) são as mais usadas para esse fim. Na literatura é possível encontrar trabalhos em que a determinação de AS é demonstrada em diferentes matrizes.

Amostras de leite bovino e de tecido muscular foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM). O método para determinação de AS envolveu duas etapas de preparo de amostra antes da injeção no sistema cromatográfico: precipitação das proteínas e extração em fase sólida. O limite de detecção (LOD) obtido nas amostras de leite foi de $11,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ e nas amostras de tecido muscular de $7,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ ⁴¹.

Sistemas de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica foram utilizados para a determinação de AS em amostras de leite UHT desnatado, leite de vaca cru e leite de cabra desnatado. O método baseou-se na reação de complexação do Fe(III) com o AS, obtendo uma faixa de trabalho entre $103,6$ e 415 mg L^{-1} ⁴². As técnicas eletroquímicas também podem ser empregada para a determinação de AS. Um biossensor amperométrico foi utilizado para determinação de AS em amostras de plasma e de leite, por meio da oxidação eletrocatalítica do AS tendo um eletrodo de disco de grafite revestido com polipirrol e tecido de banana como fonte de polifenol oxidase. O bioeletrodo modificou apresentou uma faixa linear de AS de $1,0 \times 10^{-7}$ até $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $8,9 \times 10^{-8} \text{ M}$ por voltametria de pulso diferencial⁴³.

1.4 Parâmetros analíticos de procedimentos para determinação de AS matrizes diversas.

Todavia, essas técnicas são de custo relativamente alto, utilizam grandes volumes de reagentes e solventes, necessitam de etapas complexas e demoradas de pré-tratamento de amostra, que geralmente envolvem a precipitação de proteínas e a remoção de gordura. Este tratamento é importante para evitar a retenção irreversível dos componentes da amostra em colunas cromatográficas ou dispersão de luz nas técnicas espectrofotométricas. Além disso, apresentam riscos de adsorção de espécies nas superfícies dos eletrodos e entupimento dos dispositivos de introdução de amostras em espectrometria atômica ⁴⁴. Levando em consideração as desvantagens mencionadas, o desenvolvimento de uma proposta que se mostre mais simples, barata, com menor consumo de reagentes e que não necessite de etapa de preparo da amostra se faz necessária.

A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos da literatura que determinaram esse analito em amostras de leite, frutas, plasma e vegetais. Dos oito trabalhos descritos na Tabela 1, três realizaram estudos em amostras de leite, o leite é uma amostra que pode ser bastante explorada quanto a determinação de AS, principalmente no que se refere a métodos mais simples, miniaturizadas que apresentem um custo menor e que não sejam necessárias etapas de tratamento das amostras. Os três trabalhos necessitaram de instrumentações caras como o CLAE-EM, ou de preparo de amostras demoradas, salvo a proposta por injeção em fluxo que se trata de apenas uma diluição.

Gentili e colaboradores demonstraram a dificuldade que existem em análise de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) em alimentos e amostras biológicas, pois existem fortes interações não covalentes estabelecidas com as proteínas da matriz e a quantidade de material gorduroso que ocorre. Sendo necessário, na maioria das vezes, algumas etapas de preparo de amostra. Desenvolveu-se um procedimento de extração para isolar 15 anti-inflamatórios AINEs (acetaminofeno, ácido salicílico, ibuprofeno, diclofenaco, flunixinina e seu metabólito 5-hidroxi-flunixinina, nimesulida, fenilbutazona, ácido meclofenâmico, ácido tolfenâmico, meloxicam, carprofeno, cetoprofeno, naproxeno e etodolaco). Devido à complexidade das amostras de leite e do tecido muscular bovino foram necessárias duas etapas sucessivas de tratamento dessas amostras: (a) desproteinização/extração com solvente orgânico, essencial para diminuir a constante dielétrica do meio e, portanto, liberar os analitos da matriz; (b) Limpeza de SPE em cartuchos. Como técnica de detecção utilizou a cromatografia de fase reversa de pareamento de íons combinada com a detecção de eletrospray negativa, sendo capaz de alcançar baixas capacidades de detecção (CC_βs)

para todos os analitos e, em particular, para diclofenaco cujo Limite Máximo de Resíduos (LMR) no leite é de $0,1\mu\text{g kg}^{-1}$ ⁴¹.

Tabela 1 - Comparação entre alguns métodos já descritos na literatura para determinação de AS em amostras de alimentos.

Amostras	Preparo das amostras	Técnica instrumental	Faixa Linear	LOD (mg L⁻¹)	Recuperação (%)	CV (%)	Ref.
Leite bovino e tecido muscular	Acetonitrila, vórtex sonicação, centrifugação, evaporação de solvente centrifugação, SPE	CLAE-EM/EM	<4.5	0,0112	100	5	[41]
Plasma e leite bovino	Metanol + água centrifugação e ajuste de pH	Amperometria	0.013- 13.8	0,0123	97	-	[43]
Leite bovino	Diluição com água	FIA	100–403	2,58	95 – 107.5	2.2	[42]
Em conserva (manga, tamarindo, mostarda verde, bambu)	Diluição /aquecimento (80 ° C) + agitação + centrifugação + diluição	Espectrofotometria UV-Vis	100–9000	50	-	7(1.03) 14(1.69) 21(82,98)	[78]
Folhas de tomate	Congelamento com nitrogênio 80°C, ajuste de pH, agitação, extração e centrifugação	Eletroquímica	0,138- 0,16574	0,1387	92-98	4,8	[79]

Cana-de açúcar, milho, folhas de soja		CLAE-FL	0,1- 4,0	0,03	85-110	3	[80]
Alimentos em conserva (mostarda verde, brotos de bambu, manga, limão, gingibre) e suco de maçã	Filtradas, tamponadas, mantidas em refrigeração 4°.	Eletroquímica	0,138- 27,9	0,122	84-113%.	3	[81]
Vegetais	Liofillização,pulverização, homogeinização e extração	HPLC-FL	0,02- 200	0,021	88- 97	4	[82]

1.5 Dispositivos Analíticos Microfluídicos à Base de Papel (μ PADs)

A utilização de dispositivos microfluídicos é uma estratégia atraente para o desenvolvimento de métodos analíticos miniaturizados. Define-se como microfluídica a ciência e tecnologia de sistemas que manipulam volumes de fluidos na ordem de 10^{-9} a 10^{-18} litros, utilizando canais de dimensões de dezenas e centenas de micrômetros, com aplicação em áreas biológicas, medicinais, eletrônicas e química^{45,46}. Algumas características importantes devem ser levadas em consideração para a fabricação dos dispositivos microfluídicos, tais como: custo, propriedades ópticas e/ou elétricas, biocompatibilidade, facilidade de fabricação e integração e a viabilidade de produção em grande escala. A aplicação do dispositivo é que irá direcionar qual processo de fabricação se faz mais adequado, podendo ser fabricados a partir de vidro, silício, polímeros, papel, entre outros, ou até mesmo por uma combinação destes materiais⁴⁷.

Uma proposta atrativa para fabricação de dispositivos microfluídicos é o uso do papel como substrato. Seu uso é bastante vantajoso, principalmente pelo fato de o papel ser um material barato, acessível, sustentável, versátil, fácil manuseio e descarte, além de apresentar uma estrutura porosa que permite o transporte do fluido de amostra por capilaridade^{45,48}. A utilização de papel como substrato para a realização de reações colorimétricas foi bastante explorada por Fritz Feigl, um dos pioneiros nessa área. Ele estudou a reatividade de analitos orgânicos⁴⁹ e inorgânicos⁵⁰ com diferentes reagentes em papel de filtro, que foi denominado como spot tests em papel⁵¹. Em 2007, o grupo de pesquisa do Professor George M. Whitesides apresentou o uso papel como substrato para a fabricação de dispositivos microfluídicos, originando os *microfluidic paper-based analytical devices* (μ PADs)⁴⁸.

Os μ PADs são fabricados por meio da criação de barreiras físicas utilizando diversos materiais de caráter hidrofóbico sobre um papel cromatográfico ou papel de filtro⁵². De acordo com o desenho utilizado, o fluido irá percorrer o papel pelos canais criados pelas barreiras fabricadas. Um dos métodos para criação das barreiras é por meio da impressão de cera. O procedimento possui a seguinte sequência: desenha-se a geometria desejada com o auxílio de um software gráfico e a cera hidrofóbica é depositada na superfície do papel pela impressora a cera. Para que a cera se espalhe e penetre nos poros do papel, de maneira a formar barreiras hidrofóbicas, o papel é aquecido usando uma chapa/placa ou uma estufa. Este procedimento é uma alternativa simples, que permite produzir uma grande quantidade de dispositivos em uma única impressão⁵³.

O uso de microdispositivos impressos pelo método de cera para aplicações analíticas colorimétricas envolvendo o leite foi previamente descrito na literatura. Um método desenvolvido foi utilizado para a detecção qualitativa de ureia, detergente e os neutralizadores do tipo carbonatos e bicarbonatos em amostras de leite de vaca e de búfala. Os autores adicionaram intencionalmente os adulterantes à amostra como um controle para demonstrar a viabilidade analítica dos μ PADs ⁵⁴. Outra proposta foi desenvolvida para quantificar sulfonamidas no leite e a reação colorimétrica utilizada foi entre a anidrase carbônica (CA) e acetato de 4-nitrofenil. A metodologia apresenta-se com uma boa linearidade ($R^2 = 0,986$) na faixa linear de sulfonamidas no leite de 2,5 a 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, indicando uma boa seletividade para os medicamentos mesmo em uma matriz altamente complexa ⁵⁵.

1.5.1 Detecção Colorimétrica

Os métodos colorimétricos têm como princípio a determinação de um analito em função da mudança de cor provocada a partir de uma reação utilizando um reagente colorimétrico ⁵⁹. Para se obter um melhor sinal analítico no método colorimétrico, a escolha do reagente com alta seletividade ao analito é essencial. Pode-se classificar os reagentes colorimétricos em função do tipo de interação, tais como: indicadores ácido-base, agentes precipitantes com íons metálicos, reagentes solvatocrômicos, indicadores redox, agentes de complexação, entre outros ⁶⁰.

Uma reação colorimétrica pode ser aplicada de forma qualitativa e quantitativa. A mudança de cor provocada pela adição de um reagente é um indício qualitativo da presença de uma determinada substância. Do ponto de vista quantitativo, a quantidade de luz absorvida pela solução contendo a reação colorimétrica é medida pela técnica de espectrofotometria de absorção no UV-Vis. Essa técnica espectrofotométrica clássica se baseia na medição da quantidade luz transmitida pela amostra após a incidência de radiação de comprimento de onda adequado. A quantidade de luz absorvida – denominada de absorbância – é a razão logarítmica entre a intensidade de luz transmitida pela solução da amostra e a intensidade de um solução referência (transmitância total). Pela lei de Lambert-Beer, a concentração da espécie absorvedora é proporcional a absorbância ⁶¹.

Uma abordagem de baixo custo, portátil e de fácil manuseio para a aplicação quantitativa das reações colorimétricas é a utilização de dispositivos eletrônicos de aquisição de imagens digitais, extração da informação de intensidade de cor e a sua relação com a concentração do analito. Dentre as diversas aplicações dessa abordagem, é possível encontrar trabalhos relacionados

às áreas de análise ambiental ⁶², bioanalítica ⁶³ e análises de alimentos ⁶⁴ utilizando diferentes tipos de substratos para a realização das reações. Um exemplo é a determinação de glicose e proteínas totais, por meio da oxidação enzimática do iodeto a iodo, onde a mudança de cor se dava do incolor para marrom em decorrência da presença da glicose. Para as proteínas totais, a cor foi gerada quando o reagente azul de tetrabromofenol (do inglês tetrabromophenol blue, BHT) sofre ionização e liga-se às proteínas, ocasionando uma alteração de cor de amarelo para azul ⁶⁵.

Outro método desenvolvido utilizou μ PADs para a determinação simultânea de ureia, H_2O_2 e pH em 16 amostras de leite. O dispositivo foi construído com três zonas de detecção interligadas a zona de amostragem, utilizando o tratamento de imagens digitais. O método apresentou uma faixa linear nos intervalos de concentração de 0–30,0 mmol L⁻¹, 0–10,0 mmol L⁻¹ e 6,0–9,0 para ureia, H_2O_2 e pH, respectivamente. Os valores de limite de detecção obtidos para ureia e H_2O_2 foram de 2,4 mmol L⁻¹ e 0,1 mmol L⁻¹, respectivamente. Para as medidas de pH, o ensaio colorimétrico permitiu o monitoramento do pH da solução com resolução de 0,25 unidades. A reprodutibilidade apresenta-se como adequada (RSD \leq 6,0%), precisão (91–102%) ⁶⁶.

1.5.2 Uso de modelos de cores RGB para aplicações analíticas

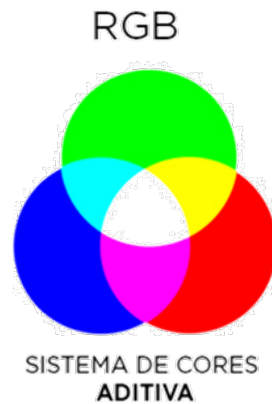
A utilização de processamento de imagens digitais obtidas para fins quantitativos é possível devido a extração da informação de intensidade de cor usando modelos de cores computacionais. Diversos modelos são existentes, tais como RGB, CMY, HSV e outros, porém, o RGB é o mais utilizado pelos sistemas de aquisição de imagens.

Um dispositivo eletrônico representa uma cor por meio da conversão de uma informação digital em intensidade de cor. De forma geral, a informação digital é obtida pelo modelo de cor utilizado. Um modelo de cores é a representação tridimensional onde cada cor tem sua representação em um ponto do sistema de coordenadas cartesianas. Os modelos mais usados para representar as cores são: RGB (do inglês: red, green and blue), CMY (do inglês: cyan, magenta and yellow) e CMYK (variante do modelo CMY, onde k denota Black), HSI (do inglês: hue, saturation, intensity) e Lab (Luminosidade, a e b) ^{67,68}.

Dentro do contexto da química analítica, para que seja possível a quantificação por meio de reações colorimétricas, é necessário transformar a cor em um parâmetro numérico, que seja proporcional a concentração do analito. Um dos modelos utilizados para representar as cores em dispositivos e imagens digitais é o modelo de cores RGB, Figura 2. Este modelo baseia-se numa

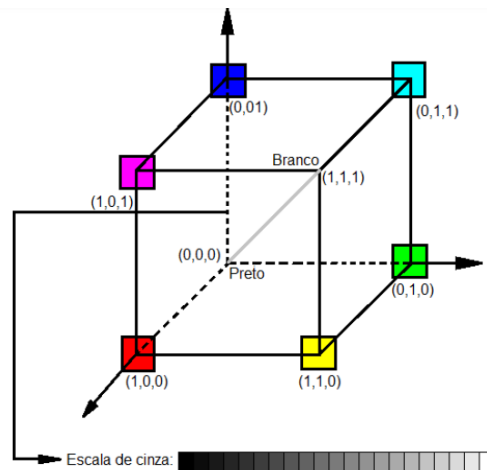
combinação aditiva das três cores primárias: vermelho, verde e azul, que se encontram representados num sistema de coordenadas cartesianas, o qual é visualizado como um cubo 3D ⁶⁹, como apresentado na Figura 3. Os três eixos perpendiculares representam as cores primárias, vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue) e nos outros três eixos as cores secundárias. Na origem se localiza a cor preta e do seu lado oposto a cor branca, entre essas duas cores a escala de cinza ⁷⁰. Por convenção, usa-se valores normalizados de 0 e 1 para indicar a cor, e as cores são definidos por vetores que parte da origem neste modelo ⁷¹.

Figura 2 - Representação dos modelos de cor RGB.



Fonte: MADEIRA, 2012

Figura 3 - Cubo 3D de cores RGB, e representação da escala de cinza (EC), localizada entre as colorações pretas (0, 0, 0) e a coloração branca (1, 1, 1)



Fonte: CARDOSO, 2014.

Neste modelo RGB, cada tonalidade de cor é representada digitalmente por um canal de 8 bits, podendo armazenar 8 bits de informação em cada canal. Portanto, cada tonalidade dessas três cores poderá variar de 0 a 255 ($2^8 = 256$). Isso gera um total de 16 milhões de combinações. Ao canal 0 é observado a ausência total de uma cor, já o canal 255 representa a intensidade máxima da mesma cor através da combinação dos três canais, ou seja, o canal branco é a intensidade máxima das três cores primárias aditivas (255, 255, 255)⁷². Os valores de RGB trazem informações relevantes se interpretados de maneira correta, onde a intensidade da cor obtida faz-se proporcional a intensidade dos valores RGB.

Os registros de cores no modelo RGB podem ser convertidos em uma escala monocromática de tonalidade de cinza (Escala de cinza, EC). A Equação 1 é utilizada para realizar esta transformação. Este procedimento é de simples aplicação dentro de um processo de quantificação, visto que quanto maior a quantidade de moléculas contra o fundo branco maior será a intensificação da cor visível de solução e, conseqüentemente, incremento na intensidade na tonalidade de cor cinza. Desta forma, é possível associar um sinal analítico de 3 canais (R, G, B) a um único valor^{71,73}.

$$\text{Eq. 1) } f(\text{RGB}) = 0,2989 R + 0,5866 G + 0,1145 B$$

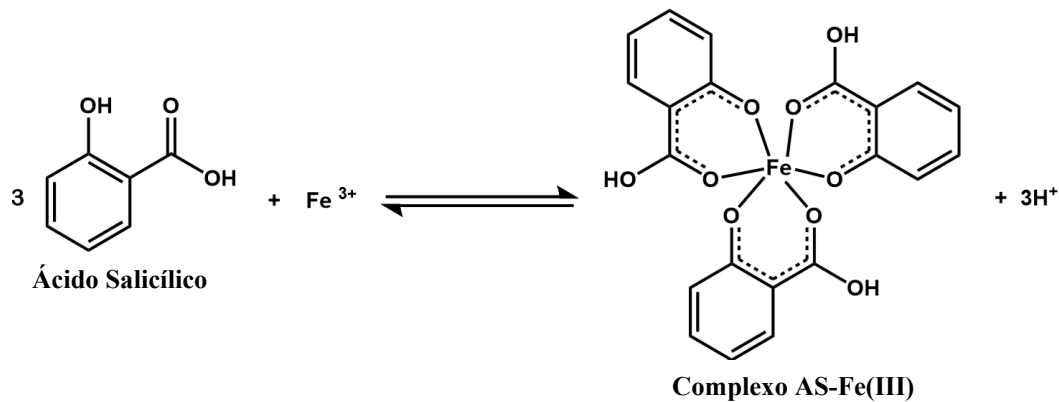
Onde $f(\text{RGB})$ é uma escala de cinza e varia de 0 a 255, R é o componente vermelho, B é o componente azul e G o componente verde^{71,72}.

O uso do scanner vem sendo bastante adotado para obtenção das imagens digitais dos sistemas analíticos. Existem basicamente três tipos: manuais, de mesa ou de cilindro e a mais utilizada no processamento de imagens é o scanner de mesa. A calibração neste equipamento é realizada pelo modelo impresso, geralmente, fornecida pelo programa do scanner. Assim, quando a imagem é capturada o programa compara os valores obtidos com os valores esperados e pode, então, gerar um perfil de correção para aquele scanner^{70,72}. Um parâmetro importante é a resolução, a qual indicará o número definido de pontos por polegada (dot per inch) que terá a imagem, quanto maior o número de pontos por polegada, maior será a resolução e, com isso, uma melhor qualidade gráfica. Em termos de qualidade da imagem ao uso do scanner de mesa convencional a literatura trás o uso de 300 e 600 dpi como sendo o de melhor qualidade e resolução⁷¹.

1.6 Reação de complexação do Ferro (III) e AS

Reações colorimétricas são empregadas na determinação de salicilato em análises clínicas pela relativa facilidade, sendo o teste de Trinder o mais usado ⁷⁴. Esse teste envolve a formação de um complexo colorido entre AS e Fe(III) ⁷⁵, onde o AS atua como ligante bidentado para formar um composto quelato, como demonstrado na Figura 4. ⁷⁶ O mecanismo da reação se dá da seguinte forma: O hidrogênio fenólico que é fracamente ácido sai e se coordena ao metal formando um anel de seis membros, através dos grupos fenolato e carboxilato do ácido salicílico ⁷⁷.

Figura 4 - Reação de formação do complexo ocorrendo entre o Fe(III) e o AS.



Fonte: A autora

Um método para determinação de salicilato utilizando a técnica de injeção em fluxo automatizada com base na reação colorimétrica do Fe(III) em meio ácido foi desenvolvido e aplicado para determinar salicilato no soro, e em comprimidos. Os resultados indicam uma precisão com coeficiente de variação inferior a 1% em todos os casos. Recuperações de salicilato de soros enriquecidos (100-1000 mg L⁻¹) variaram de 96,4–102,5%, e de soluções de amostra enriquecidas de ácido acetilsalicílico, 97,8–103,0%. Os resultados da análise de formulações de medicamentos comerciais obtidos com o método proposto concordaram bem com os procedimentos atuais ⁷⁸. Portanto, essa reação é efetiva para ser aplicada na determinação de AS em diferentes tipos de amostras.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de um método analítico simples, rápido, de baixo custo e sem etapa de preparo de amostra para determinação de ácido salicílico em amostras de leite.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Otimizar as condições da reação colorimétrica entre AS e Fe(III) em dispositivos microfluídicos em papel;
- ✓ Avaliar os modelos de cores para relação da intensidade da cor gerada com a concentração do analito;
- ✓ Obter parâmetros analíticos tais como precisão, exatidão, linearidade e limite de quantificação
- ✓ Aplicar o método desenvolvido em amostras de leite desnatado, cru, integral, zero lactose e em pó.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação e materiais

Para o preparo das soluções estoques a partir de padrões sólidos, utilizou-se uma balança analítica Shimadzu, modelo AUY220 com precisão de $\pm 0,1$ mg. Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes com grau de pureza analítica. A solução estoque de Fe(III) foi preparada em um balão volumétrico de $10,00 \pm 0,025$ mL (Tlerwex), dissolvendo 1,0031g de cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Vetec) em álcool etílico (Dinâmica) e completando-se o volume do balão até o menisco. A solução estoque de AS foi preparada em um balão volumétrico de $25,00 \pm 0,03$ mL (Salelit), pela dissolução de 1,7310 g de Ácido Salicílico (Sigma-Aldrich) em álcool etílico. Soluções de concentrações de trabalho de Fe(III) e AS utilizadas nas etapas de otimização foram preparadas por diluições utilizando micropipetas labsystem de intervalos de volumes de $20-200 \pm 0,2$ μL e $0,5-10 \pm 0,02$ μL a partir das soluções estoque. Para aquisição do espectro de absorção do complexo AS-Fe(III) utilizou-se um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesis 10S e um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1201. O ácido clorídrico (HCl) 37% na concentração 1mol L^{-1} foi preparado diluindo 84mL em 1L de água. O éter etílico foi obtido da Synth, para o procedimento do método oficial indiano.

3.1.1 Fabricação dos μPADs

Os μPADs foram fabricados pelo método de cera utilizando uma impressora de cera adequada (Xerox ColorQube 8580, New York, Estados Unidos). O substrato empregado foi um papel de filtro quantitativo (Whatman 1, Whatman, Millipore, EUA). As zonas reacionais circulares dos dispositivos foram desenhadas com o auxílio do software gráfico InkscapeTM. Posteriormente, os dispositivos impressos foram submetidos a uma temperatura de 200 °C por 180s em uma chapa de aquecimento (GT-CAD5L). É importante ressaltar que a etapa de aquecimento se faz necessária para promover a fusão da cera, e, assim, criar as barreiras hidrofóbicas de cera no substrato de papel. Na Figura 5, é apresentado um fluxograma com as etapas da fabricação.

Figura 5 - Fluxograma da fabricação dos μ PADs



Fonte: A autora

3.1.2 Obtenção das imagens digitais e tratamento dos dados

A quantificação foi realizada por meio da aquisição e processamento das imagens digitais dos sistemas analíticos adquiridas por um scanner HP Deskjet G4050 com resolução de 300 dpi. Na Figura 6 é apresentado o fluxograma de como foi realizado o processamento das imagens usando o software Image J e na Figura 7 temos a interface do software para extração dos parâmetros de intensidade de cor pelo modelo RGB.

Basicamente, os μ PADs foram escaneados mantendo o cuidado de estarem sempre colocados na mesma posição do scanner. A imagem digital é obtida e processada no software ImageJ[®]. Nesta etapa é necessário que a seleção da área da imagem seja a mais homogênea e representativa possível. Assim, o programa é capaz de calcular a área selecionada fornecendo os respectivos valores de RGB que compõem a coloração da área selecionada, na faixa de 0 a 255. De posse dos dados de RGB, estes foram exportados para o programa Microsoft Excel (versão 2019) e, por fim, os dados foram convertidos para a escala de cinza (EC) utilizando o algoritmo matricial $f(\text{RGB})$, conforme Eq. 1.

Figura 6 - Fluxograma do Tratamento da imagem usando software ImageJ

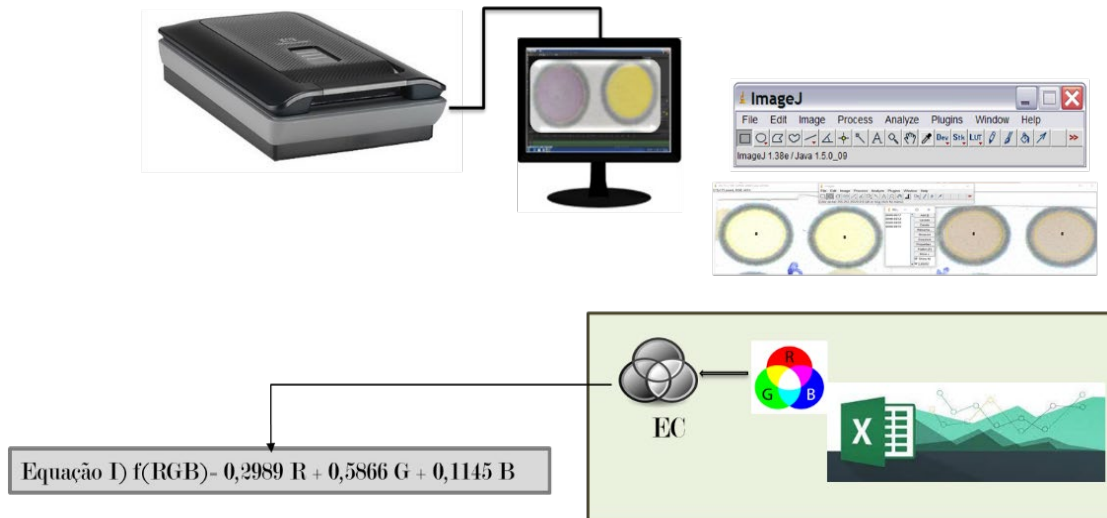
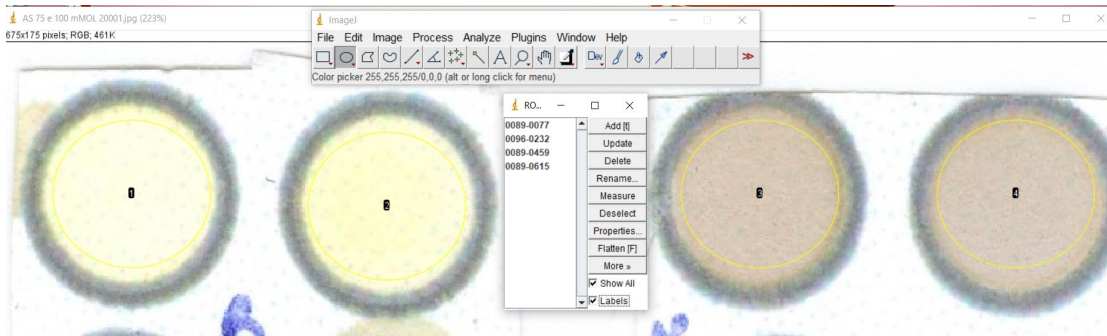


Figura 7 - Interface do software de obtenção dos valores de RGB



3.2 Amostras de leite

As amostras de leite integral, zero lactose, desnatado e em pó foram obtidas no mercado local da cidade de Uberlândia/MG, bairro Santa Mônica. O leite cru foi coletado em um sítio localizado na cidade de Iturama/MG. As amostras foram mantidas sobre refrigeração e não passaram por nenhuma etapa de pré-tratamento. Com auxílio de uma micropipeta, 50 μL da amostra de leite foi adicionado ao μPADs . Após a secagem, 50 μL da solução de Fe(III) foi adicionado. Os μPADs foram escaneados e processados conforme descritos no item 3.1.2. Este

procedimento foi realizado em triplicatas. O leite em pó foi preparado solubilizando 26,0583g da amostra em 200 mL de água.

3.3 Parâmetros analíticos avaliados

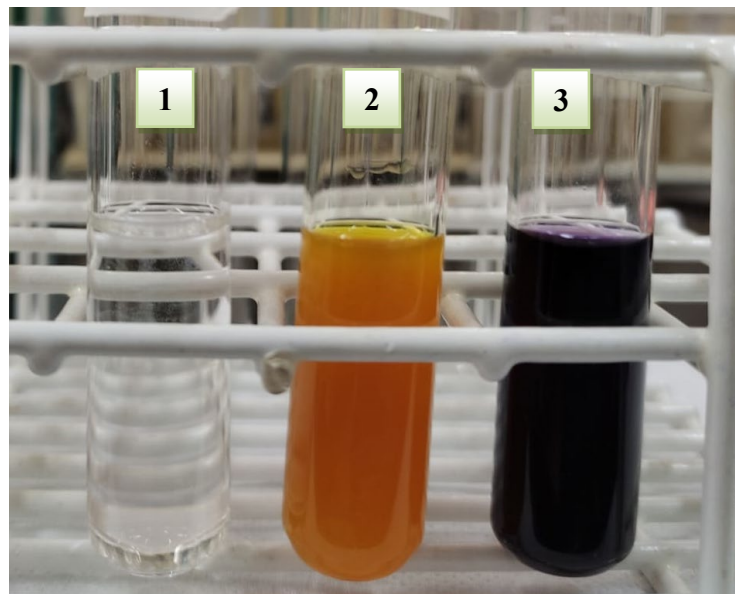
Os parâmetros analíticos constituem um conjunto de atributos mensuráveis que definem a qualidade, desempenho e a confiabilidade desse método. Os parâmetros utilizados para determinar o desempenho do método proposto foram: Linearidade, Faixa linear de trabalho, Exatidão, Precisão, Limite de detecção, Limite de quantificação.

4 RESULTADOS

4.1 Otimização das condições de reacionais entre Fe(III) e AS em solução

O método analítico proposto no presente trabalho foi baseado na formação de um complexo entre ácido salicílico e o íon Fe(III). Os testes iniciais foram realizados em solução onde o objetivo era observar qualitativamente a formação deste complexo. A Figura 8 apresenta as soluções de (1) AS de concentração 400 mg L^{-1} , (2) Fe(III) de concentração 80 mg L^{-1} e (3) complexo AS-Fe(III), este apresentou uma coloração diferente da solução aquosa de AS e da solução de Fe(III).

Figura 8 - Teste qualitativo da obtenção do complexo AS-Fe(III)

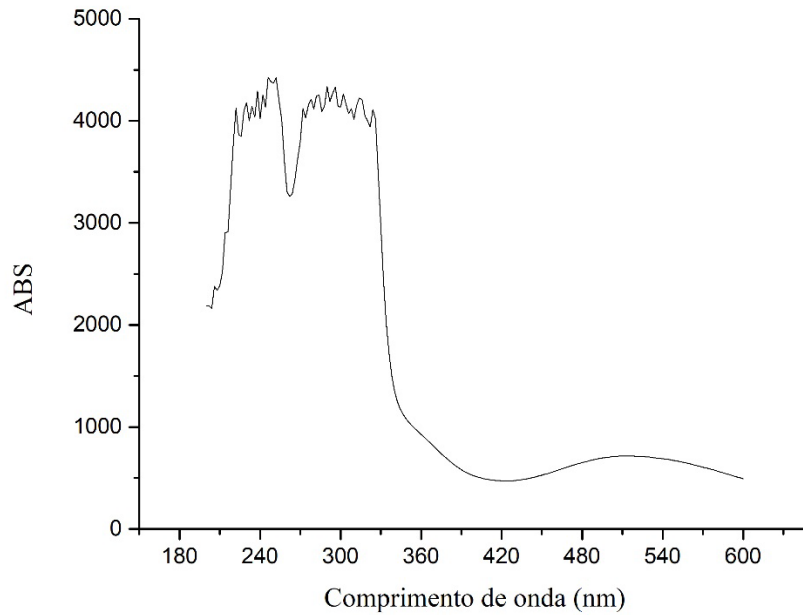


Fonte: A autor

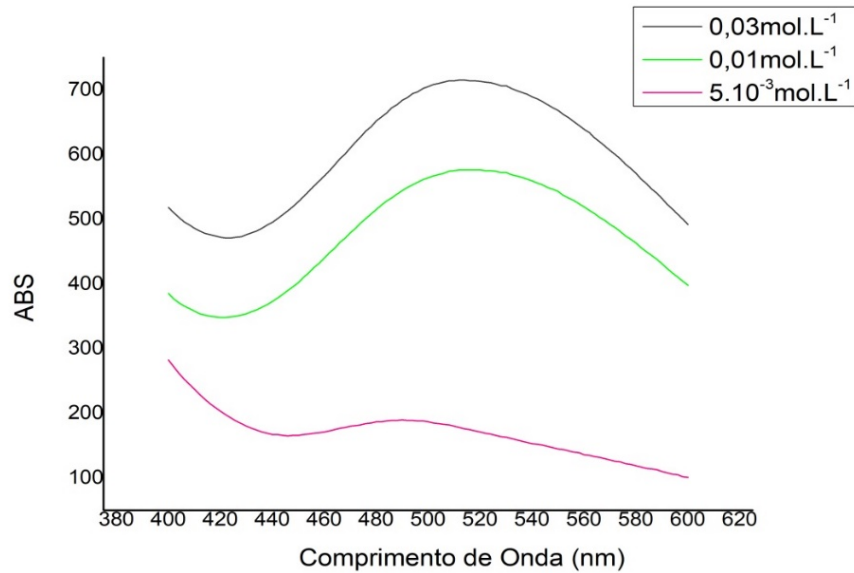
4.2 Obtenção e avaliação do espectro de absorção molecular do complexo

Para a obtenção do espectro de absorção do complexo AS-Fe(III), foram preparadas soluções de AS de concentração 400 mg L^{-1} e Fe(III) 80 mg L^{-1} . Em seguida, essas soluções foram misturadas em um balão volumétrico de 10,0 mL. Após a homogeneização dessa solução, uma alíquota de 3,0 mL foi transferida para uma cubeta de quartzo e levada ao espectrofotômetro fazendo uma varredura de comprimento de onda de 200 a 600 nm, O espectro de absorbância é apresentado na Figura 9a. A relação entre a absorbância com a concentração do complexo em diferentes comprimentos de onda foi avaliada. Para isso, foram adicionadas alíquotas de Fe(III) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em três soluções distintas de concentrações de AS $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, e $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se pela Figura 9b que o pico de absorbância máxima ocorre em 520 nm, obtendo uma relação direta com a concentração do AS. O resultado obtido neste experimento apresenta uma concordância com o desenvolvido por Pereira e colaboradores ⁸⁹ que obteve absorbância máxima em 525 nm, o que o permitiu a determinação espectrofotométrica do teor de ferro a partir desta reação.

Figura 9- Espectros de absorção obtidos entre os comprimentos de onda de 200 a 600 nm para (a) 400 a 600 nm (b) a formação de AS-Fe(III) nas concentrações de AS $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e de Fe(III) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$



(a)



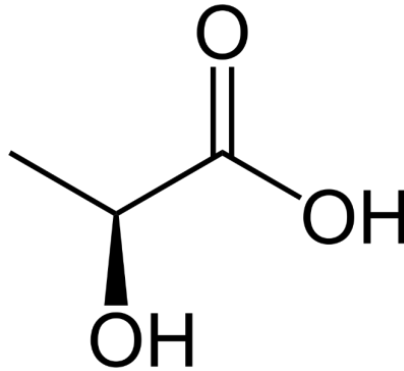
(b)

4.3 Estudo qualitativo do ácido láctico como um possível interferente na reação

Os ensaios qualitativos se definem como sendo aqueles que geram informações de resposta apontando presença ou ausência de determinadas substâncias nas amostras a serem analisadas.

Assim, os resultados de uma análise qualitativa são respostas binárias como: presente/ausente, positivo/negativo ou sim/não ^{84,90}. Considerando que amostras de leite fresco podem conter concentrações de ácido láctico residual de aproximadamente 1–2 mmol L⁻¹, podendo aumentar para 10 – 20 mmol L⁻¹ por causa da fermentação microbiana ⁹¹, faz-se necessário a avaliação deste componente como um possível interferente na determinação do AS em leite. O ácido láctico apresenta um grupo carboxilato em sua estrutura – conforme demonstrado na Figura 10 – é capaz de reagir com o Fe(III), intensificando ou atenuando o sinal analítico.

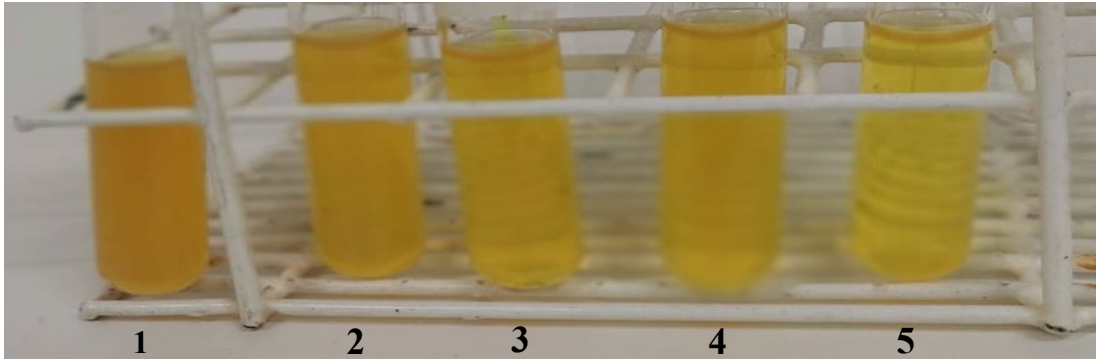
Figura 10 - Estrutura química do ácido láctico



Fonte: A autora

As soluções de ácido láctico foram preparadas nas concentrações de 20, 15, 10, 5 e 2 mmol L⁻¹ em álcool etílico. 2 mL de cada uma dessas soluções foram adicionadas a tubos de ensaios, seguidos de 1 mL da solução de Fe(III) 0,05 mol L⁻¹. Como visto na Figura 11, a solução não apresentou mudança de cor ao adicionar o Fe(III) e, portanto, o ácido láctico não pode ser considerado um interferente na reação com Fe(III), nas concentrações avaliadas.

Figura 11 - Teste qualitativo da reação do ácido láctico com o Fe(III)



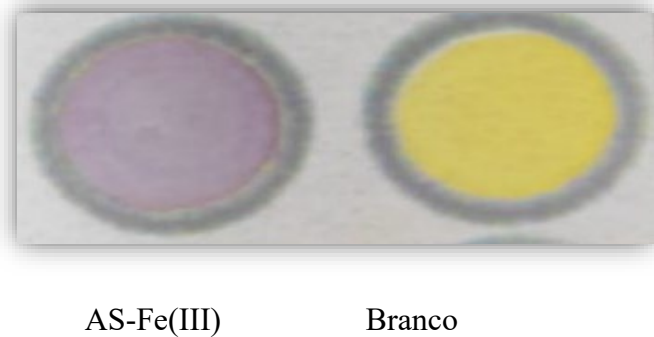
Fonte: A autora

4.4 Otimizações dos μ PADs para utilização como substrato da reação colorimétrica

Para a obtenção das melhores condições para a detecção da reação colorimétrica, alguns parâmetros foram avaliados, tais como: volume da solução de Fe(III) e AS a ser adicionada no papel, estabilidade do produto formado e a ordem de adição dos reagentes. Estes parâmetros foram otimizados para que resulte em maior uniformidade da cor formada, gerando assim, uma maior intensidade de sinal analítico. Diante do exposto, foram variadas as seguintes condições experimentais: diâmetro do μ PADs (volume de reagentes), ordem de adição dos reagentes e tempo para obtenção da imagem digital.

Inicialmente, o spot test em papel foi fabricado e avaliado com um diâmetro de 10mm. Com auxílio de uma micropipeta, impregnou-se 10 μ L da solução padrão de AS 400mg L⁻¹ e após a secagem, adicionou 10 μ L de Fe(III) 80mg L⁻¹. A reação ocorreu instantaneamente. Este teste inicial permitiu observar qualitativamente a formação do complexo AS-Fe(III), evidenciada pela coloração roxa. Na Figura 12, observa-se a coloração característica do complexo gerado, ao lado temos a representação do branco que apresentou a coloração amarela, ou seja, a aplicação do papel como substrato de reação é eficaz.

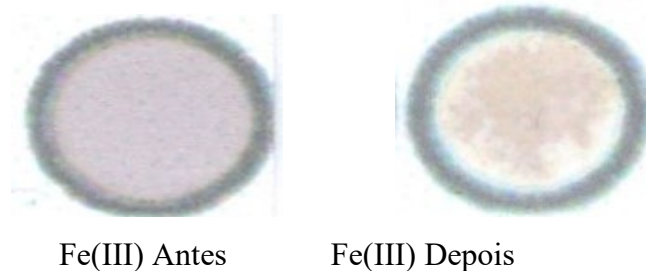
Figura 12 - Teste da utilização do papel como substrato para a reação colorimétrica



4.4.1 Influência da ordem da adição dos reagentes no padrão

A ordem de adição dos reagentes ao μ PADs é um parâmetro importante a ser avaliado, pois em alguns casos ocorre diferenças significativas entre a intensidade de cor do produto formado em função da ordem de adição. Primeiramente, 10 μ L 400 mg L⁻¹ da solução padrão de AS foi adicionado ao papel e em seguida 10 μ L da solução padrão de Fe(III) 80 mg L⁻¹. No segundo experimento, foi adicionado 10 μ L 80mg L⁻¹ da solução padrão de Fe(III) e em seguida 10 μ L da solução padrão de AS 400mg.L⁻¹. As imagens digitais dos dois experimentos foram obtidas e as informações de intensidade de cor (RGB) foram extraídas. O sinal analítico final foi considerado como sendo a subtração do valor de escala de cinza do branco com o valor da escala de cinza do experimento contendo AS (EC branco- EC sinal). Com a interpretação dos dados gerados pelo experimento, observou-se uma maior uniformidade e maior intensidade do sinal ao efetuar a adição da solução padrão de Fe(III) primeiro. No papel temos a presença dos grupos hidroxilas¹⁰⁰ e estes podem estar tendo uma interação física com o AS. Esse fato resulta em uma menor disponibilidade do AS para reagir com os íons Fe(III). Na Figura 13, é perceptível uma melhor homogeneidade e maior intensidade da cor roxa quando se adiciona o Fe(III) primeiro no papel.

Figura 13 - Avaliação qualitativa da ordem da adição dos reagentes Fe(III)



A seguir, foi realizada a avaliação quantitativa em função da ordem de adição dos reagentes. Variou-se concentração de ácido salicílico entre 800 - 1700 mg L⁻¹. Assim como observado nos resultados qualitativos, o sinal analítico (EC branco - EC sinal) foi maior em todas as concentrações quando o Fe(III) foi adicionado primeiro. Os dados estão dispostos na Tabela 2. Observa-se pelo aumento do sinal analítico que a adição do Fe(III) primeiramente ao papel é mais eficaz gerando um maior sinal analítico, portanto, os estudos posteriores foram realizados utilizando esta condição de Fe(III) primeiro.

Tabela 2 – Avaliação quantitativa do sinal analítico (EC branco - EC sinal) pela ordem de adição do Fe(III)

Concentração da solução padrão de Ácido salicílico (mg L ⁻¹)	Adição do Ferro	
	Antes	Depois
800	10,6	3,1
1000	14,4	5,9
1200	22,9	11,2
1500	24,8	16,9
1700	28,6	21,2

4.4.2 Avaliação do diâmetro da zona circular reacional µPADs

Para a avaliação da influência do tamanho da zona reacional na detectabilidade do analito, as relações entre sinal analítico e concentração de AS foram construídas utilizando o procedimento com spots com diâmetro de 10, 20, 30 e 40 mm. Quanto menor o tamanho do µPADs menor será o volume de reagente adicionado no µPADs, ou seja, menor o número de mols disponíveis para reagir e, portanto, menor será a detectabilidade. As condições de reação foram as mesmas para todas as curvas analíticas geradas: Adicionou-se um volume adequado da solução de Fe(III) ao µPADs e, após a sua secagem, foi adicionado a solução de AS. Com o µPADs totalmente seco, foi levado ao scanner e a imagem gerada foi tratada adequadamente. Utilizando a Equação 3 os valores de RGB foram convertidos em EC.

$$Eq. 3) \text{ Sinal} = -\text{Log } EC \text{ sinal} / EC \text{ branco}$$

Para avaliar os resultados obtidos, foi realizada uma comparação da linearidade em função

do tamanho do μ PADs, conforme demonstrado na Tabela 3. A linearidade se mostrou satisfatória ($> 0,99$) em todos os diâmetros de μ PADs. A faixa linear e o limite de detecção (LD) foram menores para os diâmetros de 30 e 40 mm, conforme era esperado, pois quanto maior o tamanho do μ PADs maior será o número de mols disponíveis para reagir e melhor será a detectabilidade. Comparando-se o ganho de sinal em função do volume do μ PADs, os diâmetros de 30mm foram os mais adequados, uma vez que, operacionalmente, a impregnação do volume e o tempo de espera da secagem do μ PADs de 30mm é menor em relação ao de 40mm. Portanto, o diâmetro de 30mm foi selecionado para as futuras análises. O limite de detecção (LOD) foi calculado empregando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica, onde o LOD é calculado usando 3 vezes o valor do desvio padrão do branco, dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração^{84,87}.

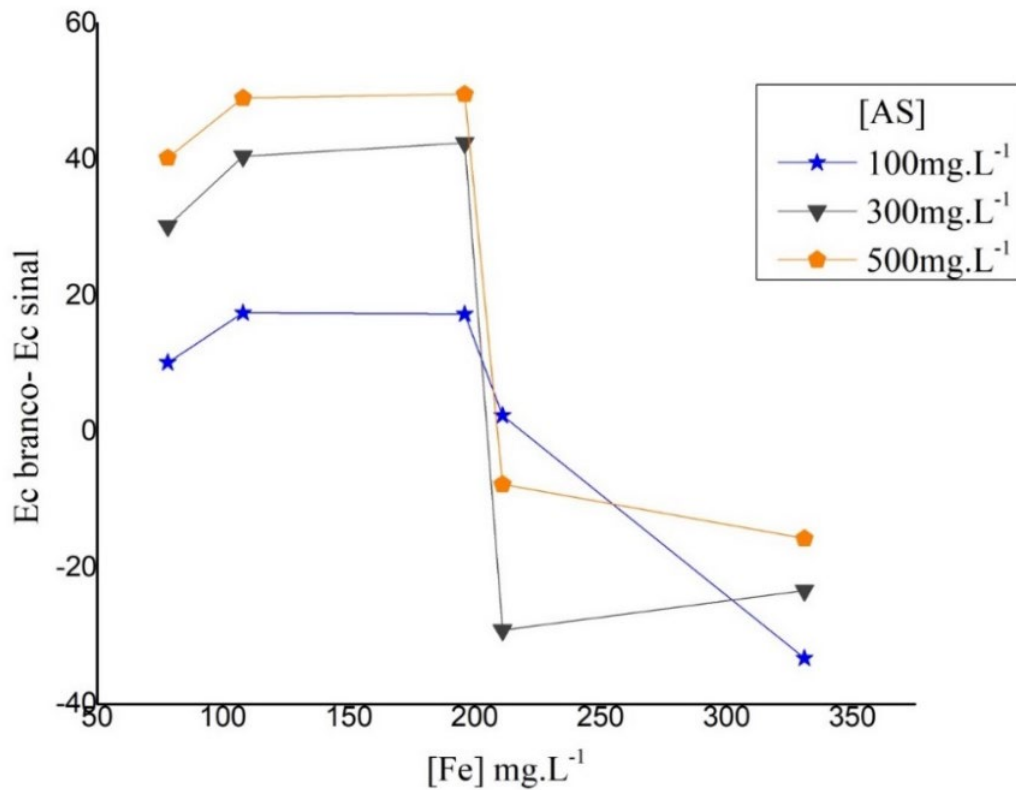
Tabela 3 – Estudo do diâmetro do μ PADs por meio das linearidades e do LD

Diâmetro (mm)	Volume μL	Equação	R²	Faixa Linear mg L⁻¹
10	20	$y = 1E-05x + 0,0235$	0,9944	700-3500
20	40	$y = 2E-05x + 0,051$	0,9907	500-3000
30	50	$y = 8E-05x + 0,0433$	0,9945	100-1200
40	60	$y = 9E-05x + 0,0541$	0,9917	50-1200

4.5 Estudo da variação da concentração de Ferro (III)

Com o propósito de avaliar a influência da concentração de Fe(III) no sinal analítico (EC branco - EC sinal), realizou-se um estudo variando a concentração de Fe(III) entre 80 e 330 mg L⁻¹. As concentrações de AS também foram variadas em três níveis: 100, 300 e 500 mg L⁻¹. Como pode ser visualizado na Figura 14, foi observado um efeito significativo nos valores do sinal analítico com o aumento da concentração de Fe(III). Nas concentrações de 100 até 200 o valor do sinal permanece constante e após 200 mg L⁻¹ o valor diminui de maneira considerável, portanto concentrações de Fe(III) maiores ou igual a 200 mg L⁻¹, não é viável para ser utilizada, pois nestas concentrações sinal do branco é alto e como obtemos pelo delta (EC branco - EC sinal) o sinal analítico diminui significativamente. Por essa razão, a concentração de 100mg L⁻¹ de Fe(III) foi selecionada para o desenvolvimento das próximas etapas do trabalho.

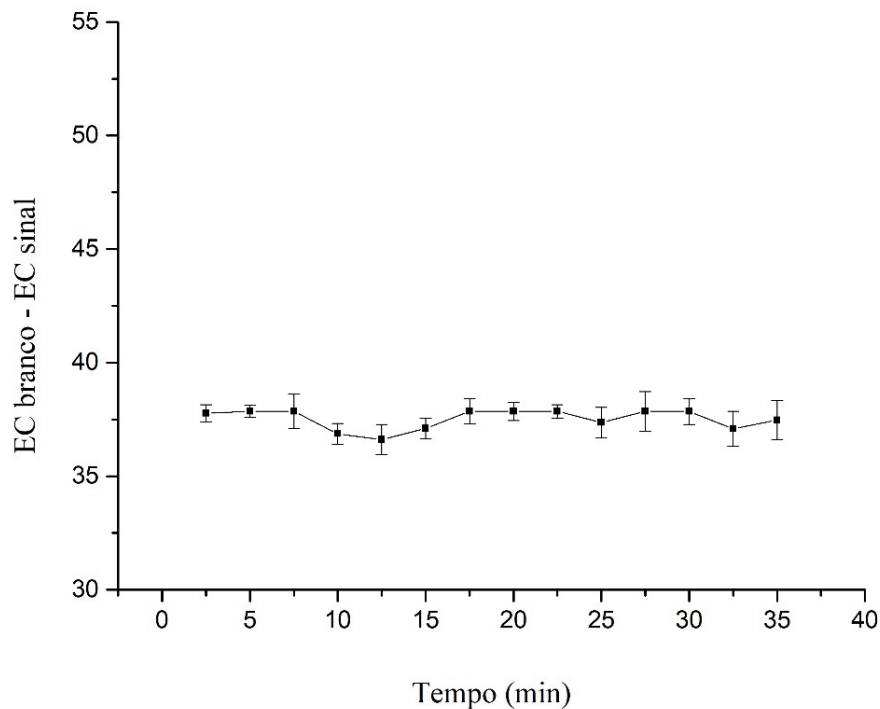
Figura 14 - Estudo da variação do sinal analítico em função da concentração de Fe(III)



4.6 Estudo da estabilidade do sinal analítico em função do tempo

Uma das vantagens do método proposto está no fato da formação do complexo ocorrer de forma imediata. No entanto, é necessário verificar a estabilidade do complexo formado em relação ao tempo. Foram adquiridas imagens após a reação do Fe(III) e AS em um intervalo de tempo de 0 a 35 minutos. As aquisições das imagens foram realizadas a cada dois minutos e meio. Conforme demonstrado na Figura 15, nota-se que a variação da intensidade do sinal analítico não é significativa quando se compara o intervalo estudado.

Figura 15 – Estudo da variação do sinal analítico em função do tempo de escaneamento do μ PAD



4.7 Influência da ordem dos reagentes em amostras de leite

Conforme visto no item 4.1.1, a avaliação da ordem de adição dos reagentes é necessária, foi observado que em solução padrão a adição do Fe(III) antes apresenta uma maior magnitude do sinal analítico. Em virtude disso, faz-se necessário a avaliação da influência da ordem de adição dos reagentes no leite. Entretanto, não foi verificado o mesmo comportamento da solução padrão frente a amostra de leite. No primeiro experimento adicionou-se 50 μ L de Fe(III) 100mg L⁻¹, após secagem adicionou-se 50 μ L da amostra de leite fortificados com 500mg L⁻¹ de AS. No segundo experimento adicionou-se 50 μ L da amostra de leite contendo 500mg L⁻¹ de AS e após secagem do papel, adicionou-se 50 μ L de uma solução de Fe(III) 100mg L⁻¹, foram realizados os tratamentos de imagens e obtidos os sinais analíticos nos dois experimentos. A Tabela 4, demonstra os sinais analíticos obtidos nos dois experimentos onde temos a adição do Fe(III) antes e depois, o sinal analítico do experimento que adiciona o Fe(III) depois é maior, isto pode ser explicado devido a viscosidade leite ser maior do que a do etanol utilizado como solvente da solução padrão de AS.

Tabela 4 - Influência da ordem da adição dos reagentes nas amostras de leite

Amostras	Ferro Antes	Ferro Depois
Integral	11,9	45,8
Zero lactose	4,4	16,1
Desnatado	35,7	30,5
Pó	22,9	36,7

4.8 Obtenção das figuras analíticas do método

O objetivo de avaliar parâmetros analíticos é demonstrar que o método desenvolvido é adequado ao que se propõe, ou seja, garantir que a método produza resultados confiáveis ⁸³. Portanto, foram obtidas algumas figuras analíticas importantes, linearidade, exatidão, precisão e o limite de quantificação para as amostras de leite desnatado, zero lactose, integral, cru e em pó.

4.8.1 Linearidade

Para a avaliação da linearidade, foram construídas curvas analíticas pelo método da calibração externa. A curva analítica do padrão foi construída variando a concentração de AS na faixa de 100 a 1200 mg L⁻¹ (n = 6 pontos). A Figura 16, apresenta o gráfico obtido da curva analítica do padrão, e a Figura 17 demonstra a curva analítica da solução padrão e do leite zero lactose. As retas obtidas pela construção da curva do leite zero lactose e a reta da curva da solução padrão não estão paralelas e seus coeficientes angulares não são os mesmos. Este resultado evidencia que esteja ocorrendo o efeito de matriz, ou seja, a curva feita no padrão não representa de maneira eficaz as curvas nos leites ⁸⁶. Desse modo, foi necessário a construção de curvas analíticas em cada amostra de leite correspondente.

Figura 16 - Curvas analítica da solução padrão

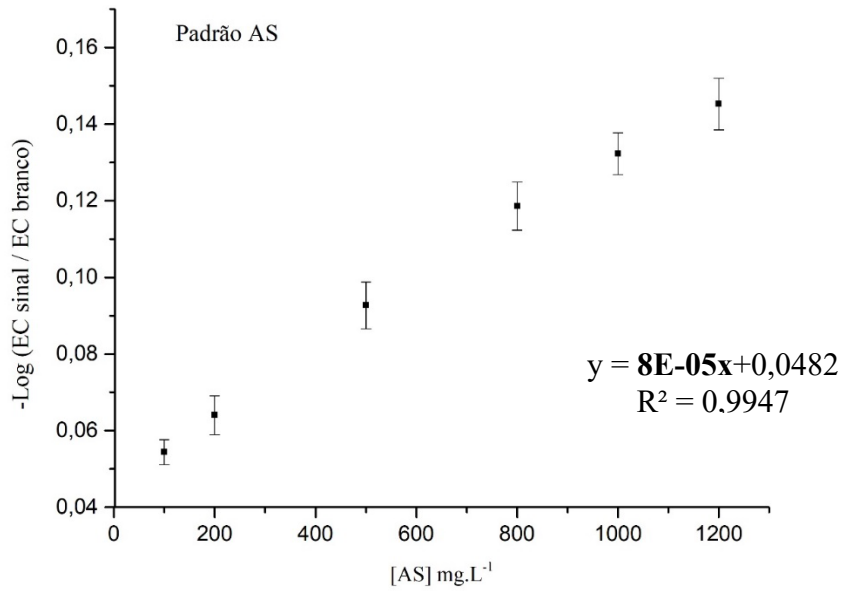
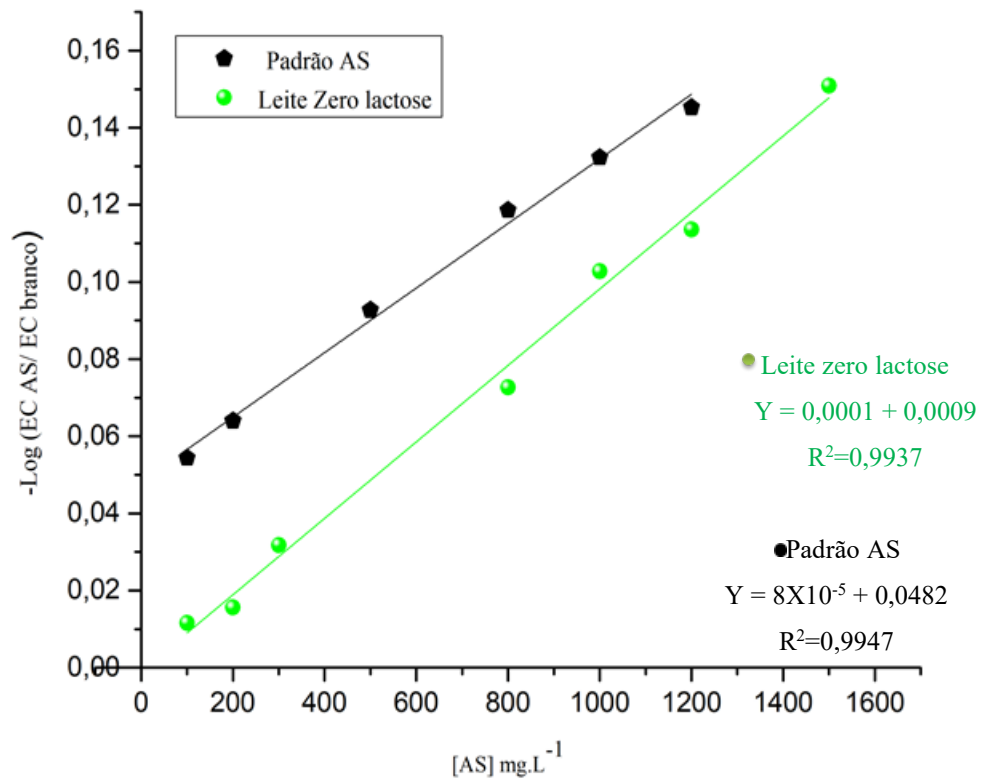
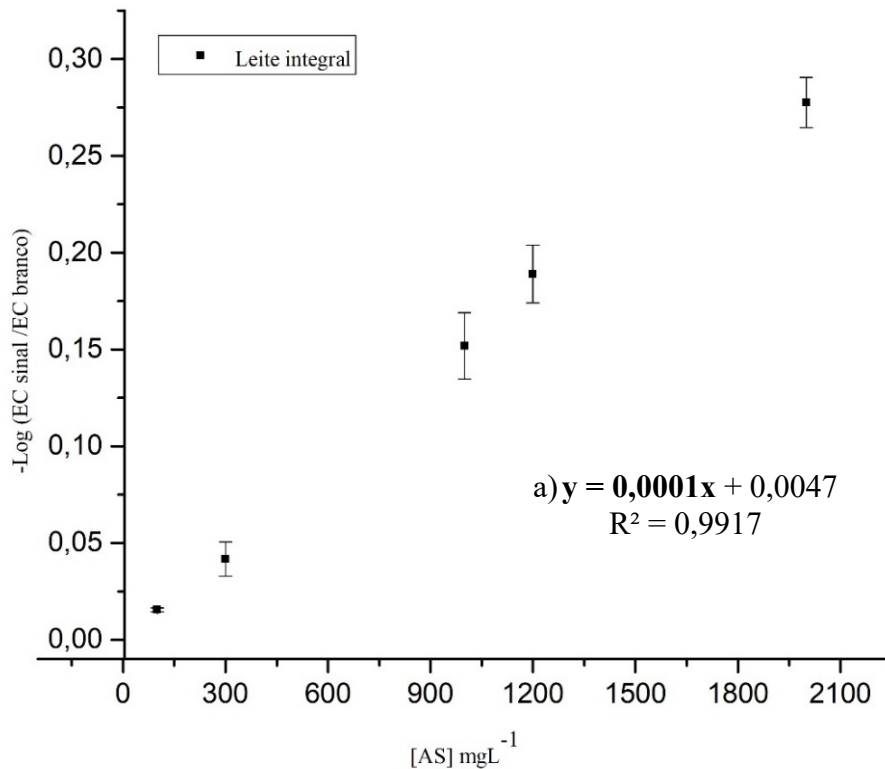


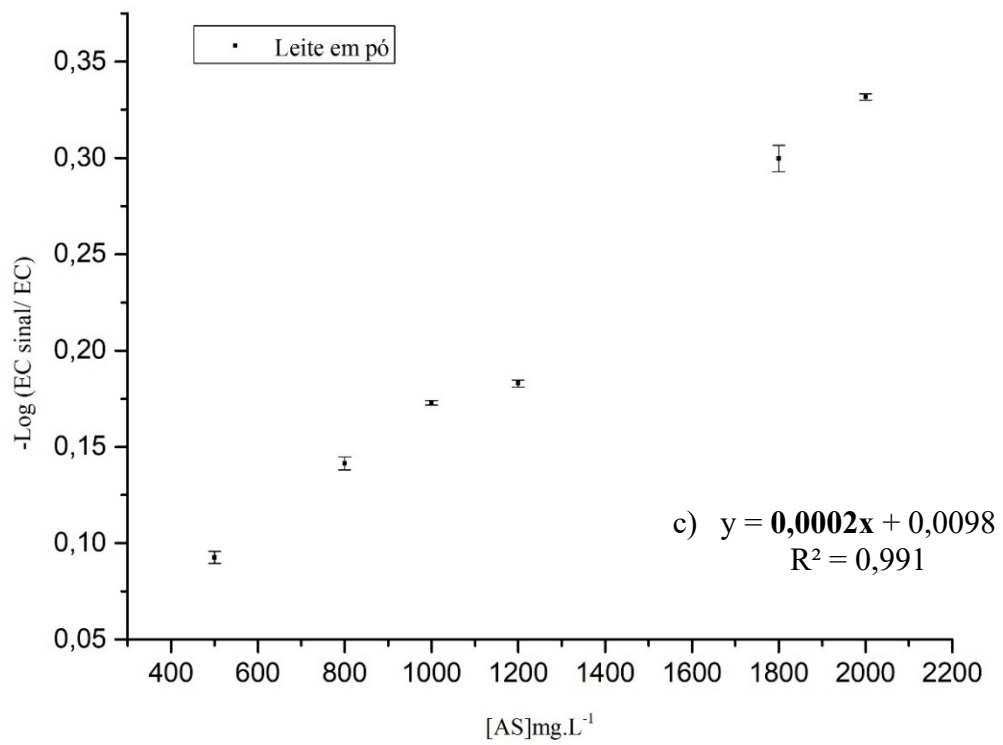
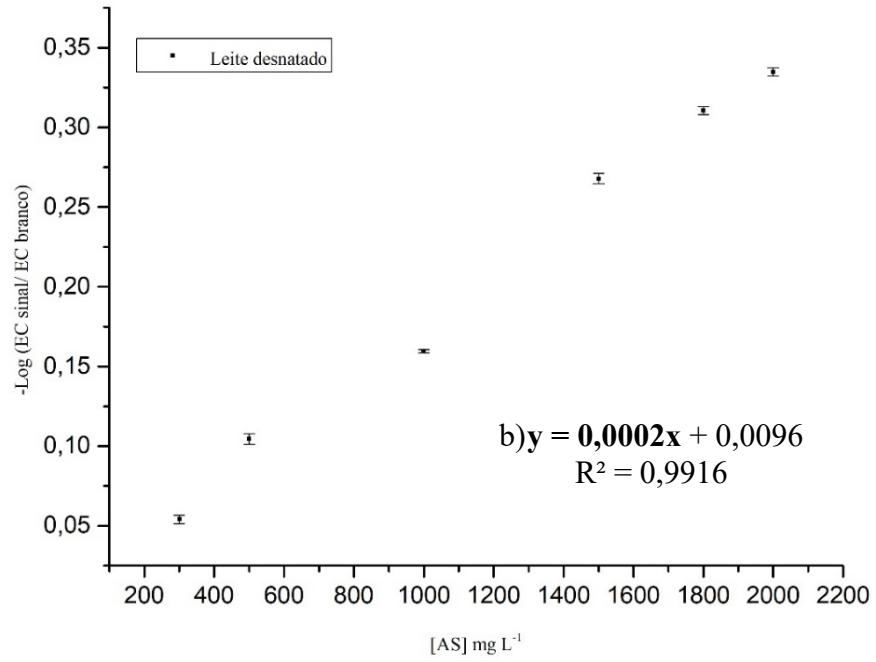
Figura 17 - Avaliação da interferência de matriz, pela relação da curva analítica do padrão de AS e pela amostra de leite zero lactose

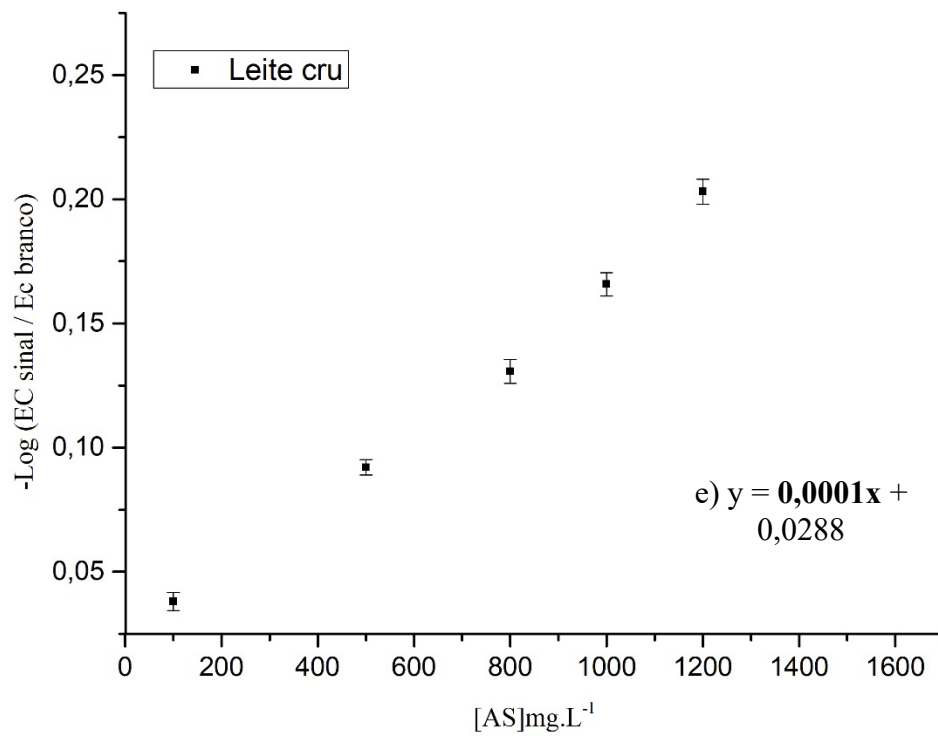
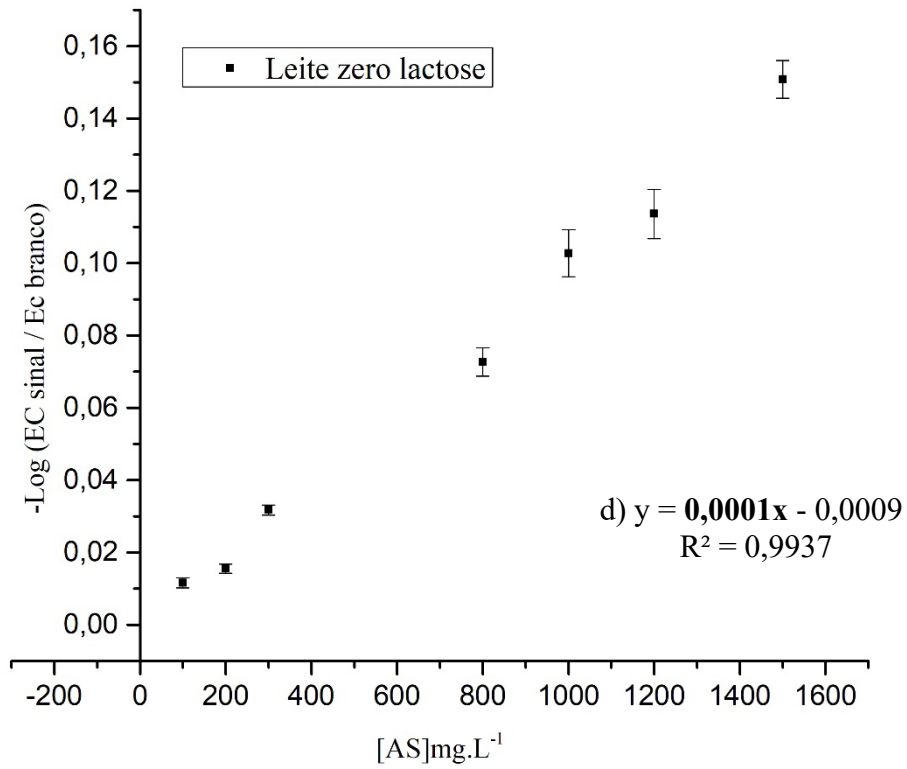


As curvas analíticas nas amostras de leite foram construídas variando a faixa do AS da seguinte forma: leite integral de 100 a 2.000 mg L⁻¹, leite desnatado de 300 a 2.000 mg L⁻¹, leite em pó de 500 a 2.000 mg L⁻¹, leite zero lactose de 100 a 1.500 mg L⁻¹ e leite cru de 100 a 1.500 mg L⁻¹. É importante pontuar que nenhuma das amostras de leite passaram por etapas prévias de tratamento. A Figura 18 apresenta os gráficos das curvas analíticas das amostras de leite zero lactose, além dos parâmetros, como o coeficiente de regressão “b”, o intercepto “a” e o coeficiente de correlação “R”. A ANVISA ⁹² recomenda um R=0,99 e o INMETRO ⁸⁴ um valor de R>0,90, em todas as curvas os resultados foram de um R>0,99, o que indica à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de um determinado intervalo de concentrações onde o método será aplicado ^{87,93,94}.

Figura 18 - Curvas analíticas em amostras de leite (Integral, desnatado, em pó, zero lactose e cru)







4.8.2 Exatidão

O número de ensaios para o estudo da exatidão utilizando o cálculo da recuperação varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características do método. A ICH (International Conference on Harmonization) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração ^{84,87}. A ANVISA também adota esta mesma metodologia como aceitável para avaliação da exatidão ⁹². Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação ^{86,84}.

A utilização de experimentos de adição e recuperação são usuais nas metodologias analíticas, visto que os materiais certificados de referência (CRM) são difíceis de serem adquiridos ou são inexistentes. A avaliação da recuperação consistiu na fortificação com AS nas amostras de leite, ou seja, adicionando soluções com diferentes concentrações de AS seguidas pela determinação da concentração do AS adicionado. Calculou-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a fórmula da Equação 4.

$$Eq. 4) \text{ Rec \%} = \frac{[\text{valor obtido} - \text{valor real}] \times 100}{\text{valor real}}$$

Para que a recuperação seja considerada satisfatória, a porcentagem encontrada deverá estar no intervalo de 70-120%, contudo, se a metodologia a ser aplicada apresentar uma maior complexidade analítica da amostra, ou seja, muitos interferentes neste intervalo de porcentagem de recuperação poderão ser de 50 -120%, com precisões variando em até 15% ⁷².

A exatidão foi avaliada em amostras de leite (integral, desnatado, zero lactose, em pó e cru) fortificadas em três níveis de concentração (baixa, média e alta) com o AS nas concentrações descritas na Tabela 5 e com n = 5. Todas as análises foram feitas em triplicata e o percentual de recuperação do método foram calculados. Os resultados estão dispostos na Tabela 5. O método desenvolvido pode ser considerado suficientemente exato, pois as recuperações estão compreendidas na faixa entre 71,4 e 120%, que é considerado aceitável segundo os guias de validação.

Tabela 5 - Valores de recuperação obtidos para amostras de leites fortificadas

Amostras	Adicionado (mg L⁻¹)	Encontrado (mg L⁻¹)	Recuperação %
Leite cru	498	489 ± 2	99 ± 1
	802	884 ± 1	110 ± 2
	1.244	1.162 ± 1	94 ± 2
Leite desnatado	304	369 ± 6	121 ± 2
	1.023	830 ± 3	81 ± 1
	2.074	1.480 ± 6	71 ± 1
Leite integral	304	313 ± 4	103 ± 1
	1.244	1.455 ± 1	116 ± 1
	2.074	2.508 ± 3	120 ± 1
Leite em pó	498	515 ± 7	104 ± 2
	1.023	808 ± 5	79 ± 1
	2.074	1.626 ± 1	78 ± 1
Leite Zero Lactose	304	275 ± 4	90 ± 1
	1.023	1.004 ± 1	98 ± 2
	1.521	1.506 ± 2	99 ± 1

4.8.3 Precisão

A precisão é o termo geral usado para avaliar quão disperso são os resultados entre os ensaios independentes repetidos em uma mesma amostra^{84,87}. As duas formas mais utilizadas para expressar a precisão de um método são a repetibilidade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e o desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%).

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando e nas mesmas condições de procedimento, mesmo operador, mesmo instrumento e repetições em curto espaço de tempo. A precisão neste trabalho foi mensurada pelo parâmetro de repetibilidade. Logo, foram realizadas 12 reações sucessivas na amostra de leite desnatado fortificando com 500 mg L⁻¹ de AS no spot de 30mm, e Fe(III) 100 mg. L⁻¹, por fim

foram geradas as imagens e os respectivos sinais analíticos. Dessas medidas realizou-se o cálculo do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) e o valor obtido pelos 12 sinais analíticos apresentaram um desvio padrão de 1,2 e um CV de 0,7%. Este valor indica uma boa precisão do método proposto para determinação de AS em amostras de leite desnatado.

4.9 Comparação com o método oficial qualitativo para identificação de AS em amostras de leite

Os órgãos governamentais regulamentadores têm por finalidade fiscalizar e aprovar a fabricação e comercialização da cadeia produtiva do leite e seus derivados. Os principais órgãos fiscalizadores são: MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) através da IN 62, DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal) e SIF (serviço de Inspeção Federal). As empresas precisam se adequar as exigências estabelecidas para que possam comercializar esses produtos tanto no mercado interno quanto externo ^{3,6}.

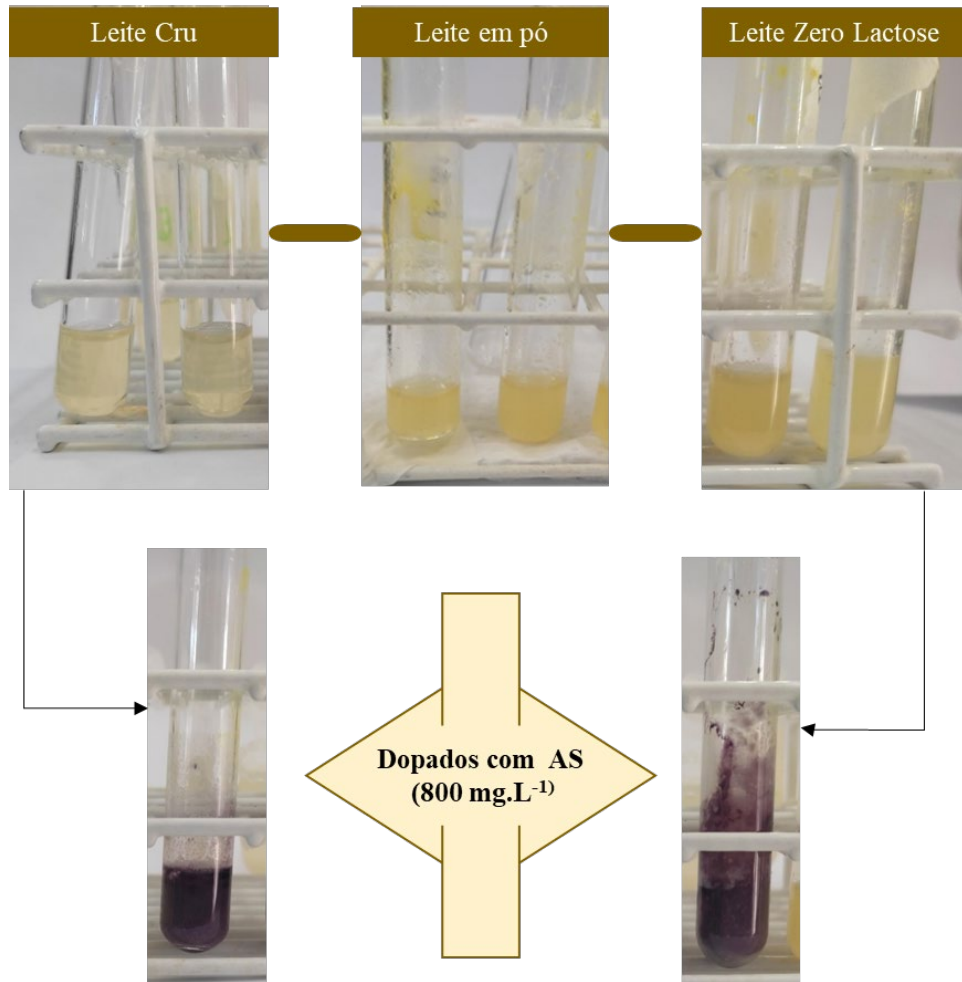
A Instrução Normativa 62 irá descrever os requisitos mínimos para que o leite possa ser comercializado, definindo os valores e especificações de produção como: composição do leite (teor de gordura, acidez, etc.), transporte (temperatura, tempo de viagem até o laticínio), especificações do estabelecimento (área construída, pisos e esgoto, paredes, aberturas e iluminação ⁹⁵. No entanto, não descreve uma metodologia oficial específica para a determinação de AS em amostras de leite e derivado. Em produtos dermatológicos a Farmacopéia Brasileira sugere como metodologia oficial a volumetria de neutralização ⁹⁶. Contudo, para uma comparação do método proposto a um oficial, aplicou-se a metodologia oficial para testes de AS em leite descrita pelo padrão Indiano (IS: 1479 (Part II) – 1961) ⁹⁷.

A metodologia oficial Indiana foi desenvolvida a partir da adição em um funil de separação de 5mL das amostras de leite, seguidos da adição de 1mL de HCl, depois, agitou-se manualmente, observando um aspecto “coalhado” com formação de grumos nas paredes do funil. Em seguida, adicionou-se 5 mL de éter etílico e agitou-se a separação com auxílio de uma centrífuga na rotação de 3000rpm por 8 min, na parte líquida adicionou-se 1mL de água e 1mL de Fe(III) 0,5%.

A Figura 18 apresenta os dados qualitativos do estudo comparativo entre o método oficial para a análise de ácido salicílico em três amostras de leite. Foram analisadas amostras de leite desnatado, cru, em pó e zero lactose. O leite cru e zero lactose foram fortificados com 800mg L⁻¹ de AS, e analisados pela metodologia oficial indiana. Sem a dopagem nenhuma das amostras estudadas foram detectadas a presença da coloração violeta que é a indicação da formação do

complexo AS-Fe(III), bem como não havia sido detectado no teste com os μ PADs. Portanto, a presença do AS na faixa de trabalho estudada não foi detectada para nenhum dos dois métodos, o oficial Indiano e o proposto neste trabalho.

Figura 19 - Estudo comparativo entre o método oficial para a análise de ácido salicílico em leite aplicado na Índia



Fonte: A autora

4.10 Estabilidade do Ácido salicílico em amostras de leite

O AS é dito como um conservante devido as suas ações bacteriostáticas. Dessa forma, avaliamos o comportamento do sinal analítico em amostra de leite cru, leite zero lactose e leite em pó que foram fortificadas de AS nas concentrações de 500 e 1000mg L⁻¹. A cada 8 dias decorridos eram realizadas o teste de reação nestas mesmas amostras que foram fortificadas anteriormente

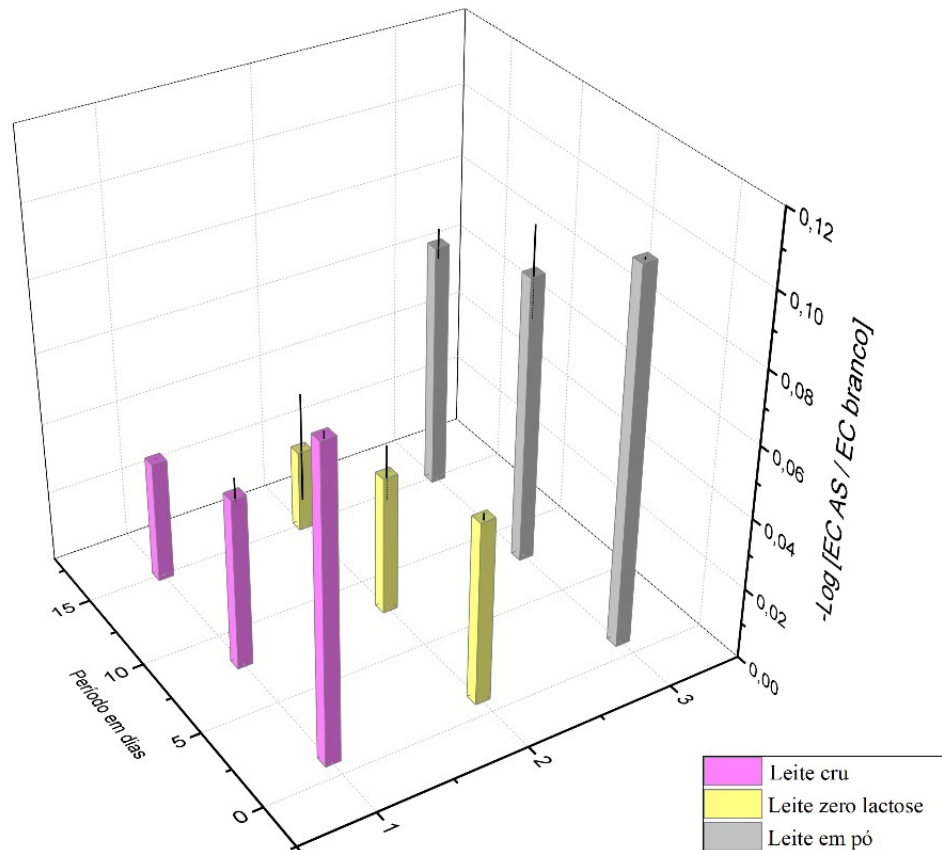
com o AS. A Tabela 6 apresenta os valores de recuperação obtidos neste estudo, os dados mostram que a intensidade do sinal diminuiu em 47% em relação ao dia inicial 26-10-21 da fortificação.

Na Figura 19, o comportamento do sinal analítico difere-se entre as amostras de leite cru, leite zero lactose e leite em pó, o maior sinal foi observado para o leite em pó, e o que apresentou uma maior variação no período de 15 dias também foram às amostras de leite em pó. Mesmo após 15 dias decorridos da dopagem do leite com AS obtivemos sinal analítico considerável nas três amostras. No período posterior de 23 dias de dopagem as amostras estavam todas coalhadas, não sendo possível a avaliação do sinal posterior há 15 dias.

Tabela 6 - Estudo da estabilidade do sinal analítico do AS nas amostras de leite cru, leite zero lactose e leite em pó

Dia	<u>Leite Crú</u>		<u>Leite em Pó</u>		<u>Leite Zero lactose</u>	
	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹
1° 26-10-21	518,17 ±0,02	971,91 ±0,01	470,91 ±0,01	774,15 ±0,01	503,05 ±0,01	884,7 ±0,01
2° 04-11-21	398,36 ±0,01	850,01 ±0,01	355,98 ±0,02	628,89 ±0,01	401,71 ±0,02	781,14 ±0,01
3° 11-11-21	245,00 ±0,01	566,56 ±0,02	299,61 ±0,03	455,47 ±0,03	225,07 ±0,02	524,76 ±0,03

Figura 20 - Estudo do comportamento do sinal analítico no período de 15 dias sobre a estabilidade do AS como conservantes no leite cru, leite zero lactose e leite em pó



4.11 Aplicação nas amostras

Após a obtenção das melhores condições e validação do método desenvolvido, este foi aplicado para determinação de AS em amostras de leite. Inicialmente, adicionou-se 50 μL de cada amostra de leite no μPAD , após secagem adicionou-se 50 μL da solução de Fe(III) 100 mg L^{-1} , ao spot de 30mm e a imagem foi obtida e tratada conforme descrita no item 3.1.2.

O sinal analítico foi obtido utilizando as equações da reta do tipo $y = ax + b$, em cada leite estudado, isso se deu pelo fato de que a curva analítica do padrão não possa ser representativa para os leites (integral, desnatado, em pó, zero lactose e cru), considerou-se o y como a intensidade cuja concentração deve ser obtida. Desse modo, a concentração, x , foi obtida por substituição direta dos coeficientes a e b na equação da regressão, resultando $x = (y - b) / a$. O resultado obtido, após substituição do sinal analítico na equação da reta, não detectou a presença do conservante AS

dentro da sensibilidade obtida no método proposto. Vale lembrar que o AS não é permitido ser encontrado em nenhuma concentração em amostras de leite, o uso do AS deve ficar restrito para usos dermatológicos e também como matéria prima na produção do medicamento AAS.

5- CONCLUSÕES

Neste trabalho de mestrado foi desenvolvido uma metodologia analítica atrativa, aplicando a reação colorimétrica do AS com Fe(III), realizadas em microdispositivos analíticos em papel os spot tests. A aplicação do tratamento de imagens digitais mostra-se como uma excelente alternativa para o monitoramento da reação colorimétrica. Em virtude, de garantir métodos confiáveis para identificar fraudes por adulteração de conservantes em amostras de leite é de extrema importância do ponto de vista econômico e da segurança alimentar, pois a legislação brasileira não permite o uso de conservantes, como o caso do AS, é obrigatório que seu uso fique restrito somente em produtos dermatológicos.

Em suma, o método desenvolvido nesta dissertação apresenta-se com resultados satisfatório, na qual foram otimizadas as melhores condições de detecção e da reação, tais como a ordem de adição do Fe(III) sendo no padrão o Fe(III) antes apresenta-se melhor desempenho já nas amostras o melhor resultado é da adição de Fe(III) depois, tamanho do spot foi de 30mm, o sinal analítico obtido pelo scanner não apresentou variações significativas no intervalo de 35min. As figuras analíticas; faixa linear, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação (LQ), foram avaliadas e em todos estes os resultados evidenciam que o método proposto gera informações confiáveis sobre a amostra estudada.

Por fim, o procedimento proposto ofereceu características analíticas comparáveis às obtidas por outros procedimentos relatados na literatura, com a vantagem de não exigir nenhuma etapa do preparo da amostra de leite, e de ser um método simples, de análises rápidas e com um custo baixo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] REZER, A. P. S. **Avaliação da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul. 2010**, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010. Disponível em

><https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/5688/REZER%2c%20ANA%20PAULA%20DE%20SOUZA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

[2] BRASIL. **Instrução Normativa nº51**, de 18 de setembro de 2002, Ministério da Agricultura. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de outubro 2002, seção 1, p.13-22, 2002. Disponível em <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-51-de-18-09-2002,654.html>

[3] BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos n.ºs. 1255, de 25 de junho de 1962, n. 1236, de 2 de setembro de 1994, n. 1812, de 8 de fevereiro de 1996, e n. 2.244, de 4 de junho de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – **RIISPOA**. Brasília, DF, 1997. Disponível em <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1950-1959/decreto-30691-29-marco-1952-339586-normaatuizada-pe.pdf>

[4] EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Gado do Leite. Importância Econômica. Juiz de Fora. 2016**. Disponível em <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.htm>. Acesso em: 20 de janeiro 2022. Disponível em <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>

[5] VENTUROSOS, R. C. et al. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 43, n. 4, out./dez., 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000400014>

[6] ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. (ed). **Brasil Dairy Trends 2020**. Campinas: ITAL, 2017. 343p. Disponível em <https://doi.org/10.17765/1518-1243.2019v21n2p175-187>

[7] SIQUEIRA, B.K O. **Mercado Consumidor de Leite e Derivados. Juiz de Fora, MG:** Embrapa Gado de Leite, 1ª edição 2019: On Line. 17p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 120). Leite;Consumo Mundial. ISSN 1678-037X. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1110792/1/CT120MercadoConsumidorKenny.pdf>

[8] Leite Inspeccionado – (IBGE) – **Balança Comercial de Lácteos** (Terra Viva) . Acesso em 05-11-2021. Disponível em < <https://ablv.org.br/wp-content/uploads/2021/05/ABLV-Relatorio-Anual-2020.pdf>>

[9] EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Unidade Gado de Leite. <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>, acessado em 20/09/2009. Disponível em <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>

[10] MONTEIRO, A. A.; PIRES, A. C. S.; ARAÚJO, E. A. **Tecnologia de Produção de Derivados de Leite**. Viçosa, MG: Ed.UFV, 2007.81p. Disponível em <https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/20245/1/TESE%20MARIA%20HELENA%203.pdf>

[11] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 3, 30/03/2017

Disponível em

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm#:~:text=DECRETO%20N%C2%BA%209.013%2C%20DE%209,de%20produtos%20de%20origem%20animal.

[12] BUSANELLO, M; POZZA, MSS; PEDROS, F; et al. **Avaliação da composição de pH e ponto de congelamento de leites padronizado, semidesnatado e desnatado no processo de ultrapasteurização.** Anais: XXI Cong. Bras. Zootec., Maceió, 2011;23-27.

Disponível em

<https://www.yumpu.com/pt/document/read/12826374/avaliacao-da-composicao-de-ph-e-ponto-de-unioeste>.

[13] POLEGATO EPS, RUDGE AC. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por miniusinas da região de Marília – São Paulo/ Brasil. **Rev Hig Aliment.**2003;17(110):56-63, jul. 2003.

< <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100032>>

[14] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.68, de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, n.239, p.8, 14 dez. 2006. Disponível em

<<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-68-de-12-dezembro-de-2006.pdf>>

[15] ANVISA -Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Disponível em [https://www.gov.br/anvisa/pt-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/contaminantes#:~:text=Explica%20sobre%20as%20atribui%C3%A7%C3%B5es%20da,de%20limites%20e%20principais%20regulamentos.&text=Contaminantes%20s%C3%A3o%20agentes%20biol%C3%B3gicos%2C%20f%C3%ADsicos,danos%20%C3%A0%20sa%C3%BAde%20da%20popula%C3%A7%C3%A3o.%20Publicado%20em%2008/06/2021)

[br/assuntos/alimentos/contaminantes#:~:text=Explica%20sobre%20as%20atribui%C3%A7%C3%B5es%20da,de%20limites%20e%20principais%20regulamentos.&text=Contaminantes%20s%C3%A3o%20agentes%20biol%C3%B3gicos%2C%20f%C3%ADsicos,danos%20%C3%A0%20sa%C3%BAde%20da%20popula%C3%A7%C3%A3o.%20Publicado%20em%2008/06/2021](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/contaminantes#:~:text=Explica%20sobre%20as%20atribui%C3%A7%C3%B5es%20da,de%20limites%20e%20principais%20regulamentos.&text=Contaminantes%20s%C3%A3o%20agentes%20biol%C3%B3gicos%2C%20f%C3%ADsicos,danos%20%C3%A0%20sa%C3%BAde%20da%20popula%C3%A7%C3%A3o.%20Publicado%20em%2008/06/2021)

[16] TRONCO, M.V. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** UFSM, 4a ed., Santa Maria, 2010. p. 192. ISBN: 978-85-7391-203-6 Ano de Publicação: 2013. Nº de páginas: 208.

Disponível em <https://livraria.funep.org.br/product/manual-para-inspecao-da-qualidade-do-leite/>

[17] CORDELLA, C.; MOUSSA, I.; MARTEL, A.C.; SBIRRAZZUOLI, N.; LIZZANICUVELIER, L. Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.1751-1764, 2002.

<https://doi.org/10.1021/jf011096z>

[18] KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, v. 102, p. 621-640, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042>

[19] DE LA FUENTE, M.A.; JUAREZ, M. Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, n. 7, p. 563–585, 2005.

<https://doi.org/10.1080/10408690490478127>

[20] ALMEIDA, M.R.; OLIVEIRA, K.S.; STEPHANI, R. & OLIVEIRA, L.F.C. Application of FT-Raman spectroscopy and chemometric analysis for determination of adulteration in milk powder. **Analytical Letters**, v. 45, p. 2589-2602, 2012.

<https://doi.org/10.1080/00032719.2012.698672>

[21] BRASIL, Poder Executivo. Decreto número 30.691, de 29 de março de 1952. Diário Oficial da União. Rio de Janeiro, 07 jul. 1952. Disponível em <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1950-1959/decreto-30691-29-marco-1952-339586-normaatualizada-pe.pdf>

[22] CASTRO, M. T. de. **Fraudes no leite: riscos para a segurança dos alimentos e para a Saúde Pública**. 2019. Disponível em < <https://foodsafetybrazil.org/fraudes-leite-saude-publica-e-seguranca-de-alimentos/>>

[23] ROBSON, Kelsey et al. A comprehensive review of food fraud terminologies and food fraud mitigation guides. **Food Control**, Volume 120, February 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107516>

[101] BECKER, Heinz; BERGER, Werner; DOMSCHKE, Günter. **Organicum: Manual Prático de Química Orgânica**. Elsevier, 2013. Disponível em <https://www.elsevier.com/books/organicum/becke/978-0-201-05504-7>

[25] RIGAZZO, J. N.; VIANA, R. da S.; FIGUEIREDO, P. A. M. de; LISBOA, L. A. M.; JÚNIOR, R. S. **Efeitos de diferentes doses de Ácido salicílico sobre características fisiológicas no desenvolvimento inicial de sorgo sacarino. Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário**. Anais...1o Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas, 2016 . Disponível em <https://releia.ifsertao-pe.edu.br/jspui/bitstream/123456789/689/1/TCC%20-%20PRODU%C3%87%C3%83O%20DE%20ALFAFA%20SOB%20D%C3%89FICIT%20H%C3%8DDRICO%20E%20APLICA%C3%87%C3%83O%20DE%20%C3%81CIDO%20SALIC%20%C3%8DLICO%20NO%20SUBM%C3%89DIO%20VALE%20DO%20S%C3%83O%20FRAN%20CISCO.pdf>

[26] SILVA, M. dos S.; SILVA, R. P. da; SOUZA, A. V. L. de; XAVIER, Y. P. M.; OLIVEIRA, A. C. de; COQUEIRO, D. S. O. - **Exogenous application of salicylic acid in yellow passion fruit for the control of fruit woodiness virus**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 83, p. 1–7, 2016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000082015>

[27] BAYER. Sobre Aspirina: História. Disponível em https://i-flora.iq.ufrj.br/hist_interessantes/aspirina.pdf

[28] PIMENTEL, Arthur dos Santos. **Peeling, máscara e acne**. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2008
Disponível em https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/07/061_PEELING_QUIMICO_COMO_TRATAMENTO_ES_T%C3%89TICO.pdf

[29] CAVALCANTE, P. M. M.; DA SILVA, R. L.; DE FREITAS, J. J. R.; DE FREITAS, J. C. R. FILHO, J. R. de F. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: Um experimento de análise orgânica na graduação. **Educacion Quimica**, v. 26, n. 4, p. 319–329, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.07.003>

[30] MARTINDALE: The extra pharmacopoeia. 30.ed. London: **Pharmaceutical Press**, 1993. p.766-771, 783-785, 1380-1381. Disponível em

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-13052009-163752/publico/TatianeRRamos_Mestrado.pdf>

[31] THOMPSON L (2005) Antiinflamatórios Agents. In: Khan CM (ed) **The Merck Veterinary Manual**, 9º edn, Whitehouse Station: Merck & Co. Inc. Disponível em

<<https://www.merckvetmanual.com/?redirectid=18?ruleredirectid=30&cfile=htm/bc/191605.ht>>

[32] ADAMS HR (2001) Veterinary pharmacology and therapeutics, 8ª ed. Blackwell Publishing, Oxford. Disponível em

https://www.academia.edu/45666571/Veterinary_Pharmacology_and_Therapeutics_J_Riviere_M_Papich

[33] RASKIN I (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 439-463

<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002255>

[34] THUN MJ, NAMBOODIRI MM, CALLE EE, FLANDERS WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. **Câncer Res.** 1993 Mar 15;53(6):1322-7. PMID: 8443812.

<https://doi.org/10.1186/1471-2407-2-31>

[35] Agência Internacional de Pesquisa em Câncer. Manuais de Prevenção do Câncer da IARC: Medicamentos Antiinflamatórios não Esteroides 1997;1:1-202. Disponível em

<<https://www.inca.gov.br/en/node/1810>>

[36] PRECISA DE CJ, BROOKS PM. Farmacocinética clínica dos salicilatos. **Farmacocinética Clínica** 1985;10:164-77.

Disponível em <https://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/7411/salicilatos.htm>

[37] MADAN, RK E LEVITT, J. Uma revisão da toxicidade das preparações tópicas de ácido salicílico. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 70 (4), 788-792, 2014. doi: 10.1016 / j.jaad.2013.12.005

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.12.005>

[38] AYATOLLAHI S. et al. Radiation chemistry of salicylic acid and methyl substituted salicylic acids: Models for the radiation chemistry of pharmaceutical compounds. **Radiation Physics and Chemistry**, v.92, p. 93-98, 2013

<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.06.007>

[39] SINGH, P., & GANDHI, N. (2015). Conservantes e adulterantes do leite: processamento, questões regulatórias e de segurança. **Food Reviews International**, 31(3), 236–261. doi:10.1080/87559129.2014.994818

<https://doi.org/10.1080/87559129.2014.994818>

[40] MADAN, RK E LEVITT, J. Uma revisão da toxicidade das preparações tópicas de ácido salicílico. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 70 (4), 788-792, 2014. doi: 10.1016 / j.jaad.2013.12.005

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.12.005>

[41] GENTILI, A., CARETTI, F., BELLANTE, S. *et al.* Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. **Anal Bioanal Chem** 404, 1375–1388 (2012). <<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6231-0>>

<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6231-0>

[42] SOUZA, G. C. S., SILVA, P. A. B., LEOTÉRIO, D. M. S., PAIM, A. P. S., & LAVORANTE, A. F. A multicommuted flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples. **Food Control**, 46, 127–135, 2014

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.021>

[43] ZAVAR, M. H. A., HEYDARI, S., & ROUNAGHI, G. H. (2013). Electrochemical determination of salicylic acid at a new biosensor based on polypyrrole-banana tissue composite. **Arabian Journal for Science and Engineering**, 38, 29–36.

<https://doi.org/10.1007/s13369-012-0411-2>

[44] BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, 181, 31–37, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.077>

[45] KOVARIK, M. L.; GACH, P. C.; ORNOFF, D. M.; WANG, Y.; BALOWSKI, J.; FARRAG, L.; ALLBRITTON, N. L. Micro Total Analysis Systems for Cell Biology and Biochemical Assays. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 516–540, 2012.

<https://doi.org/10.1021/ac202611x>

[46] LIANA, D. D.; RAGUSE. B.; GOODING, J. J.; CHOW, E. Recent Advances in PaperBased Sensors. **Sensors**, v.12, p. 11505-11526, 2012.

<https://doi.org/10.3390/s120911505>

[47] MARTINEZ, A. W. et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007.

<https://doi.org/10.1002/anie.200603817>

[48] CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–7095, 2009.

<https://doi.org/10.1021/ac901071p>

[49] ESPINOLA, A. Fritz Feigl: sua obra e novos campos tecno-científicos por ela originados. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 169–176, fev. 2004. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100029>

[50] FEIGEL, F.; ANGER, V. *Spot Tests in Organic Analysis*. Elsevier Inc., 1973. Disponível em:

<https://doi.org/10.1149/1.2403827>

[51] FEIGL, F.; OESPER, R. E. *Spot Tests in Inorganic Analysis*. Elsevier Inc., 1972.

[52] M. YOUNAS, A. MARYAM, M. KHAN, AA NAWAZ, SHI JAFFERY, MN ANWAR E L. ALI, *Microfluid. Nanofluido*. 2019, 23 , 38 .

<https://doi.org/10.1007/s10404-019-2208-z>

[53] ANA CAROLINA RAFANHIN SOUSA, CLEYTON NASCIMENTO MAKARA, LAÍS CANNIATTI BRAZACA, EMANUEL CARRILHO, A colorimetric microfluidic paper-based analytical device for sulfonamides in cow milk using enzymatic inhibition, **Food Chemistry**, Volume 356, 2021, 129692, ISSN 0308-8146

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129692>

[54] LEWIS GG, DITUCCI MJ, BAKER MS, PHILLIPS ST. High throughput method for prototyping three-dimensional, paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**. 2012 Aug;12(15):2630-2633. DOI: 10.1039/c2lc40331e. PMID: 22706568.

<https://doi.org/10.1039/c2lc40331e>

[55] SONGJAROEN, T.; Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Laiwattanapaisal, W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. **Talanta**, v. 85, p. 2587–2593, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.024>

[56] NIE, J.; ZHANG, Y.; LIN, L.; ZHOU, C.; LI, S.; ZHANG, L.; LI, J. Low-Cost Fabrication of Paper-Based Microfluidic Devices by One-Step Plotting. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 6331–6335, 2012.

<https://doi.org/10.1021/ac203496c>

[57] MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WILEY, B. J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G. M. FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**. v. 8, p. 2146–2150, 2008.

<https://doi.org/10.1039/b811135a>

[58] BÁRBARA G. S. GUINATI,*^a Lucas R. Sousa,^a Karoliny A. Oliveiraa and Wendell K. T. Coltro. Simultaneous analysis of multiple adulterants in milk using microfluidic paper-based analytical devices† *^{ab}. **Analytical Methods** .28 de novembro de 2021, edição 44, página 5257 a 5392.

<https://doi.org/10.1039/D1AY01339D>

[59] YU, J. et al. Light-Controlled Configurable Colorimetric Sensing Array. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 10, p. 6632–6637, 2019.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00549>

[60] LI, Z.; ASKIM, J. R.; SUSLICK, K. S. The Optoelectronic Nose: Colorimetric and Fluorometric Sensor Arrays. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 1, p. 231–292, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00226>

[61] SWINEHART, D. F. The Beer-Lambert law. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 7, p. 333–335, 1962.

<https://doi.org/10.1021/ed039p333>

[62] JAIN, R. et al. Advances in Imaging-Assisted Sensing Techniques for Heavy Metals 79 in Water: Trends, Challenges, and Opportunities. **Trends in Analytical Chemistry**, p. 115758, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115758>

[63] KANCHI, S. et al. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: **A review. Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, n. November, p. 136–149, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.021>

[64] SHEINI A. Colorimetric aggregation assay based on array of gold and silver nanoparticles for simultaneous analysis of aflatoxins, ochratoxin and zearalenone by using chemometric analysis and paper based analytical devices. **Mikrochim Acta**. 2020 Feb 13;187(3):167. doi: 10.1007/s00604-020-4147-5. PMID: 32055989.

<https://doi.org/10.1007/s00604-020-4147-5>

[65] HARMEET KAUR KELDA AND PRABHPREET KAUR. A review: Color models in image processing. **Int. J. Computer Technology**, 5(2):319 – 322, 2014.

<https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/use-and-analysis-of-color-models-in-image-processing-2157-7110-1000533.pdf>

[66] KATHERINE LEON, DOMINGO MERY, FRANCO PEDRESCHI, AND JORGE LEON. Color measurement in lab units from {RGB} digital images. **Food Research International**, 39(10):1084 – 1091, 2006. Physical Properties {VI}.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006>

[67] GONZALEZ, RAFAEL C.; WOODS, Richard E. *Processamento de imagens digitais*. Editora Blucher, 2000.

[68] IBRAHEEM, Noor A. et al. Understanding color models: a review. **ARNP. Journal of science and technology**, v. 2, n. 3, p. 265-275, 2012. Disponível em

https://www.researchgate.net/publication/266462481_Understanding_Color_Models_A_Review

[69] GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, Richard E. **Processamento de imagens digitais**. Editora Blucher, 2000. ISBN 8521202644, 9788521202646

[70] CARDOSO, Djeifry Edmilson Barbosa Fernandes. **Aplicação de imagem digital ao Controle da Qualidade**. 2014. Tese de Doutorado. Disponível em

< <https://eg.uc.pt/handle/10316/32350> >

[71] PASSARETTI FILHO, JULIANO. **Análise de imagens para fins analíticos: aplicações ambientais e tecnológicas**. 2015. 161 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química., 2015. Disponível em:

<<http://hdl.handle.net/11449/143007>>

[72] BERNAR, L. P. **Titulação automática com detecção digital RGB e uso de seringa microvolumétrica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2017. Disponível em

< <https://repositorio.unb.br/handle/10482/24700> >

[73] KOMPANY-ZAREH, M.; MANSOURIAN, M.; RAVAEI, F. Simple method for colorimetric spot-test quantitative analysis of Fe(III) using a computer controlled handscanner. **Analytica Chimica Acta**, v. 471, n. 1, p. 97-104, 2002

[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00871-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00871-1)

[74]. TRINDER P. Rapid determination of salicylate in biological fluids. **Biochem J**. 1954 Jun;57(2):301-3. doi: 10.1042/bj0570301. PMID: 13172184; PMCID: PMC1269746.

<https://doi.org/10.1042/bj0570301>

[75] AGREN, A. The complex formation between iron(iii)ion and some phenols .2. Salicylic acid and para-amino salicylic acid. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 8, n. 6, p. 1059-1072, 1954.

<https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.08-1059>

[76] JENNESS, R.; PATTON, S. **Principles of Dairy Chemistry**, Chapman & Hall, p. 224- 232, p.95-99, 1959.

Disponível em <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/2838/1/texto%20completo.pdf>

[77] FOYE, W. O.; TURCOTTE, J. G. Stability of metal complexes of nuclear-substituted salicylic acids - correlation with biological effects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 329-332, 1962.

<https://doi.org/10.1002/jps.2600510408>

[78] M.A. KOUPPARIS, P.I. ANAGNOSTOPOULOU, Automated flow injection determination of salicylates using Trinder reaction for clinical analysis, assays and dissolution studies of formulations, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Volume 6, Issue 1, 1988, Pages 35-46,

[https://doi.org/10.1016/0731-7085\(88\)80028-1](https://doi.org/10.1016/0731-7085(88)80028-1)

[78] NALIN RATNARATHORN, WIJITAR DUNGCHAI Paper-based Analytical Device (PAD) for the Determination of Borax, Salicylic Acid, Nitrite, and Nitrate by Colorimetric Methods. **J Anal Chem** 75, 487–494 (2020).

<https://doi.org/10.1134/S1061934820040127>

[79] LI-JUN SUN, ZHONG-QIN PAN, JING XIE, XIAO-JUN LIU, FENG-TING SUN, FENG-MING SONG, NING BAO, HAI-YING Gu, Electrocatalytic activity of salicylic acid on Au@Fe₃O₄ nanocomposites modified electrode and its detection in tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Volume 706, 2013, Pages 127-132, ISSN 1572-6657.

<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.07.038>

- [80] Marques, Thiago L. et al. “Systematic evaluation of sample preparation for fractionation of phytohormone salicylic acid in fresh leaves.” **Talanta** 208 (2020):1 20352. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914019309853>
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120352>
- [81] DETPISUTTITHAM, WARINTHORN & NGAMCHANA, SIRIMARN & RIJIRAVANICH, PATSAMON & SURAREUNGCHAI, WERASAK. Electrochemical Detection of Salicylic Acid in Pickled Fruit/Vegetable and Juice. 291-297 , 2020. **Journal of Analysis and Testing**, 4. 10.1007/s41664-020-00127-y.
<https://doi.org/10.1007/s41664-020-00127-y>
- [82] SZKOP, M., SZKOP, U., KĘSZYCKA, P. et al. Um protocolo simples e robusto para determinação rápida de RP-HPLC de salicilatos em alimentos. **Food Anal. Methods** 10, 618–625 (2017).
<https://doi.org/10.1007/s12161-016-0621-4>
- [83] ICH Harmonised Tripartite Guideline- Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005.
Disponível em <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- [84] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INIMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
Disponível em http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf.
- [85] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
Disponível em https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html
- [86] RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova** v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 200.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>

[87] ICH, International Conference on Harmonisation; **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf

[89] PEREIRA AV, VALUS N; BELTRAME FL, GARRIDO LH. Determinação de ferro (III) em produtos farmacêuticos por titulação fotométrica. **Acta Scientiarum. Health Sciences** 33 (1), 65-70, 2011
<https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v33i1.8034>

[90] AOAC, 2002. AOAC (AOAC INTERNATIONAL). AOAC International guidelines for validation of qualitative binary chemistry methods. **Journal of AOAC International**, v. 97, p. 1492- 1495, 2014.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.BinaryGuidelines>

[91] MARTINS, L. S. Pereira. **Monitoramento da produção de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentado pelos grãos de kefir e do tibet utilizando técnicas voltamétricas e HPLC**. 2006. Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, SP- 2006. Disponível em < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-16042007-102526/publico/LidiaSantosPereiraMartins.pdf>>

[92] A-NVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº899, de 29/05/2003. Disponível em < https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html>

[93] US PHARMACOPEIA -United States Pharmacopeia Convention; 24; Validation of compendial methods, Rockville, 1999.

Disponível em https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/54444492/RegulationsAndQuality-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1659621661&Signature=bWum68fXq24O~rswFPnJq01VMgvNXe7xt3F~6rYnxivqj7JDUWSlA27F-OpdmFwtAgBruMQ5wWqKyqtA0-Ag70WBzA879hfzGES9wfEGRb-IoJxzI26ovouYerhDFY0dbcz3phK3lyozHKuCX3sZiM23DprPu6tCJZaj0cFzQdF9UaD4cKugWd5rlBA5SJXxfHKP-7wMel5GRVY~4OVGR4InB3iBXVC0Pa5BBnPH4E3NAts9a6VXNZGkz66A-NipwR1oOQHYCM~WR1GVnTO~8kD683I3vkkwuqv7Xxj61-KZGSQO8PIXvA0NMz-HBjQg3zzFYo5dLgCXRRTbz-4Trg_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=743

[94] ICH -International Conference on Harmonisation; Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B, 1997. Disponível em https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527335633_c01.pdf

[95] BRASIL, Ministério da Agricultura Abastecimento e Pecuária. Instrução normativa nº 62. Brasília - D.F: 24 p. 2011. Disponível em < <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2018/06/IN62.pdf>>

[96] FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed., São Paulo: Organização Andrei Editora, 1977. p. 97 – 99.
Disponível em https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/farmacopeia_volume-1_2010.pdf

[97] Methods of test for dairy industry - part 2: chemical analysis of milk, bis is 1479-2 : 1961(r2003). Is : 1479 (part ii) – 1961. 2013.
Disponível em <https://law.resource.org/pub/in/bis/S06/is.1479.2.1961.pdf>

[98] CVM Updates - FDA Annual Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed in 2014 for Use in Food-Producing Animals [Internet]. **Center for Veterinary Medicine**. 2022.
Disponível em:

<https://www.fda.gov/animal-veterinary/cvm-updates/fda-releases-annual-summary-report-antimicrobials-sold-or-distributed-2020-use-food-producing>

[99] União Europeia - Decisão N.º 1338/2015, de 30 de julho de 2015: Reconhecimento da equivalência dos planos de controle de resíduos da área animal de países que não fazem parte da União Europeia. (2015).

Disponível em < https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Damila_Batista_Caetano_Silva.pdf >

[100] DAVID H.; HON, S. Cellulose: A random walk along its historical path. **Cellulose**, v.1, n.1, p.1-25, 1994.

<https://doi.org/10.1007/BF00818796>