



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

DANILO RICARDO ALMEIDA GONZAGA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DO
ÍNDICE DE PERÓXIDO EM MANTEIGAS**

Recife

2022

DANILO RICARDO ALMEIDA GONZAGA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO EM MANTEIGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Química Industrial da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial à obtenção
do título Bacharel em Química Industrial.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Fernanda Araújo Honorato

Coorientador (a): Msc. Flávio Montenegro de Andrade

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gonzaga, Danilo Ricardo Almeida.

Validação de metodologia analítica para determinação do índice de peróxido em manteigas / Danilo Ricardo Almeida Gonzaga. - Recife, 2022.
65 : il., tab.

Orientador(a): Fernanda Araújo Honorato

Coorientador(a): Flávio Montenegro de Andrade

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Química Industrial - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, apêndices.

1. Índice de peróxido. 2. Iodometria. 3. Manteiga. 4. Validação de metodologia. I. Honorato, Fernanda Araújo. (Orientação). II. Andrade, Flávio Montenegro de. (Coorientação). III. Título.

540 CDD (22.ed.)

DANILO RICARDO ALMEIDA GONZAGA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO EM MANTEIGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Química Industrial da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial à obtenção
do título Bacharel em Química Industrial.

Aprovado em: 03/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Fernanda Araújo Honorato (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dr.^a Daniella Carla Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Engenheiro Químico João Carlos da Cunha Rangel (Examinador Externo)
Gerente Técnico do Laboratório de Combustíveis da UFPE

Dedicatória

À minha mãe Graça e à minha irmã Thayse,
por sempre confiarem em mim e no meu potencial. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me colocado no trilho do curso novamente e por ter me feito ultrapassar tantas barreiras encontradas no decorrer dessa caminhada.

Aos meus pais Graça e Givaldo por todo o amor, suporte emocional e pela possibilidade do acesso ao estudo, sem vocês eu nada seria.

À minha irmã Thayse que foi parceira em tantos momentos que precisei, você sim é uma super irmã e, agora, uma supermãe.

Aos meus familiares por depositar tanta confiança e expectativa nos meus projetos.

Ao meu grande amigo, que tenho um enorme orgulho pelo exímio profissional da química que se tornou: Jonatas Medeiros. Obrigado por toda a ajuda nos momentos de maior tensão na produção desse trabalho. Você é inspirador.

Ao doutor/amigo mais prestativo e humano que eu conheço Igor Lacerda.

À Camila Nunes, a musa da química. Muito obrigado pelas observações feitas neste trabalho, pelos conselhos e por estar comigo, sobretudo, nesse finalzinho de ciclo. Você é muito especial!

Ao meu amigo Fernando Oliveira, que esteve comigo desde a época do pré-vestibular, trilhamos caminhos diferentes, mas tive a sorte de encontrá-lo novamente na semifinal do trajeto. Obrigado por aquele despertar inicial, ainda quando eu não entendia quase nada sobre os assuntos da escrita formal.

A todos os meus amigos que acompanharam a minha trajetória de idas e vindas nesse curso, em especial: Johnatan, Dior e Jamily. Amo vocês!

Aos colegas que encontrei na retomada à universidade, pela parceria e por ser uma acalentadora rede de apoio: Nattany, Danyel, Júlia Silvestre, Maria Júlia, Maria Eduarda, Nataly, Laís, Rafael, Pedro, Anderson, Zé Carlos, Rafaela, Caio Lunguinho, Jocemar, Danielson, Sérgio, João e Suila. E aos colegas lá da turma inicial, que não vou citar nomes para não esquecer ninguém.

À Tássia Gonçalves, que além de ter sido minha colega no curso técnico e da minha turma original dessa graduação, foi fundamental para elucidar diversas dúvidas técnicas que apareceram no decorrer do trabalho.

À Eliliane Thaís, uma mulher guerreira, que tanto me inspirou pela sua história dentro e fora da universidade. Agradeço pelos momentos compartilhados, por ter me ajudado a desenhar o escopo dos meus trabalhos de estágio e TCC e, sobretudo, por aquela conversa que me fez refletir e, assim, despertar o interesse em voltar a estudar.

À Thaís Xavier, pelo acolhimento quando cheguei ao laboratório, pelas orientações, pelas conversas leves e por participar ativamente tanto no meu início na universidade (como minha monitora) quanto no fechamento do ciclo (na realização dessa validação).

À minha ex-chefa diva maravilhosa Sayonara Assis, por todo incentivo, pela parceria, pelo ser humano lindo e exemplar que é. Obrigado, milhões de vezes!

Aos meus amigos e ex-colegas de setor Claudio Everaldo e Henrique Sérgio, pelos bons momentos compartilhados.

Ao LFDA-PE e à equipe da SAP, por me proporcionar experiências profissionais e pessoais novas e sempre desafiadoras e do IQA-POA, em especial ao RT, Marcelo Farias, por todos os ensinamentos teóricos e práticos que foram fundamentais na para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas da rede LFDA Diego Fontana, Ana Laura e Alessandra Pulcineli pelas trocas de experiências acerca do tema desse projeto.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química (DEQ), em especial à Ana Paula, Yeda, Silvana, Jorge, Luciano, Glória, Sara, Angeles, Marta, Sônia e Olga (*in memoriam*).

À Fatinha, pelos lanches maravilhosos e pelas conversas divertidas.

À coordenadora do curso Íris Eucaris e ao secretário Ivson que foram essenciais nessa caminhada, sobretudo no retorno à universidade. Como já disse e reitero: uma grande parcela desse êxito devo a vocês.

Ao meu coorientador, chamado carinhosamente de Flavinho, muito obrigado, meu amigo, pelas correções minuciosas, por cada conversa de incentivo, todas as dicas e conselhos, por abrir a minha mente para esse mundo da escrita acadêmica e enfim, por todo o conhecimento compartilhado. Você tem uma mente brilhante e é um ser humano espetacular!

Às minhas professoras orientadoras do TCC e Estágio, Fernanda Honorato e Daniella Napoleão, por serem referências na área que atuam e por todo o suporte que me ofertaram, incluindo o emocional. Sou eternamente grato às duas e declaradamente fã das pessoas e profissionais que são.

E enfim, a todos os professores, de todas as áreas do conhecimento, que contribuíram imensamente para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

“Determine que algo pode e deve ser feito, e então você achará o caminho de fazê-lo”.
(Abraham Lincoln)

RESUMO

A manteiga, produto rico em gordura saturada de origem animal, possui uma enorme relevância no nicho de leite e derivados. É um produto que possui além da fração lipídica, vitaminas (A, B e D), sais minerais e uma pequena parcela de proteínas e lactose. É um alimento consumido no mundo todo e somente no Brasil, no ano de 2021, foi produzido um montante de 82 mil toneladas. Assim, no intuito de regulamentar a identidade e a qualidade dos produtos lácteos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu uma portaria para avaliar, dentre outros parâmetros, o índice de peróxido em manteigas. Esta análise tem por finalidade indicar o nível de oxidação do alimento e a presença desse composto orgânico, em valores acima de 1 miliequivalente (mEq) por quilograma (kg) de matéria gorda, constitui, nesse caso, uma fraude sanitária. Este trabalho tem por objetivo garantir a confiabilidade dos resultados do índice de peróxido em manteigas comerciais, emitidos pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco (LFDA-PE). A metodologia analítica para determinação do referido índice utiliza a titulometria indireta de oxirredução (iodometria), cujo procedimento é descrito nos métodos oficiais de análise da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) sob o nº 965.33. Para garantia da qualidade dos resultados, a metodologia foi validada, conforme exigências do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para tanto, foram estudados os parâmetros de validação analítica: precisão, limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho (faixa de aplicação do método), além da estimativa de incerteza de medição. Os resultados de repetibilidade foram estudados em dois níveis de concentração e o de precisão intermediária em um terceiro nível. Estes dados foram dispostos em tabelas e avaliados a partir do coeficiente de variação (CV), utilizando como critério de aceitação um valor de $CV \leq 20\%$, preconizado pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA. Para a estimativa de incerteza de medição, inicialmente, as fontes de incerteza foram identificadas e inseridas na ferramenta da qualidade diagrama de Ishikawa e posteriormente, calculadas e combinadas. Para a precisão em condições de repetibilidade foram obtidos: nível 1, $CV = 9,69\%$; nível 2, $CV = 7,55\%$ e para a precisão intermediária, no nível 3, $CV = 4,86\%$. O teste de Grubbs foi aplicado e resultou na ausência de *outliers* em todos os conjuntos de dados estudados. O LQ para o método foi de 0,55 e o valor máximo obtido foi de 11,47 mEq de $O_2 \cdot kg^{-1}$, sendo, portanto, a faixa de aplicação do método. Por fim, obteve-se uma estimativa de incerteza expandida de 0,36 mEq de $O_2 \cdot kg^{-1}$ para o valor de concentração de 0,59 mEq de $O_2 \cdot kg^{-1}$, estando de acordo com o critério de aceitação interno do laboratório.

Palavras-chave: Índice de peróxido. Iodometria. Manteiga. Validação de metodologia.

ABSTRACT

Butter, a product rich in saturated fat of animal origin, has enormous relevance in the niche of milk and dairy products. It is a product that has, in addition to the lipid fraction, vitamins (A, B and D), mineral salts and a small portion of proteins and lactose. It is a food consumed worldwide and in Brazil alone, in 2021, an amount of 82 thousand tons was produced. Thus, in order to regulate the identity and quality of dairy products, the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) instituted an ordinance to assess, among other parameters, the peroxide index in butters. This analysis aims to indicate the level of oxidation of the food and the presence of this organic compound, in values above 1 milliequivalent (mEq) per kilogram (kg) of fat, constitutes, in this case, a sanitary fraud. This work aims to guarantee the reliability of the results of the peroxide index in commercial butters, issued by the Federal Laboratory of Agricultural Defense in Pernambuco (LFDA-PE). The analytical methodology for determining this index uses indirect redox titration (iodometry), whose procedure is described in the official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) under No. 965.33. To guarantee the quality of the results, the methodology was validated, as required by the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO) and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). For that, the analytical validation parameters were studied: precision, quantification limit (LQ), working range (method application range), in addition to the estimation of measurement uncertainty. Repeatability results were studied at two levels of concentration and intermediate precision at a third level. These data were arranged in tables and evaluated based on the coefficient of variation (CV), using as an acceptance criterion a value of $CV \leq 20\%$, recommended by MAPA's Analytical Quality Assurance Manual. For the estimation of measurement uncertainty, initially, the sources of uncertainty were identified and inserted in the Ishikawa diagram quality tool and later, calculated and combined. For precision under repeatability conditions, the following were obtained: level 1, $CV = 9.69\%$; level 2, $CV = 7.55\%$ and for intermediate precision, at level 3, $CV = 4.86\%$. The Grubbs test was applied and resulted in the absence of outliers in all datasets studied. The LQ for the method was 0.55 and the maximum value obtained was $11.47 \text{ mEq of O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$, being, therefore, the range of application of the method. Finally, an expanded uncertainty estimate of $0.36 \text{ mEq of O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ was obtained for the concentration value of $0.59 \text{ mEq of O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$, in accordance with the laboratory's internal acceptance criteria.

Keywords: Peroxide index. Iodometry. Butter. Methodology validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais países produtores de manteiga em 2021.	21
Figura 2 - Fluxograma de produção da manteiga.	22
Figura 3 - Estrutura química do ácido palmítico.	24
Figura 4 - Estruturas bidimensionais do CLA e Ácido linoleico.....	25
Figura 5 - Reação do $^1\text{O}_2$ com uma ligação dupla formando um hidroperóxido.....	27
Figura 6 - Etapa de iniciação da auto-oxidação.....	27
Figura 7 - Etapa de propagação da auto-oxidação.....	28
Figura 8 - Etapa de terminação da auto-oxidação.....	28
Figura 9 - Formação de produtos estáveis a partir de radicais alcóxi.....	29
Figura 10 - Reações de oxirredução da iodometria.	32
Figura 11 - Espécie de iodo (I_3^-) incorporada à hélice de β -amilose.	35
Figura 12 - Ilustração do diagrama de Ishikawa (ou de causa e efeito).....	38
Figura 13 - (a) Início da titulação, antes da adição do tiosulfato; (b) Durante a adição de tiosulfato, momento da adição do indicador amido; (c) Coloração da solução devido ao complexo amido-iodo; (d) Ponto final da titulação.	41
Figura 14 - (a) Estufa incubadora utilizada; (b) Detalhe da filtração das amostras.....	42
Figura 15 - Estabilidade da solução de tiosulfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$	48
Figura 16 - Diagrama de Ishikawa para a metodologia de determinação do teor de peróxido em manteigas.	53
Figura 17 - Percentual das Incertezas padrão associadas ao processo de validação.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros mínimos de qualidade.	23
Tabela 2 -Principais características das fases que compõem a auto-oxidação.	29
Tabela 3 - Dados referentes ao procedimento de padronização da solução de tiosulfato.	47
Tabela 4 - Avaliação dos dados referentes à padronização.	48
Tabela 5 - Resultados obtidos no teste de repetibilidade (nível 1).	49
Tabela 6 - Resultados obtidos no teste de repetibilidade (nível 2).	50
Tabela 7 - Avaliação da precisão (repetibilidade) dos conjuntos de dados.	50
Tabela 8 - Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária (nível 3).....	51
Tabela 9 - Avaliação da precisão intermediária do conjunto de dados.....	52
Tabela 10 - Incertezas padrão associadas a cada etapa do processo de validação.....	55
Tabela 11 - Dados da estimativa de incerteza do método analítico.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGL	Ácidos Graxos Livres
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CLA	<i>Conjugated Linoleic Acid</i>
CV	Coefficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FISPQ	Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IQA	Identidade e Qualidade de Alimentos
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LFDA	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCV	Movimento Custo de Vida
MET	Metodologia
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NOX	Número de Oxidação
POA	Produtos de Origem Animal e Água
RPM	Rotações por minuto
RTIQ	Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade
SIF	Serviço de Inspeção Federal
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

LISTA DE SÍMBOLOS

CH_3COOH	Ácido acético
a_w	Atividade da água
CHCl_3	Clorofórmio
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Dicromato de Potássio
g	Grama
HCl	Ácido clorídrico
L	Litro
KI	Iodeto de potássio
kg	Quilograma
mEq	Miliequivalente
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Tiosulfato de sódio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	MANTEIGA	20
2.1.1	Processo produtivo da manteiga	21
2.1.2	Classificação das manteigas comerciais	22
2.1.3	Composição das manteigas	24
2.2	PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO LIPÍDICA	25
2.2.1	Auto-oxidação	26
2.2.1.1	Iniciação	26
2.2.1.2	Propagação	27
2.2.1.3	Terminação.....	28
2.2.2	Fatores que favorecem a oxidação	30
2.3	QUANTIFICAÇÃO DA DEGRADAÇÃO LIPÍDICA	31
2.3.1	Índice de peróxido	31
2.3.1.1	Titulação iodométrica: reagentes, características e padronização.....	32
2.3.1.1.1	<i>Tiosulfato de sódio</i>	33
2.3.1.1.2	<i>Estabilidade de soluções de tiosulfato</i>	33
2.3.1.1.3	<i>Padronização de soluções de tiosulfato</i>	34
2.3.1.1.4	<i>Indicador químico do ponto final da titulação</i>	34
2.3.1.2	Especificação legal do índice de peróxido em manteigas	35
2.4	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	36
2.4.1	Parâmetros de desempenho	36
2.4.1.1	Precisão	36
2.4.1.2	Exatidão.....	37
2.4.1.3	Limite de quantificação (LQ)	37
2.4.1.4	Faixa de trabalho (faixa de aplicação do método).....	37

2.5	ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO	38
3	METODOLOGIA	40
3.1	PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO	40
3.2	PREPARO DE AMOSTRA DE MANTEIGA	41
3.3	QUANTIFICAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO	42
3.3.1	Teste da estabilidade da solução saturada de KI.....	43
3.4	ESTUDO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	43
3.4.1	Precisão.....	44
3.4.2	Limite de quantificação.....	45
3.4.3	Faixa de trabalho (faixa de aplicação do método).....	45
3.4.4	Estimativa de incerteza de medição.....	45
3.4.4.1	Determinação da incerteza expandida do método.....	45
3.4.5	Teste de Grubbs.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	ANÁLISES PRELIMINARES	47
4.1.1	Padronização da solução de Na₂S₂O₃	47
4.2	PRECISÃO.....	49
4.2.1	Repetibilidade	49
4.2.2	Precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial)	51
4.3	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	52
4.4	FAIXA DE TRABALHO (FAIXA DE APLICAÇÃO DO MÉTODO).....	52
4.5	ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO	52
4.5.1	Incerteza associada a precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial).....	53
4.5.2	Incerteza associada a padronização (Na₂S₂O₃).....	54
4.5.3	Incerteza associada à determinação de Peróxido	54
4.5.4	Determinação das incertezas padrão associadas ao método	55

4.5.5	Determinação da incerteza expandida do método.....	56
5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A - DADOS RELATIVOS ÀS FONTES DE INCERTEZA	64

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, desde o período colonial, existia uma grande preocupação dos governantes com o abastecimento de produtos alimentícios. No século XX, por intermédio de lutas travadas pelos movimentos sociais contra a carestia ou, mais conhecido como, Movimento Custo de Vida (MCV). Este mobilizou milhares de pessoas para protestar contra o preço dos alimentos e demais produtos essenciais. Com ele, a questão alimentar ganhou maior notoriedade e se encaminhou para se tornar uma política pública. Em 1985, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do primeiro governo civil, lança a Política Nacional de Segurança Alimentar, que visava promover a garantia ao acesso físico e econômico aos alimentos e em quantidades suficientes (KLIASS, 2022; BELIK, 2012).

O direito a uma alimentação saudável, balanceada, regular e adequada se estabelece como uma prática basilar para a existência humana. Para atender esses requisitos as necessidades biológicas e sociais do indivíduo devem ser priorizadas, bem como as especificidades alimentares que este necessita. O equilíbrio entre a variabilidade nutricional, moderação e prazer no ato de se alimentar constituem pilares básicos do referido direito (BRASIL, 2014).

Especialmente no Brasil, um dos alimentos que mais contribuem para a manutenção de uma dieta saudável e nutritiva, é o leite. Este produto complexo contém diversas substâncias que estão em solução, suspensão ou emulsão em água, como proteínas, carboidratos, gorduras e vitaminas lipossolúveis. O Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), produziu mais de 34 bilhões de litros de leite no ano de 2019, abrangendo quase todos os municípios brasileiros e com predominância em pequenas e médias propriedades. A produção se concentra, em sua maioria, em cinco estados: Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Santa Catarina, com cerca de 70% do total da produção. O leite e seus derivados se estabelecem no agronegócio brasileiro em papéis de grande destaque, uma vez que contribuem para o suprimento de alimentos, bem como para a geração de emprego e renda para a população (MAPA, 2022; HOTT; GUIMARÃES; WALTER, 2021; VILELA *et al.*, 2016).

Um importante nome derivado desse nicho alimentício é a manteiga, amplamente conhecida por ser um produto rico em gordura saturada e de origem animal. Outrora tida como “vilã do colesterol”, ela tem ganhado notoriedade positiva e, nos últimos anos, tal afirmação vem sendo desmistificada. A manteiga, quando ingerida moderadamente, tem sido uma alternativa para aqueles consumidores que buscam uma fonte de gordura natural e mais saudável que a margarina, por exemplo. Possuindo um alto teor de gorduras trans, a margarina

é obtida, basicamente, da hidrogenação de óleos vegetais e seu consumo contribui, comprovadamente, com possíveis elevações do colesterol “ruim”, o *Low Density Lipoprotein* (LDL) e consequente diminuição do colesterol do tipo “bom”, o *High Density Lipoprotein* (HDL) (FERREIRA; SIQUEIRA; STOCK, 2021; CAPRILES; ARÊAS, 2005).

A manteiga dispõe de uma série de nutrientes fundamentais para o bom funcionamento do organismo humano, dentre eles estão as vitaminas do complexo B, como a tiamina, a riboflavina e a importante vitamina B12 (cobalamina) que atua na formação dos glóbulos vermelhos e na síntese do Ácido Desoxirribonucleico (DNA). Além disso, a falta dessa vitamina ou a sua não absorção pelo organismo pode causar severos quadros de anemia, incluindo a classificada como perniciosa. A vitamina A também está presente nessa lista e em menores proporções figuram a vitamina D e o ácido fólico (JOHNSON, 2020; SILVA, 2019).

Visando regulamentar as práticas concernentes à produção de manteiga no Brasil, o MAPA instituiu portaria, resolução e Instrução Normativa (IN), com os requisitos da composição, qualidade e identidade da manteiga. Nesses documentos, foram definidas metodologias analíticas oficiais para determinação dos parâmetros de qualidade, limites mínimos e máximos, unidades de medida aplicáveis, entre outros (BRASIL, 2001; BRASIL; 2000; BRASIL, 1996).

A quantidade de peróxidos em gorduras como a manteiga, é um importante indicador do nível de oxidação desse alimento. Eles são os produtos primários sensorialmente inertes da rancidez oxidativa (auto-oxidação). A determinação do índice de peróxido é o meio utilizado para avaliar a oxidação, em que se aplica os princípios da iodometria (titulação indireta), utilizando excesso do ânion iodeto para formar o iodo molecular e assim reagir com o titulante, no caso, o tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (JORGE, 2009).

Com o intuito de viabilizar as atividades do Serviço de Inspeção Federal (SIF) para a manteiga, incluindo outros produtos de origem animal e vegetal, o MAPA atua em todo o Brasil, através de uma rede de Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) e laboratórios credenciados, na análise de amostras periciais. O órgão fornece, através de ferramentas da qualidade e de gestão, dados técnicos e resultados de análises laboratoriais confiáveis e rastreáveis. Além disso, a rede LFDA, composta por seis laboratórios distribuídos estrategicamente em todo o território nacional, realiza pesquisa e desenvolvimento de métodos analíticos, produz e fornece material de referência, realiza ensaios interlaboratoriais, além da validação, verificação, e/ou confirmação de desempenho de metodologias (MAPA, 2022; BRASIL, 2019a).

Os laboratórios, ao utilizar métodos de ensaios oriundos de organismos de normalização, devem comprovar que conseguem emitir resultados analíticos confiáveis. Para isto, devem fazê-lo através da reprodução adequada dos referidos métodos, dentro das condições e aparatos operacionais existentes nas suas instalações (INMETRO, 2020).

Essa comprovação pode ser obtida por meio da validação/verificação de desempenho. Tais etapas envolvem estudos de sucessivos experimentos, organizados e documentados, de modo a demonstrar que determinado método analítico avaliado é adequado à finalidade pretendida. Isto é, que suas características de desempenho sejam capazes de produzir resultados que atendam às necessidades do problema analítico (MAPA, 2015; LEITE, 2002).

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo geral realizar a validação da metodologia analítica para determinação do índice de peróxido, descrita no método oficial AOAC n° 965.33 (AOAC, 1969), conforme as condições operacionais disponíveis no LFDA-PE para fins de inspeção de alimentos. Visando alcançar esta proposta, os seguintes objetivos específicos foram elencados:

- a) Avaliar os parâmetros de validação da metodologia analítica para estudo apropriado do método em questão, tais como: precisão, limite de quantificação (LQ) e faixa de trabalho (faixa de aplicação do método).
- b) Determinar a estimativa de incerteza do método a partir dos resultados dos parâmetros de validação.

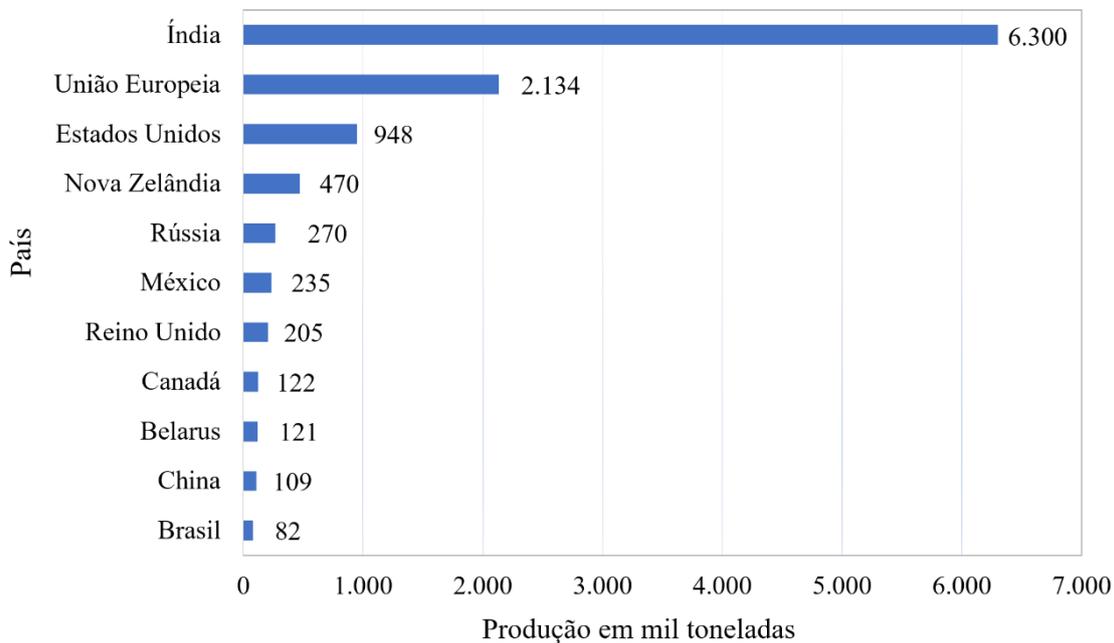
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MANTEIGA

O leite, matéria-prima para a produção da manteiga, é um alimento líquido de extrema importância nutricional, principalmente no período incipiente da vida de todos os mamíferos. É considerado um alimento completo, uma vez que é composto por proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e gorduras (lipídios). A fração lipídica do leite lhe confere uma cor amarelada e é composta por triglicerídeos, contendo ácidos graxos de diferentes comprimentos e saturação (95,80%); diglicerídeos (2,25%); fosfolipídios (1,11%); colesterol (0,46%); ácidos graxos livres (AGL) (0,28%); monoglicerídeos (0,08%); ésteres de colesterol (0,02%) e, por fim, traços de hidrocarbonetos (PANCIERI; RIBEIRO, 2021; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Manteiga, do latim *mantica*, corresponde a denominação dada à bexiga de animal usada para o transporte em tempos remotos. Tem sua aparição por volta de 1400 a.C, nos territórios da Grécia e Roma, onde acredita-se que a manteiga foi inicialmente utilizada. Nesse período, ela era usada apenas para fins medicinais, como unguento, isto é, na forma de pomada utilizada para tratar áreas inflamadas do corpo. Ela só foi utilizada como alimento, de fato, no século VII, quando seu uso foi disseminado para o norte da Europa, mais precisamente na Noruega (MAGALHÃES; GONDIM NETO, 2016).

Atualmente, a manteiga é um derivado lácteo globalmente apreciado, com a Índia se destacando em 2021 como maior produtora mundial, com total de 6,3 milhões de toneladas (Figura 1). Na sequência, a União Europeia e os Estados Unidos da América compõem o pódio dos maiores produtores mundiais de manteiga. O Brasil figura na 11ª posição no ranque, com uma produção de 82 mil toneladas (*United States Department of Agriculture*, 2021).

Figura 1 - Principais países produtores de manteiga em 2021.

Fonte: Adaptado do *UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE* (2021).

Segundo Nahid *et al.* (2008), a manteiga é definida como uma emulsão de água em gordura, em que a água está presente em aproximadamente 16% sob a forma de pequenas gotas esféricas ou ovais, impregnadas na fase contínua da gordura. Do ponto de vista técnico, ela pode ser compreendida como um produto gorduroso obtido estritamente da batadura (bateção) do creme de leite, separando-se a fase sólida da líquida (leitelho). A etapa posterior é a malaxagem que visa a retirada desse leitelho formado. Esse processo ocorre devido ao choque entre os glóbulos de gordura diminuírem sua tensão superficial, e aumentarem sua coesão, resultando em um produto mais uniforme e com maior rendimento. O creme de leite deve ser obrigatoriamente pasteurizado, podendo ter ou não modificação biológica, bem como ser oriundo exclusivamente do leite de vaca (VENQUIARUTO *et al.* 2013; BRASIL, 1996).

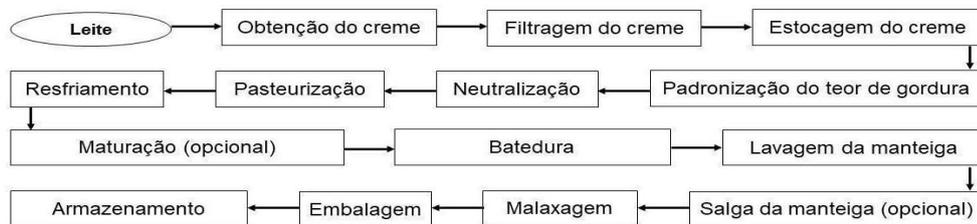
2.1.1 Processo produtivo da manteiga

A produção da manteiga se estabelece como uma das formas mais antigas de preservação da fração gordurosa do leite. Acredita-se que ela foi criada por acidente, quando uma porção de leite teria sido deixada e/ou esquecida em repouso, por um período suficiente para que fosse observada a formação de uma nata, e que ao ser batida, uma pasta de textura cremosa e agradável ao paladar era obtida (MASSA MADRE, 2018).

Até o final do século XIX, a manteiga era produzida de forma artesanal, principalmente nas fazendas, onde o desnate era feito através de agitação dentro de um barril. Posteriormente, passou-se a utilizar um invento de um cervejeiro bávaro, cujo princípio era o da conhecida centrífuga. O marco industrial do processo produtivo ocorreu em 1871, em Iowa, nos Estados Unidos da América, onde a primeira fábrica foi construída (HETTINGA; NGUYEN; SHAHIDI, 2020).

A produção de manteiga no Brasil é regulamentada pelo MAPA, cujo processo produtivo, de forma genérica, desde a obtenção do creme de leite até a embalagem e armazenamento, se encontra descrito na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma de produção da manteiga.



Fonte: Adaptado de SILVA (1996).

2.1.2 Classificação das manteigas comerciais

Segundo a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 a manteiga pode ser classificada quanto a matéria-prima em duas categorias: “manteiga extra” e “primeira qualidade”. Para estas manteigas, o creme pasteurizado do leite de vaca é um ingrediente obrigatório, enquanto o uso do cloreto de sódio e de fermento láctico pode ser opcional. É facultado ainda, aos produtores, a adição de ingredientes como: corantes, descorantes e coadjuvantes, desde que respeitado o que esteja estabelecido no respectivo regulamento técnico aplicável (BRASIL, 1996). A Tabela 1 reúne os parâmetros de qualidade pertinentes às referidas manteigas.

Tabela 1 - Parâmetros mínimos de qualidade.

Requisitos	Limite
Matéria gorda	Mínimo. 82 % (m/m) *
Umidade	Máximo. 16 % (m/m)
Extrato seco desengordurado	Máximo. 2 % (m/m)
Acidez na gordura	Máximo. 3 mmol/100g de mat. gorda
Índice de peróxido	Máximo. 1 mEq de peróxido/kg de mat. gorda

(*) No caso de manteiga salgada a percentagem de matéria gorda não poderá ser inferior a 80%.

Fonte: adaptado de BRASIL (1996).

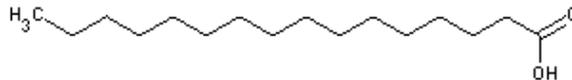
Outra classificação para a manteiga do creme de leite pasteurizado é disposta na Instrução normativa nº 30, de 26 de junho de 2001 do MAPA, em que o produto gorduroso, comumente denominado de manteiga de garrafa, possui consistência líquida ou pastosa e é produzido por eliminação quase total da água (máximo de 0,3 g de umidade/100g de amostra). Este tipo de manteiga pode ser vendido como “manteiga de garrafa”; “manteiga da terra” ou “manteiga do sertão”, com ou sem adição de sal, devendo estar especificado de forma clara no rótulo (BRASIL, 2001).

Por fim, segundo a resolução nº 4, de 28 de junho de 2000 do MAPA, tem-se a manteiga denominada do tipo “comum”, que pode ser obtida tanto a partir do creme de leite pasteurizado quanto do desnate do leite ácido ou do soro, em geral, advindo da fabricação de queijos. Entretanto, para utilizar algum desses últimos tipos de matéria-prima (menos nobres), deve-se seguir algumas especificações, como uma acidez máxima de 20° Dornic (sem ter sofrido nenhuma redução de acidez titulável anteriormente ao processo); obtido somente de estabelecimentos industriais vinculados ao SIF; ser mantido sob refrigeração na temperatura máxima de 5°C e pelo período máximo de 1 dia até o momento de sua pasteurização para o início da produção, entre outros (BRASIL, 2000).

2.1.3 Composição das manteigas

A manteiga é composta majoritariamente da gordura do leite, a qual apresenta alta concentração de ácidos graxos. Entre os demais compostos, estão a água, proteínas, vitaminas, ácidos, lactose e cinzas. O sal também pode fazer parte de sua composição (SILVA, 1996). Em relação aos seus compostos minoritários, a manteiga contém baixas concentrações de proteína, lactose e sais minerais, enquanto um teor considerável de vitamina A se faz presente em sua composição (SANTOS *et al.*, 2018). Quanto à fração lipídica da manteiga, os ácidos graxos saturados representam, aproximadamente, 63% da sua composição total, desse percentual o ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$), estrutura apresentada na Figura 3, é o que apresenta a maior concentração (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 3 - Estrutura química do ácido palmítico.



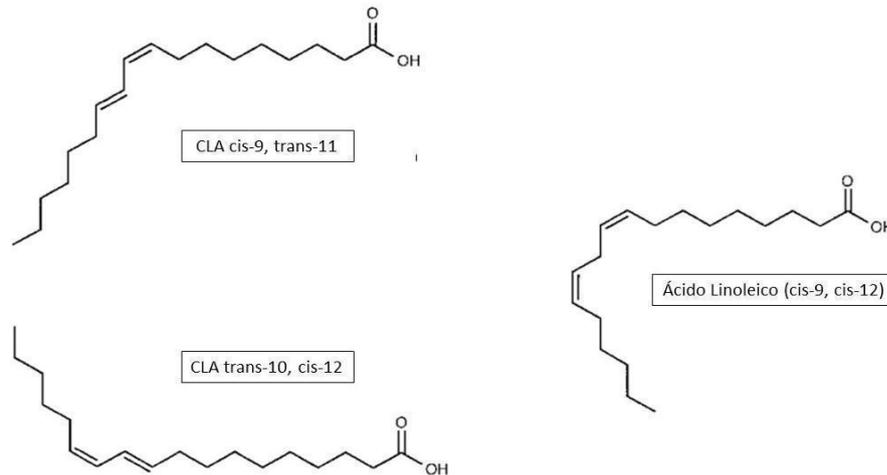
Fonte: CHEMSYNTHESIS CHEMICAL DATABASE (2022).

Por outro lado, em relação aos ácidos graxos insaturados, também presentes na fração lipídica da manteiga, destacam-se o ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) e o linoleico ($C_{18}H_{32}O_2$). O ácido linoleico conjugado (do inglês *Conjugated Linoleic Acid* (CLA)), representa um grupo de isômeros naturais do ácido linoleico e, desde o final dos anos 1970, período de seu descobrimento, ele vem ganhando notoriedade e investimento constante no tocante aos estudos sobre suas propriedades benéficas à saúde. Esse composto se destaca pela sua contribuição para o fortalecimento do sistema imunológico, aumento da mineralização óssea e apresentando também características anticarcinogênicas e antidiabéticas (NÖRNBERG *et al.*, 2022; NOVACK; FUKU; NÖRNBERG, 2013).

O teor de ácidos graxos insaturados na manteiga está estritamente relacionado com a composição do leite utilizado para sua produção. Por sua vez, este último depende do padrão de alimentação do animal, ou seja, a quantidade de forrageiras (pastagens) verdes que a vaca consome durante a vida interfere linearmente na proporção de CLA. Enquanto se o animal consome alimentos mais concentrados, como grãos, contendo elevado teor de amido, a quantidade do CLA diminui. O conteúdo, em média, desse composto, corresponde a 4,7 mg de CLA/g de gordura quando utilizada a manteiga como referencial. Nesse caso, o isômero cis-9, trans-11, também denominado ácido rumênico, é o responsável por mais de 80% desse total

(NÖRNBERG *et al.*, 2022; LUCATTO; BRANDÃO; DRUNKLER, 2014; NOVACK; FUKU; NÖRNBERG, 2013). A Figura 4 ilustra o ácido linoleico e os dois principais isômeros do CLA.

Figura 4 - Estruturas bidimensionais do CLA e Ácido linoleico.



Fonte: Adaptado de CHEMSYNTHESIS CHEMICAL DATABASE (2022).

2.2 PROCESSOS DE DEGRADAÇÃO LIPÍDICA

Os processos oxidativos (ou de rancidez) que ocorrem nos lipídios estão entre os mais frequentes e representam uma das principais causas da redução da vida de prateleira dos alimentos (SOARES *et al.*, 2012). A rancidez caracteriza o tipo de deterioração que ocorre nos alimentos, podendo ser dividida em hidrolítica e oxidativa (JORGE, 2009).

A rancidez hidrolítica pode decorrer da ação da enzima lipase ou por agente químico com a combinação de efeitos ambientais como calor e umidade. Esse tipo de decomposição das gorduras promove a formação de AGL, compostos que dão sabor e odor estranhos aos alimentos (ARAÚJO, 2008).

A rancidez oxidativa tem diversas origens, no entanto, a ação do oxigênio atmosférico sobre as insaturações dos ácidos graxos — mais susceptíveis ao ataque — se configura como a via mais comum desse processo. Essas reações possuem, na maioria das vezes, efeitos indesejáveis, uma vez que ocorre a degradação das vitaminas e ácidos graxos essenciais, resultando em perda significativa do valor nutricional. Entretanto, a produção de sabor e odor desagradáveis são, sobretudo, os piores efeitos gerados, prejudicando a integridade do alimento, na medida em que se gera compostos potencialmente tóxicos (JORGE, 2009; ARAÚJO, 2008; RAMALHO; JORGE, 2006; KIRK, 1984).

A rancidez oxidativa pode ocorrer pela ação das enzimas lipoxigenases, que agem sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a ação do oxigênio na cadeia ou pelo mecanismo da auto-oxidação, que depende da formação de radicais livres e é estabelecida como a principal rota para a degradação dos ácidos graxos (JORGE, 2009; RAMALHO; JORGE, 2006; BERGE; HAMILTON, 1995).

2.2.1 Auto-oxidação

Para que ocorra a formação dos peróxidos, é necessário que haja a produção de radical livre ($R\bullet$) a partir de um ácido graxo insaturado. Esse processo ocorre pela ação do oxigênio tripleto na presença de alguma fonte externa de energia, como o calor, a radiação ou reações químicas que envolvem íons metálicos (ARAÚJO, 2008).

Os radicais livres são espécies químicas ou fragmentos moleculares que possuem elétrons não pareados em seu orbital externo, sendo, portanto, muito instáveis e reativos. Os radicais livres podem reagir doando ou recebendo elétrons, o que implica dizer que de um jeito ou de outro o composto que interage com o radical livre também se torna um, indicando que as reações envolvendo essas espécies acontecem em cadeia (MARTELLI; NUNES, 2014; FOGAÇA; SANTANA, 2009; ARAÚJO, 2008). O processo de auto-oxidação se divide em três etapas que, com exceção da primeira, as demais ocorrem simultaneamente.

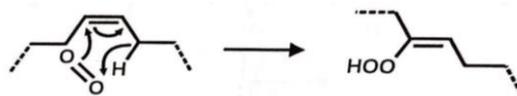
2.2.1.1 Iniciação

Esta etapa ocorre em presença de luz e calor, nela a formação dos radicais livres se dá a partir da retirada de um hidrogênio do carbono alílico da molécula de ácido graxo. A denominação “carbono alílico” é aplicada ao átomo de carbono adjacente àquele que contém a dupla ligação, cuja energia requerida para esta ação é menor, quando comparado ao carbono presente entre carbonos saturados (JORGE, 2009; RAMALHO; JORGE, 2006).

Para Coultate (2004), o início dessas reações em cadeia dá-se pela ação do oxigênio singleto (1O_2), destacando-o como uma forma de oxigênio com alta energia, de vida curta, porém bastante reativo que ataca diretamente as insaturações dos ácidos graxos. Como a molécula de lipídio é encontrada no estado singleto e o oxigênio do ar, como tripleto (3O_2), seria improvável uma interação natural entre ambos. Portanto, para que reações de degradação lipídica ocorram, moléculas de oxigênio tripleto são convertidas em oxigênio singleto, mediante uma série de etapas. Isso acontece quando o 3O_2 reage na presença de luz, diretamente com compostos fotossensíveis, naturalmente presentes nos alimentos, como a riboflavina e a clorofila (ARAÚJO, 2008).

Esse processo fornece energia em excesso ao oxigênio tripleto para que seus elétrons presentes em orbitais diferentes (girando na mesma direção) migrem para um único orbital passando a rotacionar em direções opostas, tornando-se assim uma espécie altamente eletrofílica. O oxigênio singleto ao reagir com a ligação dupla de um ácido graxo, modifica sua posição e conseqüentemente a configuração de *cis* para *trans* (Figura 5). A auto-oxidação, em si, ocorre quando há a decomposição dos primeiros hidroperóxidos, formando radicais peróxi e alcóxi (MAIA, 2015; ARAÚJO, 2008; COULTATE, 2004).

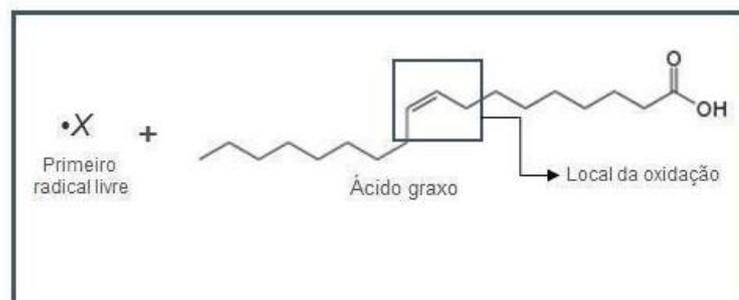
Figura 5 - Reação do $^1\text{O}_2$ com uma ligação dupla formando um hidroperóxido.



Fonte: Coultate (2004).

Segundo Jorge (2009), há duas possíveis rotas para as formações dos primeiros radicais: a decomposição dos hidroperóxidos já existentes no alimento e a oxidação dos ácidos graxos a partir de enzimas, como a lipoxigenase. Essa primeira etapa, também denominada de indução (Figura 6), acontece lentamente e produz majoritariamente compostos inodoros.

Figura 6 - Etapa de iniciação da auto-oxidação.



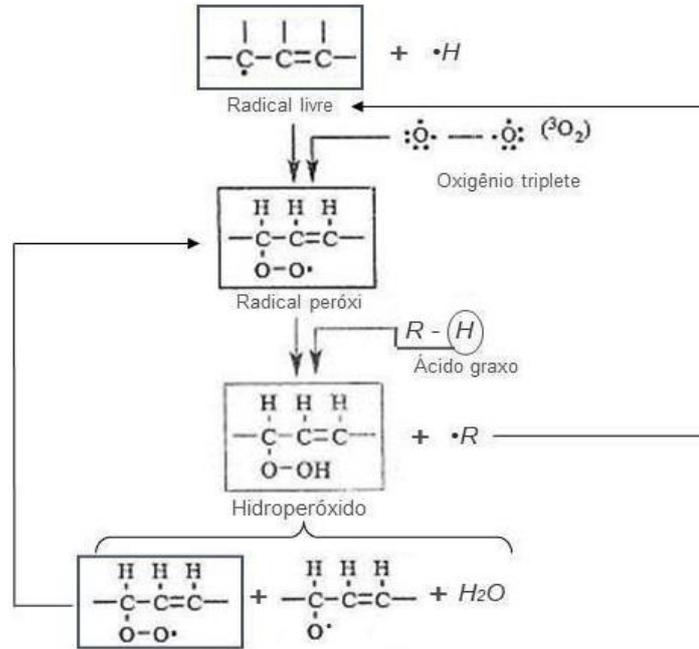
Fonte: Adaptado de COULTATE (2004) e ARAÚJO (2008).

2.2.1.2 Propagação

Uma vez iniciada, esta reação se desenvolve em cadeia de modo que é cessada apenas quando os reagentes envolvidos sejam totalmente consumidos (SOUZA, 2013; FERRARI, 1998). Nesta etapa, o radical livre formado ($R\cdot$) reage com o oxigênio dando origem ao radical peróxi ($\text{ROO}\cdot$), que retira o hidrogênio do carbono alílico do ácido graxo (RH) produzindo hidroperóxidos (ROOH), e outro radical alila, de modo que este último, torna-se disponível para reiniciar o mecanismo reacional. Os hidroperóxidos formados podem se romper, tornando-se novamente radicais, que reagem de modo semelhante aos outros. As reações envolvidas na

etapa de propagação (Figura 7) costumam ser muito rápidas e os produtos formados são caracterizados como produtos primários (JORGE, 2009; COULTATE, 2004).

Figura 7 - Etapa de propagação da auto-oxidação.

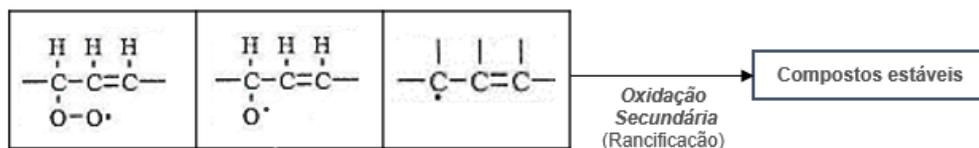


Fonte: Adaptado de COULTATE (2004) e ARAÚJO (2008).

2.2.1.3 Terminação

Esta etapa caracteriza-se pelo surgimento dos produtos secundários de oxidação (mais estáveis), e desenvolve-se a partir da decomposição dos hidroperóxidos, formando aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, hidrocarbonetos, além de dímeros e polímeros. Os aldeídos podem ser oxidados a ácidos, configurando uma fase “terciária” da reação. Nessa etapa se intensificam os prejuízos às propriedades organolépticas, iniciadas com alguns compostos na etapa anterior, incrementando mudanças na cor e na viscosidade da gordura (JORGE, 2009; RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). A Figura 8 representa a etapa de terminação.

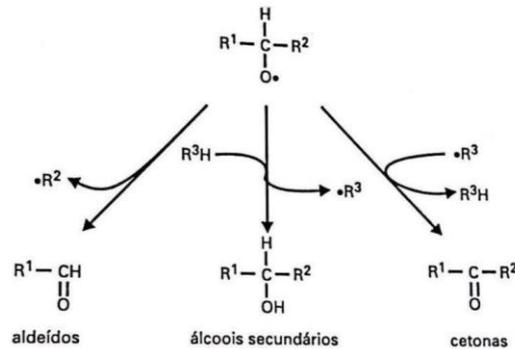
Figura 8 - Etapa de terminação da auto-oxidação.



Fonte: Adaptado de COULTATE (2004) e ARAÚJO (2008).

Uma via importante para a formação dos compostos que causam rancificação é a partir dos radicais alcóxi ($\text{RO}\cdot$), que reagem de diferentes formas convertendo-se em compostos estáveis, conforme ilustrado na Figura 9 (COULTATE, 2004). Os radicais alcóxi podem interagir entre si ou ainda se converterem em espécies não radicais (ARAÚJO, 2008).

Figura 9 - Formação de produtos estáveis a partir de radicais alcóxi.



Fonte: COULTATE (2004).

Resumidamente, foram elencadas na Tabela 2 as principais características envolvidas no processo de auto-oxidação. Desde a formação dos primeiros radicais livres até as alterações no que se referem ao odor, sabor, mudanças de cor e aumento da viscosidade, observados principalmente na fase final da oxidação.

Tabela 2 -Principais características das fases que compõem a auto-oxidação.

Fases	Características
Iniciação	Baixo consumo de oxigênio; aumento da concentração de radicais livres; baixa concentração de hidroperóxidos; não há alterações organolépticas
Propagação	Alto consumo de oxigênio; alta concentração de hidroperóxidos; início das alterações organolépticas com aparecimento de odor característico
Terminação	Diminuição no consumo de oxigênio; diminuição na concentração de hidroperóxidos; forte alteração organoléptica com modificação da cor e viscosidade

Fonte: JORGE (2009).

2.2.2 Fatores que favorecem a oxidação

Segundo Jorge (2009) e Araújo (2008), as reações de oxidação lipídica podem sofrer influência de diversos fatores, como a natureza dos ácidos graxos, a disponibilidade de oxigênio, temperatura, umidade e exposição à luz.

Quanto maior o grau de insaturação e quanto mais disponíveis elas estiverem, mais bem sucedida será a oxidação. O número, a posição e a geometria interferem na velocidade em que esse processo irá ocorrer. Como por exemplo o ácido linoleico (ômega 6) e o linolênico (ômega 3) que possuem, 2 e 3 insaturações, respectivamente, são mais susceptíveis à degradação que o ácido oleico, que só possui uma. Quanto à posição e a geometria, sabe-se que as ligações conjugadas do ácido graxo *cis*, em geral, são mais facilmente oxidadas que a ligações não conjugadas do tipo *trans*. No que se refere aos AGL, estes possuem maior facilidade ao ataque oxidativo que os ácidos na sua forma esterificada. Em relação ao oxigênio, quando ele é abundante a relação da oxidação é independente de sua quantidade. No entanto, em concentrações baixas, a velocidade que isso ocorre assume uma discreta proporcionalidade. Na ausência deste gás não há oxidação (JORGE, 2009; ARAÚJO, 2008).

Ainda segundo os autores, a temperatura influencia consideravelmente nos processos oxidativos. Quando são utilizadas temperaturas elevadas como a pasteurização aceleram sobremaneira a velocidade da reação. Estima-se que em temperaturas maiores que 60° C, um acréscimo de 15°C consegue duplicar a degradação. Em temperaturas mais baixas, como as de refrigeração e congelamento, constata-se a ação do oxigênio, porém em menor escala.

No que se refere ao mecanismo de exposição à luz no comprimento de onda na faixa do visível e em regiões próximas do UV é que os fotossensibilizadores atuam. Clorofila, mioglobina e riboflavina são exemplos clássicos que servem de mola propulsora para que a energia seja transferida para o oxigênio tripleto, tornando-o oxigênio singleto, em que este segundo possui uma energia de 92,4 kJ.mol⁻¹ a mais que o primeiro (MAIA, 2015).

Quanto ao teor de água, tem-se que em baixos valores de atividade da água (a_w), isto é, abaixo de 0,1 a oxidação ocorre muito rapidamente, devido a um maior contato entre o substrato e o oxigênio, sendo, portanto, uma exceção no que diz respeito às reações que acontecem nos alimentos, em que a água é crucial. Quando se eleva o a_w para 0,3 consegue-se um retardo significativo na oxidação. Essa blindagem pela mínima quantidade de água presente pode estar relacionada a três fatores: à redução da atividade dos catalisadores metálicos, à diminuição da ação dos radicais livres e/ou à barreira separando o lipídio do oxigênio. Entre o intervalo de 0,55 a 0,85; a velocidade oxidativa aumenta novamente, uma vez que a mobilização dos metais catalisadores e do oxigênio se restabelecem (JORGE, 2009; ARAÚJO, 2008).

Outros fatores que influenciam na oxidação são: maior área superficial, ação da enzima lipoxigenase, catalisadores metálicos como ferro e cobre e as hemoproteínas. Para mitigar os efeitos da ação oxidativa, se faz necessário controlar os fatores que a impulsiona, incluindo também a adição de antioxidantes, que atuam, em geral, diretamente sobre os radicais livres por meio de doação de átomos de hidrogênio a essas substâncias, inativando-as. Os átomos de hidrogênio capturados pelos radicais livres são sequestrados com maior facilidade que aqueles hidrogênios alílicos presentes nas moléculas insaturadas dos ácidos graxos, inativando, dessa forma, tais radicais. Os tocoferóis são antioxidantes amplamente usados para tal fim (JORGE, 2009; ARAÚJO, 2008).

2.3 QUANTIFICAÇÃO DA DEGRADAÇÃO LIPÍDICA

Existem diferentes formas de se avaliar o estado oxidativo das frações lipídicas dos alimentos. Entretanto, nenhum método quantitativo se correlaciona de maneira ideal com as modificações sensoriais produzidas durante as sucessivas reações de oxidação. Cada método fornece informações características acerca de um estado específico do processo de degradação (JORGE, 2009).

Dentre os testes mais utilizados estão: índice de acidez da fração lipídica (rancidez hidrolítica), índice de peróxido, índice de anisidina (rancidez oxidativa), determinação de dienos conjugados, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entre outros. Assim, entende-se que aliar o teste de ácido graxo livre, que indica a rancidez devido à atividade microbiana, ao teste de índice de peróxido, que visa avaliar a acidez devido à ação do ar, confere um importante indicativo da rancidez oxidativa do alimento. Esses métodos geralmente envolvem a extração da fração lipídica deste, seguido da análise quantitativa (HANNA, 2020; SOARES *et al.*, 2012).

2.3.1 Índice de peróxido

O índice de peróxido é um indicador importante do estado de oxidação do alimento. No entanto, como brevemente discutido, não necessariamente pode ser uma análise conclusiva. Em temperaturas elevadas, a velocidade de formação dos peróxidos é menor que a sua decomposição em outros compostos (oxidação secundária), ou seja, a quantificação por esse método se torna transitório e mais representativo no início da oxidação. Alimentos com oxidação em grau avançado podem não fornecer resultados confiáveis na análise de índice de peróxido (ARAÚJO, 2008). O método comumente utilizado para essa determinação envolve a

volumetria de oxirredução, que pode ser realizada por uma titulação indireta (iodometria) utilizando o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ como titulante.

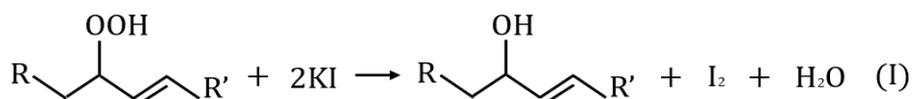
2.3.1.1 Titulação iodométrica: reagentes, características e padronização

A quantificação do teor de peróxido é obtida por meio da titulação iodométrica (iodometria) em que se utiliza o excesso do iodeto de potássio (KI) para reagir com a gordura e, caso haja peróxido na matriz, haverá uma reação de oxirredução. Nesse caso, o peróxido oxida o iodeto, formando iodo, que será titulado com solução de tiosulfato de sódio previamente padronizada por oxidante apropriado. A quantidade de titulante gasto é diretamente proporcional à quantidade de peróxido ou produtos similares provenientes da oxidação das gorduras (CAVALCANTE, 2017; MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2015; DIAS; ALVES, 2013).

Possíveis fontes de erro nessa determinação podem estar na possibilidade do iodo liberado na reação I (Figura 10) se ligar com as duplas ligações do ácido insaturado, levando a um valor de índice incorreto, nesse caso, resultando em um valor menor que o real. Outro fator a ser considerado é a interferência do oxigênio do ar no meio reacional, visto que este pode viabilizar a liberação de mais iodo e então conferir um acréscimo no valor real. Portanto, é recomendável proceder a titulação o mais rápido possível, para minimizar a exposição a este fator (JORGE, 2009).

Ainda segundo Jorge (2009), indica-se que seja realizada a análise desse índice nos primeiros estados dos processos oxidativos, pois o surgimento deste composto no alimento, mesmo que em pequenas quantidades, pode indicar uma alteração pronunciada de sua estabilidade. A Figura 10 apresenta as duas principais reações envolvidas na iodometria.

Figura 10 - Reações de oxirredução da iodometria.



Fonte: Adaptado de SILVA, BORGES E FERREIRA (1999).

2.3.1.1.1 Tiosulfato de sódio

O íon tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) é um agente redutor de grau moderado utilizado como um importante reagente analítico nas titulações de oxirredução, em que se utiliza o iodo como intermediário. Nesses casos, o íon tiosulfato é então oxidado para o íon tetrionato ($S_4O_6^{2-}$). As soluções contendo esse reagente, geralmente, são feitas a partir de um sal de tiosulfato pentahidratado e devem ser obrigatoriamente padronizadas antes de sua utilização, visto que o sal não é um padrão primário. A redução do tiosulfato com o iodo acontece a partir de uma reação com um agente oxidante e excesso de iodeto, em meio ácido. O tiosulfato é um agente redutor que não costuma se oxidar com a ação do oxigênio atmosférico, o que não acontece com o iodeto de potássio que se oxida facilmente, sendo necessário maior controle no momento do seu manuseio (SKOOG *et al.*, 2014; ROSA; GAUTO; GONÇALVES, 2013).

2.3.1.1.2 Estabilidade de soluções de tiosulfato

Apesar das soluções de tiosulfato serem resistentes à ação do oxigênio do ar, elas podem se decompor para formar enxofre coloidal e o íon hidrogeno-sulfito, conferindo turbidez à solução (ROSA; GAUTO; GONÇALVES, 2013). A reação de decomposição pode ser descrita pela Equação 1.



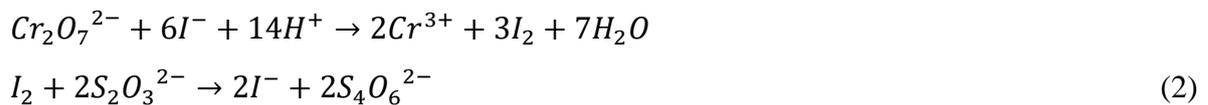
O pH ácido, a ação de microrganismos, efeitos de concentração da solução, presença de íons cobre (II) e a exposição à luz são fatores preponderantes que influenciam na velocidade dessa decomposição. Em soluções levemente alcalinas ou neutras, a instabilidade se dá devido à atividade de bactérias que oxidam o tiosulfato aos íons sulfato e sulfito, ou ainda ao enxofre elementar. Esse problema pode ser minimizado por meio do controle de pH (idealmente entre 9 e 10) a partir da adição de sais de caráter alcalino, ou ainda utilizando substâncias bactericidas, como o clorofórmio, o benzoato de sódio ou o iodeto de mercúrio (II) (SKOOG *et al.*, 2014, ANDRADE, 2001).

Em relação ao uso de sais alcalinos, como o Na_2CO_3 por exemplo, para o controle de pH, sua concentração deve ser comedida (máximo $0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Concentrações maiores que essa podem influenciar significativamente na decomposição do tiosulfato com o ar. Assim, tais variáveis podem provocar alterações na concentração da solução de tiosulfato consideravelmente em um período de poucas semanas, necessitando, nesse caso, de uma nova padronização ou o preparo de uma nova solução (ROSA; GAUTO; GONÇALVES, 2013).

2.3.1.1.3 Padronização de soluções de tiosulfato

Na padronização da solução podem ser utilizados agentes oxidantes como o iodato de potássio, bromato de potássio, hidrogeniodato de potássio, o hexacianoferrato (III) de potássio, o cobre metálico e o dicromato de potássio (SKOOG *et al.*, 2014).

O reagente analítico dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), além de ser utilizado como um padrão primário nas reações redox, também é largamente utilizado como pigmento em indústria de tintas, agente alvejante e inibidor de corrosão. Para fins de uso como padrão primário frente a soluções de tiosulfato, por exemplo, o íon dicromato quando dissolvido em meio ácido, apresenta número de oxidação (NOX), +6, o qual é reduzido para o íon cromo (III) conforme a Equação 2.



Conforme destacado por Christian (2009), quando o HCl é utilizado para acidificar o meio reacional, o íon cloreto tende a diminuir o potencial de redução formado pelo par $Cr_2O_7^{2-}/Cr^{3+}$, passando de 1,33 para 1,00 V, configurando uma desvantagem em seu uso. Em relação ao uso do $K_2Cr_2O_7$ como padrão primário frente a outros oxidantes mais fortes, tem-se que o relativo baixo potencial de eletrodo e a baixa taxa de reação com alguns agentes redutores apresentam-se como as principais desvantagens de sua aplicação (SKOOG *et al.*, 2014).

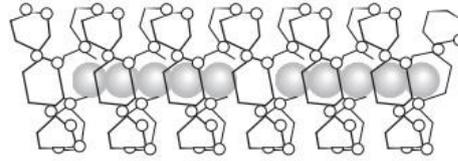
2.3.1.1.4 Indicador químico do ponto final da titulação

As titulações que envolvem iodo como reagente intermediário são realizadas com uma suspensão de amido como indicador químico. Essa substância polimérica se apresenta em duas frações: a amilose e a amilopectina. A amilopectina, por ser uma estrutura ramificada tem menor interação com o iodo, resultando em uma coloração azul menos intensa que a da amilose, que possui cadeias lineares em forma helicoidal (LOUREIRO *et al.*, 2019).

A coloração azul intensa formada é atribuída à interação do iodo (na forma de triiodeto I_3^-) com a cadeia helicoidal da β -amilose, um constituinte macromolecular presente nos amidos (Figura 11). Em contrapartida, tem-se a α -amilose, que ao interagir com iodo, reage irreversivelmente conferindo à solução uma cor avermelhada, o que não é interessante para a

análise. Assim, o amido solúvel, comercialmente vendido, é isento dessa porção da amilose (SKOOG *et al.*, 2014).

Figura 11 - Espécie de iodo (I_3^-) incorporada à hélice de β -amilose.



Fonte: Adaptado de SKOOG *et al.* (2014).

Um problema comum encontrado na suspensão aquosa de amido é a facilidade de decomposição devido a ação bacteriana, podendo causar interferências em suas propriedades como indicador. Uma maneira de contornar esse problema é a adição de bactericidas no momento do preparo, como o iodeto de mercúrio (II) ou o clorofórmio (SKOOG *et al.*, 2014).

Além disso, Skoog *et al* (2014) pontua ainda que se deve atentar para a decomposição do amido ao interagir com soluções muito concentradas de iodo. Nesse contexto, a adição do indicador na iodometria só é recomendada quando a maior parte do iodo é convertido novamente em iodeto, caracterizando-se pela mudança da coloração vermelho-amarronzada para amarelo claro (nesse ponto a titulação está na iminência de ser concluída).

Conforme descrito por Christian (2009), dois outros motivos ainda podem ser destacados para corroborar a adição tardia do iodo em uma titulação iodométrica. Se uma grande quantidade de iodo estiver impregnada ao amido inicialmente, esse complexo teria um ponto de viragem comprometido, visto que a dissociação deste complexo seria lenta. O outro fator relaciona-se com o meio acidificado, uma vez que o amido ao entrar em contato por tempo prolongado em meio ácido, pode sofrer hidrólise. Ainda é importante entender que o amido não é um indicador genérico para reações de oxirredução, visto que a sua coloração é percebida somente na presença de I_2 , sem alteração do seu potencial redox (ROSA; GAUTO; GONÇALVES, 2013).

2.3.1.2 Especificação legal do índice de peróxido em manteigas

A portaria nº 146, de 07 de março de 1996 do MAPA determina o limite máximo de índice de peróxido para manteiga destinada ao consumo direto da população em 1 miliequivalente (mEq) por quilograma de matéria gorda, bem como o método oficial para quantificação deste parâmetro, sendo, portanto, por iodometria (BRASIL, 1996; AOAC, 1969).

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação, por definição, é “a verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido” (VIM, 2012, p. 30). Nesse aspecto, entende-se que validar uma metodologia tem por princípios mitigar, controlar, qualificar e/ou quantificar os agentes que promovem erros sistemáticos ou aleatórios ao método. Sugere-se sua aplicação a métodos não normalizados, isto é, aqueles que não foram desenvolvidos por um órgão de normalização ou organizações que tenham o aval técnico para tal finalidade (métodos oficiais). Também é prudente realizar a validação para métodos elaborados e/ou desenvolvidos por laboratórios independentes, bem como para aqueles métodos normalizados/oficiais, porém utilizados fora do escopo pretendido inicialmente ou ainda, que suas modificações sejam sensíveis e possam vir a impactar os resultados analíticos (INMETRO, 2020).

A verificação de desempenho está vinculada estritamente aos métodos normalizados, desde que não haja modificação significativa na sua reprodução. O laboratório deve comprovar através de parâmetros de validação, na extensão necessária, que a resposta analítica seja confiável e o método seja pertinente ao uso, mediante atendimento aos critérios de aceitação estabelecidos (INMETRO, 2020; ABNT, 2017; MAPA, 2015).

2.4.1 Parâmetros de desempenho

Para garantir a adequação do método analítico ao uso pretendido diferentes parâmetros de desempenho podem ser avaliados. Esses parâmetros de desempenho devem incluir, quando aplicáveis: seletividade, linearidade/faixa de trabalho/faixa linear de trabalho/sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e opcionalmente a robustez, procedimento realizado na etapa de otimização da validação (INMETRO, 2020).

2.4.1.1 Precisão

Este parâmetro diz respeito à concordância entre uma série de valores experimentais obtidos, de modo que quanto menor for a amplitude entre as medidas, mais próximos esses valores estarão entre si (LEITE, 2002). Tal dispersão entre as medidas experimentais de dada amostra pode ser expressa a partir de três outros atributos, são eles: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade deve ser realizada pelo mesmo analista, sob as mesmas condições, com o mesmo material (ou similar) e mesmo dia, durante um curto período de tempo. Podem ser utilizadas amostras de rotina, material de referência ou amostra fortificada (INMETRO, 2020; MAPA, 2015).

A precisão intermediária deve ser feita por analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes ou dias diferentes. Na impossibilidade de um segundo analista realizar as análises, é recomendado que o analista responsável aguarde um intervalo superior a 24 horas de uma série de medições para a outra (MAPA, 2015). Por outro lado, a reprodutibilidade contempla validações utilizando comparações interlaboratoriais (INMETRO, 2020). Entende-se, portanto, que para tal parâmetro o laboratório deve realizar o maior número de repetições técnica e economicamente viáveis para viabilizar um estudo de validação satisfatório (MAPA, 2015; BRASIL, 1996).

2.4.1.2 Exatidão

Esse parâmetro consiste na concordância entre o resultado de uma determinada medida em relação ao respectivo valor de referência (valor verdadeiro). Quando a análise é feita repetidas vezes, isso implica em uma combinação de elementos de erros aleatórios e sistemáticos (ou tendência). A determinação da tendência utilizando valores de referência confiáveis é importante na confirmação da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. Uma maneira de se medir/avaliar a exatidão é através do erro relativo (ER), expresso em percentual (INMETRO, 2020, MAPA, 2015).

2.4.1.3 Limite de quantificação (LQ)

Este parâmetro corresponde a menor quantidade do analito que pode ser quantificada, tendo resultados satisfatórios no estudo de precisão. Existem diversas maneiras de se calcular o LQ, alguns exemplos, são: a avaliação visual, a relação de sinal/ruído, a partir da curva analítica, entre outros. É necessário atentar-se para quando o ensaio não apresentar uma curva analítica, como por exemplo um método titulométrico. Nesse caso, o menor nível de concentração avaliado pelo estudo de precisão será adotado como LQ, cujo valor deve ser escolhido criteriosamente e justificado pelo responsável do estudo (INMETRO, 2020; MAPA, 2015).

2.4.1.4 Faixa de trabalho (faixa de aplicação do método)

A faixa de trabalho compreende o intervalo entre o menor e o maior valor quantificável pelo estudo de validação, que se obteve resultados em níveis aceitáveis de precisão. Essa faixa pode estar descrita no próprio método normalizado ou ainda pode ser determinada pelo analista, baseando-se na faixa de concentração do analito que se pretende encontrar (INMETRO, 2020; MAPA, 2015). Nesse contexto, esses parâmetros de desempenho podem ser utilizados como

conjunto de ferramentas uteis para determinação da incerteza de medição do método analítico, podendo-se levar em consideração um nível de confiança pré-estabelecido em legislação ou de acordo com as normas internas do laboratório.

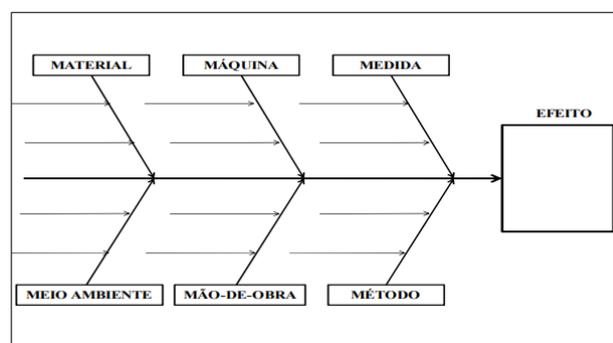
2.5 ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Ao se relatar um resultado de medição de uma grandeza, é importante dar alguma indicação quantitativa da qualidade desse resultado para que se possa avaliar sua confiabilidade. Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia, a incerteza pode ser definida como "parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas" (VIM, 2012, p. 24).

Para a determinação da incerteza de medição existem algumas abordagens possíveis. Dentre elas estão a *top-down*, que se baseia geralmente em estudos interlaboratoriais e a *bottom-up*, também denominada de método clássico. A abordagem a partir do método clássico consiste na identificação das fontes de incerteza atreladas ao método, quantificação das incertezas padrão de cada fonte e posterior combinação desses valores. Com a finalidade de obter as contribuições das incertezas padrão com a mesma unidade da grandeza de entrada, estes valores devem ser multiplicados pelo respectivo coeficiente de sensibilidade, cujo princípio se baseia na utilização de derivadas parciais para a execução do cálculo (OLIVEIRA; AGUIAR, 2009).

Para a identificação e agrupamento das diversas fontes de incerteza envolvidas na análise recomenda-se a elaboração da ferramenta da qualidade diagrama de Ishikawa (diagrama de causa e efeito), descrito na Figura 12, que representa, de forma genérica, a ferramenta contendo o efeito e os 6M.

Figura 12 - Ilustração do diagrama de Ishikawa (ou de causa e efeito).



Fonte: O autor (2022).

O diagrama de Ishikawa (Figura 12) tem por finalidade identificar as principais causas de uma ação (efeito) e a elas podem ser apontadas causas secundárias ou terciárias como complementação. Tais causas podem ou não ser divididas em seis grandes grupos, que são os 6M: máquina, matéria-prima, materiais, mão-de-obra, método e meio ambiente (COSTA; SILVA; TREVISANI, 2015).

Em relação ao cálculo das incertezas, este deve considerar, em geral, o desvio padrão vinculado à precisão intermediária e quando possível, da curva de calibração, dos equipamentos/instrumentos de medição e soluções padrão, sobretudo quando estas interferirem de modo significativo nos resultados da análise (MAPA, 2015).

Deste modo, ainda segundo o Mapa (2015), considerando as diversas fontes de incerteza envolvidas de acordo com o objetivo analítico, o resultado para este parâmetro deve envolver a contribuição de todas as fontes identificadas, a partir da combinação das incertezas individuais. Nesse sentido, a incerteza combinada (u_c) pode ser calculada, genericamente, a partir da raiz quadrada do somatório dos quadrados de cada incertezas-padrão, conforme a Equação 3.

$$u_c = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (3)$$

Em que, $u(p)$, $u(q)$, ... correspondem aos valores de cada incerteza-padrão a ser somada.

A incerteza expandida (U), última etapa do processo, é calculada a partir da incerteza combinada de todas as fontes vinculadas ao método multiplicada por um fator de abrangência para um determinado nível de confiança (OLIVEIRA; AGUIAR, 2009).

3 METODOLOGIA

A determinação do índice de peróxido foi realizada por titulação de oxirredução, seguindo os procedimentos descritos no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (MAPA, 2019b), Método oficial AOAC 942.27 - Soluções padrão de tiosulfato de sódio (AOAC, 1942) e o Método oficial AOAC 965.33 - Valor de peróxido de óleos e gorduras (AOAC, 1969). O procedimento experimental foi realizado na área de Identidade e Qualidade de Alimentos (IQA) do laboratório de Físico-Química de Produtos de Origem Animal e Água (POA), situado no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco (LFDA-PE), pertencente ao MAPA.

3.1 PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO

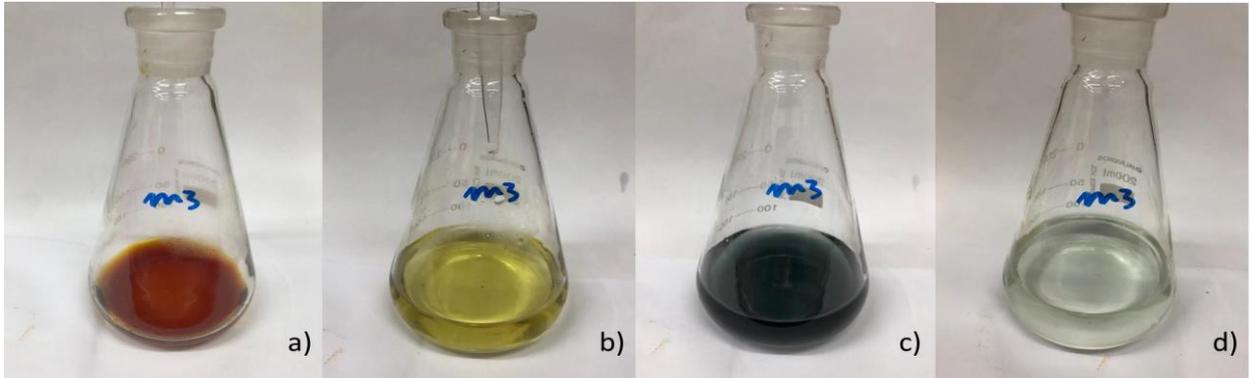
A padronização dessa solução foi realizada pelo método indireto que utiliza o iodo gerado como titulante (iodometria). Para isto, foram utilizados os reagentes $K_2Cr_2O_7$, padrão de referência do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology* - NIST), KI (marca Neon), HCl (marca Cromoline), água deionizada e amido solúvel (marca Dinâmica) como indicador.

O $K_2Cr_2O_7$ foi seco previamente em estufa (marca Lucadema) a $100^\circ C$ por 2 h e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente ($25^\circ C$). Na sequência, foram pesadas porções deste reagente entre 0,020 e 0,023 g com o auxílio de uma balança analítica (marca Mettler e modelo AE 200), utilizando um frasco Erlenmeyer de 200 mL com tampa (marca Qualividros). Com esse procedimento foram preparadas 4 replicatas. Anotou-se o valor da massa em formulário apropriado e seguiu-se para a capela de exaustão para proceder a titulação. Com o auxílio de uma proveta foram adicionados aproximadamente 10 mL de água deionizada ao frasco de Erlenmeyer contendo o $K_2Cr_2O_7$. Com uma pipeta volumétrica foram transferidos 2 mL de uma solução de KI a 10% e, após agitação do frasco, adicionou-se 2 mL de uma solução de HCl (1 mol.L^{-1}). Em seguida, os frascos foram deixados em repouso em local escuro, por 10 min.

Após findado o tempo reacional, a titulação foi conduzida, utilizando-se uma bureta de 50 mL contendo o $Na_2S_2O_3$ (marca Neon) a ser padronizado. Procedeu-se a titulação até que uma coloração amarelo-clara fosse atingida, em seguida, adicionou-se cerca de 1 mL da solução indicadora de amido 1%, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, conferindo à solução uma coloração azul escura. Em seguida, deu-se continuidade a titulação com o tiosulfato, cuidadosamente, até o desaparecimento da cor azul. Assim, anotou-se o valor gasto e procedeu-

se da mesma forma com as demais replicatas. A Figura 13 representa a transição de cores ocorrida na titulação iodométrica.

Figura 13 - (a) Início da titulação, antes da adição do tiosulfato; (b) Durante a adição de tiosulfato, momento da adição do indicador amido; (c) Coloração da solução devido ao complexo amido-iodo; (d) Ponto final da titulação.



Fonte: O autor (2022).

Uma amostra em branco foi realizada a cada batelada de replicatas. Ela foi composta por todos os reagentes exceto o $K_2Cr_2O_7$. A respectiva titulação foi realizada adicionando-se a solução de amido 1%, logo no início, e procedeu-se a volumetria igualmente às demais replicatas. O valor encontrado então foi subtraído do volume gasto na titulação destas.

A expressão de resultado é dada pela Equação 4.

$$\text{Concentração (mol.L}^{-1}\text{)} = \frac{m \times 1000}{V \times 49,031} \quad (4)$$

Em que (m) é a massa, em gramas, do $K_2Cr_2O_7$ e (V) é o volume, em mL, gasto do $Na_2S_2O_3$.

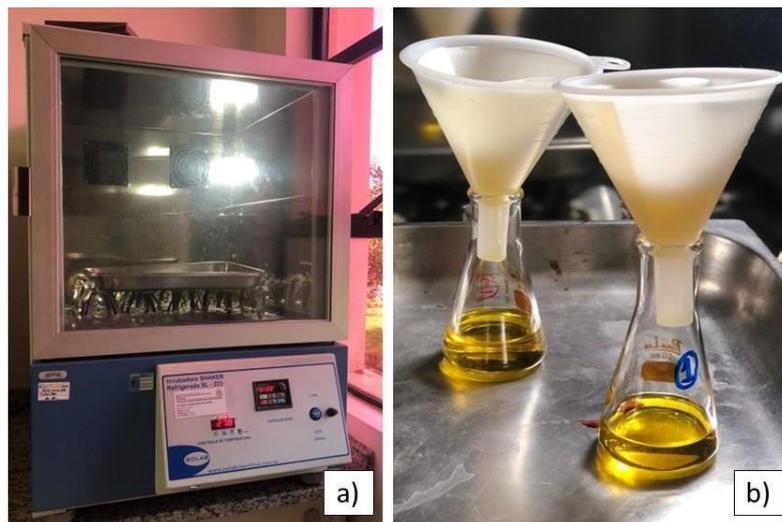
O valor do fator de correção foi determinado dividindo-se a média das concentrações obtidas pela concentração teórica ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$).

3.2 PREPARO DE AMOSTRA DE MANTEIGA

O preparo de amostra baseou-se além do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, também na MET IQA/046/01 - Determinação do índice de peróxido em manteiga (LFDA-RS) e na MET IQA 0029/001 - Determinação do índice de peróxido em manteiga por volumetria (LFDA-GO). Inicialmente, cada amostra foi aquecida ainda fechada em incubadora (marca Shaker e modelo SL-223) a uma temperatura de 24 a 35 °C até que uma consistência levemente pastosa fosse alcançada (para manteigas de pote). Para

amostras de manteiga de garrafa, a depender de sua consistência, essa etapa poderia ser dispensável. Em seguida, alíquotas foram transferidas para tubos falcon de 50 mL, preenchendo aproximadamente $\frac{3}{4}$ dos recipientes. Os tubos contendo as amostras foram dispostos em um suporte, e levados para fundir em estufa entre 40 e 45 °C. Quando o início da separação de fases era visualizado, retirava-se o tubo e este era levado para uma centrífuga (marca Hettich e modelo Rotina 420R), a 4500 rpm por 10 min. Na sequência, procedeu-se a filtração das amostras dentro de estufa incubadora, utilizando-se funil de vidro e papel de filtro qualitativo. Após a filtração, uma parcela límpida da gordura, visivelmente livre de umidade e sólidos, foi coletada dentro de um recipiente apropriado, conforme Figura 14. Finalmente, para cada amostra, uma alíquota de $5,00 \pm 0,05\text{g}$ era pesada em frasco de Erlenmeyer de 200 mL com tampa (marca Qualividros) com auxílio de uma pipeta de Pasteur e uma balança analítica (marca Mettler e modelo AE 200) (MAPA, 2015; MAPA, 2020; MAPA, 2022c).

Figura 14 - (a) Estufa incubadora utilizada; (b) Detalhe da filtração das amostras.



Fonte: O autor (2022).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO

A análise do índice de peróxido foi realizada dentro de uma capela de exaustão, protegida da luz direta, uma vez que esta, poderia interferir nos resultados da quantificação. Utilizando uma proveta (marca Roni Alzi), foi adicionada uma solução de ácido acético-clorofórmio ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CHCl}_3$) (das marcas Sciavicco e Biograde, respectivamente), na proporção de 3:2 v/v, ao frasco de Erlenmeyer contendo a amostra. Posteriormente, com uma pipeta volumétrica adicionou-se 0,5 mL de uma solução saturada de KI, agitou-se o frasco de Erlenmeyer para homogeneização e adicionou-se com uma proveta 30 mL de água deionizada.

Na sequência, procedeu-se a titulação utilizando uma bureta de 10 mL contendo o tiosulfato $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, previamente padronizado, até a formação da cor amarelo claro. Neste momento, adicionou-se cerca de 1,0 mL de solução indicadora de amido 1%, atribuindo ao meio uma cor azul escura (complexo amido-iodo). Deu-se continuidade a titulação sob agitação vigorosa, para promover a liberação de todo o I_2 da camada de CHCl_3 , até ausência da cor azul. Este ponto caracteriza o final da titulação, tendo o seu volume gasto anotado.

Uma titulação em branco foi realizada diariamente, adicionando-se todos os reagentes, exceto a porção da amostra. O resultado encontrado era então subtraído do valor encontrado na titulação da amostra.

O valor de peróxido, expresso em miliequivalente de O_2 por quilograma de matéria gorda, foi obtido empregando-se a Equação 5.

$$\text{Valor de peróxido} = \frac{V \times M \times f \times 1000}{\text{massa da porção de teste}} \quad (5)$$

Em que (V) é o volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, em mL, consumido na titulação, (M) é a concentração molar da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ nominal e (f) é o fator de correção obtido na padronização do titulante

3.3.1 Teste da estabilidade da solução saturada de KI

Para avaliar a estabilidade da solução saturada de KI após preparo, o seguinte teste foi realizado: adicionar 0,5 mL da solução saturada de KI em um béquer contendo 30 mL de uma solução de $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CHCl}_3$ e duas gotas da solução de amido 1%. Caso a mistura apresentasse a coloração azul e ela exigisse mais de uma gota da solução de tiosulfato para mudança de cor (ponto final), uma nova solução de KI deveria ser preparada, do contrário, a mesma poderá ser utilizada.

3.4 ESTUDO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Uma vez que não havia material de referência certificado (MRC), de ensaio de proficiência ou de estudo colaborativo/interlaboratorial para este método, os ensaios para determinação dos parâmetros de validação foram realizados a partir de amostras disponíveis no próprio laboratório. Então, os parâmetros possíveis para avaliação foram: precisão, limite de quantificação e faixa de trabalho (faixa de aplicação do método). Estes foram estudados

seguindo o Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos (MAPA, 2015).

3.4.1 Precisão

O estudo de repetibilidade nível 1 foi realizado no primeiro dia pelo analista 1. Para isto, foi utilizada uma amostra recém-chegada no laboratório, cujo valor do índice de peróxido, em teoria, seria o mais baixo possível. Entretanto, para se certificar de tal afirmação, foram realizados testes antes da avaliação do parâmetro ser executado de fato. Assim, realizaram-se 5 replicatas da amostra, com os mesmos aparatos operacionais e no menor intervalo de tempo possível. O estudo de repetibilidade nível 2 foi realizado no segundo dia também pelo analista 1. Para tal, utilizou-se uma amostra com tempo maior de armazenamento no laboratório, sendo feitas 5 replicatas e a execução igualmente ao do nível 1.

Quanto ao estudo de precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial), foi realizado por dois analistas, ambos treinados e habilitados para executar tal função. Foram preparadas 5 replicatas por analista, totalizando um conjunto de 10 repetições. A amostra utilizada neste nível foi de uma manteiga de garrafa, que costuma apresentar um índice de peróxidos maior que das manteigas de potes. Essa amostra também estava armazenada há mais tempo no laboratório e, antes da execução do ensaio, ela foi analisada para confirmar se o valor de peróxido estava, de fato, acima da legislação. Desse modo, tal amostra foi denominada como nível 3. A execução da análise procedeu-se com os mesmos aparatos operacionais para ambos os analistas, sendo realizadas nos dias 3 e 4 do estudo (MAPA, 2015).

A avaliação dos parâmetros de precisão foi feita pelo cálculo do coeficiente de variação (CV), ou também denominado desvio padrão relativo (DPR), dos valores obtidos para cada conjunto de dados, por nível, de acordo com a Equação 6.

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

Em que (\bar{x}) é a média aritmética do número de medições e (s) é a estimativa do desvio padrão amostral.

Para efeitos de critério de aceitação de cada conjunto de dados, adotou-se o $CV \leq 20 \%$ (MAPA, 2015).

3.4.2 Limite de quantificação

Para este parâmetro foram utilizados os dados de repetibilidade do nível 1, definido como menor valor que o método pode quantificar com segurança. Para tanto, foi realizada avaliação da precisão do conjunto de dados perante o critério de aprovação estabelecido (MAPA, 2015).

3.4.3 Faixa de trabalho (faixa de aplicação do método)

Para encontrar a faixa de trabalho, foram analisadas amostras contendo a mínima quantidade de peróxidos quantificável, com quantidade um pouco maior ao limite estabelecido na Portaria nº 146/96 para a análise do índice de peróxido (1 mEq de O₂/kg de matéria gorda) e uma terceira amostra acima desse limite. Esse parâmetro foi determinado a partir da execução dos parâmetros de LQ e precisão (BRASIL, 1996).

3.4.4 Estimativa de incerteza de medição

Para determinar a estimativa da incerteza de medição, as fontes de incertezas foram identificadas e, como já mencionado, inseridas em um diagrama de Ishikawa. Após a devida inserção dos dados no diagrama, este foi capaz de sintetizar as fontes de incerteza e os componentes de cada fonte que contribuem para a incerteza do efeito em estudo. A Equação 7 demonstra o cálculo da incerteza combinada (u_c) para o método em questão.

$$u_c = \sqrt{(u_{Repro})^2 + (u_{Padronização})^2 + (u_{Determinação})^2} \quad (7)$$

Em que (u_c) é a Incerteza combinada, (u_{Repro}) é a Incerteza da precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial), ($u_{Padronização}$) é a Incerteza associada à padronização do tiosulfato de sódio e ($u_{Determinação}$) é a Incerteza associada à determinação de peróxido

3.4.4.1 Determinação da incerteza expandida do método

Para a determinação da incerteza expandida do método, foi necessário conhecer o grau de liberdade efetivo (v_{eff}) e o fator de abrangência (k), os quais puderam ser estimados a partir das Equações 8 e 9.

$$v_{eff} = \frac{u_c^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4}{v_i}} \quad (8)$$

$$k_{95,45} \Rightarrow (= \text{inv}t(0,0455; v_{eff})) \quad (9)$$

Desse modo, para encontrar a incerteza expandida do método (U), foi utilizada a Equação 10, em que se multiplica a incerteza combinada (u_c) oriunda de todas as fontes consideradas pelo fator de abrangência ($k_{95,45}$).

$$U = k_{95,45} \cdot u_c \quad (10)$$

3.4.5 Teste de Grubbs

Para verificar a presença de possíveis *outliers* (pontos anômalos) em cada conjunto de dados, foi realizado o teste de Grubbs com 95% de confiança, (Equação 11). O resultado foi comparado com o $G_{\text{crítico}}$ tabelado, de acordo com o número de repetições e o nível de confiança, em que se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}}$, o resultado seria um indicativo da presença de um *outlier* (MILLER, 2002).

$$G = \frac{[x_i - \bar{x}]}{s} \quad (11)$$

Em que (x_i) é o resultado individual de cada replicata, (\bar{x}) é a média de todos os resultados e (s) é o desvio padrão amostral relativo ao conjunto de dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES PRELIMINARES

4.1.1 Padronização da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

De acordo com a instrução interna do laboratório, foram realizadas 4 replicatas por solução a ser padronizada cujos resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados referentes ao procedimento de padronização da solução de tiosulfato.

Replicata	Massa do padrão(g)	V titulante - V branco (mL)	Concentração obtida (mol.L^{-1})	Teste de Grubbs ($G_{\text{calculado}}$)
1	0,0209	44,40	0,0096	1,3061
2	0,0206	42,60	0,0099	0,2341
3	0,0204	41,00	0,0101	0,9335
4	0,0233	47,20	0,0101	0,6067

Fonte: O autor (2022).

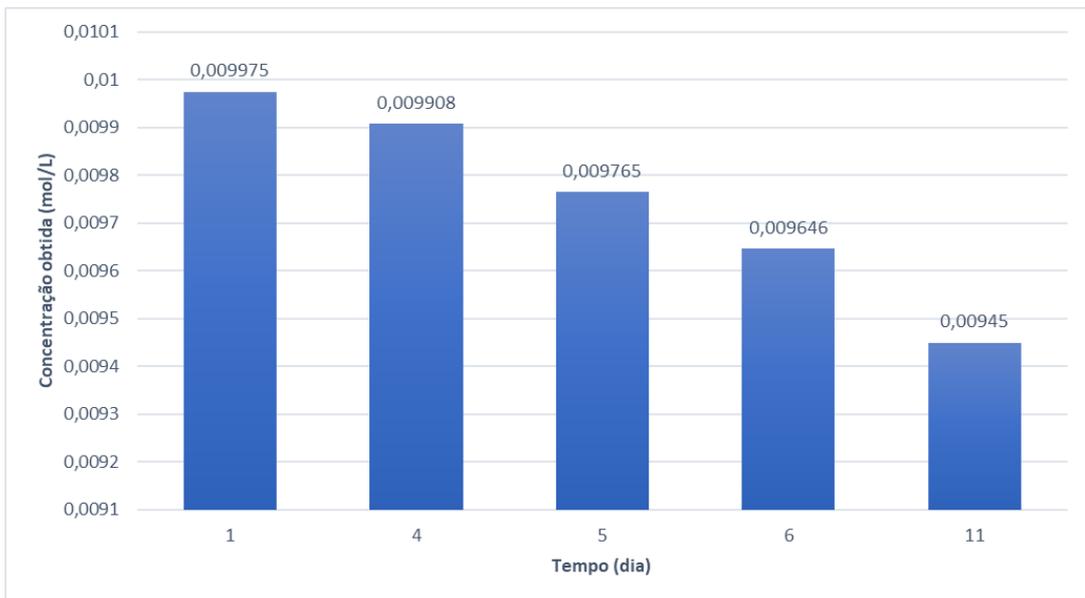
Considerando os dados da Tabela 3, para um nível de confiança de 95% e número de replicatas igual a 4, cujo $G_{\text{crítico}} = 1,481$, pôde-se observar que os valores de $G_{\text{calculado}}$ foram menores que o $G_{\text{crítico}}$ para todas as replicatas analisadas. Assim, conclui-se que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos, demonstrando-se, portanto, a ausência de *outliers* nos resultados (MILLER, 2002). As médias dos resultados das concentrações, o fator de correção calculado e o desvio padrão foram dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação dos dados referentes à padronização.

Concentração teórica (mol.L ⁻¹)	Média das concentrações (mol.L ⁻¹)	Fator de correção (<i>f</i>)	Desvio padrão (<i>s</i>)
0,01	0,0099	0,99	0,0002

Fonte: O autor (2022).

O fator de correção calculado (Tabela 4) apresentou um resultado satisfatório de acordo com o limite de controle interno do laboratório, que era de no máximo 1,13 e no mínimo 0,87. Nesse sentido, a cada parâmetro de validação avaliado era feita uma nova solução de tiosulfato e, por conseguinte, uma nova padronização, uma vez que, devido à sua instabilidade, esta tinha validade de apenas um dia. Desse modo, foi feito um acompanhamento da estabilidade da solução de tiosulfato de sódio conforme pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 - Estabilidade da solução de tiosulfato 0,01 mol.L⁻¹.

Fonte: O autor (2022).

Ao analisar a Figura 15 percebeu-se que houve um decréscimo considerável da concentração da solução em questão, corroborando com o que Skoog *et al.* (2014) e Andrade (2001) relatam em suas pesquisas. Os autores afirmam que há decomposição de soluções de tiosulfato pela ação de microrganismos, presença de íons cobre (II), exposição à luz, bem como pela própria concentração mais diluída da solução, entre outros.

4.2 PRECISÃO

4.2.1 Repetibilidade

Podem ser observados na Tabela 5 e 6, os resultados referentes ao parâmetro de repetibilidade obtidos pelo analista 1, nos dias 1 e 2 (níveis 1 e 2).

Tabela 5 - Resultados obtidos no teste de repetibilidade (nível 1).

Replicata	Massa (g)	V_{titulante} - V_{branco} (mL)	Resultado (mEq de O₂.kg⁻¹)	Teste de Grubbs (G_{calculado})
1	5,0023	0,25	0,4958	1,0905
2	5,0046	0,30	0,5946	0,7496
3	5,0181	0,30	0,5930	0,7198
4	5,0174	0,30	0,5931	0,7213
5	5,0076	0,25	0,4952	1,1002

Fonte: O autor (2022).

Na tabela 6 encontra-se o conjunto de resultados referentes ao nível 2.

Tabela 6 - Resultados obtidos no teste de repetibilidade (nível 2).

Replicata	Massa (g)	V_{títulante} - V_{branco} (mL)	Resultado (mEq de O₂.kg⁻¹)	Teste de Grubbs (G_{calculado})
1	5,0021	0,65	1,3592	1,4050
2	5,0086	0,70	1,4618	0,0135
3	5,0055	0,70	1,4627	0,0012
4	5,0036	0,75	1,5678	1,4232
5	5,0061	0,70	1,4626	0,0036

Fonte: O autor (2022).

Analisando as Tabelas 5 e 6, para um nível de confiança de 95% e número de replicatas igual a 5, cujo $G_{crítico} = 1,715$, observou-se que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos, e portanto, a presença de *outliers* nos resultados foi descartada (MILLER, 2002). As médias dos resultados das concentrações, o desvio padrão e o coeficiente de variação estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação da precisão (repetibilidade) dos conjuntos de dados.

Nível	Média das concentrações (mEq de O₂/kg)	Desvio padrão (s)	CV (%)
1	0,5544	0,0537	9,6935
2	1,4280	0,1078	7,5478

Fonte: O autor (2022).

Os valores de CV referentes aos dois níveis atendem ao critério de aceitação do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA para avaliação da precisão (repetibilidade), uma vez que ambos apresentaram um CV menor que 20%.

4.2.2 Precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial)

Nesta etapa, além da variação temporal envolvida nas determinações, a variação de analistas traz uma fonte de variabilidade adicional ao processo. Neste contexto, a tabela 8 reúne os resultados das replicatas obtidas pelos analistas 1 e 2, nos dias 3 e 4 do estudo (nível 3).

Tabela 8 - Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária (nível 3).

Analista	Replicata	Massa (g)	V _{títulante} - V _{branco} (mL)	Resultado (mEq de O ₂ .kg ⁻¹)	Teste de Grubbs (G _{calculado})
1	1	5,0106	6,5	12,3746	1,6215
	2	5,0105	5,7	10,8518	1,1093
	3	5,0145	5,9	11,2236	0,4425
	4	5,0132	5,8	11,0362	0,7785
	5	5,0071	6,2	11,8117	0,6121
2	1	5,0003	6,2	11,8277	0,6409
	2	4,9949	6,2	11,8405	0,6638
	3	5,0149	6,3	11,9835	0,9203
	4	5,0023	5,7	10,8695	1,0774
	5	4,9955	5,7	10,8843	1,0509

Fonte: O autor (2022).

Ao analisar a Tabela 8, para um nível de confiança de 95% e número de replicatas igual a 10, cujo $G_{crítico} = 2,290$, pôde-se observar que para o conjunto de dados da precisão intermediária o $G_{calculado}$ foi menor que o $G_{crítico}$ tabelado em todas as replicatas analisadas. Desse modo, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos, não tendo evidência

portanto, da presença de pontos anômalos nos resultados (MILLER, 2002). Os resultados das concentrações, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram dispostos na tabela 9.

Tabela 9 - Avaliação da precisão intermediária do conjunto de dados.

Nível	Média das concentrações (mEq de O₂.kg⁻¹)	Desvio padrão (s)	CV (%)
3	11,4704	0,5576	4,8616

Fonte: O autor (2022).

Assim como os demais níveis avaliados, o valor encontrado para o CV no nível 3 também atende ao critério de aceitação do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA ($CV \leq 20\%$).

4.3 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Devido aos critérios de aceitação de repetibilidade terem sido atendidos para a concentração de 0,55 mEq de O₂.kg⁻¹, e por esta ter sido a menor concentração possível a ser quantificada no estudo, definiu-se a mesma como o limite de quantificação do método adotado pelo laboratório.

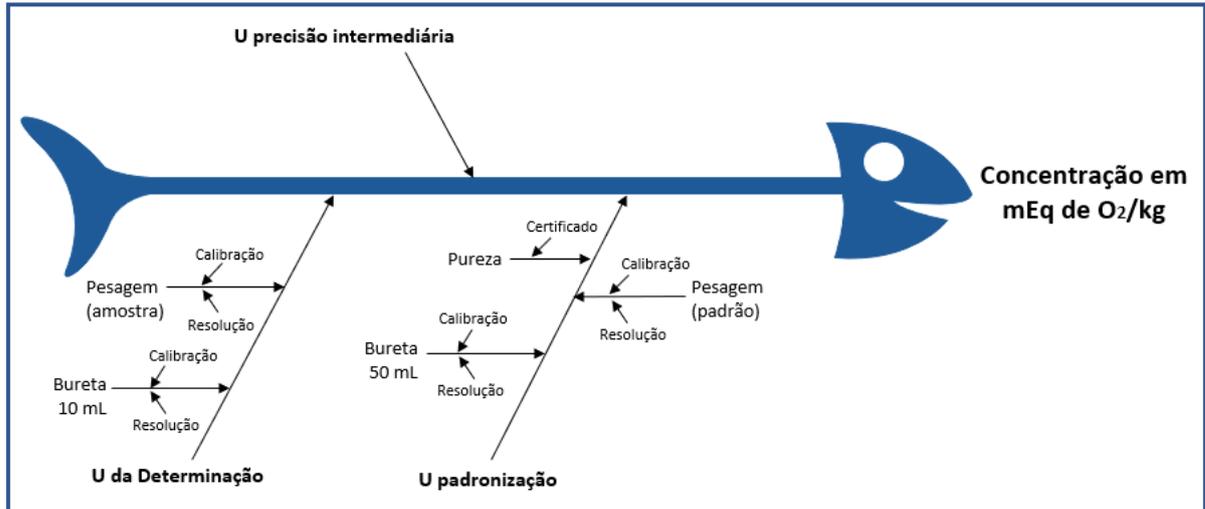
4.4 FAIXA DE TRABALHO (FAIXA DE APLICAÇÃO DO MÉTODO)

A faixa de aplicação do método para o índice de peróxido, a partir das amostras utilizadas no estudo, foi de 0,55 (nível 1) a 11,47 mEq de O₂/kg de matéria gorda (nível 3).

4.5 ESTIMATIVA DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Para identificar as fontes de incerteza do processo foi utilizada a ferramenta da qualidade “diagrama de Ishikawa”, como pode ser visualizado na Figura 16. Avaliando as etapas da metodologia, consideram-se as seguintes fontes de incerteza sobre o resultado da análise: da precisão intermediária, da determinação do peróxido e da padronização do tiosulfato.

Figura 16 - Diagrama de Ishikawa para a metodologia de determinação do teor de peróxido em manteigas.



Fonte: O autor (2022).

Após a identificação das fontes de incerteza (Figura 16), faz-se necessário determiná-las. Para isso, foram considerados o desvio padrão da precisão intermediária, o número de replicatas envolvidas, as incertezas expandidas descritas nos certificados de calibração (equipamentos/vidrarias) e de análise (MRC), bem como os tipos de distribuição de probabilidade e o fator de abrangência.

4.5.1 Incerteza associada a precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial)

A contribuição associada à precisão intermediária (u_{Repro}) dos dados obtidos foi calculada conforme Equação 12.

$$u_{Repro} = \frac{s}{\sqrt{n-1}} \quad (12)$$

Em que:

s = Desvio padrão da precisão intermediária

n = número de replicatas da precisão intermediária

A incerteza vinculada a esta fonte enquadra-se no tipo A, que considera a distribuição estatística de uma série de dados, sendo, portanto, associada à distribuição de *t-student* (GUM, 2008).

4.5.2 Incerteza associada a padronização ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

A incerteza associada a este processo foi obtida a partir da raiz quadrada do somatório dos quadrados das incertezas combinadas associadas à pureza do padrão primário ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), etapa de pesagem, resolução da balança, volume do titulante utilizado, resolução da bureta utilizada na titulação e o desvio padrão das repetições. As equações 13, 14, 15, 16 e 17 demonstram de forma detalhada como se procedeu o cálculo dos componentes da incerteza combinada associada a esse procedimento.

$$u_{\text{Padronização}} = \sqrt{(u_{\text{Pesagem}})^2 + (u_{\text{Volume}})^2 + (u_{\text{Pureza}})^2 + (u_{\text{replacatas}})^2} \quad (13)$$

$$u_{\text{Pesagem}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\text{balança}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{resolução}}}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad (14)$$

$$u_{\text{Volume}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\text{bureta 50mL}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{resolução}}}{\sqrt{6}}\right)^2} \quad (15)$$

$$u_{\text{Pureza}} = \frac{u_{\text{pureza}}}{k} \quad (16)$$

$$u_{\text{Replacatas}} = \frac{u_{\text{desvio padrão}}}{\sqrt{n-1}} \quad (17)$$

Os valores de “k” foram obtidos a partir dos certificados de calibração de cada instrumento ou, no caso do padrão primário, do certificado de análise fornecido pelo fabricante. Para o cálculo da incerteza associada à resolução da bureta e da balança, foram utilizadas as distribuições de probabilidade do tipo triangular ($\sqrt{6}$) e retangular ($\sqrt{3}$), respectivamente (MAPA, 2015).

4.5.3 Incerteza associada à determinação de Peróxido

A incerteza associada a essa análise foi obtida a partir da raiz quadrada do somatório dos quadrados das incertezas combinadas ao fator de correção, pesagem da amostra, resolução da balança, volume titulado e resolução da bureta utilizada na titulação. A equação 18 representa esse cálculo.

$$u_{\text{Determinação}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\text{fator}}}{\sqrt{n-1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{balança}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{res.balança}}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{bureta 10mL}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{res.bureta}}}{\sqrt{6}}\right)^2} \quad (18)$$

4.5.4 Determinação das incertezas padrão associadas ao método

Após o tratamento dos dados apresentados no item 4.2.2 deste trabalho e utilizando as equações citadas anteriormente, foram obtidas as incertezas associadas ao processo de validação (detalhadas na imagem c) do Apêndice A) e dispostas, resumidamente, na Tabela 10.

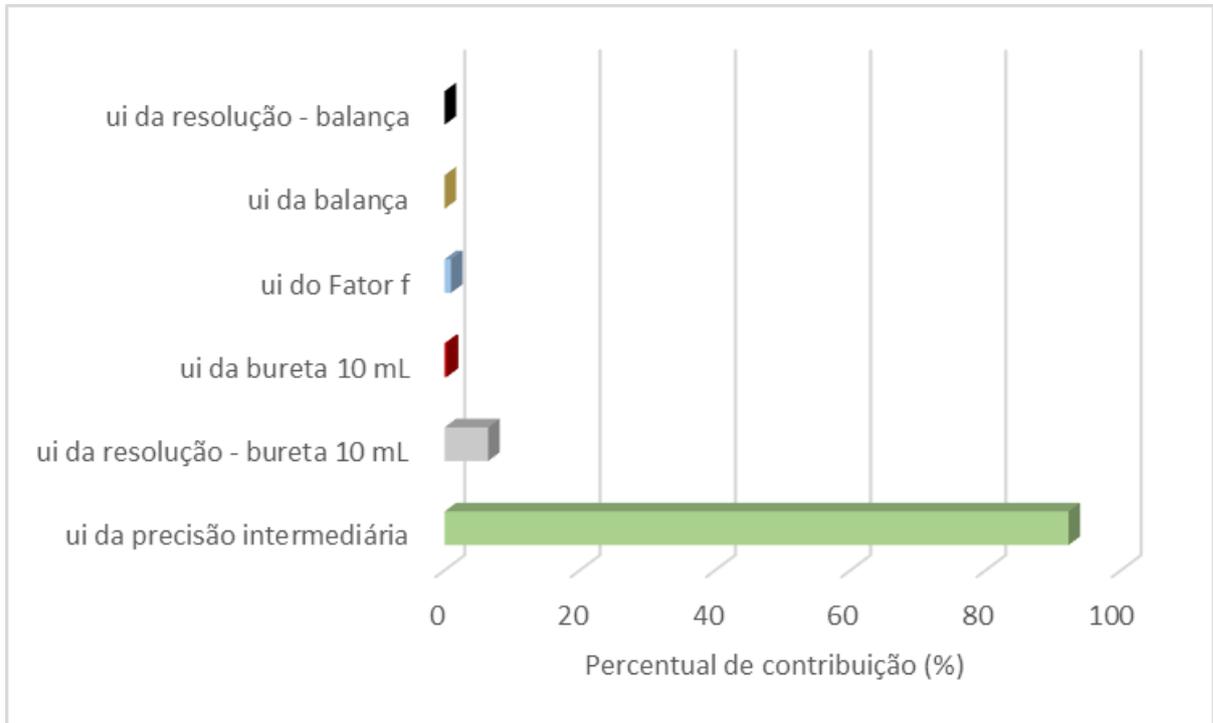
Tabela 10 - Incertezas padrão associadas a cada etapa do processo de validação.

Fonte	Incerteza padrão (mEq de O₂.kg⁻¹)
Incerteza expandida da balança	0,000004
Resolução da balança	0,000007
Incerteza do Fator <i>f</i>	0,016726
Incerteza expandida da bureta 10 mL	0,009145
Resolução da bureta 10 mL	0,040416
Desvio padrão da precisão intermediária	0,152833

Fonte: O autor (2022).

As incertezas padrão das fontes identificadas na Tabela 10 foram, percentualmente, ilustradas na Figura 17.

Figura 17 - Percentual das Incertezas padrão associadas ao processo de validação.



Fonte: O autor (2022).

A Figura 17 demonstra que a incerteza padrão referente a precisão intermediária apresentou a maior contribuição entre as incertezas padrão determinadas. Tal fato pode ter como lastro, a resolução elevada da bureta empregada nas determinações, considerando a faixa de concentrações da matriz em estudo, ou ainda a necessidade de um maior alinhamento entre os analistas participantes do experimento. Nesse sentido, para que haja uma diminuição na dispersão entre os dados obtidos (um menor desvio padrão associado), sugere-se a realização de novo treinamento, bem como a utilização de uma bureta de menor resolução a fim de reduzir a influência desta provável fonte de desvio.

4.5.5 Determinação da incerteza expandida do método

Em relação à estimativa incerteza, os valores do resultado da determinação do índice de peróxido, da incerteza combinada (u_c), graus de liberdade efetivo (v_{eff}), fator de abrangência (k) e incerteza expandida do método (U), com uma probabilidade $\cong 95\%$ de confiança, foram dispostos na Tabela 11.

Tabela 11 - Dados da estimativa de incerteza do método analítico.

Índice de peróxido (mEq de O₂.kg⁻¹)	Incerteza Combinada (u_c)	Graus de liberdade efetivo (ν_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza Expandida do método (U)
0,59	0,16	11	2,28	0,36

Fonte: O autor (2022).

Dessa forma, de acordo com os parâmetros de validação propostos, obteve-se o resultado de $0,59 \pm 0,36$ mEq de O₂.kg⁻¹. Nesse sentido, vale a pena destacar que o valor determinado para incerteza expandida do método encontra-se abaixo do limite de quantificação, estando, portanto, em conformidade com os requisitos internos exigidos pelo LFDA-PE (IQA-POA) para a determinação do índice de peróxido em manteigas.

5 CONCLUSÃO

A verificação/validação de uma metodologia se configura como principal rota norteadora para a implantação de uma técnica em um laboratório de análise química, que os resultados obtidos sejam confiáveis e rastreáveis. Tais características são de suma importância, sobretudo, quando a determinação da identidade e qualidade alimentar está envolvida no estudo.

A validação da determinação do índice de peróxido em manteiga realizada neste trabalho obteve resultados dentro da conformidade para todos os parâmetros avaliados: precisão, limite de quantificação e faixa de trabalho. Além disso, a estimativa de incerteza de medição também foi calculada, e seu resultado mostrou-se em conformidade em relação ao critério de aprovação interno do laboratório.

Na esfera profissional e educacional este estudo teve grande relevância na expansão dos conhecimentos relativos à metrologia (aspectos teóricos e práticos da medição), ao tratamento estatístico de dados e à rotina dentro de um laboratório de fiscalização de produtos de origem animal.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. C. Determinações iodométricas. **Revista Chemkeys**, n. 2, p. 1-6, 2001.
- AOAC. Peroxide Value of Oils and Fats. Official method 965.33. 1969
- AOAC. Stantard Solutions of Sodium Thiosulfate. Official method 942.27. 1942
- ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. 4ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 2008, 596 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025:2017. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.
- Avaliação de dados de medição: guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008. Duque de Caxias, RJ: INMETRO/CICMA/SEPIN, 2012 141 p.
- BELIK, W. A política brasileira de segurança alimentar e nutricional: concepção e resultados. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, SP, v. 19, n. 2, p. 94–110, 2012
- BERGE, K. G.; HAMILTON, R. J. *Em Developments in Oils and Fats*. First edition. London: Chapman & Hall, 1995.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001 - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 16 de julho de 2001. Seção 1, p. 13. Disponível em <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=16/07/2001&jornal=1&pagina=13&totalArquivos=219>> . Acesso em: 18 jun. 2022.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 11 de março de 1996. Seção 1, p. 25. Disponível em <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=11/03/1996&jornal=1&pagina=25&totalArquivos=101>> . Acesso em: 24 maio 2022.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 4, de junho de 2000 - **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 5 de julho de 2000. Seção 1, p. 68. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=05/07/2000&jornal=1&pagina=68&totalArquivos=79>> . Acesso em: 18 jun. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília, p. 8, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Construindo a política nacional de biossegurança e bioproteção: ações estratégicas da saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. Brasília, 2019a, 152p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. 2ª edição. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2019b, 158p.

CAPRILES, V.D.; ARÊAS, J.A.G. Desenvolvimento de salgadinhos com teores reduzidos de gordura saturada e de ácidos graxos trans. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25 nº2, p 363-369, 2005.

CAVALCANTE, L. S. S. R. **Caracterização físico-química e análise térmica do óleo da semente de Moringa Oleífera**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CHEMICAL SYNTHESIS DATABASE. Disponível em: <https://www.chemsynthesis.com/>. Acesso em: 19 jun. 2022.

CHRISTIAN, G. D. Química Analítica. 6ª ed. México: Mc Graw Hill, 2009.

COSTA, M. A. B.; SILVA, E. C.; TREVISANI, L. E. L. Impacto da implantação de métodos e ferramentas de qualidade: estudo de caso em uma empresa do setor sucroalcooleiro. **Desafio Online**, v. 3, n. 1, p. 109-125, 2015.

COULTATE, T.P. Alimentos: a química de seus componentes. 3ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de alimentos de Fennema. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DIAS, P. C. M.; ALVES, J. M. Avaliação da estabilidade oxidativa de cápsulas de concentrado de óleo de peixe. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 2, n. 1, p. 49-56, 2013.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, v. 11, p. 3-14, 1998.

FERREIRA, F.Q.; SIQUEIRA, K. B.; STOCK, L.A. Novos horizontes e mercado da manteiga. *Revista Indústria de Laticínios*. p 89-94, 2021.

FOGAÇA, F. H. S; SANT'ANA, L. S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. *Archives of Veterinary Science*, v. 14, n. 2, p. 117-127, 2009.

HANNA INSTRUMENTS. Valor de Peróxido e a determinação de Rancidez de alimentos 2020. Disponível em: <<https://hannainst.com.br/valor-de-peroxido-e-a-determinacao-de-rancidez-de-alimentos/>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

HETTINGA, D.; NGUYEN, L. V.; SHAHIDI, F. Butter. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, p. 1-55, 2020.

HOTT, M.; GUIMARÃES, R.; WALTER, A. Geografia da produção brasileira de leite. 2021. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/232431/1/Geografia-producao-brasileira-leite.pdf>>.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE

INDUSTRIAL. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008. Revisão 09. 2020, 30 p.

JOHNSON, L. E. Deficiência de vitamina B12. Manual MSD Versão Saúde para a Família. 2020. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/dist%C3%BArbios-nutricionais/vitaminas/defici%C3%Aancia-de-vitamina-b12#:~:text=A%20defici%C3%Aancia%20de%20vitamina%20B12%20devido%20%C3%A0%20falta%20de%20fator,B12%20da%20prote%C3%ADna%20da%20carne.>>. Acesso em: 9 jun. 2022.

KIRK, J.R. Biological availability of nutrients in processed foods. *Journal of Chemical Education*, v.61, n.4, p.364-367, 1984.

KLIASS, P. Inflação, carestia e eleições. *Terapia Política*. Disponível em: <<https://terapiapolitica.com.br/inflacao-carestia-e-eleicoes/>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

LEITE, F. Validação em análise química. 4ª edição. Campinas, SP: Editora Átomo, 2002.

LOUREIRO, A. C.; SÁ, S. K. G.; NOGUEIRA, D. M.; COMAPA, S. S.; SANTOS, B. M.; PEREIRA, M. M; SOUZA, A. Q. L.; NASCIMENTO, B. R. V. . Estudo em alimentos cotidianos: Pesquisa de polissacarídeos através da reação com iodo. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 24243-24253, 2019.

JORGE, N., Química e Tecnologia de Óleos Vegetais. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2009.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu/physical and chemical characterization and fatty acid composition of babassu oil. **Ceres**, v. 53, n. 308, 2015.

MAGALHÃES, A. V. M.; GONDIM NETO, L. A produção artesanal de manteiga da terra como resgate da identidade cultural no sertão do Ceará. 2016.

MAIA, P. J. S. Fotoquímica “verde”: desenvolvimento de complexos de metais de transição luminescentes para ativação de oxigênio singlete e a sua aplicação na desinfecção de água contaminada com microorganismos patogênicos (*Escherichia Coli* e *Enterococcus Faecalis*). 2015.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cien. Cult.**, São Paulo, v. 66, n. 3, pág. 54-57, setembro de 2014 . Disponível em <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000300017&lng=en&nrm=iso>. acesso em 22 jun. 2022.

MASSA MADRE. Descubra a fascinante história da manteiga. 2018. Disponível em: <<https://massamadreblog.com.br/know-how/curiosidades/descubra-fascinante-historia-da-manteiga/>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Estadística y quimiometria para química analítica. 4º ed. Madrid, Espanha: Pearson Prentice Hall, p. 102-108, 2002

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Coordenação Geral de Apoio Laboratorial. Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos. Brasília, DF, 2015, 51 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária - Rede LFDA. 2022a. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Mapa do Leite. 2022b. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MET IQA/0029/001 do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Goiânia (LFDA-GO). 2022c

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MET IQA/046/01 do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária no Rio Grande do Sul (LFDA-RS). 2020.

NAHID, A.; BRONLUND, J. E.; CLELAND, D. J.; PHILPOTT, B. Modelling the freezing of butter. **International Journal of Refrigeration**, v. 31, p. 152-160, 2008.

NOVACK, M. M. E.; FUKU, G.; NÖRNBERG, J. L.. Ácido linoléico conjugado (CLA) presente nos produtos lácteos e sua relação com a saúde humana. **Hig. aliment**, p. 95-100, 2013.

NÖRNBERG, M. L.; PINHEIRO, P. N.; NASCIMENTO, T. C.; FERNANDES, A. S.; NÖRNBERG, M. F. B. L.; JACOB-LOPES, E. ZEPKA, L. Q.; NÖRNBERG, J. L. Compostos bioativos em manteigas: carotenoides e ácidos graxos Bioactive compounds in butters: carotenoids and fatty acids. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 10270-10288, 2022.

OLIVEIRA, E. C.; AGUIAR, P. F. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza na cromatografia gasosa do gás natural. *Química Nova* [online], v. 32, n. 6. p. 1655-1660, 2009.

PANCIERE, B. M.; RIBEIRO, L. F. Detecção e ocorrência de fraudes no leite fluido ou derivados. **Revista GeTeC**, v. 10, n. 27, 2021

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, Oxford, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001.

RAMALHO, V. C. ; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, 2006.

ROSA, G.; GAUTO, M; GONÇALVES, F. Química Analítica: práticas de laboratório. Porto Alegre: Bookman, 2013

SANTOS, N. M. S.; CUNHA, A. F.; SANTOS, E. N. S.; CASTILHO, N. P. A.; APARECIDA, A.; VIEIRA, R. M.; LUSTOSA, A. A. Qualidade físico-química e microbiológica de manteigas de Viçosa (MG). **Revista Científica UniScientiae**, v. 1, n. 2, 2018.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/qn/a/KbCWvQcH3SKPN7HGYKPjxxv/?format=pdf&lang=pt>>

Acesso em: 22 jun. 2022.

SILVA, F. T. Manual de produção de manteiga. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA. 1996. 16 p.

SILVA, M.N. Desenvolvimento de Manteiga funcional adicionada de microrganismos probióticos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 9ª ed. Cengage Learning, 2014.

SOARES, D. J.; TAVARES, T. M.; BRASIL, I. M.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, 2012.

SOUZA, T. C. Estabilidade oxidativa da carne de frango pré-cozida contendo bioprodutos do Cerrado. 2013. 40 f., il. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Dairy Production and Trade Developments. 2021. Disponível em: <<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/5t34sj56t/sj13b3984/xw42p992f/dairy.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

VENQUIARUTO, L. D.; DALLAGO, R. M.; SANTOS, D.; MARCIELI, P.; TOLEDO, J. Avaliação microbiológica de manteigas artesanais comercializadas na cidade de Tapejara/RS. **Revista Perspectiva**, v. 37, n. 139, p. 19-25, 2013.

VILELA, D. Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos. Brasília, DF : Embrapa, 2016. 435 p

VOCABULÁRIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA: CONCEITOS FUNDAMENTAIS E GERAIS E TERMOS ASSOCIADOS (VIM 2012). DUQUE DE CAXIAS, RJ : INMETRO, 2012. 94 P.

APÊNDICE A - DADOS RELATIVOS ÀS FONTES DE INCERTEZA

a) Incerteza da Padronização do Tiosulfato de Sódio

Fontes de incerteza				Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i	Incerteza padrão	Graus de liberdade	Porcentagem de Contribuição
Origem	Fonte	Valor de Entrada	Unidade						
m	Incerteza expandida da balança	0,00006	g	normal (k)	2,00	0,466	0,000014	∞	0,91
m	Resolução da balança	0,00010	g	retangular	1,73	0,4656	0,000027	∞	3,38
V'	Incerteza expandida da bureta 50 mL	0,00900	L	normal (k)	2,02	-0,0002	-0,000001	∞	0,00
V'	Resolução da bureta 50 mL	0,10000	L	triangular	2,45	-0,0002	-0,000009	∞	0,40
τ	Incerteza expandida da pureza do padrão	0,00004	adm	normal (k)	2,00	1,0000	0,000022	∞	2,26
<i>Tipo A</i>	Desvio padrão das repetições	0,0002	N	t-student	1,73	1,0000	0,000141	3	93,05

Incerteza padrão combinada (u_c)	Graus de liberdade (v_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \cong 95%)	Unidade
0,00015	3	3,31	0,0005	mol/L (N)

Expressão do resultado			
0,0099	\pm	0,0005	mol L ⁻¹ (N)

$$\text{Coeficiente de sensibilidade para Massa: } \frac{\partial N_{(Na_2S_2O_3)}}{\partial m_{(K_2Cr_2O_7)}} = \frac{1000}{V_{(Na_2S_2O_3)} \times 49,031}$$

$$\text{Coeficiente de sensibilidade para Volume: } \frac{\partial N_{(Na_2S_2O_3)}}{\partial V_{(K_2Cr_2O_7)}} = - \frac{m_{(K_2Cr_2O_7)} \times 1000}{V_{(Na_2S_2O_3)}^2 \times 49,031}$$

b) Incerteza do Fator f

Fontes de incerteza				Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i	Incerteza padrão	Graus de liberdade	Porcentagem de Contribuição
Origem	Fonte	Valor de Entrada	Unidade						
<i>Creal</i>	Incerteza do <i>Creal</i>	0,0005	Mol/L	t-student	3,31	100,000	0,014630	3	100,00

Incerteza padrão combinada (u_c)	Graus de liberdade (v_{eff})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \cong 95%)	Unidade
0,01463	3	3,31	0,0484	adimensional

Expressão do resultado			
0,9920	\pm	0,0484	mol L ⁻¹ (N)

$$\text{Coeficiente de sensibilidade para C real: } \frac{\partial f}{\partial C_{Real}} = \frac{1}{C_{teórica}}$$

c) Incerteza Final

Fontes de incerteza				Distribuição de probabilidade	Divisor	Coeficiente de sensibilidade c_i	Incerteza padrão	Graus de liberdade	Porcentagem de Contribuição
Origem	Fonte	Valor de Entrada	Unidade						
f	Incerteza do Fator f	0,0484	adim	t -student	1,73	0,599	0,0167256	3	1,10
m_a	Incerteza expandida da balança	0,00006	g	normal (k)	2,00	-0,1186	-0,000004	∞	0,00
m_a	Resolução da balança	0,00010	g	retangular	1,73	-0,1186	-0,000007	∞	0,00
V'	Incerteza expandida da bureta 10 mL	0,00800	mL	normal (k)	1,73	1,9800	0,009145	∞	0,33
V'	Resolução da bureta 10 mL	0,05	mL	triangular	2,45	1,9800	0,040416	∞	6,44
Tipo A	Desvio padrão da precisão intermediária	0,4585	mEq/kg	t -student	3,00	1,0000	0,152833	9	92,12

Incerteza padrão combinada (u_c)	Graus de liberdade (ν_{est})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida (U) (Probabilidade \approx 95%)	Unidade
0,16	11	2,28	0,36	mEq O ₂ / kg

Expressão do resultado			
0,59	\pm	0,36	mEq O ₂ / kg

Coefficiente de sensibilidade para o fator:
$$\frac{\partial I_{\text{Peróxido}}}{\partial f} = \frac{V_{(Na_2S_2O_3)} \times 1000}{m_a}$$

Coefficiente de sensibilidade para volume de tiosulfato:
$$\frac{\partial I_{\text{Peróxido}}}{\partial V} = \frac{f \times 1000}{m_a}$$

Coefficiente de sensibilidade para a massa da amostra:
$$\frac{\partial I_{\text{Peróxido}}}{\partial m_a} = -\frac{V_{(Na_2S_2O_3)} \times f \times 1000}{m_a^2}$$