



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ANA CECILIA BERNARDINO ALVES DOS SANTOS MELO DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA CONTROLE DE
QUALIDADE DE FERMENTADO DE MAÇÃ**

Recife

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
ANA CECILIA BERNARDINO ALVES DOS SANTOS MELO DE FRANÇA

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA CONTROLE DE
QUALIDADE DE FERMENTADO DE MAÇÃ

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Engenharia Química da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Fernanda Araújo Honorato

Recife - PE

2023

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

França, Ana Cecilia Bernardino Alves dos Santos Melo de.

Avaliação de desempenho do método analítico para controle de qualidade de fermentado de maçã / Ana Cecilia Bernardino Alves dos Santos Melo de França. - Recife, 2023.

39 p, tab.

Orientador(a): Fernanda Araújo HONORATO

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2023.

Inclui referências.

1. Fermentado de Maçã. 2. Química Analítica. 3. Validação de método. 4. Grau Alcoólico. I. HONORATO, Fernanda Araújo . (Orientação). II. Título.

670 CDD (22.ed.)

ANA CECILIA BERNARDINO ALVES DOS SANTOS MELO DE FRANÇA

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA CONTROLE DE
QUALIDADE DE FERMENTADO DE MAÇÃ

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Engenharia Química da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em: 25/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA ARAUJO HONORATO**
Data: 09/10/2023 18:52:42-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Fernanda Araújo Honorato
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 **DANIELLA CARLA NAPOLEAO**
Data: 09/10/2023 08:17:46-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Daniella Carla Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 **JENYFFER MEDEIROS CAMPOS GUERRA**
Data: 09/10/2023 12:03:25-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Jenyffer Medeiros Campos Guerra
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pela sua soberania e graça.

À Ana Paula, minha mãe, pelo esforço, paciência e dedicação que me fizeram chegar até aqui.

À minha família, pelo apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho de conclusão de curso. Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora Fernanda Honorato, pela orientação valiosa e paciência. Também sou grata aos meus professores e colegas que ofereceram apoio e troca de ideias ao longo deste percurso acadêmico tornando essa caminhada mais leve.

Agradeço à Juliana Mafra Falcão, pelo acolhimento e direcionamento que recebi durante meu tempo de estágio que contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e acadêmico.

Agradeço a minha mãe, tios, avós e irmãos pelo constante incentivo, cuidado e apoio emocional. Sem o amor e encorajamento de cada um de vocês, esse projeto não teria sido possível.

Agradeço ao meu noivo, pelo amor e cuidado que teve durante toda esta trajetória.

Cada um de vocês desempenhou um papel importante na realização deste trabalho, e por isso, expresso minha profunda apreciação.

Muito obrigada.

“Sim, coisas grandiosas fez o Senhor por nós, por isso estamos alegres.”

Salmos 126: 3, Bíblia Sagrada

RESUMO

Na rotina de trabalho de um laboratório, há a necessidade de que as metodologias utilizadas sejam otimizadas e que novos métodos de análise sejam desenvolvidos, sendo frutos da evolução do laboratório e da adequação dos seus recursos às novas demandas. O surgimento de novas metodologias ou otimizações levam ao processo de validação, sendo este um estudo experimental que visa detalhar o procedimento analítico. Por meio dos resultados dos parâmetros de qualidade, avaliar considerando os critérios de aceitação, se esse método é adequado à aplicação que é proposta a fim de garantir confiabilidade nos resultados. Diante disso, uma Unidade Fabril, otimizou uma análise de qualidade no qual se verifica o grau alcoólico do fermentado de maçã, matéria-prima para a fabricação do vinagre de maçã. Logo, foi necessário realizar a validação deste método. O método consta no Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres, para análise do grau alcoólico real em destilados, que foi validado devido à mudança no escopo para fermentados. A análise de desempenho foi feita baseada no documento do INMETRO DOQ-CGCRE 008, onde foram verificados os parâmetros de limite de quantificação, limite de detecção, precisão e exatidão. Tendo como resultado, o limite de quantificação de $0,006 \text{ g./L}^{-1}$, o limite de detecção de $0,002 \text{ g.L}^{-1}$, precisão de 0,2826 e exatidão de 0,8 V/V%. Ao concluir as análises dos parâmetros de validação constatou-se que o método é adequado ao escopo do fermentado de maçã.

Palavras-chave: Fermentado de Maçã; Grau Alcoólico; Química Analítica; Validação de método.

ABSTRACT

In the work routine of a laboratory, there is a need for methodologies used to be optimized and new analysis methods are developed, being the result of the evolution of the laboratory and the adaptation of resources to new demands. The emergence of new methodologies or optimizations lead to the validation process, which is a study experiment that aims to detail the analytical procedure. Through results of quality parameters, evaluate, considering the criteria of acceptance, whether this method is suitable for the application that is proposed in order to ensure reliability in results. Therefore, a Manufacturing Unit, optimized a quality analysis in which the alcoholic level of the fermented apple, raw material for making apple cider vinegar. Therefore, it was necessary to validate this method. The method appears in Manual of Beverage and Vinegar Analysis Methods, for grade analysis of real alcohol in spirits, which was validated due to the change in scope for fermentation. The performance evaluation was based on the INMETRO document DOQ-CGCRE 008, where the limit parameters of quantification, limit of detection, precision and accuracy. With the result, the limit of quantification of $0,006 \text{ g./L}^{-1}$, limit of detection of $0,002 \text{ g./L}^{-1}$, precision of 0,2826 and accuracy of 0,8 V/V%. When completing the analysis of the validation parameters, it was found that the method is suitable for the scope of fermented apple.

Keywords: Fermented Apple; Alcoholic Degree; Analytical chemistry; Method validation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros de qualidade para o fermentado de maçã	24
Tabela 2 –	Parâmetros do fermentado acético de álcool	25
Tabela 3 –	Parâmetros do fermentado acético de fruta	26
Tabela 4 –	Parâmetros do fermentado acético, fermentado acético duplo e fermentado acético triplo, em função da acidez volátil	27
Tabela 5 –	Sequência de diluições para determinar o LQ	32
Tabela 6 –	Replicatas para a balança hidrostática	33
Tabela 7 –	Resultados do grau alcoólico pela balança hidrostática	34
Tabela 8 –	Resultados do grau alcoólico pelo densímetro digital	35
Tabela 9 –	Resultados das concentrações e erros para a exatidão	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AOAC	Associação Oficial de Química Analítica
BEV	Bebidas e Vinagres
Ceagesp	Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
IEC	Comissão Eletrotécnica Internacional
IQA	Identidade e Qualidade de Alimentos
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
NR	Normas Regulamentadoras

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	ESTADO DA ARTE	16
2.1	FERMENTADO DE MAÇÃ	16
2.1.1	Vinagre	16
2.2	ANÁLISE LABORATORIAL: DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO	17
2.3	REFERÊNCIA NORMATIVA E DOCUMENTOS ORIENTATIVOS	18
2.3.1	DOQ-CGCRE 008	18
2.3.1.1	Seletividade	19
2.3.1.2	Linearidade	19
2.3.1.3	Limite de Detecção	20
2.3.1.4	Limite de Quantificação	20
2.3.1.5	Exatidão	21
2.3.1.6	Precisão	21
2.3.2	COMPETÊNCIA TÉCNICA DE LABORATÓRIOS: ABNT NBR ISO/IEC 17025	22
2.3.3	Ministério da Agricultura e Pecuária	23
2.3.3.1	Instrução Normativa MAPA Nº 34 DE 29/11/2012	23
2.3.3.2	Instrução Normativa Nº 6, de 3 de abril de 2012	24
2.3.3.2.1.	<i>Classificação e denominação do fermentado acético</i>	25
2.3.3.2.2.	<i>Parâmetros do fermentado acético de álcool</i>	25
2.3.3.2.3.	<i>Parâmetros do fermentado acético de fruta</i>	25
2.3.3.2.4.	<i>Parâmetros do fermentado acético de cereal e Parâmetros do fermentado acético de vegetal ou de mel de abelha</i>	26
2.3.3.2.5.	<i>Parâmetros do fermentado acético, fermentado acético duplo e fermentado acético triplo, em função da acidez volátil</i>	26
3.	METODOLOGIA	28
3.1	PLANEJAMENTO DE VALIDAÇÃO	28
3.1.1	Definição dos Parâmetros de Validação	28
3.1.2	Determinação dos parâmetros de análise de desempenho	28

3.1.2.1	Limite de Quantificação	28
3.1.2.2	Limite de Detecção	28
3.1.2.3	Precisão	29
3.1.2.4	Exatidão	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1	Limite de Quantificação e Limite de Detecção	32
4.2	Precisão	33
4.3	Exatidão	36
5.	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

A análise laboratorial é de fundamental importância para o controle dos parâmetros de qualidade na produção industrial. Na rotina de trabalho de um laboratório, as análises padrão, ou de referência, são frequentemente utilizadas, porém há a necessidade de que estas sejam otimizadas e/ou que novos métodos de análise sejam desenvolvidos. Essas novas metodologias são frutos da evolução do laboratório e da adequação dos seus recursos às demandas, como a gestão do tempo e a utilização de novas tecnologias. Os resultados das análises podem assegurar a qualidade do produto ou do processo, garantem o atendimento a especificações e cumprimento da legislação, sendo de fundamental importância que estas análises sejam realizadas com procedimentos bem estabelecidos obtendo os resultados confiáveis e tecnicamente válidos.

O desenvolvimento do método e a otimização são etapas importantes que precedem o processo de validação (MAPA, 2005). É imprescindível que haja uma otimização interna do procedimento analítico no laboratório antes do processo de validação. Nessa etapa, devem ocorrer as calibrações e as qualificações dos instrumentos que serão utilizados, juntamente com as verificações dos reagentes e o treinamento dos técnicos (MAPA, 2005).

Segundo Skoog (2013), “é impossível realizar uma análise química que seja totalmente livre de erros ou incertezas”, pois todas as etapas de uma análise têm associadas a estas erros, sejam erros de métodos, operacionais ou instrumentais, que afetam o resultado da análise gerando incerteza. Por isso, é necessário a realização de estudos sobre os efeitos envolvendo os diversos fatores experimentais que podem afetar o resultado analítico, buscando ajustar as condições que reduzam essas variações, garantindo a melhor performance em termos de exatidão e precisão ao propósito que se deseja (MAPA, 2005).

Ao término dessas etapas, inicia-se o processo de validação. Este é um estudo experimental que visa detalhar o procedimento analítico e por meio dos resultados dos parâmetros de validação, avaliar, considerando os critérios de aceitação, se esse método é adequado à aplicação que é proposta a fim de garantir confiabilidade nos resultados (MAPA, 2005).

De acordo com o DOQ-CGCRE 008, é necessário que haja validação de métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo laboratório e métodos normalizados utilizados fora de seu escopo pretendido ou modificados de outra

forma. Paralelo a isto, a ISO 17025 traz os requisitos a serem atendidos para atestar competência técnica em gerar resultados confiáveis. É importante ressaltar que ao realizar um processo de validação, é fundamental que seja feito em função de procedimentos analíticos idênticos aos que ocorrem na rotina dos técnicos do laboratório, evitando gastos de tempo e recursos com validações não aplicáveis à realidade do laboratório (INMETRO, 2020).

A análise laboratorial em uma Unidade Fabril ocorre em todas as etapas do processo de fabricação, desde o recebimento da matéria-prima até a avaliação do produto acabado. Para que isso ocorra, o laboratório precisa estar preparado e capacitado para a realização de todas as análises. Essa capacitação inclui equipamentos adequados, treinamento, estrutura adequada, insumos e as metodologias de análises.

Buscando esse objetivo, uma Unidade Fabril, localizada na Região Metropolitana do Recife, produtora de vinagre de maçã que utiliza o fermentado desta mesma fruta como matéria-prima, deseja avaliar o desempenho de um novo método para a análise do grau alcoólico real no fermentado de maçã. Este método utiliza uma metodologia que pode reduzir em até 34% o tempo de análise, além de não ser necessário o acompanhamento do técnico durante toda a análise, fazendo com que o técnico possa direcionar parte do seu tempo para outra atividade.

Atualmente, a produção e comercialização do vinagre são regulamentadas pelo Ministério da Agricultura e Agropecuária, MAPA, que classifica o vinagre como uma bebida fermentada. Este trabalho é delimitado a análise Físico-Química de Bebidas e Vinagres – BEV, pertencente à área de Identidade e Qualidade de Alimentos – IQA, da Divisão de Ensaios Químicos da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial.

Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho do Método 03, do Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres para destilados, do MAPA, para a análise do grau alcoólico real do fermentado de maçã, utilizando destilador enológico e balança hidrostática aplicável a faixa de 5,8 - 12% v/v, adotando como base o documento do INMETRO, DOC-CGCRE-008, Revisão 08 – 2020, visando garantir a confiabilidade dos resultados e assim, a qualidade do vinagre produzido.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 FERMENTADO DE MAÇÃ

O fermentado de maçã é uma bebida produzida a partir da fermentação do suco de maçãs (Mapa, 2012). O processamento e a obtenção de produtos à base de maçã surgiram como uma alternativa a estas frutas que seriam descartadas devido à baixa aceitação para consumo *in natura* ou quando não são classificadas para comercialização (Embrapa, 2019). Este fermentado pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de sidra, bebida mista e vinagre.

2.1.1 Vinagre

De acordo com a Embrapa (2006), o vinagre é o produto da transformação do álcool em ácido acético por bactérias acéticas, sendo Pasteur (1822-1895), o cientista francês, o primeiro a determinar as bases científicas da produção industrial do vinagre. Atualmente, o vinagre é considerado um condimento, devido a sua característica de atribuir gosto e aroma aos alimentos.

O vinagre tem seu valor devido às suas propriedades digestivas, metabólicas e antissépticas. Ao longo da história, o vinagre foi utilizado de diferentes formas como, conservante de alimentos, purificador de ar, desinfetante e medicamento (Ferreira, 2017).

Historicamente, o vinho e o vinagre foram os primeiros produtos de fermentação espontânea utilizados pelo homem na alimentação. Apesar do termo vinagre estar ligado ao produto obtido a partir da fermentação do vinho, com o avanço industrial, a matéria-prima utilizada para a fermentação passou a ser diversificada, como o arroz, o malte, a cana-de-açúcar e a maçã. Os vinagres de frutas têm um grande destaque nas suas qualidades sensoriais e nutritivas, apresentando também características próprias de sabor e aroma (Embrapa, 2006).

Como todo processo industrial que gera produto, os vinagres passam por controle de qualidade, desde a matéria-prima até o produto acabado. Desta forma, é fundamental dispor de infra estrutura de laboratório capaz de avaliar, através de análise química, a qualidade do processo e do produto.

2.2 ANÁLISE LABORATORIAL: DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO

As análises laboratoriais consistem em um conjunto de práticas que visam determinar alguma característica de uma amostra. Estas características são fundamentais para entender os aspectos da substância e dos seus componentes, como quantidade de compostos, pH, condutividade, pureza, potabilidade, entre outros (Skoog, 2013).

Estas análises podem ser qualitativas, cujo objetivo é determinar a presença ou ausência de um elemento na amostra, ou quantitativa, visando determinar a quantidade de um determinado componente na amostra (Skoog, 2013). As análises quantitativas compreendem diversas técnicas e métodos diferentes, como os métodos volumétricos, que consistem em análises para determinar a concentração de um elemento da amostra a partir do volume da solução de um reagente de concentração conhecida (Vasconcelos, 2019).

Segundo Skoog (2019), os métodos analíticos quantitativos apresentam figuras de mérito como exatidão e precisão, sensibilidade, seletividade e limite de detecção que avaliam se o método é adequado à determinação pretendida. A exatidão indica a proximidade do valor medido com o valor tido como verdadeiro, ou aceito como tal, sendo mensurada pelos erros absolutos ou relativos. Logo, a exatidão mede a concordância entre o resultado experimental e o valor aceito como verdadeiro. Importante ressaltar que a exatidão é muitas vezes mais difícil de ser determinada, uma vez que o valor verdadeiro é geralmente desconhecido, nesses casos, um valor aceito precisa ser utilizado em seu lugar.

A precisão está relacionada à reprodutibilidade dos resultados, uma vez que ela é baseada na concordância dos resultados entre si que foram obtidos da mesma forma. A exatidão e a precisão se interligam completando uma a outra. Apesar de ser difícil obter-se exatidão sem precisão, uma boa precisão não certifica uma boa exatidão, o contrário também é válido (Vasconcelos, 2019).

A sensibilidade é a capacidade de um método ou instrumento identificar pequenas variações de concentração de uma substância na amostra. Paralelamente, a seletividade é a habilidade de detectar vários elementos diferentes. Por fim, o limite de detecção corresponde à menor concentração ou massa do analito que pode ser detectada de forma confiável, mas não quantificada (Vasconcelos, 2019).

Na rotina do laboratório podem ocorrer várias adaptações em um método buscando otimizar e assim, melhorar a eficiência, rapidez e a confiabilidade dos resultados. Para isso, é necessário ter uma seleção adequada dos instrumentos, reagentes e dos métodos que serão utilizados. Em determinadas situações, ocorre o desenvolvimento de métodos analíticos, o qual envolve diversas etapas, desde a seleção adequada de equipamentos e reagentes até a validação e implementação dos procedimentos (Mapa, 2015).

É necessário que o procedimento operacional seja descrito visando padronizar todas as operações que são realizadas em uma determinada análise. Por meio deste procedimento é possível atingir a padronização garantindo que todas as análises procedam da mesma forma (Damião, 2013). Esses procedimentos também podem ser baseados em normas que descrevem a aplicação, o procedimento, além de parâmetros de verificação da adequação à análise pretendida.

Os métodos estabelecidos por normas já são validados, sendo necessário apenas a sua verificação de acordo com parâmetros descritos nelas. Entretanto, para métodos desenvolvidos pelo laboratório, ou utilizados fora do escopo de aplicação, ou que passam por modificações, para ter seus resultados tecnicamente confiáveis, devem passar por validação (Inmetro, 2020). Neste caso, diferentes documentos orientativos ou guias de validação podem ser utilizados.

2.3 REFERÊNCIA NORMATIVA E DOCUMENTOS ORIENTATIVOS

Para o estudo experimental de bebidas o documento orientativo DOQ-CGCRE 008 tem grande destaque, juntamente com a Instrução Normativa MAPA Nº 34 DE 29/11/2012, onde há as definições para os fermentados de fruta. A ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, vem para atestar as competências do laboratório dando as diretrizes para o bom funcionamento.

2.3.1 DOQ-CGCRE 008

O DOQ-CGCRE 008 é um documento de caráter orientativo sobre a validação de métodos analíticos, onde ele busca direcionar os laboratórios a demonstrar que um método analítico, na forma em que é realizado, é capaz de obter resultados confiáveis.

O processo de análise de desempenho consiste em uma série de análises e tratamentos de dados que na sua conclusão irá garantir que aquele método pode ser utilizado de forma confiável ou se ele não é capaz de entregar resultados válidos. Todo esse estudo deve estar reunido de forma organizada em um relatório final atestando ou não o método (Inmetro, 2020).

O documento cita uma série de parâmetros de desempenho que devem ser analisados e avaliados em cada metodologia, verificando qual deles é aplicável a métodos qualitativos e quantitativos. Estes parâmetros incluem: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

2.3.1.1 Seletividade

A seletividade é o quanto um método pode quantificar um determinado analito, estando ele na presença de outros analitos ou de outros materiais que podem ser interferentes (Carvalho, 2016).

Para avaliar a seletividade são feitos ensaios utilizando padrões ou materiais de referência, amostra com e sem analitos, presença e ausência de interferentes. É importante ressaltar que a linearidade, a tendência e a precisão estão diretamente ligadas a seletividade, caso o método não seja seletivo, haverá problemas com esses parâmetros mencionados (Inmetro, 2020).

2.3.1.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método apresentar resultados proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de uma faixa de concentração. A faixa de trabalho consiste no intervalo entre a menor e a maior concentração do analito na amostra que é possível identificar através do método de forma que garanta a precisão e validade dos dados. Juntando os dois conceitos, tem-se a faixa linear de trabalho, sendo a faixa de concentração do analito que apresenta os resultados dos métodos proporcionais (Brito, 2003).

Por fim, a sensibilidade analítica demonstra se a resposta de análise muda a partir da variação de concentração da amostra (Stulzer, 2006). Nessa etapa do estudo é necessário que seja construída uma curva analítica, onde são utilizados vários níveis de concentração que estejam uniformemente distribuídos ao longo da

faixa de trabalho que se pretende utilizar. Vale ressaltar que algumas curvas analíticas não apresentam comportamento linear, logo, o seu comportamento pode ser descrito por uma função que modele a relação entre a concentração do analito e a resposta medida (INMETRO, 2020).

2.3.1.3 Limite de detecção

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectada, porém essa quantidade não precisa ser necessariamente quantificada. Ter esse parâmetro é fundamental para as análises de traços e de baixos níveis do analito na amostra que o equipamento é capaz de identificar. É importante ressaltar que o LD de um procedimento utilizando o mesmo equipamento, pode variar dependendo do tipo de amostra que é analisada (Silva, 2013).

Esse parâmetro pode ser obtido através da avaliação/percepção visual, relação sinal/ruído, estimativa a partir da curva analítica, do desvio padrão do branco, ou por meio de curva de desvio padrão (INMETRO, 2020).

2.3.1.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis. Após a identificação do menor valor de concentração, é necessário que sejam testadas amostras independentes no mesmo nível de concentração, buscando verificar se a precisão é satisfatória. O LQ é importante em métodos quantitativos pois é por meio dele que pode ser determinado a partir de qual concentração o método é válido, ou seja o limite inferior da faixa linear (Silva, 2013).

Pode-se obter esse parâmetro através dos mesmos métodos expostos no LD, porém para o LQ será necessário o registro dos valores em cada ensaio. Há uma forma simplificada de calcular o LD a partir do LQ, através da Equação (1) (Inmetro, 2020).

$$LD = \frac{LQ}{3,3} \quad (1)$$

2.3.1.5 Exatidão

A exatidão envolve a quantificação numérica dos erros que um método pode ter através de erros aleatórios e sistemáticos (Skoog, 2003). Essa quantificação pode ser realizada por meio de materiais de referência certificados (MRC), comparação interlaboratorial, comparação com método de referência ou método validado e a através de ensaios de recuperação (Inmetro, 2020).

A quantificação através de ensaios de recuperação pode ser estimada por meio da análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. As amostras podem ser fortificadas com o analito em três concentrações, baixa, média e alta (Inmetro, 2020).

2.3.1.6 Precisão

Precisão é o grau de concordância entre os valores medidos, obtidos por meio de repetições de uma mesma amostra ou de amostras similares em condições especificadas (Silva, 2013). As três formas mais usuais de determinar este valor é através da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade.

A repetibilidade é a repetição de ensaios nas mesmas condições em um curto intervalo de tempo, apenas variando a faixa de concentração da amostra, sendo pelo menos três concentrações, baixa, média e alta (Brito, 2003).

A precisão intermediária consiste no grau de concordância entre os resultados obtidos em condições operacionais diferentes, como analistas diferentes, equipamentos diferentes ou maior espaço de tempo entre as repetições, apesar de ser o mesmo local e medições do mesmo objeto ou similar. Para isso deve ser definida quais as condições que serão variadas e quais serão similares. Em um laboratório este tipo de precisão é fundamental, pois por meio dele é possível mensurar a variabilidade dos resultados na rotina do laboratório (Silva, 2013).

Entretanto há um método simplificado para estimar a precisão intermediária. Essa simplificação é baseada na análise de n medições, sendo $n \geq 15$, em condições predeterminadas, podendo ser realizado em uma mesma amostra, amostra supostamente idênticas ou padrão MRC (Inmetro, 2020).

No caso da reprodutibilidade, ela é feita através de comparação interlaboratorial. Ela é fundamental quando o laboratório deseja comparar seus resultados e avaliar o seu desempenho (Albano, 2016).

2.3.2 Competência técnica de laboratórios: ABNT NBR ISO/IEC 17025

A ISO 17025 vem promover a confiança na operação e métodos de análise dos laboratórios de ensaio e de calibração, apontando meios em que eles podem demonstrar que seus resultados são confiáveis e tecnicamente válidos. O documento determina quais são os requisitos para que possa ser certificado a competência, imparcialidade e consistência de um laboratório, podendo ser aplicado em qualquer laboratório, independente do número de funcionários ou análise química, ou ainda do tipo de matriz (Inmetro, 2017).

A norma descreve itens técnicos e de gestão, visto que contempla requisitos da ISO 9001, e tem por objetivo atestar competência técnica de laboratórios de ensaio e calibração em gerar resultados confiáveis. A norma define que as atividades do laboratório devem ser realizadas de forma imparcial, tendo uma liderança comprometida a isso, não permitindo que interesses comerciais e pessoais interfiram na imparcialidade diante da emissão de resultados de análise. O laboratório deve ser capaz de identificar pontos que possam colocar em risco a sua imparcialidade e, quando identificados, deve ser capaz de demonstrar como ele irá eliminar ou amenizar este risco (Inmetro, 2017).

Simultaneamente, o laboratório deve assumir um compromisso legal de confidencialidade. Uma vez que todas as informações pertencem ao cliente, o laboratório não pode divulgar nenhum dado sem a sua autorização prévia (Olivares, 2006).

O documento traz informações sobre a seleção e verificação de métodos que serão utilizados para as análises e sobre o processo de verificação de uma análise. O laboratório deve ser responsável por utilizar métodos e procedimentos adequados à atividade que é proposta e estar atento às atualizações das metodologias e a comunicação com o cliente (Olivares, 2006). Quando o laboratório desenvolve um método de análise, utiliza um método não normalizado ou utiliza um método normalizado, porém fora do escopo para o qual ele foi desenvolvido, inicia-se a necessidade da validação do método.

Um estudo de grande importância é a avaliação da incerteza das medições, uma vez que toda a análise tem sua quantidade de incerteza, é necessário quantificá-las para saber o quão real são os valores que são obtidos por aquele método em específico.

No texto da norma são expostos tópicos imprescindíveis à organização do laboratório que visam prover confiabilidade e padronização das suas atividades, porém não será exposto neste trabalho.

2.3.3 Ministério da Agricultura e Pecuária

O Ministério da Agricultura e Pecuária, Mapa, é um dos ministérios do governo federal, o qual é responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor (Mapa, 2023). O agronegócio é de fundamental importância para economia brasileira pois ele abrange desde o pequeno ao grande produtor rural, juntando todas as atividades que são necessárias para a produção e destinação ao consumidor final. Todas essas atividades precisam ser regulamentadas e normatizadas para que se tenha um padrão que seja bom e seguro, tanto para o produtor quanto para o consumidor.

Para ser possível abranger todo esse setor o Mapa possui uma estrutura organizacional estratificada, com órgãos de assessoramento, empresas públicas como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, e Companhia Nacional de Abastecimento, Conab, além de empresas de economia mista, como a da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo, Ceagesp (Mapa, 2023).

Dentre os produtos, que este ministério regulamenta e normatiza, estão as categorias de bebidas, vinhos e vinagres. Esta categoria abrange desde o processo de produção, incluindo as matérias primas, até a comercialização, determinando os parâmetros legais do processo e do produto final.

2.3.3.1 Instrução Normativa MAPA Nº 34 DE 29/11/2012

Entre as bebidas fermentadas que a Instrução Normativa, IN, Nº 34 estabelece os padrões está o fermentado de fruta. Porém, esta instrução não

contempla as bebidas originárias da uva, estas são regidas pela Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988 (Mapa, 2012).

A IN estabelece que a bebida fermentada só pode ser obtida a partir da fermentação do suco de uma única fruta, não podendo fazer uma composição de 2 ou mais tipos de frutas diferentes.

O Anexo 1 da norma traz os parâmetros que determinam a qualidade dos fermentados, entre eles o fermentado de maçã. Alguns dos parâmetros estabelecidos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade para o fermentado de maçã

PARÂMETRO	LIMITE MÍNIMO	LIMITE MÁXIMO
Acidez total (meq.L ⁻¹)	50	130
Anidrido sulfuroso total (g.L ⁻¹)	-	0,35
Grau alcoólico a 20°C (%v/v)	4	14

Fonte: Instrução Normativa MAPA Nº 34 de 29/11/2012, adaptado.

De acordo com o Art. 5º. desta norma, a composição química dos produtos deve obedecer aos limites preestabelecidos pela norma, não podendo ultrapassar nenhum dos limites.

2.3.3.2 Instrução Normativa Nº 6, de 3 de abril de 2012

A Instrução Normativa Nº 6 veio para estabelecer os padrões de identidade, qualidade e classificação dos produtos fermentados acéticos, como o vinagre, com exceção da fermentação acética do vinho.

A norma estabelece que não é permitido que haja a adição de aromatizante sintético e nem de corante enocianina (INS 163ii) ou de qualquer substância ou ingrediente que altere os aspectos naturais do produto final, salvo algumas exceções previstas em legislação específica. Entretanto, é permitida a adição de substâncias ou ingredientes durante o processo de fermentação, como sal nutriente, açúcar,

aminoácido e vitamina que tenham como finalidade única a alimentação das bactérias acéticas.

Foram estabelecidos a classificação e a definição dos parâmetros para os diferentes tipos de fermentados acéticos, conforme analisados posteriormente.

2.3.3.2.1. Classificação e denominação do fermentado acético

Esta classificação é realizada em função da sua composição ou forma de obtenção, tendo que ser indicado se há presença de aromatizadores ou corantes no produto. Além de apresentar os aspectos sensoriais e físico-químicos em conformidade com a composição do produto.

2.3.3.2.2. Parâmetros do fermentado acético de álcool

Alguns dos parâmetros do fermentado acético de álcool estão expostos na Tabela 2. Vale ressaltar que a norma define que o álcool utilizado como ingrediente para a produção desse fermentado deve ser oriundo exclusivamente de álcool etílico potável de origem agrícola.

Tabela 2 - Parâmetros do fermentado acético de álcool

PARÂMETRO	VALOR	
	MÍNIMO	MÁXIMO
Acidez volátil em ácido acético (g.100mL ⁻¹)	4	-
Grau alcoólico (% v/v) a 20°C	-	1

Fonte: Instrução Normativa Nº 6, de 3 de abril de 2012, adaptado.

2.3.3.2.3. Parâmetros do fermentado acético de fruta

O fermentado acético de fruta apresenta uma maior quantidade de parâmetros que foram definidos, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros do fermentado acético de fruta

PARÂMETRO	VALOR	
	MÍNIMO	MÁXIMO
Acidez volátil em ácido acético (g.100mL ⁻¹)	4	-
Grau alcoólico (% v/v) a 20°C	-	1
Cinzas (g.L ⁻¹)	1	5
Extrato seco reduzido (g.L ⁻¹)	6	-

Fonte: Instrução Normativa Nº 6, de 3 de abril de 2012, adaptado.

2.3.3.2.4. *Parâmetros do fermentado acético de cereal e Parâmetros do fermentado acético de vegetal ou de mel de abelha*

Os parâmetros do fermentado acético de cereal, de vegetal ou de mel de abelha são similares ao do fermentado acético de fruta, com exceção do parâmetro do extrato seco reduzido (g.L⁻¹) onde o valor mínimo passa de 6 para 7.

Outro ponto importante é que o ácido acético que compõe o fermentado acético tem que ser oriundo exclusivamente da fermentação acética de uma matéria prima vegetal ou do mel de abelha.

2.3.3.2.5. *Parâmetros do fermentado acético, fermentado acético duplo e fermentado acético triplo, em função da acidez volátil*

Os principais parâmetros para estes fermentados são expostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros do fermentado acético, fermentado acético duplo e fermentado acético triplo, em função da acidez volátil

FERMENTADO	ACIDEZ VOLÁTIL EXPRESSA EM ÁCIDO ACÉTICO (g.100mL ⁻¹)		ÁLCOOL ETÍLICO (% EM VOLUME) A 20°C
	MÍNIMO	MÁXIMO	MÁXIMO
Acético	4	7,99	1
Acético duplo	8	11,99	1
Acético triplo	12	-	1

Fonte: Instrução Normativa N° 6, de 3 de abril de 2012, adaptado.

Desta forma, a IN especifica que para a produção de vinagre de maçã, a matéria prima, fermentado de maçã, deve ter entre 4 - 14 v/v%. Sendo assim, um método de análise eficiente, com resultados confiáveis e qualidade garantida são relevantes para o processo industrial.

3. METODOLOGIA

3.1 PLANEJAMENTO DE ANÁLISE DE DESEMPENHO

3.1.1 Definição dos parâmetros

Os parâmetros para a verificação de desempenho variam de acordo com cada tipo de método, como esta é uma análise quantitativa não linear, os seguintes parâmetros foram definidos: Limite de Quantificação, Limite de Detecção, Precisão e Exatidão.

3.1.2 Determinação dos parâmetros de análise de desempenho

3.1.2.1 Limite de quantificação

Neste estudo adotou-se o método de avaliação/percepção visual, onde o limite pode ser determinado através da análise de diluições a partir de uma amostra de grau alcoólico conhecido, até que seja estabelecido em qual concentração é possível mensurar o grau alcoólico de forma segura (Ulrich, 2015).

Foi verificado o LQ da balança hidrostática a partir de diluições sucessivas do fermentado de maçã, seguido da sua destilação, tendo os resultados registrados. Ao ser identificado a menor concentração possível de mensurar, fez-se 6 replicatas com a mesma concentração buscando constatar que não há variação nos resultados sendo possível mensurar com segurança a menor concentração de grau alcoólico possível de verificar neste equipamento.

O LQ aceitável foi definido sendo a concentração menor do que $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, pois de acordo com a legislação do vinagre, o valor máximo que este produto pode ter de grau alcoólico é 1 v/v%, logo, se o equipamento realizar a leitura de amostras tão pequenas, garante-se que o produto terá resultados seguros e adequados.

3.1.2.2 Limite de detecção

Adotou-se a Equação (1) para determinar o LD da balança hidrostática a partir do seu LQ.

De acordo com a Equação (1) o LD aceitável deve ser menor do que 0,03 g.L⁻¹.

3.1.1.3 Precisão

Adotou-se o método simplificado de precisão intermediária para realizar a análise do grau de concordância. Para a realização dessas análises as seguintes condições foram preestabelecidas:

- 2 analistas realizaram as diferentes sequências de repetições;
- A mesma amostra foi utilizada em ambas as sequências;
- Cada analista fez uma sequência de 15 medições;
- Cada análise foi feita de forma independente, onde em cada medição foi realizada a sua destilação e, posteriormente, a quantificação do grau alcoólico;
- As sequências foram quantificadas em diferentes equipamentos, uma na balança hidrostática e outra no densímetro digital.

É válido ressaltar que todas as amostras foram destiladas utilizando a mesma metodologia e sequência de procedimentos, mudando apenas o equipamento de leitura.

Outro ponto importante é que como a concentração é desconhecida, necessitou-se ter um valor que seja aceito como verdadeiro Skoog (2019). O valor que foi aceito como verdadeiro é o valor médio das análises em cada sequência de ensaios.

Após o levantamento dos dados foi calculada a precisão por meio do desvio padrão, S_i , pela Equação (2) de cada equipamento usado para mensurar o grau alcoólico:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y - \bar{y})^2} \quad (2)$$

Sendo:

n = número de ensaios efetuados por amostra;

y = cada resultado obtido;

$\bar{Y}$ = média aritmética do conjunto de análises de cada analista.

Como foram realizados 15 ensaios, $n = 15$, logo passamos para a equação (3):

$$Si = \sqrt{0,0714 \sum_{1}^{15} (y - \bar{y})^2} \quad (3)$$

O desvio padrão da precisão intermediária pode ser usado para o cálculo de incerteza de medição, uma vez que este desvio é a dispersão mais realista do método (INMETRO, 2020).

O primeiro analista, denominado “ANALISTA 1”, realizou a destilação e, posteriormente, foi mensurado o grau alcoólico em uma balança hidrostática. Após 24 h o segundo analista, denominado “ANALISTA 2”, realizou a destilação e, posteriormente, foi mensurado o grau alcoólico em um densímetro digital.

O critério de aceitação para este parâmetro foi estabelecido sendo o desvio padrão menor do que 0,3, pois este valor garante uma homogeneidade nos resultados, deixando eles mais próximos entre si.

3.1.1.4 Exatidão

Adotou-se a metodologia de ensaios de recuperação para calcular a exatidão por meio da fortificação das amostras. Esta fortificação ocorreu por meio da adição de volumes de 10, 25 e 50 mL, sendo baixa, intermediária e alta, respectivamente, utilizando pipetas volumétricas graduadas e calibradas. As amostras fortificadas têm volume de 200 mL e através da Equação (4), foi calculado a concentração teórica dos três níveis de concentração. Por meio da análise laboratorial, foi verificado o valor das concentrações encontradas nos respectivos níveis. O erro foi calculado pela diferença entre a concentração esperada e a concentração encontrada. E por fim, o erro da análise é calculado pela média dos três erros.

Como o analito é o álcool, adotou-se o álcool hidratado de °GL 95,3 v/v% e a concentração da amostra não fortificada é de 6,05 v/v%.

Por meio da Equação (4), foi calculado a concentração de analito após a adição dos diferentes volumes à amostra nas três situações:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (4)$$

O critério de aceitação foi definido em uma faixa menor ou igual a 1 v/v%. Pois como a análise é aplicada à amostras que estão na faixa entre 5,8 v/v% - 12 v/v%, a variação de no máximo 1 v/v% não traria consequências para o produto final.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Por meio da metodologia e dos parâmetros definidos anteriormente, as análises experimentais foram realizadas, verificando-se os resultados expostos a seguir.

4.1 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

A Tabela 5 apresenta os resultados da sequência de diluição, verificado na balança hidrostática, sendo feito um comparativo entre o grau alcoólico e a sua respectiva concentração.

Tabela 5 - Sequência de diluições para determinar o LQ.

CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)	GRAU ALCOÓLICO (V/V %)
60,650	6,07
48,510	5,39
38,160	4,77
29,225	4,18
21,810	3,64
15,000	3,00
9,460	2,37
5,325	1,78
2,400	1,20
0,580	0,58
0,130	0,26
0,036	0,15
0,006	0,06
0,001	ERRO

Fonte: A autora (2023).

A concentração de 0,006 g.L⁻¹ foi identificada como a menor concentração que foi possível mensurar, sendo respectivamente o grau alcoólico de 0,06 v/v%. Na

Tabela 6, estão registradas as leituras das 6 replicatas da concentração identificada acima, sendo constatada então como a menor concentração em que é possível mensurar com precisão o grau alcoólico neste equipamento.

Tabela 6 - Replicatas para a balança hidrostática

REPLICATAS		
NÚMERO	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)	GRAU ALCOÓLICO (v/v%)
1	0,006	0,045
2	0,006	0,035
3	0,006	0,030
4	0,006	0,035
5	0,006	0,050
6	0,006	0,035

Fonte: A autora (2023).

Ressaltando que pela Instrução Normativa Nº 6, de 3 de abril de 2012, do MAPA, o produto final, vinagre, precisa ter no máximo 1 v/v%. Logo, este método assegura que se houver concentrações próximas ou abaixo de 1 v/v% será detectado na análise, desde que a concentração esteja acima de 0,035 v/v%.

A partir da determinação do LQ, determinou-se o Limite de Detecção pela Equação (1), sendo de 0,002 g.L⁻¹. O resultado é adequado ao critério estabelecido, uma vez que ele é menor do que 0,03 g.L⁻¹.

4.2 Precisão

O ANALISTA 1, realizou a destilação e, posteriormente, foi mensurado o grau alcoólico em uma balança hidrostática, conforme exposto na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do grau alcoólico pela balança hidrostática

NÚMERO DA AMOSTRA	GRAU ALCOÓLICO (v/v%)
1	3,76
2	3,27
3	3,66
4	3,30
5	4,20
6	4,15
7	3,53
8	3,64
9	4,08
10	4,02
11	3,95
12	3,94
13	3,82
14	3,90
15	3,88

Fonte: A autora (2023).

Calculando a média, tem-se $\bar{Y} = 3,8067$. Substituindo o valor da média na Equação (3), tem-se o desvio padrão, $S_i = 0,2826$.

Após 24 h o ANALISTA 2, realizou a destilação e, posteriormente, foi mensurado o grau alcoólico em um densímetro digital, apresentando os resultados conforme mostra a Tabela 8:

Tabela 8 - Resultados do grau alcoólico pelo densímetro digital.

NÚMERO DA AMOSTRA	GRAU ALCOÓLICO (v/v%)
1	3,56
2	3,55
3	3,56
4	3,54
5	3,57
6	3,57
7	3,55
8	3,55
9	3,56
10	3,56
11	3,56
12	3,55
13	3,57
14	3,60
15	3,52

Fonte: A autora (2023).

De maneira similar ao calculado para a balança hidrostática, realizou-se os cálculos para o densímetro digital. Calculando a média, tem-se $\bar{Y} = 3,5580$. Substituindo o valor da média na Equação (3), tem-se o desvio padrão, $S_i = 0,0174$.

Ambos os valores do desvio padrão, atendem ao critério de aceitação, onde precisava ser um valor menor que 0,3. Apesar do resultado do densímetro digital ser menor que do a balança hidrostática, fazendo que tenha uma homogeneidade maior, o desvio padrão da balança hidrostática é bem aceito por se enquadrar na faixa de aceitação e resultar em valores com pouca variação.

4.3 Exatidão

A Tabela 9 apresenta as concentrações esperadas, as concentrações encontradas e os erros para cada nível de concentração analisada.

Tabela 9 - Resultados das concentrações e erros para a exatidão.

	CONCENTRAÇÃO (v/v%)		
	BAIXA	INTERMEDIÁRIA	ALTA
CONCENTRAÇÃO ESPERADA (v/v%)	4,75	11,88	23,76
CONCENTRAÇÃO ENCONTRADA (v/v%)	4,39	11,24	22,42
ERRO (v/v%)	0,36	0,64	1,34

Fonte: A autora (2023).

O valor do erro aumenta com o aumento da concentração, devido a quantidade de analito presente na amostra. Tem-se que o erro da análise é de 0,8 v/v%, se encaixando no critério de aceitação do parâmetro.

Por meio destas análises experimentais das figuras de mérito foi possível avaliar se o método é adequado à determinação pretendida (Skoog, 2019). Sendo verificado o seu desempenho nos quatro parâmetros aplicáveis, limite de quantificação e detecção, precisão e exatidão, visando-se garantir que este método seja utilizado de forma confiável e capaz de entregar resultados válidos (Inmetro, 2020).

5. CONCLUSÃO

A segurança na análise laboratorial é imprescindível, principalmente se tratando de análises em produtos alimentícios, onde é possível controlar os parâmetros de produção. Estes parâmetros asseguram a qualidade e garantem o atendimento a especificações e cumprimento da legislação. Por isso, é necessário que os procedimentos sejam oficializados e, em certos casos, validados. Como ocorreu no Método 03, do Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres, do MAPA, para análise do grau alcoólico real em destilados, que foi validado devido à mudança no escopo para fermentados.

Ao aplicar este método aos fermentados de maçã para a análise do grau alcoólico, o resultado se mostrou satisfatório, nos parâmetros analisados. Apresentando o limite de quantificação de $0,006 \text{ g./L}^{-1}$ e o limite de detecção de $0,002 \text{ g./L}^{-1}$, os quais comprovam que o método é eficiente em baixas concentrações. Apontou uma precisão de 0,2826, sendo uma baixa variação e atendendo o critério de aceitação. Apresentou uma exatidão de 0,8 V/V%, ou seja, entre o valor medido e o valor real, há uma variação de até 0,8 V/V%, sendo um valor aceitável para a faixa de trabalho de 5,8 V/V% a 12 V/V%, onde este método será aplicado, além de também está dentro da faixa de aceitação. Diante disso, a avaliação de desempenho foi realizada com êxito, e o método verificado pode ser aplicado com segurança para a finalidade do trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALBANO, Filipe de Medeiros. **Desenvolvimento de melhorias no processo de provisão de ensaios de proficiência por comparação interlaboratorial**. Porto Alegre, RS, 2016.
- AOAC International. AOAC Official methods of analysis. **Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis**. Washington: AOAC International, 2002.
- AOAC International. **Appendix F: Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- BRASIL. Casa Civil. **Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Brasília, DF, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 16, de 19 de março de 2020**. Brasília, DF, 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação de Vinhos e Bebidas**. Brasília, DF, 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Procedimento para Laboratório**. Brasília, DF, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa MAPA Nº 34, de 29 de novembro de 2012**. Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa MAPA Nº 6, de 3 de abril de 2012**. Brasília, DF, 2012.
- BRITO, Natilene Mesquita et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.
- CAMARGO, Ricardo dos Santos. **Aplicação do Analytical Quality Assurance Cycle no Desenvolvimento de Método para Análise de Compostos Voláteis e Semivoláteis pelo Acoplamento das Técnicas Refrigerated Sorptive Extraction e Gas Chromatography (RSE/GC)**. São Carlos, 2016.
- CARVALHO JÚNIOR, Rui Miguel de et al. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de elementos traço em amostras de solo e plantas de girassol utilizando espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**. Florianópolis: SC, 2016.
- Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. Brasília, DF: INMETRO, 2020.

- D.W. Preston e E.R. Dietz. **The Art of Experimental Physics**. Ed: John Wiley & Sons. Nova York, 1991.
- DA SILVA, Joel Rocha et al. Validação de metodologia da fluoxetina cloridrato. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, 2013.
- DAMIÃO, Gleise Catarina. **Implantação de procedimentos operacionais padrão em uma pequena empresa do ramo de transporte de mercadorias do agronegócio**. Horizontina: RS, 2013.
- DE SOUZA, Frederico Koch Fernandes et al. **Desenvolvimento de fermentadores em série para o estudo cinético de fermentado de maçã**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 5, n. 1s, 2011.
- FERREIRA, Bárbara Sofia Pinto. **Produção e Caracterização Das Propriedades Funcionais de Vinagre de Dióspiro (Diospyros Kaki)**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade do Minho (Portugal).
- GIRARDI, C. L.; ZANUS, M. C. **Sidra: alternativa para a diversificação e agregação de valor na cadeia produtiva da maçã no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011.
- Harris, D. C.; **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed., Editora S. A.: Rio de Janeiro, 1999.
- INMETRO. **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados**. Duque de Caxias, RJ : 2012.
- PEDROSO, Paula Regina Ferraz et al. **Produção de vinagre de maçã em biorreator airlift**. 2003.
- SANTOS, Juracir Silva. **Development and optimization of methodologies to the nitrogen determination**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. 102 f.
- SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, São Paulo-SP, 2013.
- SOUZA, Reginaldo; Canto, Judson. **Bíblia Sagrada**. 1ª Edição. São Paulo: Vida, 2017.
- STULZER, Hellen Karine; PIAZZON TAGLIARI, Monika; SEGATTO SILVA, Marcos Antonio. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação por espectroscopia UV de captopril em comprimidos de liberação prolongada**. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, v. 35, n. 2, p. 212-223, 2006.

TERRA, Juliana; ROSSI, Adriana Vitorino. **Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais**. Química Nova, v. 28, p. 166-171, 2005.

ULRICH, João Cristiano. **Validação de Metodologia Analítica**. Conselho Regional de Química - IV Região, 2016.