



Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu*

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Campus Rio de Janeiro

Juliana Salloum Farah

Adulteração em leite: potencial uso da análise térmica, em particular Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Orientador: Adriano Gomes da Cruz

Orientadora: Verônica Calado

Rio de Janeiro – RJ

2018

Juliana Salloum Farah

Adulteração em leite: potencial uso da análise térmica, em particular Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no programa
PCTA.

Orientadores:

Orientador: Adriano Gomes da Cruz

Orientadora: Verônica Calado

Rio de Janeiro – RJ

2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela proteção, saúde e força de todos os dias.

Aos meus pais Elizabeth e Cesar pela motivação, inspiração, palavras de estímulo e amor incondicional, que me permitiram concluir mais essa etapa da minha vida. Nenhuma conquista seria possível sem a ajuda e a participação vocês.

Ao orientador e professor Adriano Cruz, pelos ensinamentos e apoio durante a minha formação no mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, além de ser um exemplo de dedicação e excelência na área de alimentos.

A orientadora, professora Veronica Calado, por ceder o seu laboratório e o seu tempo para realização das análises e pelos seus valiosos ensinamentos.

A professora Marcia Cristina Silva, pelos ensinamentos durante o mestrado e por conduzir a coordenação do mestrado no IFRJ de forma inspiradora.

Ao futuro mestrando, Luiz Guilherme Zambrano, que me acompanhou nas análises, tenho certeza que sem a sua paciência e o seu otimismo, seria muito mais difícil, o seu futuro será brilhante.

A banca avaliadora, agradeço pela disponibilidade, colaboração e atenção.

Aos meus avós, meus tios e primos, pelo apoio e por compreenderem a minha ausência durante a minha formação.

As minhas amigas, Louise Prado, Renata Neves, Maristela Fujimoto, Raphaela Ferreira, Bruna Aguiar, Carina Soares, Lucile Pizzolatti, Marcia Martinello, Cinthia, Aclícia Mesquita e Ana Carolina Ascensão e as suas famílias, por fazerem parte da minha vida.

A minha turma do mestrado, principalmente a Débora Andrade e Fernanda Souza, que tornaram os dias de aula, dias mais felizes.

RESUMO

As fraudes no leite são derivadas da intenção das indústrias, produtores e comerciantes para aumentar a rentabilidade do produto. Buscam por adulterações que podem ocorrer em diversas etapas da produção e de formas variadas prejudicando assim os aspectos nutricionais e sensoriais do leite que chega ao consumidor, sendo necessária a avaliação por métodos analíticos que não geram resíduos químicos e que sejam rápidos para otimizar a rotina laboratorial.

Este estudo teve como objetivo analisar leite intencionalmente fraudados por meio da análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Amostras de leite foram adulteradas com amido, ureia, formaldeído e soro em diferentes níveis. Foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de DSC, em todos os adulterantes envolvidos. O uso do método de análise de componentes principais foi capaz de gerar classificar 100% das amostras nas etapas de construção e validação do modelo com valores iguais a 1,0 para sensibilidade e especificidade.

De forma geral, os resultados demonstram que a análise por DSC é um método que apresenta potencial para ser utilizado para verificar as análises em leite com os adulterantes pesquisados.

Palavras-chaves: Calorimetria Diferencial de Varredura, leite, adulteração.

ABSTRACT

Frauds in milk are derived from the intention of the industries to increase the profitability of the product, so they seek adulterations that can occur in various stages of production and in varied ways, thus damaging the nutritional and sensorial aspects of the milk that reaches the consumer.

This study had the objective of analyzing intentionally fraudulent milks through Differential Scanning Calorimetry (DSC). Samples of milk were adulterated with starch, urea, formaldehyde and serum at different levels. The key parameters in the DSC were observed in all the adulterants involved. Aromatic model of 100% of the construction samples and validation of the model with values equal to 1.0 for sensitivity and specificity.

Overall, the results of the DSC analysis is a method that can be used to verify the analyzes in milk with the investigated adulterants.

Keywords: Differential Scanning Calorimetry, milk, adulteration.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	LEITE	9
2.1.1	Características do leite	9
2.1.2	Composição química do leite.....	10
2.2	TIPOS DE LEITE	13
2.2.1	Leite Cru.....	13
2.3	FRAUDES.....	14
2.3.1	Definição	14
2.3.2	Importância Econômica	15
2.3.3	Fraudes em Leites.....	16
2.3.4	Tipos de Fraudes em Leites	18
2.3.5	Casos de Fraude no Mundo	20
2.4	ANÁLISE TÉRMICA	21
2.4.1	Análise por calorimetria diferencial de varredura	22
2.4.2	Curva típica do DSC	25
2.5	QUIMIOMETRIA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.1.1	Amostragem	29
4.1.2	Adulteração	29
4.1.3	Calorimetria Exploratória Diferencial	29
4.1.4	Análise Quimiométrica.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	AMIDO	31
5.2	FORMOL	35
5.3	SORO DE LEITE	38
5.4	UREIA.....	41
6	SIMCA.....	44
7	CONCLUSÃO	45

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
---	----------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos de origem animal está em expansão no Brasil devido ao seu grande volume de consumo. O leite de vaca recebe destaque, uma vez que o país é um dos maiores produtores mundiais e seus derivados são consumidos em grande escala.

O leite pode ser obtido por meio de grandes produtores que dominam grande parte do mercado, mas também por pequenos produtores, de economia familiar. O leite e seus derivados são consumidos pela maioria das faixas etárias e classes sociais, uma vez que é um alimento nutritivo e rico em cálcio e vitaminas.

Algumas indústrias e produtores, com o intuito de aumentar a rentabilidade do produto, realizam fraudes que podem ocorrer em diversas etapas da produção e de formas variadas, prejudicando assim os aspectos nutricionais e sensoriais do leite que chega ao consumidor, por vezes gerando um problema de saúde pública.

A fim de inibir a atuação dos produtores, transportadores e distribuidores na execução de fraudes no leite, foram verificadas diversas operações federais que tem o objetivo de identificar a fraude e impedir que o produto adulterado chegue ao consumidor.

A legislação brasileira estabelece, de acordo com publicações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os padrões de identidade e qualidade, tipos de contaminantes e fraudes para leites com o intuito de padronizar o produto para o mercado interno e externo e evitar a ocorrência de fraudes.

Um dos métodos para identificação de fraude em leite é por meio da calorimetria diferencial de varredura, que é uma técnica popular para estudos de análise térmica, onde é avaliada a diferença entre o calor necessário para aumentar a temperatura da amostra padrão em relação a referência, assim é muito utilizado principalmente devido à sua velocidade e simplicidade.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo analisar leites intencionalmente fraudados por meio da análise de Calorimetria Diferencial de Varredura, a fim de identificar as características dos perfis gráficos obtidos e verificar se ocorre diferença significativa entre os parâmetros por meio de análise estatística.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE

2.1.1 Características do leite

O Brasil é o quarto maior país produtor de leite de vaca do mundo (SOFI Brasil, FAO, 2014).

O consumo de leite é importante durante as fases da vida, uma vez que durante a infância porque fornece proteínas, minerais e gordura para apoiar o desenvolvimento do corpo durante a adolescência e promove condições propícias a um desenvolvimento rápido e consistente de músculos, ossos e do sistema endócrino. No caso de grávidas e lactantes, o consumo desse alimento é importante porque é convertido em subprodutos que auxiliam o desenvolvimento da criança. E no caso de idosos representa uma fonte de cálcio essencial mantendo a integridade dos ossos no combate a osteoporose (YILDIZ e UNLUTURK, 2009; SOARES et al, 2010).

Encontra-se uma grande variedade de alimentos derivados do leite como, por exemplo: queijos, doces de leite, iogurtes, leite fermentado, bebida láctea, requeijão, creme de leite.

De acordo com a instrução normativa nº 62/2011 do Ministério do Abastecimento Pecuária e Agricultura (MAPA) que estabelece a seguinte definição para leite:

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda.

O leite obtido de modo natural é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, com suave odor e levemente doce (BEHMER, 1999), é secretado pela glândula mamária de mamíferos com a finalidade de nutrir seus filhotes, uma vez que é rico em nutrientes como proteínas, lipídios, açúcares, vitaminas e minerais, que são necessários para o crescimento e desenvolvimento. Por ser uma excelente fonte de energia e nutrientes, leite e produtos lácteos derivados de outros mamíferos, especialmente vacas, búfalas, cabras e ovelhas, são utilizados na nutrição humana (COSTA *et al*, 2009).

Historicamente, o leite é considerado um importante alimento, não só pelo ponto de vista nutricional, mas também pela sua relevância econômica e social considerando que emprega pessoas e é uma importante fonte de renda no cenário global. Por esta razão, o controle de qualidade do leite e seus derivados é extremamente importante e envolve, além da determinação dos seus principais componentes, o estabelecimento e controle de vários indicadores físico-químicos. Frequentemente tais análises consomem tempo e dinheiro, então é preciso processos de garantia da qualidade e segurança durante a manipulação do alimento (NASCIMENTO *et al*, 2013).

O leite é considerado um dos mais completos alimentos *in natura* porque é adquirido a um baixo custo e, dessa forma, está acessível a grande parte da população e é considerado um alimento essencial porque o seu consumo está associado a benefícios para a saúde do consumidor (SANTIAGO, 2011).

A qualidade do leite tem sido determinada de acordo com a composição do alimento e a condição de higiene na sua obtenção, esses aspectos podem ser ampliados, conforme a seguir: qualidade composicional, qualidade nutricional, qualidade higiênica (inocuidade), qualidade tecnológica e qualidade sensorial. Posteriormente, foram observados outros fatores relacionados a qualidade do leite como, por exemplo, o bem-estar do animal, a rastreabilidade dos produtos, rendimento industrial, entre outros (PINTO *et al*, 2013).

Outro fator relacionado à qualidade do leite reside no fato de que o mesmo é considerado alimento funcional, assim além de satisfazer à saciedade do consumidor, esse alimento contribui com a saúde das pessoas, uma vez que possui propriedades nutracêuticas que auxiliam a prevenir doenças como osteoporose, já que é considerado como uma importante fonte de cálcio; fornece quantidades suficientes de gordura sendo uma das principais fontes de ácidos graxos essenciais, como ácido linoleico conjugado (CLA) que possui propriedades anticarcinogênicas, auxilia a inibir a síntese de gorduras saturadas no organismo, auxilia a redução do colesterol e atua como fator contra a obesidade e diabetes, além disso as gorduras do leite auxiliam na absorção de vitaminas lipossolúveis A, D, E e K pelo intestino (SANTIAGO, 2011).

A globalização econômica impõe desafios ao setor agropecuário, uma vez que a entrada de produtos importados estimula empresas nacionais a aumentarem a competitividade, reduzindo o custo de produção, mas elevando o nível de qualidade que é determinante para consumidores exigentes. A qualidade influencia toda a cadeia produtiva do leite, desde a criação de bezerras (como por exemplo, sanidade do animal, bem-estar, alimentação) até a forma de comercialização do produto final (SANTIAGO, 2011).

2.1.2 Composição química do leite

A composição do leite é complexa e pode apresentar variação influenciada por fatores como a raça, alimentação, idade e número de parições, tempo de lactação e variações climáticas. Há limites para essa variação, tanto para detectar problemas na produção, como para acusar adulterações no produto (ABRANTES *et al*, 2014).

O Leite é um alimento composto pela combinação de uma variedade de substâncias sólidas, e algumas se encontram dissolvidas e outras em suspensão na água, e participam com 12% a 13% do volume do leite (MATOSO *et al*, 2016).

O alimento é composto por uma emulsão de glóbulos graxos, é estabilizado por albuminoides em um soro que contém: lactose (açúcar), proteínas, sais minerais e orgânicos

e em menor quantidade contém lecitina, ureia, aminoácidos, ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, álcool, vitaminas, enzimas entre outros componentes (BEHMER, 1999).

2.1.1.1 Água

Em volume, a água constitui em média 87,5% da massa do leite, sendo o seu principal componente e interfere na densidade do leite. Como causa da variação da porcentagem, podemos indicar que o tempo de lactação tem grande interferência, uma vez que, no fim da lactação o leite é mais concentrado do que no início (BEHMER, 1999).

2.1.1.2 Proteínas

De acordo com a instrução normativa nº 62/2011 do Ministério do Abastecimento Pecuária e Agricultura (MAPA) que estabelece os padrões de identidade e qualidade do leite cru refrigerado no item que trata dos requisitos físicos e químicos fica estabelecido como limite o mínimo de 2,9g de proteínas por 100g de leite, constituindo então, no mínimo, 2,9% da massa do leite (MAPA, 2011).

A proteína do leite bovino possui, em média, 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, esse percentual que pode variar em função da raça do animal, da ração fornecida e do país de origem (HARAGUCHI *et al*, 2006).

A caseína é quantitativamente a principal proteína do leite e as suas micelas são compostas por α , β , κ e γ caseínas. As micelas de caseína possuem grande importância industrial porque a sua estrutura é essencial para o processamento do leite em produtos que sofrem gelificação como queijo e iogurte e a sua estabilidade durante o aquecimento permite diferentes aplicações (GLANTZ *et al*, 2010).

A caseína obtida pela precipitação natural (fermentação) ou com o auxílio de coalhos e ácidos é o principal componente dos queijos e das coalhadas (BEHMER, 1999).

A separação das caseínas pode ocorrer por precipitação no pH 4,6, que corresponde ao ponto isoelétrico. No leite, as caseínas se unem e formam micelas, que ficam dispersas na fase aquosa e são estruturas porosas, que permitem a entrada e saída de água, no entanto, é uma molécula estável que não se deposita em solução. As micelas são constituídas por várias moléculas de caseína com fosfato de cálcio e pouca quantidade de sais de magnésio e citrato. A k-caseína fica disposta na parte externa e ajuda na estabilização da micela (PINTO *et al*, 2013).

As proteínas do soro compreendem β -lactoglobulina e α -lactoalbumina que são solúveis em meio aquoso e tem pH próximo de 4,6. Essas moléculas apresentam maior número de aminoácidos sulfurados, que se ligam em pontes dissulfeto internas, o que permite a formação de estruturas globulares de cadeia polipeptídica. A β -lactoglobulina pode transportar moléculas hidrofóbicas como, por exemplo, o retinol (vitamina A). A α -

lactoalbumina é uma metaloproteína que contém um átomo de cálcio por molécula e regula a síntese da lactose na glândula mamária (PINTO *et al*, 2013).

Durante o processo de fabricação do queijo, as proteínas do soro do leite, são extraídas e possuem alto valor nutricional, contendo alto teor de aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada além de apresentar alto teor de cálcio e de peptídeos bioativos do soro. (HARAGUCHI *et al*, 2006).

2.1.1.3 Lipídeos

A matéria gorda é o componente mais variável no leite, e varia de 1% a 7%, sendo o elemento de maior valor no leite, é formada por glóbulos de diversos tamanhos, que se encontram em suspensão no líquido, dando-lhe aspecto emulsivo e opaco. (BEHMER, 1999).

Os glóbulos contêm lipídios não polares ou centrais como triglicerídeos, ésteres de colesterol, e ésteres de retinol e são revestidas com materiais bipolares como fosfolipídios, proteínas, colesterol, enzimas. A membrana do glóbulo de lipídeo impede os glóbulos de coalescência e atua como um estabilizador de emulsão (JENSEN, 2002).

Durante o processamento do leite ocorre a clarificação, que pelo uso de centrifugas, tem como objetivo a separação dos sólidos não lácteos da gordura do leite, a pasteurização, aparentemente, tem pouco efeito sobre o teor de lipídeos e sua composição. No entanto, a homogeneização é um processo que reduz o diâmetro dos glóbulos lipídicos de 10 µm para cerca de 0,3-0,8 µm (JENSEN, 2002).

2.1.1.4 Lactose

A lactose, açúcar principal presente no leite, é encontrada no leite de todos os tipos de mamíferos e constitui em média 4,6% da massa do leite. A transformação da lactose em ácido láctico causa a precipitação da caseína e assim o leite é coagulado (BEHMER, 1999).

A lactose é um dissacarídeo encontrado em leite de mamíferos, composto de duas moléculas de açúcar menores, a glucose e galactose (RIENZO *et al*, 2013).

Quando o leite é obtido por meio de práticas de higiene inadequadas, o alimento pode apresentar contaminação inicial alta, que é responsável pela sua acidez. Esse aumento ocorre devido a fermentação da lactose com produção de ácido láctico e tem como resultado um leite ácido, que não é recomendado para a fabricação de qualquer tipo de queijo porque interfere na sua coagulação e pode causar desmineralização da coalhada. Normalmente tem como destino a fabricação de outros derivados do leite como, por exemplo, requeijão, manteiga e pode ser desnatado para a obtenção de creme de leite (MONTEIRO *et al*, 2012).

2.1.1.5 Sais Minerais

Os sais minerais são encontrados em pouca quantidade na composição do leite, variando em torno de 0,7% (BEHMER, 1999).

Os principais sais minerais do leite são os citratos, fosfatos, cloretos, carbonatos, sulfatos, cálcio, potássio e magnésio, porque são importantes para o desenvolvimento dos ossos e dos tecidos do recém nascido. Do cálcio total do leite, 1/3 pode ser encontrado em solução e 2/3 em associação a misturas de caseína, que tornam estáveis e estruturadas as misturas de caseína (PINTO *et al*, 2013).

O cálcio é um dos principais minerais presentes no leite e durante a fase de crescimento seu consumo é necessário, uma vez que faz parte da formação dos ossos. A absorção média de cálcio varia de 21% a 27% sendo ainda maior nas gestantes, variando de 36% a 47%. Existem estudos que relacionam a ocorrência de osteoporose, com o consumo menor que o necessário de cálcio ao longo da vida, dessa forma verificamos que em todas as faixas etárias há a necessidade do consumo do cálcio (TRONCO, 2008).

Dessa forma, verificamos a seguinte composição química do leite cru:

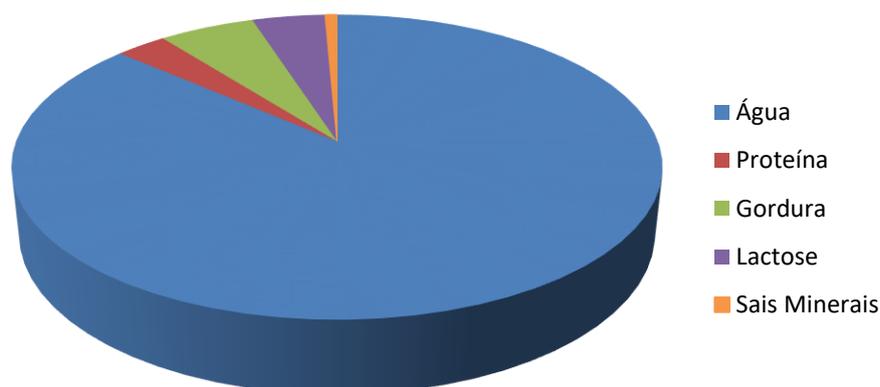


Figura 1: Composição química do leite cru

2.2 TIPOS DE LEITE

2.2.1 Leite Cru

No processamento para a obtenção do leite, a ordenha é uma etapa que deve ser controlada, uma vez que, tem grande vulnerabilidade, considerando que pode ocorrer diversas formas de contaminação como, por exemplo, físicas, químicas e biológicas. Dessa forma, questões relacionadas a qualidade do leite cru estão recebendo atenção mundial por parte dos pesquisadores e dos órgãos responsáveis pela fiscalização, uma vez que essa etapa interfere nos aspectos nutricionais, econômicos e aspectos relacionados a saúde (PINTO *et al*, 2013).

O leite obtido sem os devidos preceitos de higiene se torna um alimento de qualidade inferior, mesmo que posteriormente sejam aplicados cuidados e tratamentos adicionais. O centro de distribuição tem como objetivo prolongar a conservação e a qualidade do produto, mas nunca de regenerar o alimento de baixa qualidade (BEHMER, 1999).

A Instrução Normativa nº 62/2011 estabelece as características físico-químicas que devem ser avaliadas no leite cru destinado ao processamento, e os métodos de referência para a análise e estabelece também que tais métodos poderão ser substituídos por outros métodos de controle operacional, desde que sejam conhecidos os desvios e as correlações em relação aos respectivos métodos de referência (ROBIM *et al*, 2012).

A baixa qualidade do leite cru está relacionada a fatores como deficiência no manejo, higiene durante o ordenhamento, ocorrência de mastite nas vacas, desinfecção inadequada dos equipamentos, refrigeração, mão de obra sem adequado treinamento, entre outros (PINTO *et al*, 2013).

2.3 FRAUDES

2.3.1 Definição

Atualmente, autenticidade dos alimentos é uma preocupação para os investigadores, consumidores e produtores envolvidos no processo de produção. Uma matéria-prima livre de fraudes tem como objetivo cumprir a rotulagem, principalmente em relação aos ingredientes, produção, e de identidade genética (FUENTE e JUÁREZ, 2005).

Dessa forma, a autenticidade é um atributo de qualidade dos alimentos. Muitos produtos alimentares são adulterados com o objetivo de aumentar o lucro da indústria (TOMASZEWSKA-GRAS, 2016).

É importante para a indústria de alimentos e bebidas o desenvolvimento de métodos que identifiquem mudanças nas medições dos processos que podem levar a alterações em ingredientes ou no produto final. Além disso, as agências regulatórias estão interessadas em detectar fraudes econômicas devido a substituição de ingredientes ou adulteração que podem causar riscos à saúde como, por exemplo, contaminações. Dessa forma, é necessária a verificação de métodos, de preferência automatizados para medir a qualidade de um produto (ARVANITTOYANNIS e TZOUROS, 2005).

Visto que a qualidade dos alimentos se tornou uma questão de importância mundial, é cada vez mais importante detectar produtos rotulados de forma fraudulenta e de baixa qualidade, por razões relacionadas à saúde pública e econômicas. Dessa forma, é necessária a utilização de métodos para a detecção de possíveis substâncias indesejadas nos alimentos (EGITO *et al*, 2006).

Assim, devido a necessidade de fornecimento a população de um leite de qualidade e devido a crescente produção, no Brasil, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) trabalha com o intuito de fiscalizar as unidades de beneficiamento do leite e com o objetivo de atualizar as legislações vigentes (HOCHMÜLLER et al, 2017).

De acordo com Bansal et al, 2015, a adulteração de alimentos envolve a adição de substâncias prejudiciais e desnecessária aos alimentos diminuindo sua qualidade e classificando nas categorias de fraude intencional e fraude não intencional, conforme a seguir:

A fraude intencional é a inclusão de substâncias inferiores com propriedades semelhantes aos alimentos, são difíceis de detectar. O adulterante pode ser de natureza física, química ou biológica.

A fraude não intencional ocorre quando há adição de substâncias indesejáveis devido a falta de conhecimento dos manipuladores de alimentos ou por falta de instalações adequadas ou higiene durante o processamento de alimentos. São exemplos desse tipo de fraude a contaminação de alimentos por bactérias ou fungos, deterioração de alimentos por roedores, entrada de poeira ou resíduos nocivos.

2.3.2 Importância Econômica

Como o leite é muito consumido e é utilizado como base para a produção de derivados lácteos, esse alimento move economicamente uma cadeia produtiva complexa e importante. Dessa forma, fica suscetível a uma série de fraudes que prejudicam a cadeia do leite, uma vez que impacta no rendimento financeiro e industrial, além de poder prejudicar a saúde do consumidor (HOCHMÜLLER et al, 2017).

O consumo de produtos lácteos é diferente dependendo da região e do país. Enquanto os produtos lácteos que passam por processamento (exemplo iogurte, manteiga e queijo) tem o seu consumo crescente, o leite líquido ainda é em grande parte o produto mais consumido em relação ao volume (HANDFORD et al, 2016).

A Índia é o maior segmento de consumo de leite fluido. Como alimento humano, foi considerado imensamente superior a outras gorduras pois é rico em lipídios bioativos, como ácido linoleico e ácido butírico, que ajudam na redução do risco de câncer, obesidade e doenças cardiovasculares além de fornecer um sabor rico e agradável a diversos produtos. Como é o mais importante e caro produto lácteo, sua adulteração é lucrativa e amplamente praticada (UPADHYAY et al, 2016)

Diversos fatores estimulam o aumento do consumo de leite, incluindo o crescimento econômico, a urbanização, o crescimento populacional nacional, o aumento do interesse público em dietas ricas em proteínas por meio de apoio do consumo em escolas, o aumento da conscientização e da disponibilidade de produtos lácteos através do setor

varejista, a crescente demanda por variedades de queijos entre outros derivados do leite. (HANDFORD et al, 2016).

Em relação ao consumo futuro, em termos globais, espera-se que o consumo seja crescente especialmente em países em desenvolvimento como a Ásia Oriental, Sul da Ásia e África Subsaariana. No entanto, espera-se que na China e na Índia aumentem a sua produção de forma que o setor de leite e de produtos lácteos seja ultrapassado, em termos de produção agrícola, apenas pela carne de aves e óleos vegetais, assim é projetado que a produção de leite se expandirá a uma taxa anual de 2% até 2021 (FAO, 2013).

2.3.3 Fraudes em Leites

Em geral, questões de autenticidade em produtos lácteos, caem em uma ou mais das seguintes categorias:

1. Não cumprimento dos requisitos legais: rotulagem do produto, teor máximo / mínimo de gordura e água em determinados produtos lácteos; origem geográfica.

2. Adição de ingredientes proibidos, não necessariamente de origem láctea: adição de água ao leite; mistura de leite de diferentes espécies; adição de proteínas não lácteas (soja); adição ilegal de conservantes / adição de substâncias; Concentrações superiores às prescritas; adição de gorduras vegetais ou animais à gordura do leite; alteração da proporção estabelecida de caseína / proteína de soro de leite.

3. Incumprimento da utilização de processos tecnológicos: amadurecimento do queijo, tratamento térmico (ARVANITOYANNIS e TZOUROS, 2005).

Laticínios são produtos de grande interesse, uma vez que são um grupo de alimentos que desempenham um papel importante na alimentação da população e são essenciais para determinados grupos de consumidores (mulheres, crianças e idosos) (FUENTE e JUÁREZ, 2005).

A qualidade do leite é uma preocupação para as autoridades ligadas às áreas de saúde porque, observada a importância do leite na alimentação da população, é preciso identificar as adulterações desse alimento a fim de garantir a sua autenticidade (MATOSO, 2016).

Em produtos industriais a verificação da falsificação é mais simples quando comparada aos produtos naturais, uma vez que os avaliadores de fraudes de produtos naturais devem considerar a inconstância da composição, variações que dependem da raça, alimentação e clima no qual o animal estava inserido (BEHMER, 1999).

O leite é uma matéria prima relativamente cara e do ponto de vista econômico é atraente modificar sua composição e substituir parte dela com outros produtos lácteos ou ingredientes não lácteos (FUENTE e JUÁREZ, 2005).

O leite utilizado para consumo humano pode sofrer adulterações por materiais mais baratos ou por produtos químicos perigosos, como por exemplo, água, leite em pó reconstituído, ureia, glicose e detergentes. O leite pode ser adulterado de tal forma que tenha perda significativa em relação ao seu valor nutricional e também pode até ser tóxico configurando um problema de saúde pública (HANDFORD et al, 2016).

Por sofrer numerosas etapas de processamento, o leite se torna mais vulnerável para a adulteração e contaminação antes de chegar aos consumidores. Pelo alto teor de proteínas no conteúdo do leite, o produto torna-se essencial para determinados grupos de consumidores como, por exemplo, mulheres, crianças e idosos, desempenhando assim um papel importante na alimentação da população (JHA et al, 2016).

Os produtos lácteos estão sofrendo adulterações de diversas formas: adição de água, soro de queijo, retirada de componentes, mistura de tipos leite de diferentes espécies, adição de espessantes entre outros. O mercado oferece uma diversidade de produtos que tem como objetivo atender aos interesses de cada consumidor específico, com preços variados. Os consumidores buscam qualidade, produtos saudáveis e prezam pela confiança de que estão levando o alimento que é especificado no rótulo. Nas embalagens, os ingredientes utilizados para a fabricação devem ser descritos, pois a adição não mencionada de ingredientes fere o direito do consumidor e a legislação vigente (DIAS et al, 2009).

O leite é um dos sete principais alimentos que são adulterados, e este fato tem sido amplamente registrado (AQUINO et al, 2014).

Tipicamente, o leite é adulterado devido a ganhos financeiros ou devido às más condições de higiene no processamento, armazenamento, transporte e/ou comercialização. Uma das mais antigas e simples fraudes leiteiras é através da adição de volumes variáveis de água para aumentar artificialmente seu volume para gerar maior lucro; isso pode diminuir substancialmente o valor nutricional do leite, e se a água estiver contaminada, existe um risco para a saúde humana devido à potenciais doenças transmitidas pela água. Para aumentar a espessura e a viscosidade do leite e manter a composição de gordura, carboidrato ou proteína são adicionados, por exemplo: ureia, sal, amido, óleo vegetal entre outros. Para aumentar a vida útil do leite, são adicionados bicarbonato de sódio e soda cáustica (HANDFORD et al, 2016).

As adulterações iniciais do leite tinham como objetivo o aumento do volume, por meio da adição de água, e desnate para produção de creme de leite. Posteriormente, surgiram novas formas de adulteração com outras finalidades, como adição de soro de queijo, de substâncias conservantes (peróxido de hidrogênio), neutralizantes (hidróxido de

sódio, bicarbonato de sódio) e reconstituintes da densidade e crioscopia (sal, açúcar, amido) (ABRANTES et al, 2014).

Assim, considera-se leite fraudado, adulterado ou falsificado quando este for adicionado de água, tiver sofrido subtração de qualquer dos seus componentes ou for adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição (BRASIL, 1997).

2.3.4 Tipos de Fraudes em Leites

2.3.4.1 Água

Um dos problemas mais comuns que afetam a qualidade do leite é a adição de água no produto. Normalmente, a adição de água tem o objetivo de aumentar o volume, a fim de obter lucros ilícitos. A metodologia estabelecida para detectar esse tipo de adulteração, suportado como um método de referência pela International Dairy Federation and International Organization for Standardization, é o congelamento do leite para a determinação do ponto ou crioscopia. No entanto, o crioscópio, o dispositivo que faz o teste crioscopia, é pouco portátil, muito caro e precisa de constante calibração. Além disso, não é fraude-prova, sendo limitado para detecção de fraude por adição somente de água, se ocorrer, co-adulteração envolvendo água e alguns produtos químicos tais como o cloreto de sódio a fraude pode não ser detectada (NASCIMENTO et al, 2013).

A presença de água pode ser percebida pela interpretação dos valores obtidos na crioscopia e densidade. A densidade fica reduzida e a crioscopia mais alta, de modo que o valor se aproxima do ponto de congelamento da água (ABRANTES et al, 2014).

2.3.4.2 Soro de Leite

A legislação brasileira, e também a de todos os países desenvolvidos, proíbe a adição de soro de queijo ao leite de consumo. Caso a adição seja feita, o produto final deverá chamar-se “bebida láctea” e não poderia ser considerado leite porque reduz o valor nutritivo do alimento diluindo os teores de proteínas e gorduras. Caracteriza, ainda, prática abusiva que lesa os direitos do consumidor e que pode, em casos de consumo prolongado, gerar desnutrição, principalmente em lactentes (ABRANTES et al, 2014).

Durante a fabricação de queijos, o soro de leite é a porção aquosa liberada do coágulo, é considerado um efluente residual que pode acarretar graves problemas ambientais associados ao seu alto teor de matéria orgânica. Cerca de 90 a 95% do volume do leite usado para a fabricação de queijos resultam em soro, o qual contém, aproximadamente metade dos sólidos totais do leite, incluindo proteínas solúveis, sais e principalmente lactose (OLIVEIRA et al, 2012).

A adição fraudulenta de soro ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do caseinomacropéptido (CMP), um fragmento hidrofílico da k-caseína,

liberado pela ação da quimosina durante a coagulação enzimática do leite que permanece solúvel no soro, e que deve estar ausente no leite. Atualmente existem vários métodos para a detecção desta fraude, sendo que no Brasil as atenções têm-se voltado para a fraude por adição de soro ao leite in natura, devido a sua maior participação no mercado nacional (VALENTE et al, 2014).

2.3.4.3 Ureia

A adulteração de leite por ureia é comum para aumentar a sua vida útil. Embora a adição de ureia torne a cor do leite atrativa, a sua adição é danosa ao consumidor causando graves problemas de saúde, tais como indigestão, acidez, úlceras e pode levar à insuficiência renal (JHA et al, 2016).

O nível de ureia no leite deve ser periodicamente monitorizado, porque pode ser usado para prever o estado de saúde do animal, como um indicador da eficiência de proteína na alimentação. No entanto, para melhorar a proteína contida no leite, alguns produtores, com fins lucrativos, adicionam ureia ao leite, o que pode representar uma ameaça à saúde direta para os seres humanos. Os métodos analíticos normalmente utilizados para verificar ureia são cromatografia líquida de alta eficiência, conductometria, potenciometria, espectrometria, entre outros. Muitos destes métodos baseiam-se na reação enzimática em que a enzima catalisa a conversão da ureia em bicarbonato e amônia (NIE et al, 2016).

A ureia é usada para aumentar o volume e, como a densidade é muito próxima à do leite, causa pouca alteração (ABRANTES et al, 2014).

2.3.4.4 Formol

No caso da adição de conservantes, normalmente são utilizadas substâncias químicas ou outros agentes, os quais exercem ação sobre o desenvolvimento de microrganismos, por retardar a multiplicação. Os conservantes mais utilizados são ácido bórico e seus sais, ácido salicílico e seus sais, água oxigenada, bicromato de potássio, formol, cloro e hipocloritos (WANDERLEY et al, 2013)

Quando há fraude por adição de formol ou peróxido de hidrogênio no leite, o objetivo é de fraudar paralisando a atividade microbiana. Leites com alta carga microbiana apresentam pH alterado e, assim, acidez Dornic elevada, diagnosticado através dos testes de plataforma efetuados durante a recepção, o que causa recusa do leite pelo laticínio (ABRANTES et al, 2014).

2.3.4.5 Peróxido de Hidrogênio

A quantificação de peróxido de hidrogênio é de imenso valor para o monitoramento da qualidade do alimento. O leite é facilmente suscetível a deterioração e a fim de evitar a sua deterioração ou estender a sua longevidade, as indústrias fraudam o alimento

adicionando o peróxido de hidrogénio (H₂O₂). No entanto, o consumo de H₂O₂ pode levar ao aparecimento de efeitos nocivos, como o aumento do estresse oxidativo e efeito prejudicial as enzimas que digerem carboidratos encontrados no intestino delgado (THANDAVAN et al, 2015).

Além disso, a adição de H₂O₂ pode trazer efeitos sobre o valor nutricional do leite, tais como a degradação de ácido fólico, que é uma vitamina essencial para o corpo humano. Assim, a adição de H₂O₂ no leite em qualquer concentração não é permitido no Brasil em tal maneira que o produto contendo H₂O₂ é considerado adulterado (SILVA et al, 2012).

2.3.4.6 Amido

Um dos tipos de fraudes mais comum é a adição de sacarose e amido ao leite, devido a facilidade para a execução. No caso da venda do leite por volume, o produtor adiciona água com o objetivo de aumentar a quantidade de leite vendido, no entanto, causa a alteração na densidade do leite, que é verificada na maioria dos laticínios com o objetivo de evitar a fraude por aguagem. Assim, após a fraude por aguagem o produtor adiciona sacarose e/ou amido para que a adição de sólidos aumente a densidade do leite aguado e dificulte a detecção da fraude (ROSA-CAMPOS et al, 2011).

Assim, o amido e a sacarose são substâncias reconstituintes de densidade e são adicionadas para restabelecer a aparência e características físico químicas do leite fraudado com água ou soro. Os fraudadores também estão adicionando maltodextrina, com o objetivo de recompor valores analíticos “normais” de índices de qualidade química ou física do leite normal (WANDERLEY et al, 2013).

Como reconstituintes de densidade, as substâncias utilizadas com maior frequência são: amido, cloreto de sódio, urina, soro de leite e sacarose (TRONCO, 2008).

2.3.5 Casos de Fraude no Mundo

No ano de 2007, a Polícia Federal encontrou duas cooperativas de laticínios no estado de Minas Gerais que foram acusadas de adicionar soro de leite, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio ao leite longa vida integral, a operação ficou conhecida como “Ouro Branco”. Em 2013, o Ministério Público iniciou a “Operação Leite Compensado” com o intuito de coibir a fraude em leite cru que era realizada por transportadores do interior do Rio Grande do Sul com adição de água e ureia. E em 2014, já foi deflagrada a chamada “Operação Leite Adulterado” I e II, no estado de Santa Catarina, e o III envolvendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com o objetivo de investigar e punir os envolvidos em adulteração de leite (ABRANTES et al, 2014).

Em 2008, foram verificados casos de crianças doentes na China devido ao leite contaminado que incluiu seis mortes, os pacientes exibiam problemas urinários, obstruções renais e pedras nos rins, devido à adulteração com melamina. A melamina é amplamente

utilizado em plásticos, adesivos, louça e quadros, mas a sua utilização em alimentos não é aprovada pela FAO. Ainda devido ao seu alto conteúdo de nitrogênio, que está sendo adicionado ao leite ilegalmente para fazê-lo aparecer no alto teor de proteína como padrão. Os ensaios de determinação de proteínas (por exemplo, pelo método de Kjeldahl) não pode diferenciar entre nitrogênio proteico e nitrogênio não proteico. (JHA et al, 2016).

Em 2012, na China foi verificada a venda de leite contaminado com melamina e ácido cianúrico. O ácido cianúrico é usado para limpar piscinas e foi adicionado ilegalmente ao leite para aumentar artificialmente o teor de nitrogênio, burlando a dosagem de proteínas. (JHA et al, 2016).

Na Turquia é comum a utilização ilegal de antibióticos em leite UHT nas seguintes situações: para fins terapêuticos de vacas lactantes ou para modificar funções fisiológicas. Todos os antibióticos aplicados estão presentes em algum grau no leite e, por consequência, nos seus derivados e o consumo de alimentos contaminados por antibióticos pode causar resistência antimicrobiana e efeitos colaterais nos consumidores (YILDZ e UNLUTURK, 2009).

Na Índia, o inquérito nacional mais recente sobre a adulteração de leite de 2011 realizado pela Autoridade de Segurança Alimentar e Padrões da Índia (FSSAI 2012) revelou que a água é o adulterante mais comum usado no leite, o que resultou em amostras com valores nutricionais muito baixos e a segunda maior não-conformidade foi a presença de glicose no leite em pó desnatado. Adicionalmente, foi verificado a presença de substâncias perigosas para a saúde como, por exemplo, detergentes que possivelmente estavam presentes no leite devido à processos de higiene mal realizados e saneamento no manuseio e acondicionamento do alimento (HANDFORD et al, 2016).

2.4 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica é utilizada há muitos anos para caracterizar polímeros sintéticos. No entanto, existe um interesse crescente para o uso de análise térmica em alimentos, como por exemplo, para detecção de perda de água, desnaturação das proteínas, cristalização de amido, concepção de novos processos como secagem por pulverização e extrusão. A análise também auxilia a determinação e melhoria da qualidade dos alimentos, segurança e estabilidade (YILDZ e UNLUTURK, 2009).

Adicionalmente, as técnicas termoanalíticas estão sendo tradicionalmente utilizadas para a determinação de propriedades termofísicas de alimentos e bebidas (calor específico, entalpia, condutividade térmica, difusividade, temperatura de transição de fase, entre outros) que é relevante uma vez que se deseja efetuar cálculos de transferência de calor para

estimar o tempo de armazenamento, secagem, refrigeração ou aquecimento durante o processamento, assim as técnicas termoanalíticas são tradicionalmente (PARNIAKOV, 2016).

Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas encontram-se a Análise Térmica Diferencial (DTA - do inglês "Differential Thermal Analysis"), na qual se acompanha a variação de temperatura da amostra em relação a um material inerte de referência, e a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC - do inglês "Differential Scanning Calorimetry"), na qual se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência. O DSC permite determinações quantitativas, estando a área dos picos relacionada com a energia envolvida no processo (BERNAL et al, 2002).

2.4.1 Análise por calorimetria diferencial de varredura

A análise por calorimetria diferencial de varredura é uma técnica popular para estudos de análise térmica. Nessa técnica a diferença entre o calor necessário para aumentar a temperatura da amostra padrão em relação a referência é determinada em função da temperatura. (YILDIZ e UNLUTURK, 2009).

Geralmente, a determinação das temperaturas para uma análise de DSC é concebida de tal modo que a temperatura do suporte de amostra aumenta linearmente em função do tempo. Apenas alguns mg da amostra são necessários para executar a análise (KODRE et al, 2014).

Assim, o DSC é um método de análise térmica muito utilizado, principalmente devido à sua velocidade, simplicidade e disponibilidade, é usado principalmente para análise quantitativa. Além disso, é um equipamento muito atraente porque não envolve o uso de materiais de referência quando se tem o objetivo de determinar a pureza de um composto ou alimento e apresenta vantagens como curto tempo de análise e não é necessário tratamento específico para a amostra (MOREIRA et al, 2010; KODRE et al, 2014).

A calorimetria diferencial de varredura é considerada uma técnica relativamente simples, conveniente, rápida, de baixo custo e não necessita de muita mão de obra, facilitando análises de vários componentes de alimentos, incluindo proteínas, carboidratos e gorduras, além de estudos sobre fusão e cristalização de gordura. A utilização desta técnica envolve a medição das quantidades de calor liberado ou absorvido (TOMASZEWSKA-GRAS, 2016).

Quando uma amostra sofre uma transformação física tal como uma transição de fase, será necessário calor para manter a amostra e a referência (tipicamente um recipiente de amostra vazio) na mesma temperatura (KODRE et al, 2014).

Ou seja, a DSC é uma técnica que analisa a temperatura e o fluxo de calor associado a transição do material em estudo, relacionados a temperatura e ao tempo. As

medidas transmitem informações quantitativas e qualitativas sobre mudanças químicas e físicas que envolvem processos endotérmicos (quando ocorre a absorção de calor), exotérmicos (quando ocorre evolução de calor) ou mudanças na capacidade calorífica (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

Dessa forma, podemos ter reações exotérmicas ou endotérmicas na amostra, por exemplo, quando a amostra sólida funde para um líquido, irá requerer mais calor fluindo para a amostra para aumentar a sua temperatura, assim devido à absorção de calor pela amostra em relação a referência, poderá ser observado um pico endotérmico. Da mesma forma, à medida que a amostra sofre processos exotérmicos, como a cristalização, é necessário menos calor para aumentar a temperatura da amostra em relação a referência. Assim, ao observar a diferença no fluxo de calor entre a amostra e a referência, o DSC é capaz de medir a quantidade de calor que é absorvido ou liberado durante essa transição (KODRE et al, 2014).

Em relação ao funcionamento do equipamento, foi verificado que a diferença no fluxo de calor para a amostra e referência é medida enquanto a temperatura da amostra é alterada na taxa constante. Assim as células, chamadas de panelinhas são pratos de aquecimento cilíndricos feitos de prata, que dissipa calor por meio de um disco constante que está ligado ao bloco. O disco tem duas plataformas elevadas nas quais são colocadas a amostra e a referência e termopares são embutidos de forma independente para medir as temperaturas, e um gás inerte passa através da célula (KODRE et al, 2014).

Como apresentado na figura 2, no DSC tipo fluxo de calor, a amostra e a referência são sofrem elevação da temperatura por uma única fonte e as temperaturas são medidas por termopares em contato com cada uma delas, de forma individual. A curva calorimétrica é apresentada com relação a diferença de temperatura entre a referência e a amostra em função do tempo e da temperatura (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

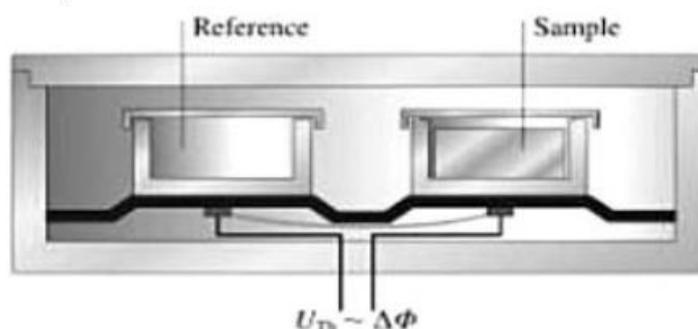


Figura 2: Funcionamento do DSC

2.4.1.1 Benefícios e limitações do DSC

O DSC tem potencial para ser utilizado tanto em análises laboratoriais quanto em análises industriais uma vez que há o objetivo de prever modificação nas propriedades nutricionais e físico-química após o processamento térmico do alimento, por exemplo. E na indústria pode ser útil no ajuste de condições de processamento, reduzindo o tempo de processamento e a temperatura, gerando economia de energia e reduzindo o custo de produção (PARNIAKOV, 2016).

De acordo com KODRE et al, 2014, o DSC é uma técnica termoanalítica altamente sensível e precisa, assim é utilizada devido a sua velocidade, simplicidade e disponibilidade. E, pode ser aplicada em várias áreas como polímeros, estudos de cristal líquido, ciência de alimentos, química e análise de drogas, entre outros compostos.

Logo, dentre as vantagens relacionadas ao uso do DSC pode-se verificar que é uma ferramenta de investigação útil para estudar fenômenos relacionados ao calor nos componentes, monitorando a entalpia, capacidade de calor e transição de fase / temperatura. Além disso, devido a sua capacidade de estudar processos sob as condições dinâmicas de temperatura, o equipamento também pode fornecer dados cinéticos (PARNIAKOV, 2016).

Dessa forma, o DSC possui as seguintes vantagens: rápido tempo de análise, fácil preparo da amostra, pode ser aplicado para sólidos e líquidos, medidas quantitativas e larga faixa de temperatura (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

No caso de alimentos congelados, o uso de DSC na faixa de congelamento tem potencial para modelar suas propriedades térmicas bem como estado da água. E, em alimentos cozidos porque esse método evita o contato entre a amostra e o meio de transferência de calor (PARNIAKOV, 2016).

Em relação a amostra utilizada para análise, é requerida uma pequena quantidade e a análise é realizada de forma mais rápida quando comparada a análises com o mesmo objetivo. Os parâmetros termodinâmicos podem ser calculados pelo programa associado ao equipamento (PARNIAKOV, 2016).

E, em relação as limitações do método de análise por calorimetria diferencial de varredura, verificamos que o equipamento tem custo elevado e devido a utilização de pouca quantidade de amostra é necessário verificar se a amostra foi devidamente homogeneizada e se representa o universo que se deseja analisar. Após as análises, são apresentadas curvas de respostas térmicas, e dependendo da degradação ao alimento pode gerar dificuldades para interpretação dos picos endotérmicos e exotérmicos dessas curvas (PARNIAKOV, 2016).

Assim, dentre as limitações do DSC observamos redução da sensibilidade quando a linha de base está em inclinação ou em curvatura, necessidade de elevar razões de aquecimento para aumentar a sensibilidade, mas reduzindo a resolução e algumas transações são complexas e de difícil interpretação (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

2.4.2 Curva típica do DSC

Considerando o DSC tipo fluxo de calor, pode-se verificar que a amostra e a referência são aquecidas por uma única fonte assim as temperaturas são medidas por termopares individuais, logo a curva calorimétrica é apresentada na forma de diferença de temperatura entre a referência e a amostra em função da temperatura e do tempo (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

Há dois tipos de fatores afetam a curva DSC, fatores instrumentais (taxa de aquecimento localização dos sensores e atmosfera do equipamento, composição dos recipientes de amostras) e características das amostras (quantidade de amostra, tamanho da partícula, solubilidade dos gases, calor da reação, condutividade térmica) (KODRE et al, 2014).

2.4.2.1 Interpretação da curva típica do DSC

Para interpretação do pico de cristalização na curva de resultados do DSC, verifica-se que em determinada temperatura as moléculas liberam energia suficiente e se movem em arranjos muito ordenados, chamados de cristais. Assim, neste momento há liberação de calor, logo o equipamento fornece menos calor para manter a temperatura e apresenta um pico exotérmico, onde é possível medir a área do pico e assim obtemos a energia latente de cristalização do polímero. Adicionalmente, o pico de cristalização indica que o componente analisado pode de fato cristalizar, ou seja, não é um componente 100% amorfo (KODRE et al, 2014).

Posteriormente, pode-se verificar a curva de fusão e ebulição que ocorre quando, em determinada temperatura, os cristais começam a se desmoronar, ou seja, saem dos seus arranjos ordenados e começam a se movimentar livremente uma vez que estão absorvendo calor, indicando um pico endotérmico na curva de resultados da análise (KODRE et al, 2014).

É importante ressaltar a necessidade de obtenção da linha de base, uma vez que para se ter segurança nas interpretações é necessário que se tenha certeza de que o equipamento não apresenta nenhum tipo de variação na curva, quando não ocorre nenhuma transformação na amostra. Assim é realizada uma análise com duas cápsulas vazias, uma em cada compartimento (amostra e referência). Essa análise deve fornecer um gráfico com uma linha praticamente reta, que é denominada linha de base (LUCAS et al, 2011).

Na figura 3, podemos verificar uma curva típica de resultado do DSC, onde os eixos são compostos pela temperatura do fluxo de calor em função do tempo e pode-se observar os pico de cristalização (exotérmico) e o de fusão (endotérmico):

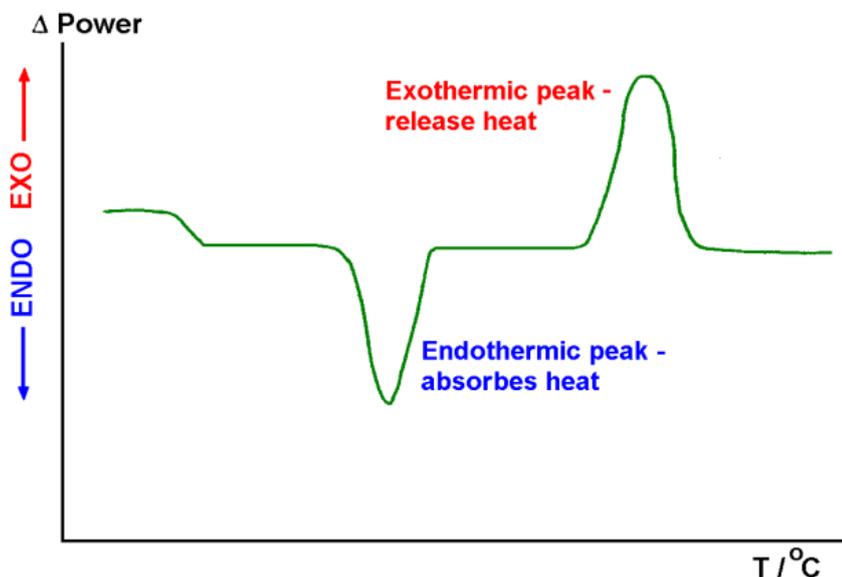


Figura 3: Curva típica do DSC

Cada curva é composta de três pontos, o início do pico, o máximo do pico e o final do pico. As temperaturas no início e no fim do pico são determinadas na inserção dos prolongamentos. O ponto de início do pico, apresenta a fusão dos primeiros cristais e é significativa a sua utilização quando se quer estudar a temperatura na qual os cristais começam a se fundir. O ponto de máximo do pico, é onde a maioria dos cristais se fundem e a temperatura no ponto de fim do pico, indica a temperatura na qual ocorre a fusão completa de todos os cristais (LUCAS et al, 2011).

Assim como na técnica de DTA, a área da curva apresentada pelo DSC é diretamente proporcional a variação de entalpia (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009). Assim esclarecemos a relação entre entalpia e área do pico, uma vez que, por exemplo, a área do pico de fusão é proporcional ao ΔH da amostra e à quantidade de amostra colocada na cápsula. Assim, por meio da equação,

$$m. \Delta H = K.A \quad (2.4)$$

Onde m é a massa da amostra, ΔH é a variação de entalpia, K é a constante de proporcionalidade, que deve ser determinada por meio de uma amostra padrão, cujo valor de ΔH encontra-se tabelado e A é a área do pico. A maioria dos equipamentos fornece o valor da entalpia mas esse valor é proveniente dos valores de massa e da área, conforme o cálculo mostrado acima (LUCAS et al, 2011).

O fluxo de calor dQ/dT é derivado da medida da diferença de temperatura entre um material de referencia e a amostra (LUCAS et al, 2011).

O registro da curva DSC é apresentado em termos de fluxo de calor (miliwatts, mW) *versus* temperatura (°C) ou tempo (min) (LUCAS et al, 2011).

2.5 QUIMIOMETRIA

O objetivo da maioria das análises multivariadas é desenvolver um modelo que caracterize com precisão alguma propriedade que é difícil de medir diretamente e dessa forma, tem como objetivo verificar se ocorre diferenciação das amostras e as variáveis que possuem poder de modelagem. A quimiometria é a expressão de tais técnicas e aplicada ao seguinte:

(A) monitorização e controle do processo, uma vez que minimiza a preparação, permite a medição da composição química de um produto não tratado, análise mais rápida, e pouco ou nenhum desperdício de produto;

(B) determinação de origem geográfica, com base em aromas e aromas componentes e oligoelementos.

(C) avaliação sensorial;

(D) determinação de fraude econômica em caso de adulteração do produto, contaminação e substituição (ARVANITOYANNIS e TZOUROS, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar o método da calorimetria diferencial de varredura (DSC) em leite cru integral fraudado por ureia, soro de leite, formol e amido em diferentes concentrações com o objetivo de obter uma biblioteca de resultados e avaliar se ocorre diferença estatística entre os parâmetros apresentados pelo DSC.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Desenvolver o método de análise de leite cru integral pelo método DSC;

Analisar o perfil gráfico apresentado pelo DSC do leite cru integral fraudado em diferentes concentrações;

Obter resultados, gerados a partir do DSC, que permitam avaliar se ocorre diferença estatística pelos parâmetros obtidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Amostragem

Para esse estudo foi utilizado leite bovino de vaca alimentada com pasto, criada em fazenda nas redondezas da cidade do Rio de Janeiro. Foi utilizado o leite *in natura*, não pasteurizado, obtido por ordenha manual.

4.1.2 Adulteração

A fim de realizar a contaminação do leite para estudo foi realizada fraude com os seguintes contaminantes: soro de leite, amido, ureia e formol.

A determinação das concentrações foi estabelecida de acordo com SANTOS et al, (2016). Para a referida análise, foi realizada fraude com amido nas seguintes concentrações: 1,0 g/L, 2,0 g/L, 3,0 g/L, 4,0 g/L e 5,0 g/L, soro de leite, formol e ureia nas seguintes concentrações: 5%, 10%, 20% 30% e 40%.

O armazenamento das amostras foi realizado em recipiente hermético e sob refrigeração. Antes das análises as amostras foram homogeneizadas e a análise foi realizada em duplicata.

A realização do estudo com os adulterantes conjugados não foi necessária, uma vez que o objetivo do trabalho é caracterizar as fraudes individualmente e, a contaminação conjugada pode tornar inviável a distribuição do leite.

4.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC foram obtidas no equipamento PYRIS Diamond DSC da marca Perkin Elmer Instruments, equipado com um intracooler e foi utilizado o software Pyris Manager para examinar as identidades dos gráficos dos leites fraudados, que pertence ao laboratório Labter da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Para suporte das amostras foram utilizados cadinhos de alumínio de 10 µg fechados com auxílio de uma prensa fornecida pelo fabricante e para a referência foi utilizado cadinho similar vazio hermeticamente selado.

Durante as análises foram utilizadas as seguintes condições: atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, a curva de resfriamento foi realizada entre as temperaturas de 25°C e -40 °C e a curva de aquecimento foi realizada entre -40°C a 180°C.

Foram analisados os seguintes parâmetros, para os picos de cristalização, fusão e ebulição do leite: temperatura inicial da curva (onset – temperatura na qual é iniciada a mudança de fase), temperatura do pico (temperatura onde temos a maior taxa do evento que estamos analisando) e entalpia (máxima energia termodinâmica em forma de calor).

Além desses eventos também foi observado que o equipamento fornece como parâmetros a área, o fluxo de calor inicial e fluxo de calor no pico. A área do pico é proporcional a entalpia da amostra e à quantidade de amostra colocada na cápsula, assim, antes de iniciar cada análise, coloca-se no software a massa da amostra analisada e o valor da entalpia foi calculado pelo software e o fluxo de calor que é a taxa de calor transferido, ou seja, é o resultado da diferença de temperatura. No entanto esses parâmetros não foram considerados durante as análises dos resultados porque seria redundante, uma vez que utilizamos para análise dos resultados a entalpia, temperatura inicial e temperatura no pico.



Figura 4: Equipamento DSC PYRIS Diamond DSC da marca Perkin Elmer Instruments

4.1.4 Análise Quimiométrica

Foi realizada análise estatística pelo software XLSTAT 2017.4.45191 onde foram obtidos dados de média e desvio padrão e análise de variância. (ANOVA) e o teste de Fisher considerando nível de significância de 95%, considerando cada adulterante separadamente.

Adicionalmente, foi realizado o método de modelagem por componentes principais (SIMCA) considerando duas estratégias. O primeiro modelo foi desenvolvido para classificar as amostras são adulteração e as amostras adulteradas (modelo de autenticação) enquanto o segundo modelo foi utilizado para discriminar as amostras baseado no nível de adulteração. Ambos os modelos foram avaliados usando os parâmetros de sensibilidade e especificidade, sendo dividido 75% das amostras para construção do modelo e 25% das amostras para validação do modelo. Para essa análise foi utilizada o software Pirouette 4.5 (Infometrix, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMIDO

De acordo com dados da literatura, o amido puro decompõe-se em 200°C, dessa forma, na análise das curvas DSC foram verificadas interferências, após o pico endotérmico de ebulição, que indicam a degradação do amido, conforme apresentado na figura 5 que compara as curvas do DSC obtidas pela análise da fraude do amido em diferentes concentrações no leite.

De acordo com a análise estatística ANOVA realizada para a fraude de leite com amido, verificamos que há diferença estatística entre os seguintes parâmetros: entalpia de cristalização, temperatura inicial de fusão, temperatura do pico de fusão, temperatura inicial de ebulição, temperatura do pico de ebulição e entalpia de ebulição.

Para a entalpia de cristalização, que é calculada de acordo com os valores da massa da amostra e com a área apresentada, foi verificado que ocorreu diferença estatística entre as amostras, verificamos que as amostras que foram fraudadas com amido de 2 g/L a 5 g/L não apresentaram diferença estatística ao nível de significância de 5%. Logo, o controle, a fraude do leite com 1g/L de amido e as demais amostras diferiram estatisticamente entre si. É importante ressaltar que as amostras fraudadas diferiram estatisticamente do controle, indicando dessa forma que o DSC é capaz de indicar uma amostra de leite fraudado com amido, a partir de 1 g/L.

Em relação a temperatura inicial de fusão, foi verificado que o controle é diferente estatisticamente das amostras de leite fraudadas com amido. Além disso, pode-se verificar que o leite puro teve a maior temperatura inicial de fusão (-0,385°C) e as amostras fraudadas tiveram temperaturas mais negativas, conforme pode-se verificar pela figura 5.

Para a curva de ebulição foi verificada diferença estatística em todos os parâmetros da curva, conforme a seguir:

- Para o parâmetro da temperatura inicial de ebulição verificamos que o controle não diferiu estatisticamente das amostras de leite fraudadas com amido até 3 g/L. As amostras fraudadas com 4 g/L e 5 g/L de amido o controle diferiram estatisticamente em relação ao controle. A figura 5 que apresenta as curvas do DSC em diferentes concentrações do amido indica que conforme o aumento da concentração da fraude ocorre um aumento diretamente proporcional da temperatura inicial de ebulição.

- Para o parâmetro de temperatura do pico de ebulição, foi verificado diferença estatística em relação ao controle apenas na fraude com maior concentração de amido (5 g/L) que também apresentou a maior temperatura de ebulição de 168,8°C.

- Para a entalpia de ebulição, verificamos que o controle diferiu estatisticamente ao nível de significância de 5% de todas as amostras fraudadas, ou seja, é um bom indicador para detecção de fraude do leite por amido.

APLICAÇÃO DO DSC PARA FRAUDE DE LEITE COM AMIDO

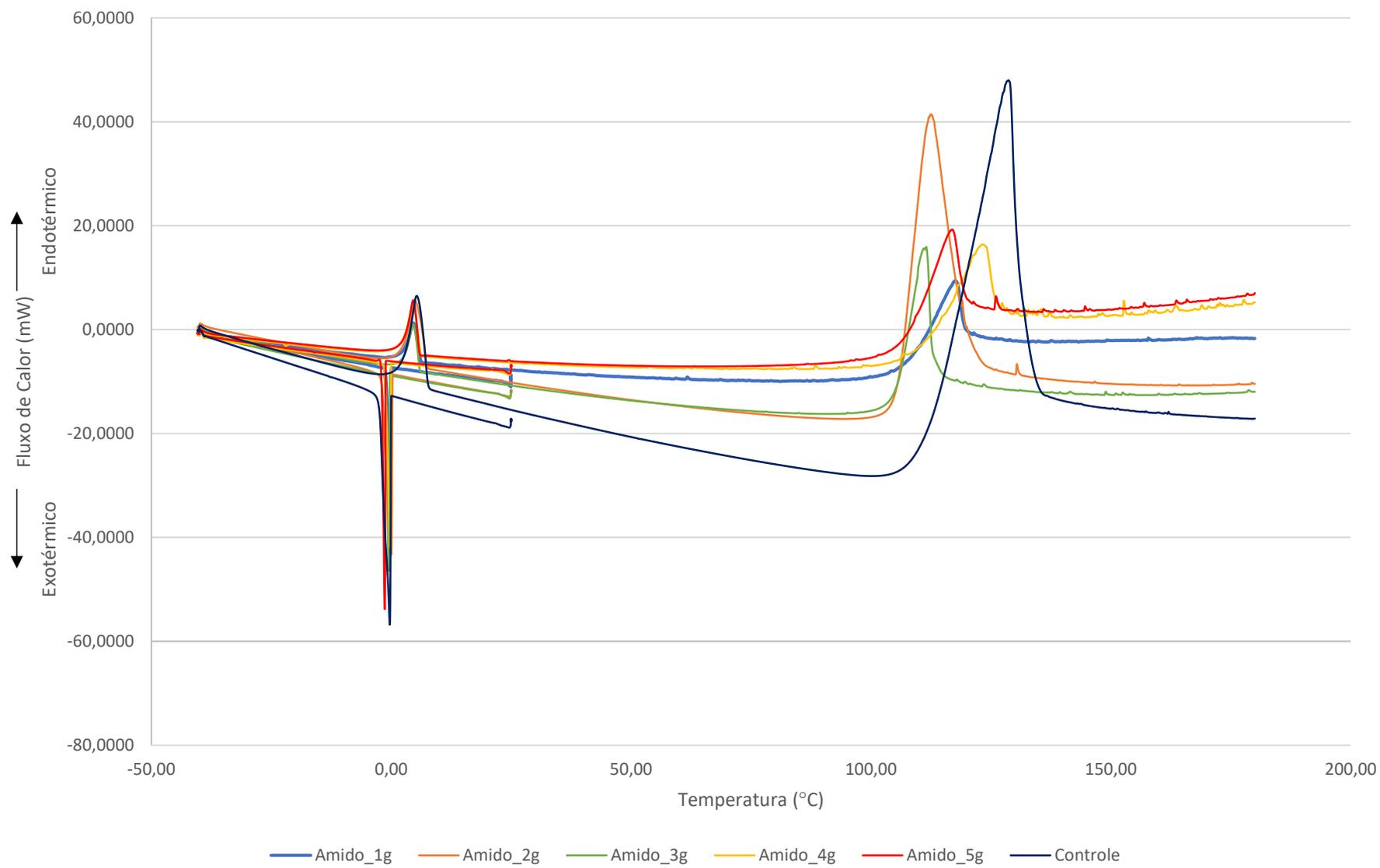


Figura 5: Aplicação do DSC para fraude de leite com amido

Tabela 1 - Análise ANOVA para fraude de leite com amido

Amostra	Nível de Adulteração	Temperatura Inicial de Cristalização (°C)	Temperatura do pico de Cristalização (°C)	Entalpia de Cristalização (J/g)	Temperatura Inicial de Fusão (°C)	Temperatura do pico de Fusão (°C)	Entalpia de Fusão (J/g)	Temperatura Inicial de Ebulição (°C)	Temperatura do pico de Ebulição (°C)	Entalpia de Ebulição (J/g)
CONTROL	0 g/L	-0,430 ^{ab} ± 0,01	-0,400 ^a ± 0,14	-253,501 ^c ± 4,20	-0,385 ^a ± 0,01	5,315 ^b ± 0,09	220,833 ^{bc} ± 6,92	104,505 ^b ± 0,87	123,330 ^{bc} ± 7,07	3577,565 ^b ± 451,98
STARCHI	1 g/L	0,035 ^a ± 0,43	-0,290 ^a ± 0,07	-233,430 ^a ± 5,52	-0,645 ^c ± 0,06	4,600 ^c ± 0,04	263,704 ^a ± 35,26	103,955 ^b ± 2,06	118,615 ^c ± 1,56	870,990 ^d ± 38,71
STARCHII	2 g/L	0,065 ^a ± 0,42	-0,035 ^a ± 1,04	-247,197 ^{bc} ± 1,80	-0,535 ^b ± 0,01	5,665 ^b ± 0,46	236,707 ^{ab} ± 0,77	105,645 ^b ± 3,23	131,570 ^b ± 1,23	4313,429 ^a ± 117,31
STARCHIII	3 g/L	-0,480 ^{ab} ± 0,25	-0,795 ^a ± 0,11	-244,578 ^b ± 0,13	-1,140 ^d ± 0,01	5,495 ^b ± 0,15	199,669 ^c ± 6,35	105,400 ^b ± 4,43	123,805 ^{bc} ± 3,94	1416,971 ^c ± 33,51
STARCHIV	4 g/L	-0,670 ^b ± 0,03	-0,535 ^a ± 0,39	-243,339 ^b ± 4,56	-1,925 ^f ± 0,01	5,350 ^b ± 0,21	217,466 ^{bc} ± 3,42	107,025 ^c ± 2,00	121,935 ^c ± 1,36	1675,230 ^c ± 52,55
STARCHV	5 g/L	-0,5355 ^{ab} ± 0,04	-0,740 ^{bc} ± 0,03	-244,377 ^b ± 2,04	-1,230 ^e ± 0,03	6,510 ^a ± 0,16	226,643 ^{bc} ± 4,45	163,480 ^a ± 1,60	168,880 ^a ± 1,41	844,814 ^d ± 48,35
Pr > F		0,130	0,602	0,019	< 0,0001	0,003	0,058	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Significativo		Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim

(*) Letras iguais dentro de uma mesma coluna indicam que os parâmetros não apresentaram diferença estatística entre as amostras com diferentes concentrações de fraudes ao nível de significância de 5%.

5.2 FORMOL

De acordo com dados da literatura, o formol tem o seu ponto de ebulição à $-19,5^{\circ}\text{C}$ e seu ponto de fusão à -92°C . Na análise DSC abaixo, pela figura 6, onde podemos verificar as curvas apresentadas pelo DSC para o controle e para as fraudes, foi possível verificar que o controle, leite puro, teve seu ponto de cristalização próximo de 0°C , no entanto todas as amostras fraudadas com diferentes concentrações de formol tiveram seu pico de cristalização alterado para valores negativos, devido a temperatura de ebulição do formol, o que foi confirmado pela análise estatística ANOVA, onde é possível verificar que para a temperatura inicial de cristalização verificamos que o controle difere estatisticamente das amostras fraudadas e foi o único que teve temperatura inicial de cristalização em temperatura positiva. Dessa forma, esse parâmetro pode ser considerado um bom indicador para fraude de leite com formol.

Ainda de acordo com a análise estatística ANOVA realizada para a fraude de leite com formol, verificamos que há diferença estatística entre os seguintes parâmetros: temperatura inicial de cristalização, temperatura do pico de cristalização, entalpia de cristalização, temperatura inicial de fusão, temperatura inicial de ebulição, temperatura do pico de ebulição e entalpia de ebulição.

Em relação a temperatura do pico de cristalização foi verificado que o controle diferiu estatisticamente em relação às amostras fraudadas e teve a menor temperatura de cristalização, ou seja, indica que o leite fraudado com formol a partir de 5% a temperatura do pico de cristalização será mais negativa.

Para a curva de fusão observamos que ocorreu diferença significativa no parâmetro de temperatura inicial de fusão onde foi verificado que apenas a amostra fraudada com 40% de formol diferiu estatisticamente das demais amostras e do controle.

Para a curva de ebulição, foi identificado que ocorreu diferença estatística em todos os parâmetros, conforme a seguir:

- Na temperatura inicial de ebulição foi verificado diferença estatística em relação ao controle para as amostras fraudadas com 20 a 40% de formol. E uma leve tendência de aumento da temperatura inicial de ebulição nas amostras fraudadas.

- Para a entalpia de ebulição foi verificado que as amostras com formol a 30% e 40% diferiram estatisticamente do controle.

APLICAÇÃO DO DSC PARA FRAUDE DE LEITE COM FORMOL

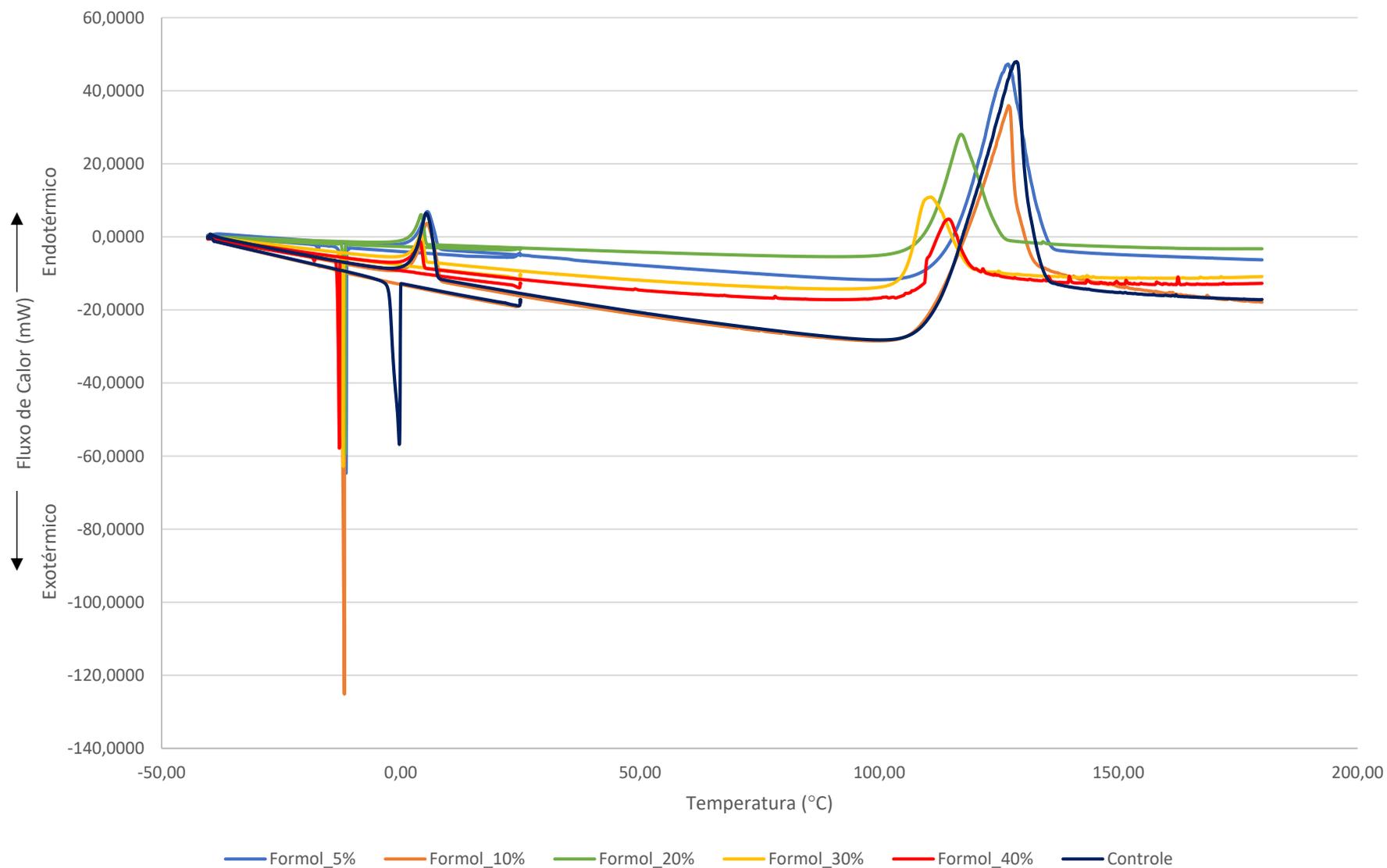


Figura 6: Aplicação do DSC para fraude em leite com formol

Tabela 2 - Análise ANOVA para fraude de leite com formol

Amostra	Nível de Adulteração	Temperatura Inicial de Cristalização (°C)	Temperatura do pico de Cristalização (°C)	Entalpia de Cristalização (J/g)	Temperatura Inicial de Fusão (°C)	Temperatura do pico de Fusão (°C)	Entalpia de Fusão (J/g)	Temperatura Inicial de Ebulição (°C)	Temperatura do pico de Ebulição (°C)	Entalpia de Ebulição (J/g)
CONTROL	0%	0,440 ^a ± 0,61	-0,400 ^a ± 0,07	-246,474 ^b ± 2,87	-0,380 ^a ± 0,01	5,380 ^a ± 0,09	215,940 ^{ab} ± 6,92	105,120 ^c ± 0,87	128,330 ^{bcd} ± 7,07	2997,166 ^b ± 184,41
FORMI	5%	-13,855 ^{bc} ± 2,54	-12,650 ^{bc} ± 1,70	-245,078 ^b ± 6,59	-0,955 ^a ± 0,01	5,725 ^a ± 0,19	223,193 ^{ab} ± 8,71	110,795 ^{bc} ± 4,12	131,550 ^{bc} ± 6,49	3732,937 ^{ab} ± 310,32
FORMII	10%	-14,500 ^c ± 0,21	-14,595 ^{cd} ± 0,28	-244,644 ^b ± 5,45	-0,815 ^a ± 0,22	4,860 ^a ± 0,88	264,122 ^a ± 46,10	106,455 ^c ± 1,97	123,770 ^{cd} ± 4,60	2059,749 ^c ± 17,31
FORMIII	20%	-11,785 ^{bc} ± 0,43	-11,590 ^b ± 0,11	-254,442 ^b ± 2,09	-0,890 ^a ± 0,16	4,845 ^a ± 0,54	210,879 ^{ab} ± 14,84	156,765 ^a ± 3,92	158,365 ^a ± 1,79	3019,774 ^b ± 29,16
FORMIV	30%	-10,780 ^b ± 0,99	-16,195 ^d ± 1,65	-188,775 ^a ± 0,97	-0,440 ^a ± 0,38	5,250 ^a ± 0,17	229,370 ^{ab} ± 7,14	106,335 ^c ± 4,66	131,165 ^{bcd} ± 1,49	4442,561 ^a ± 522,35
FORMV	40%	-12,225 ^{bc} ± 0,95	-12,205 ^{bc} ± 0,90	-245,654 ^b ± 3,04	-2,115 ^b ± 0,16	5,390 ^a ± 0,30	186,642 ^b ± 15,89	117,375 ^b ± 3,09	136,990 ^b ± 4,00	1939,875 ^c ± 2,79
Pr > F		0,001	0,000	0,000	0,006	0,622	0,236	0,000	0,004	0,002
Significativo		Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim

(*) Letras iguais dentro de uma mesma coluna indicam que os parâmetros não apresentaram diferença estatística entre as amostras com diferentes concentrações de fraudes ao nível de significância de 5%.

5.3 SORO DE LEITE

Avaliamos o resultado da fraude de adicionar o soro de leite ao leite puro porque esse tipo de fraude reduz o valor nutritivo do alimento diluindo os teores de proteínas e gorduras.

De acordo com dados da literatura, o soro é composto por 94% de água, 5% de lactose, 0,7% de proteína e 0,3% de gordura. Assim esperamos um comportamento próximo ao da água, com ponto de fusão a 0°C e ponto de ebulição a 100°C.

De acordo com a análise estatística ANOVA realizada para a fraude de leite com soro de leite e com a Figura 7, que apresenta os resultados do DSC para o controle e para as amostras fraudadas com soro de leite, foi verificado que há diferença estatística entre os seguintes parâmetros: temperatura do pico de cristalização, temperatura inicial de fusão, temperatura do pico de fusão, entalpia de fusão, temperatura inicial de ebulição, temperatura do pico de ebulição e entalpia de ebulição. Ou seja, em todos os parâmetros da curva de fusão e de ebulição ocorreu diferença significativa entre as amostras. Assim, na curva exotérmica, temos o ponto de cristalização das concentrações de leite fraudado bem próximas ao leite puro (controle).

Para a temperatura inicial de fusão, verificamos que o controle teve a temperatura mais próxima de zero, que é a temperatura de fusão esperada para o leite puro. Pode-se observar que as amostras fraudadas de 5% a 30% de soro de leite no leite puro tiveram temperaturas iniciais de fusão mais negativas em relação ao controle que teve como temperatura inicial de fusão em $-0,005^{\circ}\text{C}$, e para o leite fraudado com 40% de soro de leite pode-se verificar que a fusão só se iniciou em temperatura positiva, diferente das demais amostras.

Em relação ao parâmetro da temperatura inicial de ebulição, foi verificado que as amostras fraudadas com soro de leite tendem a ter uma temperatura inicial de ebulição maior que a do leite puro, sendo maiores do que 100°C. E a mesma tendência é observada na temperatura do pico de ebulição, uma vez que as temperaturas tendem a ser maiores em relação ao controle. A instabilidade no ponto de ebulição pode ser explicada, uma vez que o soro de leite é composto em sua maior parte de água e esse fato pode reduzir a temperatura inicial de ebulição da amostra, além disso o comportamento da água no DSC é muito instável e nesse ponto também podemos ter instabilidades pela degradação das proteínas que pode ter causado interferências no gráfico.

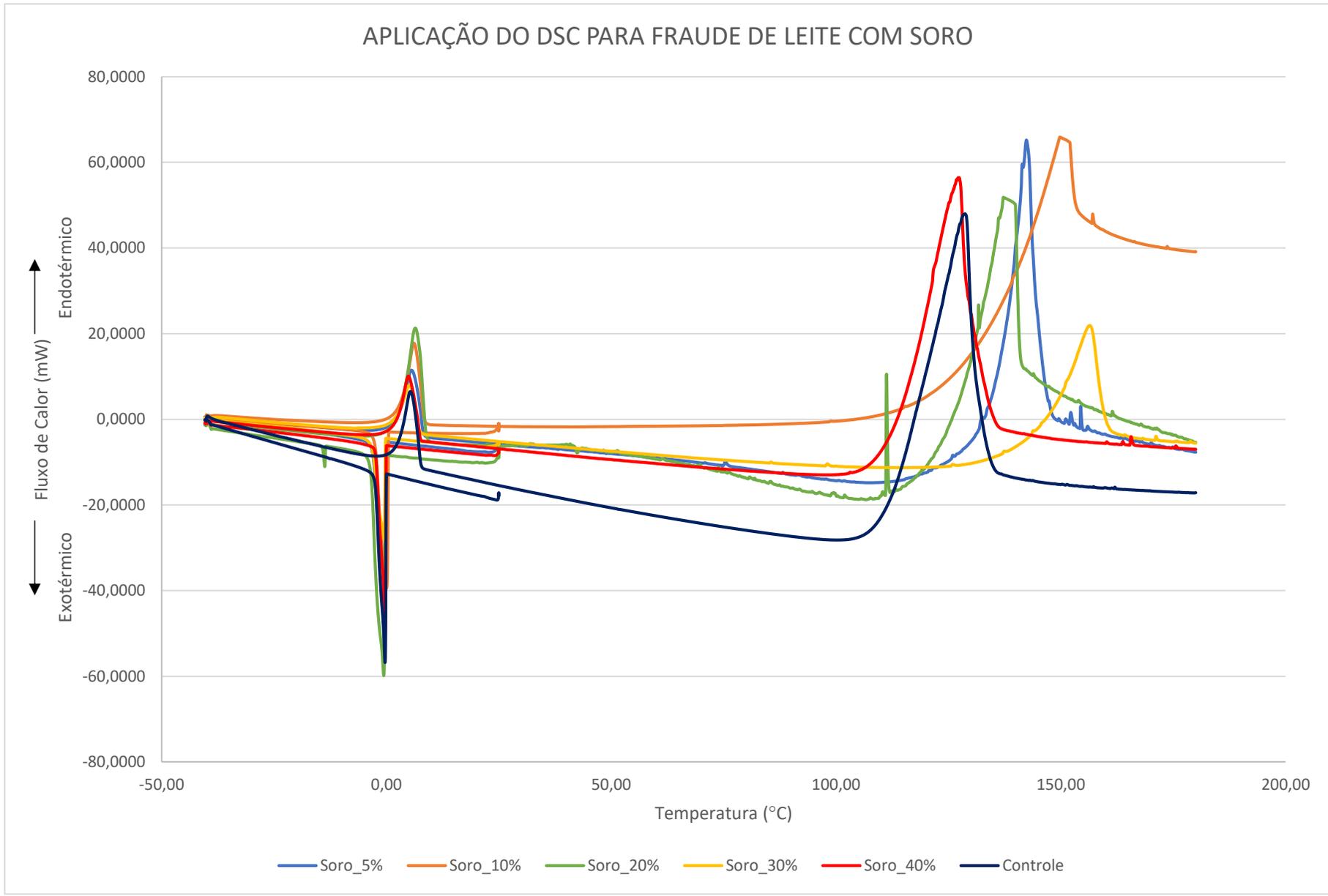


Figura 7: Aplicação do DSC para fraude de leite como soro de leite

Tabela 3 - Análise ANOVA para fraude de leite com formol

Amostra	Nível de Adulteração	Temperatura Inicial de Cristalização (°C)	Temperatura do pico de Cristalização (°C)	Entalpia de Cristalização (J/g)	Temperatura Inicial de Fusão (°C)	Temperatura do pico de Fusão (°C)	Entalpia de Fusão (J/g)	Temperatura Inicial de Ebulição (°C)	Temperatura do pico de Ebulição (°C)	Entalpia de Ebulição (J/g)
CONTROL	0%	-0,405 ^b ± 0,02	-0,450 ^b ± 0,07	-248,501 ^{ab} ± 2,87	-0,005 ^a ± 0,54	5,315 ^{cd} ± 0,09	225,833 ^{bc} ± 0,15	104,505 ^d ± 0,87	128,330 ^d ± 0,00	3727,565 ^a ± 239,85
WHEYI	5%	0,005 ^{ab} ± 0,30	-0,365 ^{bc} ± 0,01	-241,157 ^a ± 2,36	-0,980 ^b ± 0,01	5,545 ^c ± 0,09	221,929 ^c ± 1,64	113,995 ^{bc} ± 1,87	142,915 ^{bc} ± 0,81	1751,917 ^c ± 55,78
WHEYII	10%	0,500 ^a ± 0,04	-0,430 ^{ab} ± 0,02	-249,517 ^b ± 6,25	-0,715 ^b ± 0,01	6,125 ^b ± 0,05	225,245 ^{bc} ± 6,87	134,305 ^a ± 2,64	145,705 ^b ± 5,76	1075,597 ^d ± 29,46
WHEYIII	20%	-0,015 ^{ab} ± 0,36	-0,615 ^c ± 0,05	-249,763 ^b ± 0,73	-0,980 ^b ± 0,01	6,595 ^a ± 0,22	238,817 ^a ± 7,06	124,180 ^b ± 4,38	137,685 ^c ± 0,64	1875,896 ^c ± 0,03
WHEYIV	30%	0,015 ^{ab} ± 0,01	-0,560 ^c ± 0,01	-248,016 ^{ab} ± 0,68	-3,060 ^c ± 0,08	5,295 ^{cd} ± 0,19	202,184 ^d ± 4,19	119,595 ^{bc} ± 0,05	155,670 ^a ± 0,85	3576,716 ^{ab} ± 361,12
WHEYV	40%	0,005 ^{ab} ± 0,64	-0,440 ^{ab} ± 0,11	-244,606 ^{ab} ± 1,23	0,285 ^a ± 0,01	5,020 ^d ± 0,04	234,265 ^{ab} ± 2,37	108,160 ^d ± 1,53	127,665 ^d ± 0,67	3255,187 ^b ± 77,84
Pr > F		0,140	0,002	0,150	< 0,0001	0,000	0,002	0,000	0,000	< 0,0001
Significativo		Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

(*) Letras iguais dentro de uma mesma coluna indicam que os parâmetros não apresentaram diferença estatística entre as amostras com diferentes concentrações de fraudes ao nível de significância de 5%.

5.4 UREIA

De acordo com a análise estatística ANOVA realizada para a fraude de leite com ureia e com a Figura 8, que apresenta o gráfico do DSC para o controle e fraudes analisadas, foi verificado que há diferença estatística ao nível de significância de 5% entre os seguintes parâmetros: temperatura inicial de fusão, temperatura inicial de ebulição, temperatura do pico de ebulição e entalpia de ebulição.

Podemos verificar que na curva exotérmica de cristalização, não foi verificada diferença estatística entre o controle e as amostras fraudadas com ureia. E, no primeiro ponto da curva endotérmica, de temperatura inicial de fusão, foi verificado que os valores de temperatura ficaram muito próximos, dessa forma, esse resultado indica que esse não é o melhor ponto para identificação da fraude.

Em relação a curva de ebulição, foi verificado que na temperatura inicial de ebulição a menor temperatura foi a do controle (104,505°C), indicando, dessa forma, que o leite fraudado com ureia tende a ter um aumento na temperatura inicial de ebulição.

Para a temperatura do pico de ebulição foi verificado que o controle foi diferente significativamente da amostra com maior índice de ureia (40%) e, além disso, a temperatura do pico de ebulição foi menor (123,330°C) em relação as amostras fraudadas, conforme apresentado na figura 8.

Para a entalpia de ebulição, foi verificado que o controle diferiu estatisticamente das fraudes, a partir de 20% de ureia no leite, sendo dessa forma, um forte indicador a fraude de ureia no leite.

Logo, de acordo com dados da literatura, a ureia tem o seu ponto de fusão a 132,7°C, assim verificamos que as amostras fraudadas com diferentes concentrações de ureia tiveram picos de cristalização e de fusão muito similares ao controle, leite puro. No entanto, em relação ao ponto de ebulição podemos verificar que ocorreu grande variação entre as curvas devido a temperatura de ebulição do leite ser próximo ao ponto de fusão da ureia. Para as amostras fraudadas podemos verificar interferência no final das curvas das amostras fraudadas indicando degradação da ureia.

APLICAÇÃO DO DSC PARA FRAUDE DE LEITE COM URÉIA

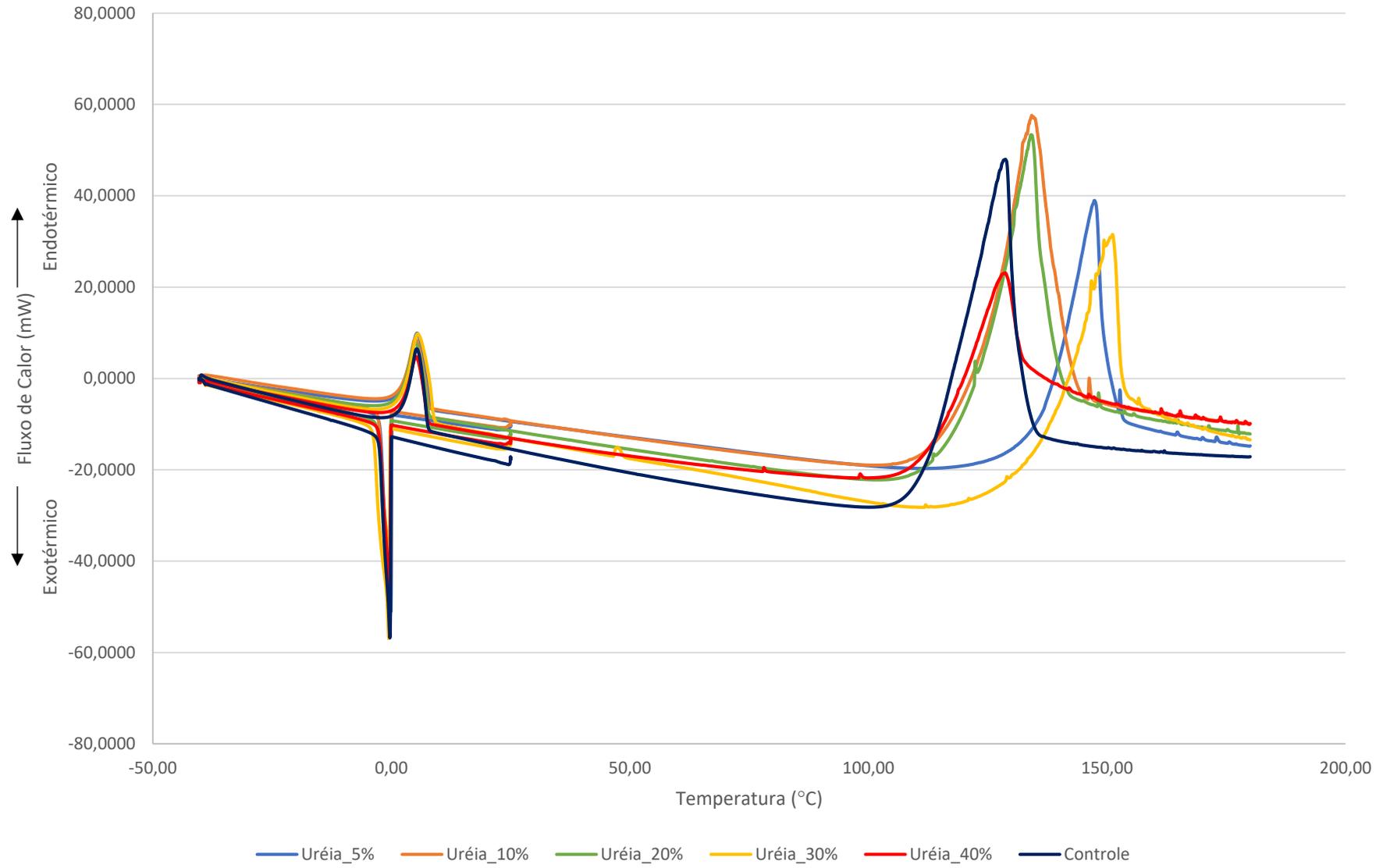


Figura 6: Aplicação do DSC para fraude de leite com ureia

Tabela 4 - Análise ANOVA para fraude de leite com uréia

Amostra	Nível de Adulteração	Temperatura Inicial de Cristalização (°C)	Temperatura do pico de Cristalização (°C)	Entalpia de Cristalização (J/g)	Temperatura Inicial de Fusão (°C)	Temperatura do pico de Fusão (°C)	Entalpia de Fusão (J/g)	Temperatura Inicial de Ebulição (°C)	Temperatura do pico de Ebulição (°C)	Entalpia de Ebulição (J/g)
CONTROL	0%	0,430 ^b ± 0,01	-0,400 ^a ± 0,14	-248,501 ^a ± 2,87	-0,335 ^a ± 0,06	5,315 ^{ab} ± 0,09	220,833 ^a ± 6,92	104,505 ^c ± 0,87	123,330 ^c ± 7,07	3577,565 ^a ± 451,98
UREAI	5%	-0,005 ^{ab} ± 0,35	-0,425 ^{ab} ± 0,02	-243,748 ^b ± 0,16	-1,390 ^{bc} ± 0,31	5,345 ^{ab} ± 0,09	229,547 ^a ± 5,94	123,875 ^b ± 7,87	146,160 ^{ab} ± 1,73	1553,144 ^c ± 51,02
UREAII	10%	-0,115 ^{ab} ± 0,01	-0,285 ^a ± 0,01	-247,113 ^a ± 6,70	-1,175 ^b ± 0,01	5,355 ^{ab} ± 0,45	165,659 ^b ± 48,15	107,885 ^{bc} ± 5,42	133,170 ^{bc} ± 1,50	3197,240 ^a ± 21,64
UREAIII	20%	0,390 ^a ± 0,72	-0,450 ^{ab} ± 0,06	-237,619 ^a ± 3,03	-1,680 ^c ± 0,33	5,045 ^b ± 0,05	195,681 ^{ab} ± 21,38	119,365 ^{bc} ± 3,03	130,650 ^{bc} ± 4,78	2392,361 ^b ± 30,07
UREAIV	30%	-0,245 ^{ab} ± 0,01	-0,490 ^b ± 0,06	-238,403 ^a ± 17,44	-0,275 ^a ± 0,09	5,610 ^a ± 0,03	198,061 ^{ab} ± 2,74	118,555 ^{bc} ± 13,61	139,585 ^{bc} ± 13,88	1436,848 ^c ± 22,75
UREAV	40%	0,245 ^{ab} ± 0,05	-0,350 ^{ab} ± 0,04	-240,877 ^a ± 4,19	-0,535 ^a ± 0,02	5,270 ^{ab} ± 0,08	212,995 ^{ab} ± 4,90	163,585 ^a ± 5,03	158,750 ^a ± 1,05	1688,031 ^c ± 80,71
Pr > F		0,259	0,176	0,682	0,001	0,258	0,189	0,001	0,017	0,000
Significativo		Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim

(*) Letras iguais dentro de uma mesma coluna indicam que os parâmetros não apresentaram diferença estatística entre as amostras com diferentes concentrações de fraudes ao nível de significância de 5%.

6 SIMCA

A idéia principal em SIMCA é a construção de um limite de confiança para cada classe com a ajuda de PCA, projetar as amostras não classificadas em cada espaço de componentes principais e atribuir-lhes a classe em que eles se encaixem melhor. A seleção do número ótimo de componentes é um importante passo em SIMCA e é geralmente determinado utilizando uma validação cruzada com o destaque de um objeto (Stanimirova et al., 2010) (Cruz et al, 2013). O desempenho SIMCA foi demonstrada calculando os parâmetros de sensibilidade e especificidade.

Pode-se observar que foi obtido sucesso pois com dois componentes principais, os resultados foram iguais a 100% no que diz respeito a classificação e validação do modelo considerando ambos os casos (modelo de autenticação e modelo baseado no nível de adulteração). O desempenho das análises de DSC demonstrou-se melhor quando comparada a outros métodos de análise de análise instrumental como espectroscopia de infravermelho e imagem digital (Poliana, Edenir & Luis, 2013; Poliana & Edenir, 2013). Com relação aos parâmetros de sensibilidade, ou seja, a habilidade de detectar amostras verdadeiramente positivas como positivas e especificidade, ou seja, a capacidade do modelo de detectar amostras negativas como negativas, ambos os parâmetros foram 1, o que determina a potencialidade do DSC na análise de adulterantes em leite.

7 CONCLUSÃO

Os resultados preliminares do DSC aplicados a avaliação de diversos adulterantes em leite mostrou-se interessante e promissor, sendo capaz de detectar diferenças entre os parâmetros de análise com relação ao nível de adulteração realizado. Isto foi confirmado pela análise quimiométrica que foi capaz de prever 100% das amostras durante a amostra de construção e validação do modelo, independente da estratégia utilizada.

Neste contexto, na medida em que o DSC é um método que não exige preparo de amostra, não gera resíduos químicos, ele pode ser considerado como método de análise junto à Agência de Vigilância Sanitária e aos Órgãos de Fiscalização do Ministério da Agricultura, que são encarregados da fiscalização na cadeia do leite.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, M. R; CAMPÊLO, C. S; SILVA, J. B. A. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. Rev Inst Adolfo Lutz, 73, 244-251, 2014.
- AQUINO, L. F. M.C; SILVA, A. C. O; FREITAS, M. Q; FELICIO, T. L; CRUZ, A. G; CONTE-JUNIOR, C. A. Identifying cheese whey an adulterant in milk: Limited contribution of a sensometric approach. Food Research International, 62, 233-237, 2014.
- ARVANITTOYANNIS, I. S; TZOUROS N. E. Implementation of Quality Control Methods in Conjunction with Chemometrics Toward Authentication of Dairy Products. Food Science and Nutrition, 45:4, 231-249, 2005. DOI:10.1080/10408690490478073
- BANSAL, S; SINGH, A; MANGAL, M; MANGAL, A. K; KUMAR, S. Food Adulteration: Sources, Health Risks and Detection Methods. Food Science and Nutrition, 1-80, 2015.
- BERNAL, C; COUTO, A. B; BREVIGLIERI, S. T; CAVALHEIRO, E. T. G; Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. Quimica Nova, v.25, n. 5, 849-855, 2002.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, 2011.
- BEHMER, M. L. A. *Tecnologia do Leite*. 13. ed. São Paulo: Nobel, 1999. 320 p.
- COSTA, M.R; JIMÉNEZ-FLORES, R; GIGANTE, M.L. Propriedades da Membrana do Glóbulo de Gordura do Leite. Alim. Nutr., Araraquara, v.20, n.3, 507-514, 2009.
- DIAS, S. S; LOBATO, V; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. Rev Inst Adolfo Lutz, v.68, n.3, 327-333,2009.
- EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 58, n.5, 932-939, 2006.
- FELLOWS, P. Tecnologia do processamento de alimentos. Porto Alegre: Artmed,
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2017.
- FUENTE, M.A.D.L; JUÁREZ, M. Authenticity Assessment of Dairy Products. Food Science and Nutrition, v.45:7-8, 563-585, 2005. DOI: 10.1080/10408690490478127.

GLANTZ, M; DEVOLD T. G.; VEGARUD G. E.; MÅNSSON H. L.; STÅLHAMMAR H. PAULSSON M. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 4, 1444-1451, 2010.

HANDFORD, C, E; CAMPBELL, K; ELLIOTT, C. T. Impacts of Milk Fraud on Food Safety and Nutrition with Special Emphasis on Developing Countries. *Food Science and Food Safety*, v.5, 130-142, 2016.

HARAGUCHI, F.K; ABREU, W.C; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr. Campinas, SP*, v.19, n.4, 479-488, 2006.

HOCHMÜLLER, A. L. H; HOCHMÜLLER, J. H; CERESER N. D; SALAZAR, R. F. S; SALAZAR, L. N. Estudo Exploratório em Leites UHT para Verificação de Ocorrência de Adulteração. *Revista Interdisciplinar de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v.04, n.1, 174-180, 2017.

HONORIO, R; TOMÉ, L., C., D; VALÉRIO, G., D; COSTA, M., R; SOUZA, C., H., D; SANTANA, E., H., W. Effect of Storage on Quality of UHT Milk. *Uniciências*, v.19, n.1, 11-16, 2015.

JENSEN, R. G. Invited Review: The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.2, 295-350, 2002.

JHA, S. N.; JAISWAL, P.; GREWAL, M., K; GUPTA, M; BHARDWAJ, R. Detection of Adulterants and Contaminants in Liquid Foods — A Review. *Food Science and Nutrition*, 56:10, 1662-1684, 2016. DOI:10.1080/10408398.2013.798257

LUCAS, E. F; SOARES, B. G; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros. Determinação de peso molecular e análise térmica. 1. Ed. E-papers Serviços Editoriais, 2011. 366 p.

KODRE, K. V; ATTARDE, S.R; YENDHE P. R; PATIL R. Y; BARGE V. U. Differential Scanning Calorimetry: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v.3, n.3, 11-22, 2014.

MAIA, G. B. S.; PINTO, A. R.; MARQUES, C. Y. T.; ROITMAN, F. B.; LYRA, D. D. Produção leiteira no Brasil. *BNDES Setorial*, n. 37, p. 371-398, 2012.

MATOSO, A. C; FREITAS F; FREITAS K. J; OLIVEIRA M. M; BALBI M.E; Análise de Leites Industrializados Longa Vida Comercializados na Região Metropolitana de Curitiba, PR. *Visão Acadêmica*, v.17, n.1, 2016.

MOREIRA, G. F; BALBO, A; ACHETE, C. A; BARIN, J. S; WOLLINGER, W; NOGUEIRA, R; BITTENCOURT C. F; RODRIGUES, J.M. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial

(DSC) para Determinação da Pureza de Fármacos. *Produto e Produção*, v.11, n. 1, 22 – 29, 2010.

MONTEIRO, A. A; PIRES, A. C. S; ARAÚJO, E. A; *Tecnologia de Produção de Derivados do Leite*. 2 edição. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, 2012, 85p.

MOTHÉ, C, G; AZEVEDO, A, D. *Análise Térmica de Materiais*. 1. Ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2009. 325 p.

NASCIMENTO, W. W. G; OLIVEIRA, M. A. L; FURTADO, M. A. M; ANJOS, V. C; BELL, M. J. Development and Optimization of an Alternative Methodology for Detection of Milk Adulteration by Water. *Journal of Food Science and Engineering*, v.3, 363-370, 2013.

NIE, F; WANG, N; XU, P; ZHENG, J. Determination of urea in milk based on N-bromosuccinimide-dichlorofluorescein postchemiluminescence method. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1-6, 2016.

OLIVEIRA, D. F; BRAVO, C. E. C; TONIAL I. B. Soro de Leite: um Subproduto Valioso. *Rev. Inst. Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 67, n. 385, 64-71, 2012.

OLIVEIRA, L. N; MARINHO, V. T; ZIMAGNO, M, V; LAURO, M. A; BARBOZA, J. A. N; SILVA, P. H. F. Avaliação do Índice de Soroproteína Não-Desnaturada como um Indicador de Tratamento Térmico para leite UHT e Leite em Pó. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 70, n. 2, 78-84, 2015. DOI: 10.14295/2238-6416.v70i2.389

PARNIAKOV, O; BALS, O; BARBA, F. J; MYKHAILYK, V; LBOVLA, N; VEROBIEV, E. Application of differential scanning calorimetry to estimate quality and nutritional properties of food products. *Food Science and Nutrition*, 1-89, 2016.

PINTO, C. L. O; PICCOLO, M. P; BRITO, M. A. V. P; MARTINS, M. L; MACÊDO, C. S; FARIÑA, L. O. *Qualidade microbiológica do leite cru*. 1 edição. Editora: EPAMIG, 2013, 272 p..

RIENZO, T.D; D’ANGELO, G; D’AVERSA F; CAMPANALE, M.C; CESARIO V; MONTALTO M; GASBARRINI A; OJETTI V. Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.17, n.2, 18-25, 2013.

ROBIM M.S; CORTEZ, M. A.S; SILVA, A. C. O; FILHO R. A. T; GEMAL, N. H; NOGUEIRA, E. B. Pesquisa de fraude no leite uat integral comercializado no estado do rio de janeiro e comparação entre os métodos de análises físico-químicas oficiais e o método de ultrassom. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, nº 389, 43-50, 2012.

Rosa-Campos, A. A; Rocha, J. E. S; Borgo, L. A; Mendonça, M. A. *Avaliação Físico-Química e Pesquisa de Fraudes em Leite Pasteurizado Integral Tipo 'C' Produzido na Região de*

Brasília, Distrito Federal. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, nº 379, 30-34, 2011.

SANTIAGO, L. L. *Apontamentos estratégicos no agronegócio do leite*. 1 ed. São Paulo: GFM Gráfica & Editora, 2011. 174 p.

SILVA, R. A. B; MONTES, R. H. O; RICHTER, E. M; MUNOZ, R. A. A. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. *Food Chemistry*, 133, 200 – 204, 2012.

SANTOS, P. M; PEREIRA-FILHO, E. R; COLNAGO L. A. Detection and quantification of milk adulteration using time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR). *Microchemical Journal*, 124, 15–19, 2016.

SOARES, V. A; KUS, M. M. M; PEIXOTO, A. L. C; CARROCI, J. S; SALAZAR, R. F. S; IZÁRIO, H. J. V. Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraíba region (Brazil). *Food Control*, v. 21, n. 1, 45-49, 2010.

THANDAVANA, K; GANDHI, S; NESAKUMAR, N; SETHURAMANA, S; RAYAPPANA, J. B.B; KRISHNANA, U. M. Hydrogen peroxide biosensor utilizing a hybrid nano-interface of iron oxide nanoparticles and carbon nanotubes to assess the quality of milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 215, 166-173, 2015.

TOMASZEWSKA-GRAS, J. DSC Coupled with PCA as a Tool for Butter Authenticity Assessment. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 126, 61-68, 2016. DOI 10.1007/s10973-016-5346-5.

TOMASZEWSKA-GRAS, J. Rapid quantitative determination of butter adulteration with palm oil using DSC technique. *Food Control*, 60, 629-635, 2016.

TRONCO, V.M. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. Santa Maria: Editora UFSM, 3º ed., 2008. 203p.

UPADHYAY, N; GOYAL, A; KUMAR, A; LAL, D. Detection of adulteration by caprine body fat and mixtures of caprine body fat and groundnut oil in bovine and buffalo ghee using differential scanning calorimetry. *International Journal of Dairy Technology*, 69, p.1-7, 2016.

VALENTE, G. F. S; GUIMARÃES, D. C; GASPARDI, A. L. A; OLIVEIRA, L. A; Aplicação de redes neurais artificiais comoteste de detecção de fraude de leite por adição de soro de queijo. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 69, n. 6, p. 425-432, 2014. DOI: 10.14295/2238-6416.v69i6.353

WANDERLEY, C. H; SILVA, A. C. O; SILVA, F. M. R; MÁRSICO, E. T; CONTE JUNIOR, C. A. Avaliação da Sensibilidade de Métodos Analíticos Para Verificar Fraude em Leite Fluido. Rev. de Ci. Vida, v. 33, n. 1, 54-63, 2013.

YILDIZ, O; UNLUTURK. Differential scanning calorimetry as a tool to detect antibiotic residues in ultra high temperature whole milk International. Journal of Food Science and Technology 44, 2577–2582, 2009.