



Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Campus Rio de Janeiro

Pablo Tavares Coimbra

**Detecção de formaldeído em leite usando a ressonância magnética de baixo campo e
quimiometria**

Rio de Janeiro, RJ

2017

Pablo Tavares Coimbra

**Detecção de formaldeído em leite usando a ressonância magnética de baixo campo e
quimiometria**

Trabalho de Dissertação de
Mestrado apresentado como parte
dos requisitos necessários para a
obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Co-orientadora: Prof. Dra. Marcia Cristina da Silva

Rio de Janeiro, RJ

2017

A minha Mãe Valcira e Avós Maria do Carmo e Jacira por serem exemplo de luta, fibra moral e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Olorum criador do universo e a Deusa Mãe, Irmã e Amiga pela dádiva de ser um operário do bem e estar sempre sendo amparado por toda legião de luz dos arcanjos, elementais da terra, fogo, ar e água somados as todas as criaturas celestes.

Momisy Valcira por estar ao meu lado sempre me amparando desde a mais tenra infância dedicando sua vida e amor incondicional na minha transformação em um homem de bem e que olha o mundo com os olhos cheios de amor. Te Amo, mãe!

Vovisy Maria do Carmo (*in memorian*) que sempre estará viva no meu coração, através das suas mãos e coração de ouro o vento e raio de Iansã estão eternizados na minha alma. Seu congá estará sempre em segurança e levaremos a bandeira branca do tempo até do dia do nosso reencontro na pátria espiritual.

Vovó Jacira obrigado pelas orações e carinho sem precedentes. Através da sua honestidade, resignação e gratidão tenho em você um exemplo a seguir e sempre você será avó mais linda do seu neto.

Meu irmão Diego, Tia Barbara, minhas irmãs Lélia e Liliane, meu afilhado Tainã, minha afilhada Stephanie, meu sobrinho Davi e cunhada Gisele pelo apoio e carinho. Juntos somos mais fortes!

Meus Tios Vaninho, Vilson e Valmir por serem exemplos de homens e pais a serem seguidos, que não esmorecerem diante das dificuldades da vida.

Minha grande amiga, irmã e comadre Lorena sua amizade e palavras são fundamentais. Sou imensamente agraciado em poder dividir nessa existência os grandes momentos da sua vida. Divido com você cada vitória, pois sabemos o quanto lutamos para alcançar nossos objetivos.

Meus amigos Camilla e Diogo mesmo separados por um oceano e muitos quilômetros de distância nossa amizade continua forte e sempre que nos falamos sinto o abraço e a presença de vocês. Vamos ficar velhinhos relembando nossas histórias e cuidando um do outro.

Minha amiga Claudia (Coração) sem sua dedicação, amizade e carinho essa vitória não seria possível. Nossa amizade torna tudo mais leve e não esqueça que um dia nossas conversas poderão aparecer no telão celestial.

Rodrigo e Paulo meus grandes irmãos de caminhada e coração. Vocês são peças fundamentais da minha vida. Que toda essa união, carinho e preocupação com outro sejam eternas. Abençoado seja o intercâmbio e essa Bahia que amo tanto!

Minha grande amiga Jéssica pelo apoio e cumplicidade durante o período em que fomos colegas de trabalho e de curso de mestrado profissional. Admiro você pela grandiosidade e excelência em tudo o que você faz.

Meu amigo Jefferson ou Padrinho Mágico obrigado por se mostrar um grande amigo sempre me apoiando nos estudos e estando presente em momentos em que celebramos juntos os bons

momentos da vida. Além disso, você é fonte de inspiração pelo professor e profissional dedicado.

A minha eterna Malvada Favorita, Professora, Fada Madrinha e Deusa Michele Feitoza. Você é fonte de inspiração e exemplo de profissional. Tenho certeza de que nossa amizade vem de muitas outras vidas. Obrigado por ser um ponto de luz no meu caminho!

As meninas da minha turma de Residência Multiprofissional em Vigilância Sanitária pelo apoio e carinho para comigo. Sophia, Gleice, Paulinha, Vanessinha, Gabi, Nathalia, Thaiz, Luiza, Monique e Tainá e Laís.

Aos meus amigos, colegas e conhecidos que torcem pela minha vitória e realização profissional o meu mais sincero obrigado.

Ao Professor Dr. Adriano Gomes da Cruz por ser exemplo de dedicação e profissionalismo. Seu domínio sobre o conteúdo e a oportunidade dada para o meu crescimento pessoal e profissional nunca serão esquecidos. Serei eternamente grato e um eterno aluno seu.

A Professora Dra Márcia Cristina da Silva pela doce presença e ensinamentos nas disciplinas. O amor como você conduz seu trabalho, família e amizades são encantadores. Muito obrigado por tudo durante esse período em que fui aluno do mestrado.

A Professora Dra Maria Inês Bruno Tavares e ao DSc Roberto Pinto Cucinelli Neto do Instituto de Macromoléculas Heloísa Mano que me auxiliaram na realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear de Baixo Campo, na retirada de dúvidas e conhecimentos compartilhados.

Aos Professores Dr. Daniel Pais Pires Vieira e Dr. Clenilson da Silva Sousa Junior da banca examinadora por dedicar seu tempo precioso para ler, corrigir e avaliar minha dissertação. Vossa presença nesse processo é fundamental. Deixo aqui registrado a minha eterna gratidão.

“Vontade pura, desaliviada da ânsia de resultado, é de todo perfeita.”

(Aleister Crowley)

Coimbra, P.T. Detecção de formaldeído em leite usando a ressonância magnética de baixo campo. 60 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

RESUMO

A adulteração em alimentos é um tópico de extrema importância que com o aumento da fiscalização tornou-se um conceito de saúde pública e de segurança de alimentos nos últimos anos. O uso do intencional de formaldeído é ilegal, porém ele é adicionado ao leite cru com o objetivo de aumentar o tempo de vida comercial à temperatura ambiente. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo é uma poderosa técnica no controle de qualidade de leite sendo extremamente viável para checar a autenticidade do alimento. O objetivo desse trabalho é analisar leite bovino adulterado com formaldeído em RMN de baixo campo combinado à análise colorimétrica, para assim, correlacionar duas análises através de técnicas quimiométricas. Foi observada uma separação visível de fases nas amostras a partir de 2,5% de formaldeído. Consequentemente, o conteúdo de água livre aumentou, gerando um tempo de relaxação transversal maior em relação ao leite não adulterado. O índice de brancura e a luminosidade diminuíram devido a separação de fases nas concentrações acima de 12,25% que leva a coagulação das proteínas e predominância do soro na superfície gerando valores baixos pela perda do aspecto homogêneo. Já o índice de amarelecimento apresentou aumento de acordo com o aumento da concentração de formol. O teste SIMCA obteve resultados iguais a 1.0 tanto para amostras controle como as adulteradas tanto na autenticação do modelo como no nível de adulteração. Nas análises de PLS pode-se observar que ocorreu uma maior contribuição dos componentes no tempo zero tendo um índice de habilidade preditiva maior. O tempo de relaxação transversal apresentou os maiores valores de variável de importância de projeção (VIP) devido às modificações na mobilidade da água e gordura durante a coagulação que levaram a separação de fases e as modificações nos tempos de relaxação transversal. Nossos resultados sugerem que é possível relacionar o aumento da concentração de formaldeído no leite adulterado em ambas as técnicas analíticas utilizadas Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo e análise colorimétricas.

Palavras-chave: leite, adulteração, RMN de baixo campo, formaldeído, quimiometria

Coimbra, P.T. Detecção de formaldeído em leite usando a ressonância magnética de baixo campo. 60 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

ABSTRACT

Food adulteration is a topic of extreme importance that with increased surveillance has become a concept of public health and food safety in recent years. The intentional use of formaldehyde is illegal, but it is added to raw milk in order to increase the commercial shelf life at room temperature. Low field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a powerful technique in milk quality control being extremely feasible to check the authenticity of the food. The objective of this work is to analyze bovine milk adulterated with formaldehyde in low field NMR combined with colorimetric analysis, in order to correlate two analyzes through chemometric techniques. A visible phase separation in the samples was observed from 2.5% formaldehyde. Consequently, the free water content increased, resulting in a greater transverse relaxation time relative to the unadulterated milk. The whiteness index and brightness decreased due to phase separation at concentrations above 12.25% which leads to protein coagulation and surface predominance of serum generating low values due to loss of homogeneous appearance. The yellowing index increased as the formalin concentration increased. The SIMCA test obtained results equal to 1.0 for both control and adulterated samples in both the model authentication and the adulteration level. In the PLS analyzes it can be observed that a greater contribution of the components occurred in the 0 hour time having a higher predictive ability index. The transversal relaxation time presented the highest values of variable of importance of projection (VIP) due to the modifications in the mobility of water and fat during the coagulation that led to the phase separation and the modifications in the times of transversal relaxation. Our results suggest that it is possible to relate the increase of the formaldehyde concentration in the adulterated milk in both analytical techniques using low field Nuclear Magnetic Resonance and colorimetric analysis.

Keywords: milk, adulteration, low field NMR, formaldehyde, chemometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Conversão do metanol em formaldeído pela enzima álcool desidrogenase	2
Figura 2	Fórmula Estrutural Formaldeído	9
Figura 3	Fórmula Estrutural Peróxido de Hidrogênio	10
Figura 4	Fórmula Estrutural Ácido Salicílico	10
Figura 5	Fórmula Estrutural Ácido Bórico	11
Figura 6	Fórmula Estrutural Ácido Benzóico	11
Figura 7	Fórmula Estrutural Ureia	13
Figura 8	Fórmula Estrutural Melamina	14
Figura 9	Esquema do Espectrômetro de RMN	23
Figura 10	Fenômeno de Relaxação Longitudinal T_1 e Transversal T_2	24
Figura 11	Gráfico de relação entre os valores de $1/T_2$ e o percentual de formaldeído das amostras de leite adulterado	36
Figura 12	Componentes Principais de Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Baixo Campo com dados de leite cru adicionado de diferentes concentrações de formol (a) 0 hora (b) 48 horas. WI – Índice de Brancura (variável suplementar)	40-41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Definições dos Tipos de Adulteração	4
Quadro 2	Resultado de análise realizada em leite coletado em escolas de rede pública e particular em Faisalabad no Paquistão	18
Quadro 3	Tempos de relaxação obtidos através da análise em RMN de leite adulterado com formol no intervalo de 0 hora	34
Quadro 4	Tempos de relaxação obtidos através da análise em RMN de leite adulterado com formol 48 horas após adição de formaldeído	35
Quadro 5	Parâmetros de cor em leite cru refrigerado adulterado com diferentes concentrações de formaldeído nos tempos de 0 hora e 48 horas	38
Quadro 6	Valores de a^* e b^* em leite cru refrigerado adulterado com diferentes concentrações de formol nos tempos de 0 hora e 48 horas	39
Quadro 7	Variáveis de importância em projeção dos tempos de relaxação obtidos nas análises de 0 hora e 48 horas	42
Quadro 8	Q^2 , R^2Y e R^2X acumulados obtidos com a regressão de quadrados mínimos parciais das amostras adulteradas em 0 hora.	44
Quadro 9	Q^2 , R^2Y e R^2X acumulados obtidos com a regressão de quadrados mínimos parciais das amostras adulteradas em 48 horas	44
Quadro 10	Poder de Modelagem dos parâmetros de Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo	45
Quadro 11	Poder Discriminante dos parâmetros de Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo	46
Quadro 12	Sensibilidade e Especificidade do SIMCA	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	Álcool Desidrogenase
CRA	Capacidade de Retenção de Água
DEHP	Ftalato de di-(2-etilexila)
DLI	Decaimento de Livre Indução
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
FDA	Food and Drug Administration
FSSAI	Food Safety and Standards Authority of India
IA	Índice de Amarelecimento
IARC	International Agency for Research on Cancer
IB	Índice de Brancura
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
PLRS	Partial Least Regression Squares
Q ²	Índice de habilidade preditiva
R ² X	Qualidade do Ajuste do Modelo da Variável X
R ² Y	Qualidade do Ajuste do Modelo da Variável Y
RMI	Ressonância Magnética de Imagem
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SIMCA	Soft Independent modeling of class analogies
T	Tempo de Relaxação
USP	United States Pharmacopeia
VIP	Variante de importância de Projeção
WI	Whiteness Index
YI	Yellowness Index

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1 ADULTERAÇÃO EM ALIMENTOS	3
2.2 ADULTERANTES EM LEITE	7
2.2.1 Adição de conservantes	8
2.2.1.1 Formaldeído	8
2.2.1.2 Peróxido de Hidrogênio	9
2.2.1.3 Ácido Salicílico	9
2.2.1.4 Ácido Bórico	10
2.2.1.5 Ácido Benzóico	10
2.2.2 Adição de água	11
2.2.3 Desnate	11
2.2.4 Adição de Alcalinos	11
2.2.5 Adição de Reconstituintes	12
2.2.5.1 Óleo Vegetal	12
2.2.5.2 Ureia	12
2.2.5.3 Melamina	13
2.2.5.4 Sulfato de Amônio	13
2.2.5.5 Açúcar e Amido	13
2.2.6 Adição de Soro de Queijo	14
2.2.7 Resíduos de Sanitização	14
2.3 LEITE – CASOS DE ADULTERAÇÃO	15
2.3.1 Índia	16
2.3.2 Paquistão	17
2.3.3 China	18
2.3.4 Brasil	21
2.4 RMN DE BAIXO CAMPO	23
2.4.1 RMN de Baixo Campo e Aplicabilidade	26
2.4.2 RMN de Baixo Campo e Adulteração em Alimentos	27

2.4.3 RMN de Baixo Campo e Produtos Lácteos	29
3 OBJETIVO	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Amostras	32
4.2 Determinação Cor Instrumental	32
4.3 Ressonância Magnética nuclear de baixo campo	33
4.4 Análises Estatísticas	33
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	35
5.1 Ressonância Magnética nuclear de baixo campo	35
5.2 Determinação Cor Instrumental	38
5.3 Análise de Componente Principal (PCA)	42
5.4 Regressão de Quadrados Mínimos Parciais (PLRS)	44
5.5 <i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i> (SIMCA)	47
6 CONCLUSÃO	50
7 REFERÊNCIAS	51

1. Introdução

A fraude em alimentos é um tópico de extrema importância e com o aumento da fiscalização tornou-se uma questão de saúde pública e de segurança de alimentos nos últimos anos (Spink & Moyer, 2011). Também, tornou-se um tópico de extrema importância na indústria de alimentos devido às perdas financeiras substanciais e aos riscos para a saúde humana. Dentre os tipos de fraude podemos citar: Adulteração, falsificação e rotulagem incorreta. (Handford *et al*,2016).

Relatos desse tipo de ação são datados desde o Império romano quando o vinho era adulterado com água, adoçantes e corantes. Naquela época, porém, a atividade era limitada a um espaço geográfico restrito (Armstrong, 2009; Spink & Moyer,2011). Devido a constante expansão e ao aumento da complexidade da cadeia de distribuição de alimentos mundial, tais práticas intensificaram o risco de fraude em alimentos para toda a população mundial. Portanto tendo maior impacto na proteção da saúde do consumidor (Moore *et al*, 2012).

Adulteração de alimentos é um termo que está inserido no conceito de fraude. Pois um alimento adulterado é aquele que pode estar deteriorado ou intencionalmente alterado devido à adição de uma substância química exógena, ou seja, o adulterante (Handford *et al*,2016).

O leite bovino, por definição, é uma mistura complexa composta de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e outros componentes oriundos de síntese celular secretada pela glândula mamária bovina (Damodaran, Parkin & Fennema, 2010). Sendo assim o leite contém todos os macro e micronutrientes importantes para manter a saúde e vida dos lactentes e infantes, assim como adicionando qualidade à dieta humana como um todo (Konuspayeva *et al*,2009; Medhammer *et al*, 2011). Os derivados lácteos são constituintes importantes da alimentação de grande parte da população mundial.

Segundo Moore e colaboradores (2012), ao analisar a Farmacopeia Americana (USP, 2015) no Banco de dados da convenção de fraudes em alimentos. Eles determinaram os 25 alimentos com maior tendência a sofrer fraude. O azeite de oliva encontra-se na primeira posição com 16% dos dados coletados entre 1980 e 2010 e em segundo lugar o leite com 14%.

A alta oferta de nutrientes torna o leite cru susceptível a ação de microrganismos deteriorantes, patogênicos ou não, que levam a mudança dos seus componentes e principalmente características físico-químicas (como por exemplo, pH), promovendo alteração da qualidade quando demora a ocorrer quando respeitada a cadeia de frio. A

adulteração visa mascarar essas transformações ocorridas no leite cru através da adição de compostos químicos oferecendo variados riscos para a saúde do consumidor (Singh & Gandhi, 2015).

O formaldeído é um gás produzido mundialmente, em grande escala, a partir do metanol. Em sua forma líquida (misturado à água e álcool) é chamado de formalina ou formol – solução aquosa: 37 a 50% de formaldeído e 6 a 15% de metanol que tem função de estabilizante (IARC, 2004).

O uso intencional de formaldeído é ilegal, porém ele é adicionado ao leite cru com o objetivo de aumentar o tempo de vida de prateleira em temperatura ambiente (Singh & Fox, 2015). Devido às suas propriedades tóxicas em baixas concentrações e ser classificado como carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer, o formaldeído não deve ser adicionado ao leite (IARC, 2004; Singh & Fox, 2015).

A ingestão de formaldeído pode causar infecções agudas, irritação a pele, dermatite, dor de cabeça, tonturas, lacrimação, tosse e espirros. Já uma exposição a altas concentrações provoca conjuntivite, distúrbios nasais e laríngeos, espasmos na laringe e edema pulmonar. Entretanto os últimos efeitos citados são praticamente improváveis na quantidade presente nos leites adulterados (Tang *et al*, 2009; Gwin *et al*, 2010).

A aplicação de Ressonância Magnética Nuclear em baixo campo na ciência dos alimentos tem sido amplamente investigada ao longo dos anos pelo fato de não exigir preparo da amostra, ser uma medida simples e rápida, ter estabilidade instrumental e não destruir a amostra. Sendo assim conferindo informações sobre atributos sensoriais, reológicos e de estágios de amadurecimento ou de degradação (SANTOS *et al*, 2015).

O RMN H^1 de baixo campo fornece informações preciosas sobre a água ligada, a água livre e a transição entre esses dois estados. Sendo utilizada para avaliar a capacidade de retenção de água (CRA) e mudanças no aspecto durante e transformação de músculo em carne, cozimento e congelamento. Demonstrando assim ser uma poderosa técnica no controle de qualidade de leite e de queijo sendo extremamente viável para checar a autenticidade do alimento ao conseguir identificar a presença de água da torneira, soro de leite, uréia e peróxido de hidrogênio quando adicionado ao leite (RIBEIRO *et al*, 2014).

2. Revisão de Literatura

2.1. Adulteração de Alimentos

A adulteração em alimentos é conhecida desde o início da civilização tanto pela diminuição da qualidade em si dos alimentos como pelo impacto negativo sobre a saúde humana. Os conceitos atuais em segurança de alimentos e de assuntos regulatórios em alimentos unidos às mais variadas técnicas físicas, bioquímicas, imunológicas estão sendo utilizados para a pesquisa de adulterantes em alimentos. Entidades sanitárias, produtores, revendedores e consumidores tem interesse na obtenção de um alimento seguro com procedência conhecida, autênticos e de alta qualidade (Handford, Campbell & Elliot, 2015). Os alimentos adulterados são um tópico atual e de extrema importância, pois a sua ocorrência leva a riscos para a saúde pública e vai de encontro ao conceito de alimento seguro, ou seja, livre de contaminantes físicos, químicos e biológicos.

Quadro 1. Definições dos Tipos de Adulteração

Tipos de Adulteração	
Falsificação	Todos os aspectos do produto em si foram totalmente replicados ou a embalagem do produto original é utilizada, porém o seu conteúdo não é original.
Desvio\Roubo	Venda ou distribuição de produto original fora das condições nas quais deveria ser comercializado.
Excesso	Produção de quantidade superior em relação a que foi aprovado para o processo
Simulação	Embalagem modificada do produto para parecer com o produto original.
Sabotagem, envenenamento ou bioterrorismo	Adição intencional de substâncias tóxicas ou microorganismos patogênicos para realizar ameaças ou mortes usando alimentos.

Indução ao engano	Nesse caso o uso de palavras como natural e tradicional ou uso de figuras que não correspondem ao produto dentro da embalagem
Tamanho da embalagem	Uso de uma embalagem muito maior que o conteúdo

Fontes: (Croall, 2009; Spink & Moyer, 2011; BRC, 2015)

A adulteração é um dos tipos de fraude em alimentos é um termo amplo no qual também são contemplados: Falsificação onde todos os aspectos do produto em si e da rotulagem foram totalmente replicados ou a embalagem do produto legítimo é utilizado, porém o seu conteúdo original não está presente; Desvio nesse caso ocorre à venda ou distribuição de um produto legítimo fora das condições ou mercado onde deveria estar sendo comercializado; Simulação produto não legítimo tem sua embalagem modificada para parecer mas não é uma cópia exata do produto legítimo; Roubo onde o produto original roubado é comercializado; Sabotagem, envenenamento ou bioterrorismo adulteração intencional para causar ameaça, medo ou assassinato usando alimentos; Indução ao engano nesse caso o uso de palavras como natural e tradicional ou uso de figuras que não correspondem ao produto dentro da embalagem; Tamanho da embalagem uso de uma embalagem muito maior que o conteúdo (Spink & Moyer,2011) (BRC, 2015) (Croall,2009).

A adulteração de alimentos no Brasil é considerada uma infração à legislação sanitária federal segundo a Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977 onde no artigo 10 onde estão às definições das infrações sanitárias, no parágrafo XXVIII “[...] *fraudar, falsificar ou adulterar alimentos, inclusive bebidas, medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, dietéticos, saneantes e quaisquer outros que interessem à saúde pública: pena - advertência, apreensão, inutilização e/ou interdição do produto, suspensão de venda e/ou fabricação do produto, cancelamento do registro do produto, interdição parcial ou total do estabelecimento, cancelamento de autorização para o funcionamento da empresa, cancelamento do alvará de licenciamento do estabelecimento e/ou multa [...]*” (Brasil, 1977).

De acordo com Ato Federal nos Estados Unidos da América para alimentos, drogas e cosméticos, seção do ato 342 (*U.S. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act Section 342*) a

primeira lei voltada para alimento seguro da *Food and Drug Administration* os alimentos podem ser considerados adulterados quando: a substância adicionada for prejudicial à saúde, utilizar ingrediente barato ou de qualidade inferior, ter algum constituinte de alto valor agregado retirado, apresentar índices de qualidade abaixo do padrão, adição de qualquer substância para aumentar peso ou volume, para aumentar o retorno econômico. Os alimentos adulterados podem causar efeito tóxico ou nocivo para a saúde, diminuir a biodisponibilidade de nutrientes presentes no alimento e levar a quadros de intoxicação ou de alergia em indivíduos sensíveis as substâncias utilizadas como adulterantes (Bansal, Singh, Mangal, Mangal & Kumar,2015).

A adulteração é uso de substâncias desnecessárias, perigosas, sem função nutricional nos alimentos levando a diminuição e/ou perda da qualidade. Pode ser dividida em quatro categorias: Adulteração intencional caracteriza-se pela inclusão de substâncias economicamente inferiores que tem propriedades similares ao alimento aos quais foram adicionadas, são de difícil detecção. Pois o adulterante tem origem química ou biológica semelhante ao alimento original como, por exemplo, a adição de água ao leite “aguagem”, matérias estranhas em temperos e remoção e substituição de sólidos gordurosos e não gordurosos no leite. Adição não intencional ocorre quando há inclusão de substâncias que não deveriam estar presentes devido à falta de higiene durante o processo, falta de cuidado ou imperícia podemos ter como exemplo contaminação, consumo do alimento por roedores, poeira, resíduos em recipientes de armazenamento. Também podemos citar a contaminação metálica através da adição intencional ou não de metais pesados e a contaminação microbiológica na qual o alimento sofre deterioração por microorganismos de diferentes origens durante seu processamento como: colheita, armazenamento, produção, distribuição, transporte e preparação (Bansal, Singh, Mangal, Mangal & Kumar, 2015).

Grande parte dos casos de adulteração em alimentos não causaram danos à saúde pública. Entretanto temos algumas exceções como o caso da melamina em leite em pó desnatado (Gossner *et al*, 2009), uso de tinta em pó Sudão I em temperos (Stiborová, Martínek, Rýdlová, Hodek & Frei, 2002), o uso de agentes plastificantes Bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP) como agentes clarificantes em alimentos e bebidas (Yang, Hauser & Goldman, 2013), escândalo *horsegate* no Reino Unido (Elliott, 2014) e adição em suco de laranja de açúcares, sucos de frutas provenientes de outras regiões, suco reconstituído ou com suco de *grapefruit* que nesse último caso pode causar interações medicamentosas graves (Goodacre *et al*, 2016). Os mais diferentes tipos de fraude geram os mais variados ganhos financeiros, independente de quão refinada for a fraude que tenha sido realizada e se ocorrer a

detecção poderá ocorrer a investigação da mesma num sentido mais amplo de crime em alimentos.

O *US Food and Drug Administration* (FDA) definiu o termo Adulteração Economicamente Motivada (AEM) como um ato fraudulento, substituição intencional ou adição de substância em produtos com o intuito de aumentar a quantidade do produto e reduzir seu custo de produção. Esse tipo de fraude consiste em adicionar ao alimento qualquer material de grau inferior acidentalmente ou não, sendo assim é de extrema importância que os órgãos reguladores mantenham a fiscalização sobre os alimentos mais suscetíveis como leite, azeite e suco de frutas (Spink & Moyer, 2011).

A Contaminação acidental ou intencional ocorre particularmente quando os agricultores ou produtores não estão conscientes do conjunto de circunstâncias que podem levar à contaminação dos alimentos. No entanto, quando a adulteração de alimentos se caracteriza como intencional, isto é, quando fatores econômicos impulsionam a prática ela se torna crime. Práticas deliberadas do uso de ingredientes de alimentos e medicamentos contaminados são encontradas em mercados com aspectos regulatórios fracos e atuação mínima ou inexistente de vigilância sanitária. Na China, por exemplo, existem mais de 500.000 empresas de processamento de alimentos com margens de lucro baixo levou a alguns proprietários a cortar custos através da substituição de ingredientes de alto custo por outros de baixo custo (Zach, Doyle, Bier & Czuprynski, 2012). Entre essas substituições podemos citar a diluição de fórmula infantil (Xiu & Klein 2010), utilização de dietilenoglicol como um substituto para a glicerina (US FDA, 2008), utilização de corantes vermelhos ilegais em ovos de pato (Du & Sun, 2007) e reetiquetagem de frutos do mar (D'Amico, Armani, Castigliero, Sheng, Gianfaldoni, & Guidi, 2014).

No âmbito legislativo brasileiro a adulteração responde ao Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940 do Código Penal que foi alterada pela Lei Nº 9.677, de 2 de julho de 1998 alterando os dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências como o Artigo. 1º Os dispositivos a seguir indicados do Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940 - Código Penal, passam a vigorar com a seguinte redação: "[...] *Falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de substância ou produtos alimentícios* [...]". "[...] *Art. 272. Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substância ou produto alimentício destinado a consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo*[...]" "[...] *Pena - reclusão, de 4 (quatro) a 8 (oito) anos, e multa.*[...] "(NR) "[...] § 1º-A. *Incorre nas penas deste artigo quem fabrica, vende, expõe à venda, importa, tem em*

depósito para vender ou, de qualquer forma, distribui ou entrega a consumo a substância alimentícia ou o produto falsificado, corrompido ou adulterado. [...] ""[...] § 1º Está sujeito às mesmas penas quem pratica as ações previstas neste artigo em relação a bebidas, com ou sem teor alcoólico[...]." "[...] Modalidade culposa"§ 2º *Se o crime é culposo: Pena - detenção, de 1 (um) a 2 (dois) anos, e multa [...]"* (Brasil, 1940) (Brasil,1998).

A Lei N° 8.137/90, capítulo II, Dos Crimes Contra Economia e as Relações de Consumo: “[...] Art. Artigo VII, parágrafo II, *vender ou expor à venda mercadoria cuja embalagem, tipo, especificação, peso ou composição esteja em desacordo com as prescrições legais ou que não corresponda à respectiva classificação oficial [...]*”. O Código de Defesa do Consumidor, Lei N° 8.078/90, capítulo IV, da Qualidade de Produtos e Serviços, da Prevenção e Reparação dos Danos, Seção I, da proteção à saúde e segurança: “[...] Art. 8 - *os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não acarretarão risco à saúde ou segurança dos consumidores exceto os considerados normais e previsíveis em decorrência de sua natureza e fruição, obrigando-se os fornecedores, em qualquer hipótese, a fornecer informações necessárias e adequadas a seu respeito [...]*”; “[...] Art. 18 § 6º - *São impróprios ao uso e consumo: II – os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados,falsificados, corrompidos, fraudados, nocivo á vida ou à saúde, perigosos, ou ainda, aqueles em desacordo comas normas regulamentares de fabricação, distribuição e apresentação [...]*”; “[...] Art. 39 - *é vedado ao fornecedor de produtos ou serviços, dentre outras práticas abusivas:VIII – colocar no mercado de consumo, qualquer produto ou serviço, em desacordo com as normas expedidas pelos órgãos oficiais competentes [...]*” (Brasil,1990).

2.2. Adulterantes em leite

Os adulterantes em leite possuem uma classificação de acordo com funcionalidades que podem ser: Adição de conservantes, Adição de água, Desnate, Adição de alcalinos, Adição de Reconstituintes, Adição de soro de queijo e Resíduos de sanitização. Há também riscos destas substâncias serem prejudiciais a saúde do consumidor. A adição de adulterantes é uma prática abusiva que lesa os direitos do consumidor e que pode, em casos de consumo prolongado, gerar desnutrição e desenvolvimento de patologias, principalmente em lactentes.

2.2.1. Adição de conservantes

Nesse tipo de adulteração ocorre a adição de formaldeído, peróxido de hidrogênio, ácido bórico e ácido salicílico ao leite pela sua ação conservante paralisa a atividade

microbiana, diminuindo sua proliferação e mascarando as alterações no grau de acidez Dornic (Abrantes, Campêlo & Silva, 2014). Mota e colaboradores (2003) também descreveram a utilização de ácido benzóico como adulterante no leite (Mota, Implvo, Cunha, Beatriz & Oliveira, 2003). Sendo assim, estende o prazo de validade do leite mesmo sem utilizar refrigeração. Uso exclusivo em países em desenvolvimento onde as temperaturas ambientes são mais altas e os recursos para conservação a frio são deficientes (Singh & Gandhi, 2015).

2.2.1.1 Formaldeído

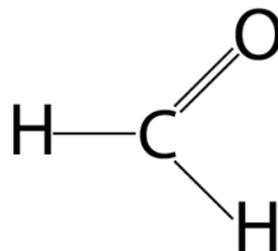


Figura 2: Fórmula Estrutural Formaldeído

Composto químico altamente tóxico que possui como mecanismo de ação a inibição do crescimento bacteriano, já que possui a capacidade de reagir com o grupo amina da proteína celular, produzindo, assim, o efeito letal sobre as bactérias (Davies, 1982). Assim permitindo a manutenção do leite sobre condição de conservação ruim ou ausente (Afzal, Mahmood, Hussain, Akhtar, 2011).

O metanol utilizado na solução para estabilizar o formaldeído também oferece riscos, pois sofre biotransformação no corpo humano sendo oxidado a formaldeído numa reação de oxidação de fase I, nos humanos pela enzima álcool desidrogenase (ADH) como ilustrado na Figura 1 (Hardman, Limbird, Molinoff, Ruddon, & Gilman, 1996) A ingestão do mesmo causa acidose metabólica, deficiência visual, disfunções do sistema nervoso central, neurodegeneração e morte. (Zhai, Zheng, Rizak & Hu, 2016). Sendo assim a utilização de formaldeído como adulterante gera riscos tanto pela presença de outra substância química que possui mecanismo de toxidez conhecido.

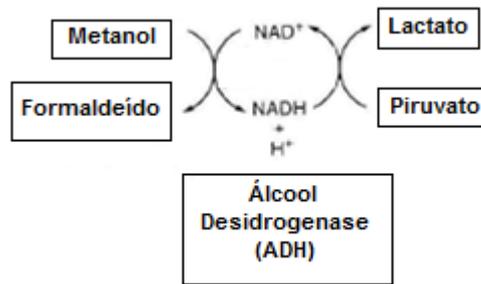


Figura 1: Conversão do metanol em formaldeído pela enzima álcool desidrogenase (Hardman, Limbird, Molinoff, Ruddon & Gilman, 1996)

A ingestão de leite contendo formaldeído pode causar: vômitos, diarreia, diminuição da temperatura corporal, dermatite, alterações de humor, dor abdominal, danos renais e hepáticos, problemas de visão (Tang, Bai, Duong, Smith, Zhang, 2009) (Gwin, Lienert, Kennedy, 2010).

2.2.1.2 Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é comumente encontrado em solução aquosa na forma de água oxigenada a 3% (v/v). Seu mecanismo de ação é baseado na ação da enzima catalase existente nas bactérias e no próprio leite que levam a produção de oxigênio (Huger, 1983). Quando utilizados no leite podem causar náuseas, vômitos, gastrite e letargia. (Afzal, Mahmood, Hussain, Akhtar, 2011) (Singuluri & Sukumaran, 2014).

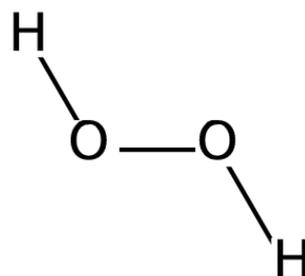


Figura 3: Fórmula Estrutural Peróxido de Hidrogênio

2.2.1.3 Ácido Salicílico

O ácido salicílico quando adicionado ao leite e o mesmo é consumido pode causar irritação gástrica, sangramento, diarreia e em casos graves de intoxicação podem resultar em

morte. Crianças menores de três anos de idade possuem mucosas extremamente sensíveis à substâncias irritantes (Singh & Gandhi, 2015).

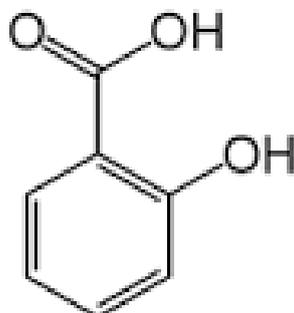


Figura 4: Fórmula Estrutural Ácido Salicílico

2.2.1.4 Ácido bórico

A ingestão de leite contendo ácido bórico causa náuseas, vômitos, dor de cabeça, diarreia, grave lesão renal e cólica severa. Devido à imaturidade dos seus órgãos recém-nascidos e crianças estão mais propensos aos seus efeitos tóxicos. Pois em doses muito mais baixas causa maiores problemas para crianças em comparação com adultos (See, Salleh, Bakar, Yusof, Abdulmir & Heng, 2010).

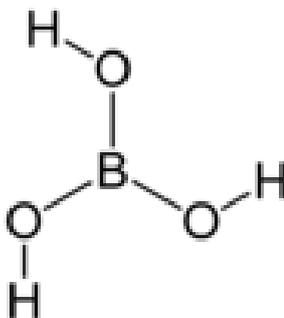


Figura 5: Fórmula Estrutural Ácido Bórico

2.2.1.5 Ácido Benzoico

Qi e colaboradores encontraram ácido benzoico em amostras de leite na China (Qi, Hong, Liang & Liu, 2009). Os problemas gerados para a saúde são náuseas, dor de cabeça, asma, urticária, hiperatividade e transtornos comportamentais em crianças (Singh & Gandhi, 2015). Indivíduos alérgicos, particularmente aqueles com asma e crianças mais suscetíveis a

distúrbios comportamentais são mais sensíveis (Barham, Khaskheli, Soomro & Nizamani, 2014).

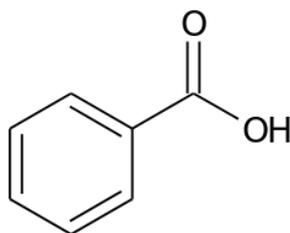


Figura 6: Fórmula Estrutural Ácido Benzoico

2.2.2. Adição de água

No Brasil, a adição de água é a principal fraude detectada no leite que tem como objetivo aumentar seu volume. A adição de água no leite reduz de forma significativa o seu valor nutritivo, este procedimento prejudica a qualidade microbiológica do produto. A adição de água no leite é detectada pela interpretação dos valores obtidos no índice crioscópico que são mais altos e os de densidade que ficam reduzidos (Abrantes, Campêlo & Silva, 2014). Lactentes e crianças de países em desenvolvimento que possuem como fonte principal de nutrição o leite estão entre as mais vulneráveis a esse tipo de adulteração devido à diminuição do valor nutricional (Barham, Khaskheli, Soomro & Nizamani, 2014).

2.2.3. Desnate

O desnate é a retirada da gordura na propriedade rural sendo um dos possíveis fatores que podem afetar a porcentagem da gordura no leite. A determinação de gordura é também um dos meios utilizados para verificar fraude em leite. Silva e colaboradores (2008) em pesquisa com leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado Alagoas, utilizando métodos convencionais, constataram que 112 (32 %) amostras analisadas quanto ao teor de gordura não atenderam aos padrões físico-químicos (Silva, Silva, Ramos, Melo & Oliveira, 2008) segundo a legislação vigente no período (Brasil, 2002).

2.2.4. Adição de Alcalinos

A adição de hidróxido de sódio, carbonatos e bicarbonatos é considerada uma adulteração intencional no leite no intuito de aumentar de conservação, mascarando os

valores de acidez do leite mal conservado. A ingestão de leite pode causar vômitos e diarreia em quem consumir o leite (Singuluri & Sukumaran, 2014).

A adição de hidróxido de sódio no leite nos casos mais graves pode causar vômitos, queimaduras nos lábios, língua e irritar a mucosa do esôfago (Mordjikian, 2001). Lactentes e crianças jovens que possuem o leite como sua principal fonte de alimentação, são mais susceptíveis a danos do esôfago (Ryan, Witherow, Mirza & Ayliffe, 2006).

2.2.5. Adição de Reconstituintes

De acordo com a Instrução Normativa 62 do MAPA, não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia na elaboração do leite. Mesmo que a adição desses elementos não cause problemas de saúde humana, uma vez que não são tóxicos, a legislação não permite sua adição ao leite (Brasil, 2011).

2.2.5.1 Óleo Vegetal

O óleo vegetal é utilizado para substituir a gordura do leite retirada no processo de desnatagem para o produtor aumentar os lucros através da substituição total ou parcial por óleo vegetal (Singh & Gandhi, 2015). O óleo de alguns tipos de oleaginosas podem causar reações alérgicas como: dermatite alérgica, dificuldade para respirar, edema de glote, tosse, vômitos e diarreia, podendo levar a morte indivíduos alérgicos (Sicherer, Burks & Sampson, 1998).

2.2.5.2 Ureia

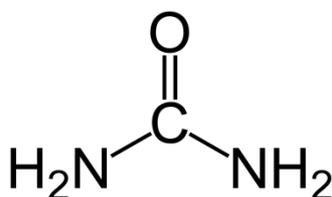


Figura 7: Fórmula Estrutural Ureia

A presença de ureia no leite indica a adição de urina animal ou de ureia pecuária com o objetivo de aumentar o teor de nitrogênio total, mascarando os valores de proteína no leite. A urina é usada para aumentar o volume e, como tem a densidade muito próxima à do leite, a

alteração da mesma é muito pequena (Abrantes, Campêlo & Silva, 2014). Os riscos para a saúde humana são: indigestão, diarreia, acidez estomacal, mau funcionamento dos rins, danos ao trato intestinal e sistema digestivo, úlceras estomacais (Trivedi *et al*, 2009). Problemas de visão em bebês e crianças pequenas especialmente as meninas acelera o processo de puberdade (Bhatt, Singh & Bhatt 2008). Não menos importante é particularmente prejudicial para as mulheres grávidas e os idosos (Kandpal, Srivastava & Negi, 2012).

2.2.5.3 Melamina

A melamina, produto químico industrial é adicionada ao leite para conferir aparentemente os níveis normais de proteína por aumentar o teor de nitrogênio total e assim aumentar os lucros na venda do leite que sofreu processo de aguagem (Xiu & Klein 2010). Na literatura foram relatados casos tóxicos graves de cálculo renal, envenenamentos, hipertensão, edema agudo, insuficiência renal, câncer de bexiga (Hau, Kwan & Li, 2009) e a morte de recém-nascidos e crianças pequenas, devido fórmula infantil ser por muitas vezes sua única forma de nutrição e a imaturidade de seus órgãos. (Sharma & Paradakar, 2010).

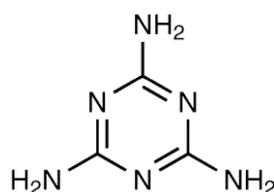


Figura 8: Fórmula Estrutural Melamina

2.2.5.4 Sulfato de Amônio

A adição do sulfato de amônio ao leite aumenta a dosagem indireta do teor de proteína (Singh & Gandhi, 2015). Sua ingestão causa náuseas; vômitos; diarreia; efeitos adversos no trato gastrointestinal, sistema respiratório e pele; distúrbios sensoriais. Bebês e crianças dependentes de leite como é a sua principal fonte de nutrição são as maiores vítimas (Ayub, Ahmed, Abbas, Qasi & Hattak, 2007) (Barham, Khaskheli, Soomro & Nizamani, 2014).

2.2.5.5 Açúcar e Amido

Rosa-Campos e colaboradores (2011) detectaram presença de sacarose em larga escala em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília (Rosa-Campos,

Rocha, Borgo, & Mendonça, 2011). O amido e o açúcar são utilizados criminosamente para encobrir aguagem do leite, aumentando a densidade (Behmer, 1987). Os riscos para a população são o consumo de leite com açúcar por indivíduos diabéticos e pré-diabéticos (Malik, Schulze & Hu, 2006)

2.2.6. Adição de Soro de queijo

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 (tipo A, B, C, esterilizado, etc.) (Abrantes, Campêlo & Silva, 2014).

A legislação brasileira considera fraude a adição de soro de queijo ao leite pasteurizado, esterilizado ou em pó (Brasil, 2011). Entretanto, por estar quase sempre disponível, uma vez que é um subproduto da fabricação de queijos, de custo reduzido ou nulo, torna-se economicamente atrativa a adição de soro de queijo ao leite, prejudicando diretamente o consumidor e os concorrentes que obedecem à legislação, além de incorrer em crimes previstos na legislação. Uma vez que a adição de soro de queijo ao leite compromete a sua qualidade, torna-se imprescindível o controle deste importante alimento distribuído aos consumidores, para sua utilização como se fosse leite puro. No entanto, para uma grande diversidade de outros produtos como leites fermentados, achocolatados, confeitos, panificações e as denominadas bebidas lácteas, o soro de queijo é um ingrediente de uso comum (Abrantes, Campêlo & Silva, 2014).

2.2.7. Resíduos de Sanitização

A presença dessas substâncias pode ocorrer devido a falhas no processo de enxague após utilização de soluções alcalinas e hipoclorito na limpeza de equipamentos, utensílios ou mesmo da própria estrutura física para remoção de gordura do leite ou sanitização.

A adição de detergentes ao leite visa mimetizar a espuma natural formada na superfície do leite (Mudgil & Barak, 2013). Esses casos são comuns em países onde as boas práticas de fabricação e controle de qualidade não são seguidas corretamente (Bhatt, Singh, Bhatt, 2008). Sua ingestão leva a complicações gastrointestinais, hipotensão, doenças respiratórias e câncer (Tay, Fang, Chia & Li, 2013).

2.3. Leite (Casos de Adulteração)

O leite e seus derivados merecem destaque por constituírem um grupo de alimentos de grande valor nutricional, uma vez que são fontes consideráveis de proteínas de alto valor biológico, além de conterem vitaminas e minerais. O consumo habitual desses alimentos é recomendado, principalmente, para que se atinja a adequação diária de ingestão de cálcio, um nutriente que, dentre outras funções, é fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea do organismo (Muniz, Madruga & Araújo, 2013). O alto valor nutricional do mesmo o torna um alimento amplamente consumido, entretanto pelo aumento da sua demanda no mercado a atividade de adulteração do mesmo acabou sendo estimulada (Konuspayeva *et al*, 2009; Medhammer *et al*, 2011).

Nas últimas décadas a produção e o consumo de leite e de laticínios cresceram vertiginosamente em países em desenvolvimento particularmente no Leste e Sudeste da Ásia, porém o nível de consumo ainda é mais baixo do que em países desenvolvidos (FAOSTAT, 2014). A produção de leite em países em desenvolvimento está emparelhada entre o seu crescimento e o consumo. Consequentemente nas últimas três décadas a produção total mundial de leite aumentou cerca de 50% de 500 milhões de toneladas em 1983 de 747 milhões de toneladas em 2013 (FAO, 2015). Em termos de produção mundial a Índia é hoje o maior produtor de leite em todo o mundo (18 %), seguido pelos EUA (12 %), e, em seguida, China e Brasil (Ambos a 4 %) (FAO 2015).

A adulteração em alimentos é um problema que ocorre ao longo da história da humanidade sendo um problema de alcance mundial. Os mais recentes estudos presentes na literatura revelaram que os produtos lácteos de origem bovina e de búfala por serem produzidos em maior escala são comumente fraudados podem ser encontrados em muitas regiões no mundo, entretanto especialmente em países em desenvolvimento são mais observados. Esses casos de fraudes que ocorrem em países em desenvolvimento são intencionais, que acabam sendo favorecido pela falta de punição devida à falta de controle das autoridades sanitárias. Nesse caso ocorre uma diminuição dos benefícios gerados pelos produtos lácteos adulterados e a possibilidade do seu consumo apresente riscos potenciais para a saúde humana (Medhammer *et al*, 2011).

Segundo Moore e colaboradores (2012) ao analisar a Farmacopeia Americana (USP, 2015) no Banco de dados da convenção de fraudes em alimentos determinaram os 25 alimentos com maior tendência a sofrer fraude. O azeite de oliva encontra-se na primeira

posição com 16% dos dados coletados entre 1980 e 2010 e em segundo lugar o leite com 14%.

2.3.1. Índia

Em pesquisa realizada por Bhatt e colaboradores (2008) para detectar a presença de adulterantes prejudiciais no leite. Uma pesquisa foi realizada com 365 crianças e suas respectivas mães entrevistadas em cada domicílio sobre a ingestão de leite. Foram coletadas amostras em cada domicílio visitado e também em 160 mercados, fornecedores e barracas, sendo assim foram realizadas análises para ureia e detergente. Foram detectadas a presença de ureia, detergentes, agrotóxicos e óleo vegetal foram detectados nas amostras de leite. Foram relatados dor de cabeça, problemas de visão e diarreia em todas as faixas etárias da área rural e urbana (1 a 5, 6 a 18 e 19 a 22 anos) que participaram do estudo. No estudo apresentado foi concluído que as crianças do perímetro urbano apresentaram uma porcentagem maior de sintomas relacionados a adulteração do leite citados anteriormente, devido o maior consumo de leite. Em relação aos parâmetros físico- químicos o leite sintético apresentou uma faixa de pH mais baixo ou mais elevado do que o leite não adulterado (Bhatt, Singh & Bhatt, 2008).

Pesquisa realizada pela Autoridade Indiana de Segurança Alimentar (*Food Safety and Standards Authority of India - FSSAI*) em 2012 para determinar a qualidade de leite e identificar os adulterantes presentes em todo o país. Foram recolhidas e analisadas 1791 amostras de leite em 33 estados cerca de 1226 (68,4%) amostras não conseguiram cumprir os padrões da FSSAI. A água é o adulterante mais utilizado em leite na Índia sendo encontrado em 46,8% de amostras em não conformidade, em segundo lugar o leite em pó desnatado em 44,7% das amostras e também foi detectado detergente em amostras de leite, o que indica ausência de higiene nas unidades produtoras (FSSAI, 2012).

Kandpal e colaboradores (2012) coletaram amostras de leite cru para determinar diluição com água ou adição de outras substâncias adulterantes. Sessenta Amostras de leite cru abertas e com nome comercial foram coletadas em cantinas de educação pública lugares e fornecedores de leite. Os principais achados foram: 80% das amostras de leite cru estavam diluídas com água, foi detectada também a presença de ureia e detergentes em todas as amostras. Este estudo demonstrou que são necessárias melhores práticas de higiene durante a produção e cadeia de fornecimento e implementação de regimes de monitorização mais eficazes (Kandpal, Srivastava & Negi, 2012).

Um total de cinquenta amostras de leite foi coletado em instituições educacionais públicas e particulares para pesquisa de adulterantes. Foram encontrados o seguinte percentual de amostras adulteradas: 22% açúcar, 26% para neutralizantes, 32% formaldeído e peróxido de hidrogênio, 44% detergentes, 82% cloreto de sódio e 60% para uréia e 80% para leite em pó desnatado. As amostras em sua maioria estavam em não conformidade com a instituição sanitária vigente na Índia e esse estudo também indica que grande parte dos adulterantes foram adicionados durante o processo de produção do leite (Singuluri & Sukumaran, 2014).

2.3.2. Paquistão

Estudos recentes demonstraram uma grande variedade de adulterantes encontrados que foram adicionados ao leite como, por exemplo, substâncias de baixa qualidade com baixo valor nutricional e substâncias tóxicas. Akhtar num recente trabalho demonstrou a situação no Paquistão, onde 80% do leite vendido embalado ou a granel está adulterado (Akhtar, 2015). Para testar a presença de adulterantes em leite mercado foram recolhidas e analisados 100 amostras de leite *in natura*. Foram detectados em 73% das amostras água; seguido de detergente (32%), açúcar (22%), soda cáustica (20%), e farinha de arroz (17%). O Nível de adulteração encontrado nos estabelecimentos foi: loja de laticínios (4,2%), coletores de leite (3,5%), intermediários (3,2%), processadores (2,5%), e produtores (1,1%). Foi concluído pelos autores que a água foi o adulterante mais comumente encontrado que a adulteração foi mais realizada pelos que comercializam o leite do que os produtores (Barham, Khaskheli, Soomro & Nizamani, 2014). Em outro estudo Barham e colaboradores encontraram essas substâncias nos leites submetidos ao teste detergente (32%), açúcar (22%), soda cáustica (20%), farinha de arroz (17%), cloreto de sódio e leite desnatado (15% cada), peróxido de hidrogênio (13%), amido (12%), formaldeído (11%), e ureia óleo vegetal (10% cada), ácido bórico (8%), sulfato de amônio (6%), glicose (5%), sorbitol (4%), e farinha araruta (1%)

Para investigar diferentes adulterantes e seu impacto sobre as características do leite comercializado foram analisadas um total de 80 amostras de leite cerca de 20 amostras de leite de cada o produtor de leite, leite coletor, vendedor de leite, e lojas de leite da cidade de Badin, Paquistão foram analisadas para vários adulterantes, incluindo a água, leite em pó desnatado, neutralizadores e agentes espessantes. A aguagem foi encontrada nas seguintes porcentagens de amostras, respectivamente para produtores (60%), coletores (53,5%), fornecedores de produtos lácteos (62,7%) e lojas de leite e derivados (56,9%). Nos aspectos físico-químicos as amostras não conseguiram atingir o nível mínimo de gordura exigido

6,1%, assim como o teor de proteína média presente na amostra de leite controle. A utilização de água de procedência desconhecida demonstrou alterações nas características químicas das amostras somente não alterando o seu teor de lactose (Soomro *et al*, 2014).

Estudo realizado por Faraz e colaboradores (2013) coletaram sessenta amostras de leite não transformadas obtidas em cantinas de instituições de ensino particulares e públicas para detecção diferentes adulterantes.

Quadro 2: Resultado de análise realizada em leite coletado em escolas de rede pública e particular em Faisalabad no Paquistão.

Amostras	Rede Particular	Rede Pública
Aguagem	97%	93%
Ureia	63%	87%
Formaldeído	23%	27%
Açúcar	87%	97%
Peróxido de Hidrogênio	-	3%

Fonte: (Faraz, Lateef, Mustafa, Akhtar, Yaqoob & Rehman, 2013).

Segundo a Tabela 2 foram encontradas respectivamente nas escolas particulares e públicas em 97 % e 93% água no do leite como principal adulterante, foi relatado também uréia em 63 % e 87 %, 23 % e 27 % de formaldeído das amostras, açúcar em 87% e 97 % e peróxido de hidrogênio encontrado em 3 % das amostras de locais públicos. Indicativo de falta de higiene e boas práticas foram a presença de terra em 67% das amostras resultando em aumento do resíduo mineral fixo e consequentemente a quantidades de cinzas insolúveis (Faraz, Lateef, Mustafa, Akhtar, Yaqoob & Rehman, 2013).

2.3.3. China

Na China os escândalos envolvendo adulteração de leite são recorrentes envolvendo notórios incidentes com esse alimento. Nas últimas três décadas foi observado um aumento da produção de leite e o consumo de fórmulas infantis. O aleitamento materno é o método mais adequado para a nutrição lactentes e infantes (Gartner, Morton , Lawrence , Naylor , O'Hare & Schanler, 2005). O leite materno contém todos os nutrientes como proteínas,

gorduras e carboidratos necessários para o desenvolvimento do recém nato. Até a metade do século passado a amamentação era obrigatória até no mínimo por 12 meses (Zhao, Niu, Xu, Garrett & Greiner, 2003). A amamentação também é importante no processo de imunização passiva do recém-nato estimulando assim o sistema imunológico do mesmo (Hanson, 1998). Sendo assim o mercado de fórmula infantil era inexistente e não existiam outras alternativas disponíveis. Atualmente a China tornou-se o maior mercado da fórmula infantil no mundo. Um recente relatório mostrou que o consumo desse alimento está crescendo rapidamente, com uma taxa anual de 20% ao ano, a população chinesa consome um quarto da fórmula infantil produzida no mundo (UBIC,2014). A alimentação exclusiva com leite materno tem se tornado escassa pois menos de 30% dos bebês com menos de 6 meses obtiveram essa fonte de nutrição de forma exclusiva numa pesquisa realizada na China central e ocidental. A utilização da fórmula infantil foi uma das razões mais comuns para não somente alimentar o recém-nato com leite materno (Guo , Fu , Scherpbier , Wang , Zhou & Wang, 2010).

Produtores inescrupulosos com objetivo de obter maiores lucros ao observarem essa tendência de mercado começaram a produzir fórmulas lácteas de baixa qualidade gerando uma adulteração economicamente motivada (AEM). Em 2004, cerca de 200 crianças chinesas sofreram de desnutrição grave e 13 morreram depois de terem consumido fórmula infantil, que teve praticamente nenhum valor nutritivo (Handford, Campbell & Elliot, 2015). Esse incidente ficou conhecido como "doença da cabeça grande", por que a cabeça dos bebês tornou-se desproporcional aos seus corpos. Investigação revelou 45 de marcas de leite em pó estavam não conformes e outras 10 falsificadas à venda nos supermercados em Anhui, uma província de China. Embora nos testes não fossem encontradas substâncias tóxicas nos produtos, grande parte delas não cumpriam os padrões nutricionais. Análise de uma fórmula descobriu que continha apenas um sexto da quantidade diária recomendada de proteína e outros nutrientes que são necessários para o crescimento e desenvolvimento adequados dos lactentes, alguns minerais como ferro não estava presente (Handford, Campbell & Elliot, 2015). Os fabricantes e atacadistas da fórmula infantil envolvida foram condenados pela morte de crianças. Devido uma repressão nacional sobre violações do alimento seguro (Grace 2004).

Em 2008 outro escândalo relacionado a leite adulterado veio à tona quando um jornal local divulgou que 14 crianças foram diagnosticadas com cálculo renal. Este surto incomum foi ligado a fórmula infantil contaminada, sendo um dos maiores escândalos relacionado a segurança alimentar da história contemporânea, causando preocupação internacional.

Investigada pelas autoridades locais foi descoberto que a Sanlu® utilizou-se de leite em pó contaminado com melamina, um reagente de uso industrial normalmente utilizado em revestimentos, colas, pratos e utensílios de cozinha (Litao e Seng 2008).

A melamina é altamente nitrogenada e foi adicionada ilegalmente ao leite diluído com água para simular aumento do seu conteúdo proteico (Xiu e Klein 2010). O teor de nitrogênio é rotineiramente utilizado para quantificar os níveis de proteína em leite, portanto, é um indicador de qualidade do leite. Em 11 de setembro de 2008, o governo chinês anunciou um recall da fórmula infantil da Sanlu Dairy Company®, que na época foi um dos maiores produtores de leite da China, porém mais tarde foi pesquisado que a fórmula infantil de 22 empresas de laticínios apresentou melamina em seus produtos (Chen, 2009). Dentro de dias, foi relatado que mais de 54000 crianças ficaram doentes e quatro tinham morrido devido a danos renais depois de ter consumido produto contaminado por melamina (Xiu e Klein 2010). Quando chegou ao público o conhecimento de que outros produtos lácteos, incluindo o leite, sorvete e iogurte também continham melamina. Conseqüentemente a Organização das Nações Unidas emitiu um alerta internacional, levando os outros países a proibirem as importações de produtos lácteos chineses. A União Européia proibiu todos os alimentos de origem chinesa para bebês, enquanto a França tomou uma posição mais severa, proibindo todos os alimentos que continham leite produzido na China, como uma medida de precaução. Um total de 24 outros países na Ásia, América do Sul e África proibiu a importação de produtos lácteos chineses (Parry, 2008).

O pânico se espalhou quando foi revelado que Empresa Sanlu Dairy® estava ciente do problema durante meses sendo que, possivelmente, no ano de 2007, permitiu que cerca de 900 milhões de toneladas de leite tóxico deixassem suas fábricas de laticínios para serem comercializado (Handford, Campbell & Elliot, 2015; Xiu & Klein 2010). Foi só quando seu parceiro na Nova Zelândia, Fonterra Cooperative Group Ltd. interveio que a produção finalmente foi encerrada. Fonterra® notificou funcionários do governo chinês sobre o problema pedindo a apreensão do leite em pó produzido pela Sanlu na China. O perfil toxicológico da melamina e seus compostos relacionados não são totalmente conhecidos (Moore, Spink, Lipp, 2012). O mecanismo de toxicidade de melamina sugerido é a nefropatia causada pelo aumento de ácido úrico em seres humanos, onde os cristais obstruem os túbulos renais, resultando em insuficiência renal aguda (Skinner, Thomas & Osterloh, 2010)

Desde que o escândalo de melamina em 2008, muitos países chineses tornaram-se preocupados com a segurança da fórmula infantil produzida nacionalmente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o leite em pó contaminado com melamina e produtos

lácteos relacionados causou a morte de pelo menos seis crianças, e mais de 51.900 lactentes e crianças jovens foram hospitalizadas com problemas renais (WHO,2013). Em 2011 preocupações sobre a segurança das fórmulas infantis voltou a ser discutida com a descoberta da prática de adição por alguns fabricantes de proteína hidrolisada de couro, derivada de cortes de couro não utilizados pela indústria nos produtos lácteos chineses para aumentar de forma artificial o teor de proteína (Centre for Food Safety,2013).

Após escândalo do leite contaminado com melamina na China, uma outra substância tóxica de difícil detecção em lácteos foi encontrado em amostras analisadas em 2011. A presença da proteína de couro hidrolisada em produtos lácteos foi relatada, agravando preocupações públicas sobre a segurança dos alimentos chineses. Esse produto protéico de baixo valor nutricional e econômico é adicionado ao leite pelos produtores inescrupulosos para aumentar o teor de proteína aparente, camuflando a diluição por água. Esta prática ilegal fornece menos riscos do que a adição de melamina, mas ainda apresenta problemas em relação ao seu consumo por conta de produtos químicos nocivos como o ácido sulfúrico que podem ser utilizados no processo de extração. O Center for Food Safety rotineiramente realiza testes em produtos lácteos para detecção de proteína de couro hidrolisada e melamina também, realizando assim um programa de vigilância. (Center for Food Safety,2011; Montague-Jones, 2011).

2.3.4. Brasil

O rápido desenvolvimento do mercado de lácteos na última década no Brasil promoveu um ambiente favorável para a adulteração em alimentos. Isso ocorreu devido o aumento do consumo de produtos à base de leite aliado ao crescimento da população brasileira, o aumento da renda e mudanças nos hábitos alimentares. Outra mudança importante para a comercialização de leite foi a transformação dos supermercados em pontos de distribuição; essa modificação foi motivada principalmente pela entrada para o mercado do leite que sofreu o processo chamado *ultra high temperature (UHT)*. O leite *UHT* veio para trazer conforto e conveniência para as necessidades consumidores (Nahmias, 2008).

O caso Parmalat S/A uma multinacional italiana e líder mundial no setor de leite e responsável pela popularização do leite UHT. No ano de 2007 fatos muito importantes ocorreram no mercado brasileiro de laticínios: os preços da maioria dos produtos lácteos tornaram-se muito altos, falta de supervisão da indústria por órgãos fiscalizadores, com apenas um terço do leite produzido no Brasil era inspeccionado pelas autoridades e a indústria de laticínios do Brasil foi atingida por uma crise inesperada quando a notícia dos

escândalos de fraude no leite comercializado chegou ao conhecimento dos consumidores (Ferreira, 2014) (Handford, Campbell & Elliot, 2015).

No Brasil, os leites das fazendas de gado leiteiro são vendidos por cooperativas, que pertencem e são administradas por fazendeiros produtores de leite. Em 2007, a Polícia Federal flagrou duas cooperativas de laticínios no estado de Minas Gerais acusadas de adicionar soro de leite para aumentar o volume, peróxido de hidrogênio com o intuito de reduzir a carga microbiana e hidróxido de sódio para reduzir a acidez ao leite longa vida integral, numa operação que ficou conhecida como Ouro Branco (Abrantes, Campêlo & Silva, 2014).

A Parmalat S/A, uma das maiores empresas do mercado lácteo brasileiro comprou leite adulterado, porém afirma ser uma vítima. Embora não tenha sido diretamente responsável pela venda e produção do leite, a Parmalat S/A mostrou negligência por não realizar o controle de qualidade do leite cru adquirido e, por conseguinte, sofreram as consequências da fraude de leite. Este escândalo também provou como ineficiência dos sistemas de inspeção da qualidade estabelecida pelas instituições do governo que fiscalizam a agroindústria visto que o leite adulterado conseguiu chegar a supermercados e ao consumidor final. Quase imediatamente após o escândalo atingiu as manchetes da mídia o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ordenou a Anvisa (Agência Brasileira de Vigilância Sanitária) para realizar a retirada das caixas de Tetrapak® e garrafas de plástico de leite envolvidas, que incluiu a Parmalat S/A, causando uma crise financeira tanto na empresa citada anteriormente como em outras envolvidas (Ferreira, 2014) (Handford, Campbell & Elliot, 2015).

Os consumidores deixaram de comprar os produtos Parmalat com medo de consumir peróxido de hidrogênio e soda cáustica. Pois o escândalo sobre o leite adulterado foi nacionalmente divulgado, com relatórios de andamento do caso na televisão, na *internet* e na imprensa, bem como grandes perdas financeiras para as empresas envolvidas e da prisão de muitos indivíduos. Relatórios de fraude ilícita em leite UHT em várias regiões do Brasil ainda foram relatados (Ferreira, 2014). Sousa (2005) afirma que a venda de produtos lácteos inseguros a partir de leite cru é verificada em todo o território nacional ameaçando a saúde da população de uma maneira geral, e principalmente dos que possuem o sistema imunológico mais frágil como crianças, idosos e imunocomprometidos (Sousa, 2005).

Estudo realizado por Souza e colaboradores em 2011, analisou um total de 100 amostras de leite UHT no Brasil para detectar adulterantes tais como amido, cloro, formaldeído, peróxido de hidrogênio, e urina de vaca. Com a exceção do amido, todas as

amostras relataram a presença de pelo menos um adulterante. Os maiores valores de não-conformidades foram encontrados para a urina (55%) e formaldeído (44%), seguido por peróxido de hidrogénio (30%) e cloro (12%). Além disso, a presença de cloro indica uma falta de lavagem e higiene no equipamento utilizado na ordenha (Souza *et al*,2011).

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 (Brasil, 2014). Segundo a Instrução Normativa 62 do MAPA devem estar ausentes neutralizantes da acidez e reconstituintes de densidade no leite cru refrigerado que dará origem aos outros tipos de leite como pasteurizado padronizado (Brasil,2011).

2.4. RMN de Baixo Campo

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) como todas as formas de espectroscopia, trata-se da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Porém, o RMN diferencia-se da espectroscopia óptica em vários aspectos fundamentais, tais como: primeiro, a separação entre os níveis de energia $\Delta E = \gamma \hbar B_0$ e um resultado da interação do momento magnético μ de um núcleo atômico com um campo magnético B_0 aplicado; segundo, a interação é com a componente magnética da radiação eletromagnética em vez da componente elétrica. Na figura 9 está ilustrado o espectrômetro de ressonância magnética nuclear (Tavares & Silva, 2011).

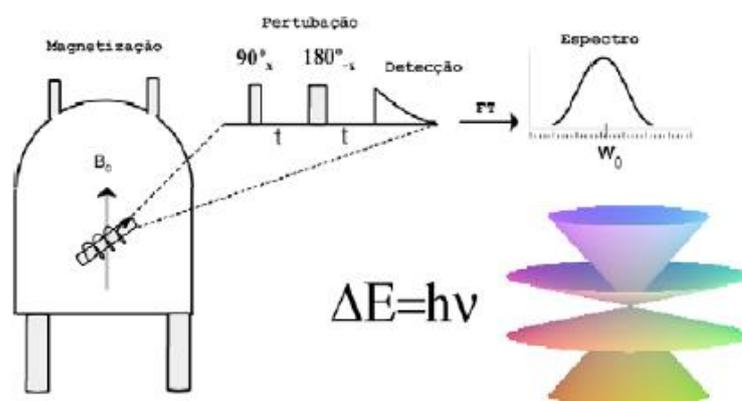


Figura 9: Esquema do Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é capaz de analisar amostras empregando equipamentos de alta e baixa resolução, permite avaliar as amostras em seus estados físicos e

a análise de diferentes núcleos, possibilita ainda a utilização de um conjunto de técnicas não destrutivas que informam tanto sobre a estrutura química quanto a dinâmica molecular (Tavares & Silva, 2011).

De acordo com essas características da RMN, as análises do núcleo de hidrogênio são fundamentais para o estudo de diferentes sistemas por meio da análise da dinâmica molecular. Os processos de relaxação relacionam o tempo necessário para que os spins nucleares retornem ao seu estado fundamental após a liberação da energia absorvida quando do fenômeno da RMN (de Oliveira, Tavares, Silva, Lima e Neto, 2015). Os processos de relaxação são de dois tipos: relaxação spin-rede e o processo de relaxação spin-spin que estão demonstrados na figura 10.

A relaxação spin-rede também é chamada de longitudinal e está relacionada ao retorno da população de spins ao seu equilíbrio térmico, a este processo de relaxação está associada uma constante de tempo, T_1 , este é um processo entálpico e a transferência de energia dos spins é doada indiscriminada para a rede, sendo transformada em movimentos rotacionais e translacionais na molécula. A medida do tempo necessário para que ocorra essa relaxação fornece informações sobre a presença de domínios de mobilidades diferentes, homogeneidade, miscibilidade, interação entre componentes, entre outros (de Oliveira, Tavares, Silva, Lima e Neto, 2015).

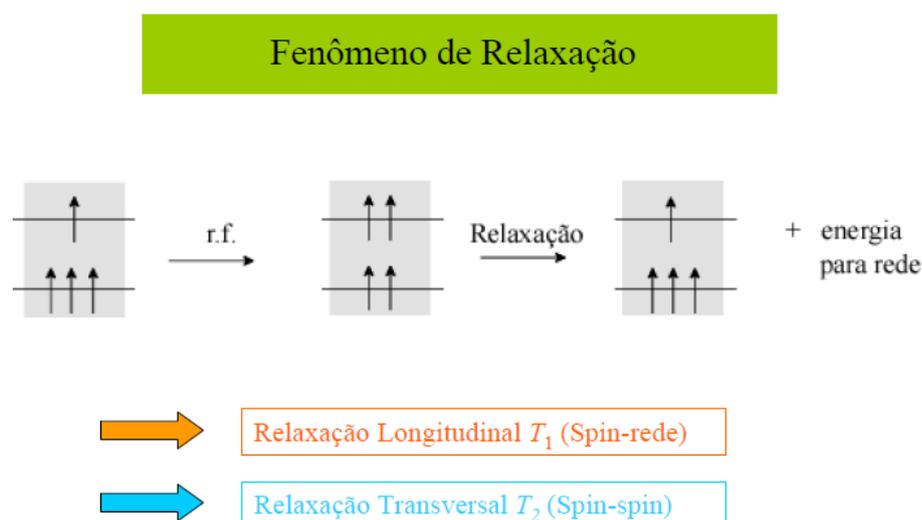


Figura 10: Fenômeno de Relaxação Longitudinal T_1 e Transversal T_2

A relaxação transversal, também denominada spin-spin, possui constante de tempo T_2 e está relacionada ao decaimento do sinal de ressonância. Neste processo de relaxação

ocorre a transferência de energia de um spin para outro spin muito próximo. A relaxação T_2 está relacionada tanto ao DLI (Decaimento de Livre Indução) quanto à largura dos sinais no espectro. Se o DLI for curto, ou seja, com decaimento rápido, o T_2 correspondente será curto e os sinais obtidos serão largos, o que é o caso de materiais sólidos. E, de forma análoga, obtendo-se um DLI largo, que terá decaimento lento, o T_2 será longo e seus sinais correspondentes serão finos. Assim, amostras que possuem reticulação são rígidas, e irão apresentar sinais muito largos. As amostras cristalinas, devido à isotropia obtida pela orientação, irão apresentar sinais mais finos, em comparação a amostras amorfas (anisotrópicas). As amostras que possuem ligações hidrogênio terão um aumento na largura do sinal, devido à menor mobilidade molecular, restrição de movimentos, que essas interações proporcionam à molécula (de Oliveira, Tavares, Silva, Lima e Neto, 2015).

A RMN é uma espectroscopia que analisa o comportamento do spin nuclear perante a ação de um campo magnético externo e forte. Esta técnica permite analisar diferentes núcleos de uma amostra, empregando uma sequência de pulsos específica. Sua aplicação mais conhecida envolve os espectrômetros de alto campo, os quais são muito sensíveis e baseiam-se nas diferenças de deslocamentos químicos. Equipamentos de baixa resolução em baixo campo vêm sendo utilizados, com êxito, para informar sobre a morfologia, a interface química e dinâmica do nanocompósito, assim como a interação entre os componentes do material, forma de dispersão, homogeneidade e tipo de reação química (Brito & Tavares, 2013).

Atualmente as atividades de controle de qualidade do leite incluem prevenção de adulterações do produto *in natura* (Abrantes, Campêlo & Silva, 2014). Segundo Zhang e colaboradores, é necessário introduzir algum método de detecção sensível e preciso na rastreabilidade de alimentos no intuito de prevenir e verificar fraudes em produtos (Zhang, Zhang, Dediu & Victor, 2011) Ressonância Magnética de Imagem (RMI) é uma técnica tradicionalmente utilizada na área de medicina diagnóstica para investigar a estrutura de tecidos moles, como uma ferramenta para diagnóstico clínico e surgiu a partir da utilização de radiofrequência, semelhante às ondas de rádio atingindo as estruturas internas de tecidos humanos. Mesmo assim, o RMI provou ser uma ferramenta analítica forte para a engenharia de investigação, bem como, devido à sua precisão e versatilidade.

A ressonância magnética de imagem (RMI) pode ser utilizada na caracterização de muitos sistemas biológicos e não biológicos (d'Avila, Powell, Phillips, Shapley, Walton, Dungan, 2005). O instrumento utilizado para o RMI é um grande tubo, chamado Magneto, aberto em ambas nas extremidades, que emite ondas de radiofrequência, que serão captados e

transformados em imagens por computador imagens bidimensionais ou tridimensionais que mostram áreas com propriedades físico-químicas diferentes (por exemplo, teor de umidade) com diferentes contrastes (d'Avila, Powell, Phillips, Shapley, Walton, Dungan, 2005) (Hashemi, Bradley & Lisanti 2010).

Relaxometria de RMN H^1 , por outro lado, não necessita gradientes, exceto para medidas de difusão. Utiliza impulso de rádio frequência (RF), a fim de criar uma perturbação temporária em uma amostra colocada em outro campo magnético estático. A relaxação do sinal excitado é monitorada e várias informações podem ser obtidas (Hashemi, Bradley & Lisanti 2010). Nessa técnica é possível diferenciar sinal proveniente dos diferentes ambientes químicos onde o próton está localizado, por exemplo: organelas celulares e mobilidades diferentes da água nos compartimentos de géis hidrofílicos.

A natureza não invasiva e não destrutiva de ambos os métodos permite a coleta de dados qualitativos e quantitativos sobre as propriedades físicas e químicas de diferentes tipos de amostras. O uso da relaxometria é popularmente aplicado à pesquisa em alimentos (Cornillon & Salim, 2000).

O princípio básico por trás das técnicas é o magnetismo nuclear. O mesmo emerge do momento magnético resultante. A fim de obter uma rede momentânea de magnetização nuclear, o núcleo deve conter um número ímpar de núcleons ou seja spin $I > 1/2$. Para os experimentos, qualquer elemento com um número ímpar de núcleons pode ser utilizado. No entanto, é preferido na maior parte dos estudos em alimentos o hidrogênio. Isso se deve a abundância natural do isótopo de hidrogênio 1H ser de 99,99%, ampla presença em amostras orgânicas (presença na água e óleo), e alta sensibilidade à ressonância magnética (H^+ dá o maior sinal) (Konez, 2011). No caso do RMN baixo campo (geralmente até 0,54 T) estuda-se a relaxação da população de um determinado núcleo de maior abundância isotópica (Song, 2009).

2.4.1. RMN de Baixo Campo e Aplicabilidade

Muitos processos de fabricação utilizam-se do processamento através do sistema de fluxo contínuo. Inserir na linha de produção um método analítico não invasivo contínuo para o controle de processo e qualidade. Por exemplo, em um processo químico, moléculas diferentes podem ser produzidas em diferentes fases da produção o que seria extremamente útil para determinar a composição química em tempo real e integração dos dados com o sistema de controle do processo a fim para aperfeiçoar o processo. Na produção de alimentos

é importante examinar desde a matéria-prima até o produto final, por exemplo, por seu conteúdo de água, lipídeos e açúcar. A Espectroscopia de RMN é amplamente utilizada na análise de produtos químicos, biológicos e de outros materiais e eles certamente estão sendo utilizados para a análise de produtos em produções por batelada (Song, 2009). No entanto, por causa do tamanho volumoso, alto custo e complexidade de operação e manutenção, raramente é utilizada como um sistema de controle de processos em linha.

O RMN de alto campo quando integrado ao sistema de produção pode também apresentar um perigo para o ambiente de trabalho tornando difícil e dispendioso sua manutenção. Em contraste, um sistema de RMN de baixo campo é muito mais flexível, relativamente baixo custo e pode ser personalizado para uma análise em linha de produção. O campo magnético inferior torna difícil realizar uma análise de deslocamento químico, no entanto, é muito útil para a análise de relaxação e difusão. Os produtos lácteos podem ser considerados como um sistema de suspensão coloidal de glóbulos de gordura em água, sendo a água a fase contínua. Como resultado, as medições de relaxação e difusão podem ser úteis para quantificar a microestrutura interna de tais sistemas onde a difusão de moléculas de água e de gordura são afetadas pela presença da suspensão (Song, 2009).

2.4.2. RMN de Baixo Campo e Adulteração em Alimentos

Estudo recente realizado por Santos e colaboradores (2016) foi examinar a viabilidade da aplicação do RMN H^1 combinada com análise multivariada para identificar e quantificar a adulteração de leite pela adição de água da torneira, soro de leite, leite sintético, uréia e peróxido de hidrogênio. De acordo com o banco de dados de fraude alimentar desenvolvido por membros da *Food Ingredients* da Convenção *Pharmacopeia US Intencional Adulterants*, o leite é um dos alvos mais comuns de adulteração e o principal problema para a indústria de laticínios (Moore, Spink, & Lipp, 2012).

O estabelecimento de um método rápido pode ter uso prático na indústria de laticínios para a inspeção da autenticidade do leite. Este é o primeiro estudo que demonstrou a viabilidade de RMN de baixo campo para detectar e quantificar a adulteração de leite de forma rápida, não destrutiva e não invasiva. Isto significaria que a possibilidade de utilizar $1H$ TD-RMN para medir a adulteração de leite sem qualquer preparação de amostra e através da embalagem de leite (Santos, Pereira-Filho, Conalço, 2016).

Zhu e colaboradores (2017) realizaram estudo onde foi pesquisada a adulteração de óleo de amendoim com outros óleos vegetais de baixo valor comercial e óleos de amendoim

falsificados utilizando RMN de baixo campo. Além disso, foi utilizada quimiometria para a análise qualitativa de óleo de amendoim adulterado com óleos vegetais de baixo custo. Os óleos vegetais incluídos no estudo foram óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de canola, e óleo de palma (Zhu, Wang & Chen, 2017).

A técnica de RMN H^1 pode ser uma ferramenta muito promissora para detectar de forma rápida e simples a adulteração de óleos de amendoim, mostrando vantagens em relação a outros processos de extração e purificação que consomem tempo. Além disso, oferece um grande potencial para a triagem de outros tipos de óleos utilizados em misturas de óleo de amendoim *in situ* (Zhu, Wang & Chen, 2017).

Os azeites de oliva extra virgens são produzidos a milhares de anos em países do mar mediterrâneo, sua qualidade está ligada à sua origem geográfica, bem como aos métodos de processamento. A União Europeia tem regras muito rígidas associadas à rotulagem de azeites em termos do método região de produção e produção específica. Devido aos preços do mesmo serem altos, o ato fraudulento de rotular de forma errônea e a adulteração do produto em si ocorrem com muita frequência. Embora vários métodos analíticos já existam para a detecção de adulteração em azeite de oliva extra virgem, RMN de baixo campo mostra-se efetivo na verificação da autenticidade com base na sua origem geográfica (Alonso-Salces, Moreno-Rojas, Holland, Reniero, Guillou & Heberger, 2010). Para fins de aumentar a confirmação outras análises têm sido realizadas em azeites de oliva extra virgens, incluindo H^1 , C^{13} , e / ou análises de RMN de P^{31} , fração insaponificável de compostos fenólicos na fração polar (Alonso-Salces, Holland, Moreno-Rojas, Mariani, Bellan & Reniero, 2010; Christophoridou, Dais, Tseng, & Spraul, 2005).

Outros estudos também estão sendo realizados e demonstrando a eficiência do RMN de baixo campo na pesquisa de adulteração de alimentos como uma ferramenta rápida, simples e eficaz para ser amplamente utilizado no controle de qualidade de alimentos e medidas de propriedades de material. A relaxação spin-rede (T_1) e relaxação spin-spin (T_2) são dois parâmetros importantes No RMN de baixo campo que representam duas características de relaxação prótons. Atualmente, T_2 está sendo usado com mais frequência devido sua maior sensibilidade e pode fornecer mais informações sobre o tempo de relaxação. Baseado na mobilidade e distribuição de prótons de hidrogênio presentes na água e nos ácidos graxos (Todt, Guthausen, Burk, Schmalbein, & Kamlowski, 2008), diferentes tipos de prótons como aqueles vinculados em água livre ou na água ligada, ou prótons pertencentes aos carboidratos, lipídios e proteínas (Bluemich, Casanova, & Appelt, 2009) podem ser distinguidos. Este método também foi usado para estudar a mobilidade de água em bebidas

fermentadas a base de leite (Salomonsen, Sejersen, Viereck, Ipsen, e Engelsen, 2007; Saragusty & Arav, 2011), músculo de peixe após diferentes condições de congelamento e armazenamento (Miklos, Cheong, Xu, Lametsch, & Larsen, 2015), e o grau de secagem e qualidade de carne de frango tipo *jerky* (Sanchez-Alonso, Moreno, & Careche, 2014). Além disso, o RMN de baixo campo proporciona uma poderosa ferramenta para avaliar a qualidade do óleo utilizado em fritura, e existe uma boa correlação entre o total de compostos polares, viscosidade e parâmetros analisados no RMN (Shen et al., 2013). No entanto, tem havido poucos estudos sobre a medição de adulteração de óleo comestível, utilizando medidas de relaxação em RMN de baixo campo. Estudo de Zhang, Saleh, e Shen demonstrou que a tecnologia de ressonância citada pode ser uma ferramenta útil para detectar a adulteração de óleos comestíveis com óleo de fritura. Eles descobriram que as distribuições de T_2 entre o óleo não exposto a processo térmico e o utilizado na fritura são diferentes e isto pode ser atribuído aos produtos poliméricos produzidos durante o processo de aquecimento da gordura.

2.4.3. RMN de Baixo Campo e Produtos Lácteos

A maioria dos produtos alimentares pode ser considerada como sendo mistura de vários componentes sendo a água um dos principais constituintes. Por exemplo, produtos lácteos são principalmente uma mistura de gordura e água com algumas macromoléculas (caseínas alfa-s1, alfa-s2, beta e capa-caseína) e carboidratos (lactose) dissolvidos na fase aquosa e fase lipídica. Essa última citada consiste principalmente em triglicérides que estão contidos em pequenos glóbulos de poucos microns em suspensão na fase aquosa (Song, 2009).

No leite não processado, os glóbulos de gordura exibem uma ampla gama de tamanhos, 1-10 μM e que estão sob a forma de uma emulsão com as maiores que tendem a separar-se da fase aquosa que forma uma película na parte superior do leite. O processo de homogeneização amplamente utilizado reduz a distribuição de tamanho de gordura significativamente para cerca de 2-3 μM conferindo uma maior estabilidade ao alimento. A gordura do leite é apenas uma pequena percentagem em volume ou peso em leite e o percentual aumenta progressivamente em leite concentrado, creme, iogurte, queijo e manteiga (Song, 2009).

Para os produtos com maior teor de gordura, tais como queijos, eles mantêm uma fase aquosa contínua. Neste modelo, a difusão de moléculas de gordura é limitada dentro dos

glóbulos de gordura. No entanto, a estrutura coletiva dos glóbulos de gordura é refletida na diminuição da constante de difusão da água, como é o caso para outros suportes porosos, tais como rochas. Como resultado, a teoria de meios porosos pode ser útil para caracterizar a microestrutura dos produtos lácteos através das interpretações do RMN (Song, 2009).

Além de propriedades de difusão, a relaxação de prótons e rotação na molécula de água num produto lácteo é afetada principalmente pela caseína, umas das proteínas mais abundantes. Dependendo da preparação dos produtos lácteos, as proteínas da caseína podem estar presentes sob a forma de micelas (leite) ou como uma rede contínua porosa (queijo), e são, portanto, um parâmetro chave no controle da consistência e das propriedades mecânicas (Song, 2009).

RMN foi usado durante muitos anos na indústria de alimentos para proporcionar uma medição do teor de gordura. O método baseia-se no decaimento rápido T_2 dos prótons da gordura em contraste com o decaimento mais lento dos óleos. O valor de T_2 para prótons em gordura é da ordem de 100 μ S, demonstrando que o RMN de baixo campo é uma metodologia que atende às necessidades da indústria alimentícia (Song, 2009).

McGee (2004) mostrou em seu trabalho que as técnicas de difusão do gradiente de magnetismo são capazes de diferenciar sinais de gordura e água, a fim de proporcionar uma melhor caracterização dos produtos lácteos. Desde a relaxação até a difusão essas medições não requerem um campo magnético alto e com boa homogeneidade, esta técnica abre uma nova oportunidade para aplicações de controle de processo (McGee, 2004).

3. Objetivo

3.1. Objetivo Geral

Analisar leite bovino adulterado com formaldeído em Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo comparado à análise colorimétrica.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a variação do tempo de relaxação dos parâmetros de Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo em relação à concentração de formaldeído.
- Utilizar ferramentas quimiométricas para correlação entre os parâmetros de RMN de baixo campo e determinação de cor instrumental.

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostras

Dois litros de leite cru foram obtidos de um pequeno produtor rural localizado em Guadalupe no Rio de Janeiro e transportados sob refrigeração (aproximadamente 5°C) ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro. As amostras foram acondicionadas no laboratório de alimentos e imediatamente adulteradas com formaldeído 35% (v/v) estabilizado com 10% de metanol gerando as seguintes concentrações: 0%, 1,75%, 5,25%, 8,75 %, 12,25 %, 17,5% e 21% (v/v), sendo as amostras mantidas sob refrigeração por 48 horas mantidas entre 0-4 °C (Santos, Pereira & Conalço, 2016).

De acordo com a legislação vigente, o tempo transcorrido entre a ordenha inicial do leite e seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser no máximo de 48h sendo que a temperatura de acondicionamento e transporte do leite cru refrigerado deve ser de no máximo 4°C e 7°C, respectivamente (Brasil, 2011).

Dessa forma, todas as análises (cor instrumental e ressonância magnética nuclear de baixo campo) foram realizadas durante o período de estocagem, a saber 0 h e 48h. Todo o experimento foi repetido duas vezes, sendo as análises realizadas em triplicata.

4.2. Determinação da Cor instrumental

A mensuração da cor foi realizada em três determinações separadas de cada tratamento de leite adulterado a 7±2 °C nos tempos 0h e 48h, utilizando um colorímetro portátil (CR-410, Minolta Sensing Konica, Inc., Tóquio, Japão).

As coordenadas L^* , a^* e b^* foram obtidas através da escala CIE, em que L^* determina medida de luminosidade, a^* a variação de verde (-) para vermelho (+) e b^* de azul (-) para amarelo (+), utilizando o iluminante D65 e observador em 10°. O índice de brancura (IB) foi calculado a partir da equação 1 (Balthazar et al, 2015), enquanto o índice de amarelecimento pela equação 2 (Patharw, Opara, & AL-Said., 2013), respectivamente:

$$\text{Eq.I: IB} = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

$$\text{Eq.II: IA} = 142,86 b^* / L^*$$

4.3. Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo

A ressonância magnética nuclear de baixo campo foi mensurada no Laboratório de Soluções em Relaxometria do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano na Universidade Federal do Rio de Janeiro por espectrômetro de baixo campo a 23.4 MHz para prótons (MARAN Ultra 0.54 T) com duração de pulso 90° de 7,5 µs, com o tempo entre os ecos de 600 µs e tempo de reciclagem de 10 s. Três tubos para cada tratamento foram preparados a temperatura laboratorial (20°C). Os tubos possuíam diâmetro de 18 mm por 20 mm de altura. Antes da análise, os tubos eram equilibrados termicamente em uma probe a 28 °C. As medidas de tempo de relaxação transversal (T2) foram realizadas utilizando-se Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) [p90x – t(p180y - t)n]. Os valores de T2 foram encontrados a partir do ajuste dos pontos do sinal de decaimento, com base na equação abaixo:

$$\text{Eq.III: } M(t) = M_0 \exp (-t/T_2)$$

Onde refere-se à disponibilidade de água (ligada, intersticial ou livre). As curvas originadas da leitura das amostras em TD-NMR foram tratadas com o software de ajuste dos pontos: Originlab OriginPro e o software de Transformada Inversa de Laplace foi o WinDXP.

4.4. Análise Estatística

Os parâmetros de análise de cor instrumental e da ressonância magnética nuclear de baixo campo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação entre médias conduzidas pelo teste de Tukey a $p < 0.05$ (Granato, de Araújo Calado & Jarvis, 2014) para cada tempo analisado a saber 0 e 48 horas.

As análises quimiométricas realizadas foram análise de componentes principais e regressão por mínimos quadrados parciais (Cruz et al., 2013; Matera et al., 2014) sendo realizadas para cada tempo de análise, 0 e 48 horas considerando os valores médios de cada parâmetro.

Para cada análise, foi elaborada uma matriz de dados composta de sete linhas e cinco colunas, onde as linhas representadas às amostras de leite adulteradas com os diferentes percentuais de formaldeído e as colunas representam os valores médios dos parâmetros da ressonância magnética nuclear de baixo campo (tempos de relaxação). A variável índice de brancura (IA) foi considerada variável suplementar. Antes da realização das análises foi realizado o auto-escalamentos dos dados, a fim de todas as variáveis auto-escaladas antes da realização da análise.

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLRS) foi igualmente realizada em ambos os tempos, 0 e 48 horas. Nesse caso, o índice de brancura foi considerado variável dependente e os parâmetros obtidos com a ressonância magnética de baixo campo (tempo de relaxação) foram considerados variáveis dependentes.

5. Resultados e Discussão

5.1. Ressonância Magnética Nuclear de Baixo Campo

Nas análises de RMN, foi utilizado tempos entre ecos mais elevados (2τ) de 600 μ s diferindo de outros trabalhos dessa natureza (Santos, Pereira & Conalço, 2016; Fundo *et al*, 2015) que utilizaram respectivamente 400 μ s e 500 μ s respectivamente. Esta escolha permitiu analisar prioritariamente a fração mais líquida do leite, onde se encontram as populações de hidrogênio da caseína e do formol. Devido à grande interação existente entre as duas últimas moléculas citadas originando um polímero caseína-formol ou galalite que possui uma alta rigidez e não se funde sob aquecimento. Segundo Upadhyay *et al* (2014) já está bem estabelecida a reação química entre os grupamentos amino com o formaldeído, que leva também a um aumento da acidez levando à separação de fases durante o armazenamento. Não foram encontrados registros nos quais outros constituintes sofressem interferência do formol como lactose, sólidos totais, gorduras e densidade na adição de formol ao leite (Upadhyay, Goyal, Kumar, Ghai & Singh, 2014). Nas concentrações utilizadas de 0,3% e 0,5% segundo Upadhyay *et al.*(2014) não houve mudança na densidade das amostras no período em que foram analisadas até 48 horas após adulteração. Entretanto a reação entre o formol e a caseína que leva a formação de um polímero insolúvel deve ter ocasionado alterações na densidade devido às altas concentrações utilizadas de formaldeído.

Segundo El-Bakry *et al.* (2011) cada tempo está relacionado ao estado e a mobilidade de água e gordura. Os três componentes $T_{2,1}$, $T_{2,2}$ e $T_{2,3}$ estão associados com a água ligada, gordura e água livre respectivamente (El-Bakry, Duggan, O’Riordan & O’Sullivan, 2011; Kirtil & Oztop, 2016). A partir das curvas de relaxação obtidas por CPMG, foram extraídos os domínios de relaxação através da Transformada Inversa de Laplace. Foram encontradas três regiões de relaxação e cada uma está relacionada aos constituintes do leite $T_{2,1}$ (água ligada aos glóbulos de gordura), $T_{2,2}$ (hidrogênios da caseína), $T_{2,3}$ (hidrogênios do soro, água livre e formol). Já T_2 a relaxação transversal são os prótons pertencentes a água livre.

Quadro 3. Tempos de relaxação obtidos através da análise em RMN de leite adulterado com formol no intervalo de 0 hora.

Amostras	O hora			
	T ₂ (ms)	T _{2,1} (ms)	T _{2,2} (ms)	T _{2,3} (ms)
0 %	137,0 ± 1,4 ^f	0,0 ± 0,0 ^b	0,00 ± 0,0 ^b	137,5 ± 0,7 ^e
1,75 %	171,0 ± 0,0 ^e	6,4 ± 1,6 ^b	0,00 ± 0,0 ^b	173,0 ± 0,0 ^e
5,25 %	317,0 ± 1,4 ^d	7,5 ± 0,0 ^b	62,35 ± 22,1 ^a	395,0 ± 15,6 ^d
8,75 %	426,5 ± 4,9 ^c	19,15 ± 8,3 ^a	100,5 ± 31,8 ^a	641,5 ± 51,6 ^b
12,15%	489,0 ± 4,2 ^b	7,3 ± 1,8 ^b	80,10 ± 10,2 ^a	781,0 ± 0,0 ^a
17,5%	428,5 ± 7,8 ^c	6,7 ± 2,7 ^b	53,10 ± 4,4 ^{ab}	503,5 ± 20,5 ^c
21,0%	566,5 ± 19,1 ^a	7,2 ± 0,0 ^b	49,17 ± 19,7 ^{ab}	618,0 ± 0,0 ^b

* Linhas com letras distintas indicam diferença significativa (p < 0,05).

Quadro 4. Tempos de relaxação obtidos através da análise em RMN de leite adulterado com formol 48 horas após adição de formaldeído.

Amostras	48 horas			
	T ₂ (ms)	T _{2,1} (ms)	T _{2,2} (ms)	T _{2,3} (ms)
0 %	170,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	170,5 ± 0,7 ^b
1,75 %	163,0 ± 1,4 ^a	8,75 ± 3,5 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	168,0 ± 7,1 ^b
5,25 %	343,5 ± 12,0 ^a	5,0 ± 0,0 ^a	62,5 ± 10,0 ^a	455,0 ± 0,0 ^{ab}
8,75 %	398,0 ± 2,8 ^a	7,5 ± 0,6 ^a	61,85 ± 4,5 ^a	540,5 ± 0,0 ^{ab}
12,15%	465,0 ± 4,2 ^a	7,5 ± 3,9 ^a	75,7 ± 12,4 ^a	695,0 ± 0,0 ^a
17,5%	408,5 ± 9,2 ^a	7,5 ± 1,6 ^a	69,0 ± 2,8 ^a	503,5 ± 20,5 ^{ab}
21,0%	429,5 ± 31,8 ^a	6,5 ± 0,8 ^a	61,6 ± 7,6 ^a	463,0 ± 0,0 ^{ab}

* Linhas com letras distintas indicam diferença significativa (p < 0,05).

O aparecimento do domínio intermediário T_{2,2} ocorre devido o aumento da concentração de formol e a conseqüente separação de fases favorecido pela formação do polímero caseína-formol em ambos os sistemas analisados 0 horas e 48 horas. Com a maior

formação de soro o tempo de relaxação $T_{2,3}$ aumenta denotando assim o aumento de água livre. Desta forma é possível correlacionar a taxa de relaxação transversal ($1/T_2$) das amostras com a concentração do adulterante como pode ser observada na figura 9 ($R^2 = 0,98$). Pois as modificações na mobilidade da água e gordura durante a coagulação que levam a separação de fases levam a modificações nos tempos de relaxação T_2 , como pode ser observado nos Quadros 3 e 4 onde o aumento do tempo acompanhou o aumento das concentrações de formol.

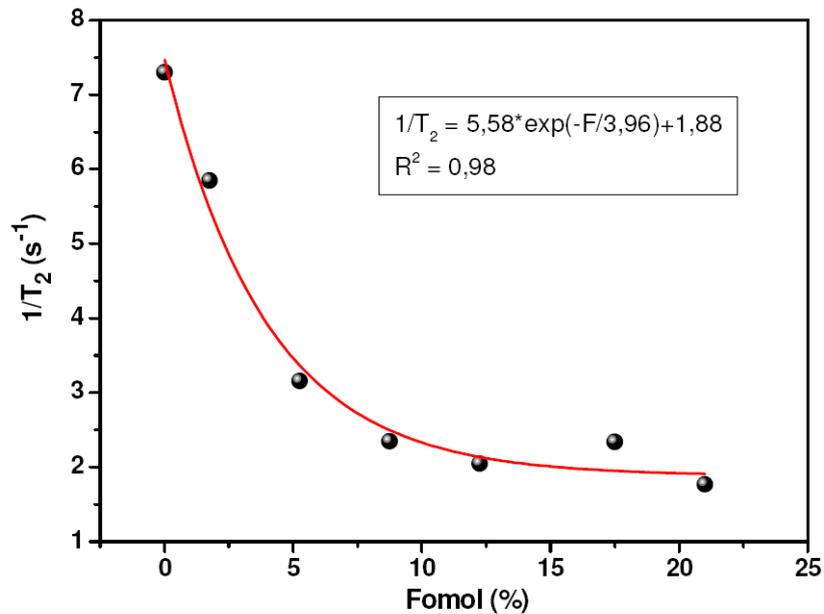


Figura 11: Gráfico de relação entre os valores de $1/T_2$ e o percentual de formaldeído das amostras de leite adulterado

Para ambos os sistemas, nota-se uma separação visível de fases a partir de aproximadamente 5,25% de formol, quando a precipitação da caseína se traduz no aparecimento do domínio na região de 0,1 s, demonstrado na figura 9. Conseqüentemente, o soro deslocado torna-se mais livre, com um T_2 maior em relação ao leite não adulterado (homogêneo). Este evento é mais nítido nos sistemas após 48h de estocagem, sugerindo que o formaldeído no leite adulterado favorece ainda mais a separação de fase durante o processo de envelhecimento.

5.2. Determinação de Cor Instrumental

A luminosidade em ambos os tempos apresentou um ligeiro aumento entre as concentrações (1,75% - 8,75 %) e depois decaiu nas concentrações superiores a 12,25% onde se observou

uma separação de fases mais definida o que deve ter levado a uma menor presença de glóbulos de gorduras na superfície do leite adulterado, como eles são responsáveis pela difusão da luz incidente foram gerados consequentemente valores mais baixos de L^* como foi observado na amostra que continha 21% de formol obteve a menor luminosidade ($L^* = 70,46, p < 0,05, 0$ horas) ($L^* = 82,26 p < 0,05, 48$ horas), pois foi a que apresentou uma separação de fase mais rápida e bem definida nos primeiros instantes do experimento (Nozière *et al*, 2006; Balthazar *et al*,2015).

O índice de brancura (IB) apresentou o mesmo comportamento que a luminosidade e esse fato pode ser justificado pela separação de fases nas concentrações acima de 12,25% que leva à coagulação das proteínas e predominância do soro na superfície gerando valores baixos pela perda do aspecto homogêneo que a amostra não adulterada do leite apresenta com as micelas de caseína e glóbulos de gordura estabilizados que caracterizam o leite pela sua cor branca. Ao observar a tabela 5 a concentração de 1,75% apresentou os valores maiores próximos ao leite não adulterado (IB = 79,03, $p < 0,05$), 0 horas) e (IB = 80,51 $p < 0,05$, 48 horas). Tendo como justificativa a baixa concentração de formol o que favorece aos adulteradores. Pois em pequenas concentrações alguns atributos podem até ser mascarados pela presença do adulterante químico. Já no tratamento com 21% os valores são os menores encontrados (WI = 65,26 $p < 0,05$, 0 horas) e (WI = 72,76 $p < 0,05$, 48 horas) corroborando com a justificativa dada pelo comportamento da amostra em concentrações de formol acima de 12,25%.

Segundo Kneifel,Ulberth e Schaffer (1992) os valores de L^* encontrados para o leite líquido (81,7 a 87,5) acabam gerando um alto índice de brancura. Produtos desnatados possuem valores baixos de L^* do que os seus produtos correspondentes integrais que produzem um alto valor devido à maior dispersão de luz na superfície desses alimentos devido o maior teor de gordura. O índice de amarelecimento (IA) que está relacionado a ação de produtos químicos (Pathare, Opara & Al-Said,2013) apresenta aumento de acordo com o aumento da concentração de formol como pode ser observado no Quadro 5.

Quadro 5: Parâmetros de cor em leite cru refrigerado adulterado com diferentes concentrações de formol nos tempos de 0 hora e 48 horas

Parâmetros	Tempo	0%	1,75%	5,25%	8,75%	12,25%	17,5%	21%
L	0h	85,24 ± 0,33 ^c	86,15 ± 0,60 ^c	86,03 ± 0,18 ^{cd}	86,33 ± 0,27 ^b	83,81 ± 0,12 ^e	75,16 ± 0,20 ^f	70,46 ± 0,34 ^e
	48h	90,26 ± 0,09 ^b	91,10 ± 0,05 ^b	91,46 ± 0,05 ^a	91,83 ± 0,14 ^a	89,53 ± 0,25 ^c	85,25 ± 0,25 ^f	82,26 ± 0,16 ^e
WI	0h	77,97 ± 0,27 ^{ab}	79,03 ± 0,35 ^b	78,36 ± 0,18 ^a	77,65 ± 0,15 ^{ab}	75,17 ± 0,33 ^c	68,35 ± 0,05 ^d	65,26 ± 0,25 ^d
	48h	78,73 ± 0,12 ^b	80,51 ± 0,10 ^b	78,14 ± 0,29 ^c	76,88 ± 0,29 ^d	74,29 ± 0,20 ^e	72,37 ± 0,27 ^f	72,76 ± 0,51 ^d
YI	0h	27,80 ± 0,42	26,18 ± 0,20	27,51 ± 0,21	29,29 ± 0,08	32,26 ± 0,85	36,33 ± 0,35	35,92 ± 0,41
	48h	30,14 ± 0,20	27,38 ± 0,17	30,90 ± 0,47	34,08 ± 0,45	37,07 ± 0,25	38,75 ± 0,38	36,58 ± 1,17

* Linhas com letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Quadro 6: Valores de a^* e b^* em leite cru refrigerado adulterado com diferentes concentrações de formol nos tempos de 0 hora e 48 horas

Parâmetros	Tempo	0 %	1,75%	5,25 %	8,75 %	12,25%	17,5%	21%
a^*	0h	0,05 ± 0,04 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	-0,08 ± 0,04 ^a	-1,00 ± 0,08 ^a	-2,09 ± 0,01 ^e	-3,62 ± 0,04 ^d	-3,66 ± 0,08 ^d
	48h	0,08 ± 0,04 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	-0,31 ± 0,10 ^a	-1,14 ± 0,03 ^b	-2,40 ± 0,04 ^c	-3,37 ± 0,06 ^d	-3,18 ± 0,19 ^d
b^*	0h	16,35 ± 0,25 ^{bc}	15,74 ± 0,14 ^c	16,53 ± 0,09 ^{acd}	17,65 ± 0,03 ^{ab}	18,71 ± 0,52 ^a	19,27 ± 0,23 ^a	17,91 ± 0,23 ^a
	48h	18,90 ± 0,12 ^{cd}	17,34 ± 0,11 ^e	20,12 ± 0,29 ^{cd}	21,60 ± 0,26 ^a	23,36 ± 0,08 ^a	23,11 ± 0,17 ^a	20,42 ± 0,69 ^{ab}

* Linhas com letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

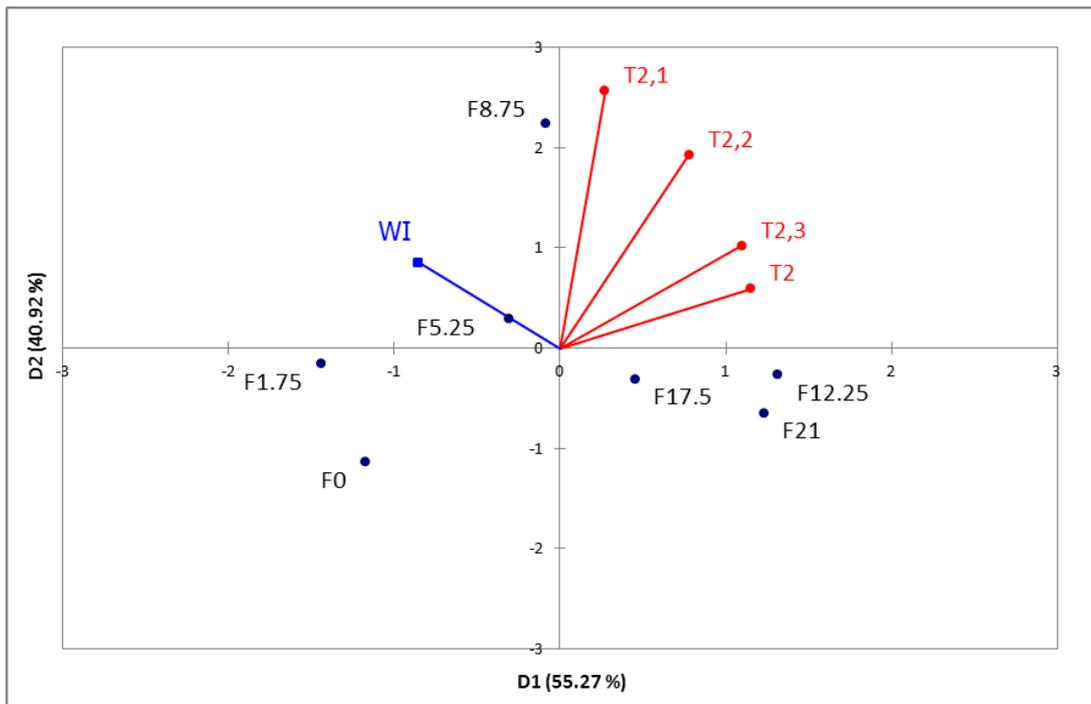
Na Quadro 6 o parâmetro a^* apresenta valores negativos a partir da concentração 5,25% demonstrando uma tendência ao verde, já que o soro pode apresentar uma coloração esverdeada e denotando a separação de fases decorrente do aumento da concentração de formol. Já o parâmetro b^* apresenta também um aumento dos valores demonstrando uma tendência ao amarelo confirmando a separação de fases e perda do aspecto homogêneo presente no leite não adulterado. Corroborando com os valores encontrados por Giangiaco e Messina (1988) em que foram encontrados valores de $a^* = -4,35$ e $b^* = 5,40$ que demonstram a tendência de produtos lácteos apresentarem valores que tendam ao verde e ao amarelo devido à constituição.

O leite utilizado nos experimentos gerou valores bem baixos de a^* na amostra não adulterada como Bosset e Blanc (1978) que encontraram $a^* = -2,0$ e $b^* = 12,6$ onde eles analisaram leites pasteurizados. Ao comparar os valores de b^* de 0 e 48 horas é percebido um aumento dos valores o que é atribuído por Giangiaco e Messina (1989) ao processo de acidificação e processo de coagulação que ocorre na produção do iogurte. Entretanto nesse caso é atribuído não só pelas altas concentrações de formol, mas também pelo período de estocagem que mesmo em baixa temperatura levou a um processo de coagulação intenso devido à formação do polímero caseína-formol.

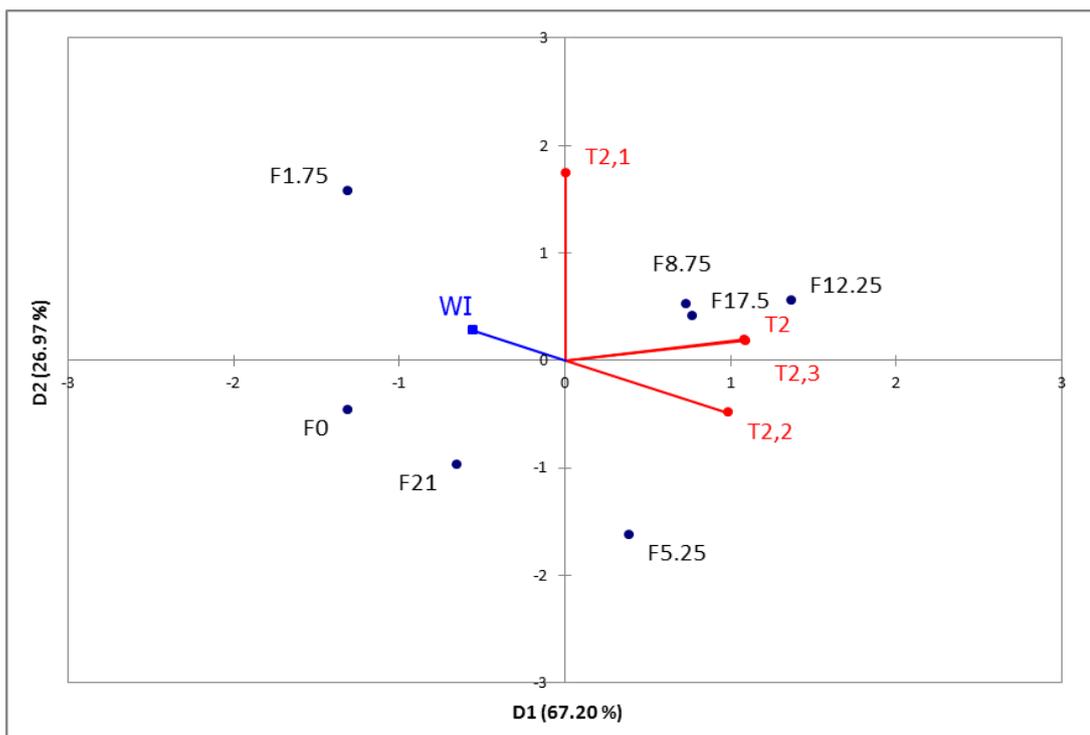
5.3. Análise de Componente Principal (PCA)

Em relação às variáveis de RMN adicionadas de concentrações crescentes de formol no período 0h (Figura 12a), observa-se que o PCA foi capaz de explicar 96,19 % dos dados através de dois componentes, 55,27 % dos dados foram explicados pelo primeiro componente principal (D1) e 40,92 % pelo segundo componente principal. Enquanto para o período de 48h (Figura 9b), a PCA explicou 94,17 % dos dados, sendo que D1 explicou 67,20 % e D2 explicou 26,97 %. A análise de PCA é satisfatória quando a mesma explica uma ampla fração dos dados das variáveis (Margraf et al., 2016).

Como verificado na Figura 10 os dados referentes à análise de RMN e IB contribuíram para explicação de D1, sendo associadas positivamente aos tratamentos F5,25 e F8,75. Enquanto, os mesmos dados de RMN foram associados positivamente aos tratamentos F12,25, F17,5 e F21, pois contribuíram para explicação de D2.



(a)



(b)

Figura 12: Componentes Principais de Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Baixo Campo com dados de leite cru adicionado de diferentes concentrações de formol (a) 0 hora (b) 48 horas. IB – Índice de Brancura (variável suplementar).

Quando se observa os resultados de PCA referente ao período de 48h (figura 12b), é possível distinguir uma modificação, pois somente os dados de T2,1, T2 e IB explicam D1,

sendo associados positivamente aos tratamentos F1,75, F8,75, F12,25 e F17,5. Enquanto os todos os dados de RMN explicam D2 pela associação positiva com os tratamentos F5,25 , F8,75, F12,25 e F17,5.

Logo, conclui-se que a concentração de formol interferiu nos resultados das análises citados de acordo com o período de tempo que o leite foi exposto às concentrações dessa substância.

5.4. Regressão de Quadrados Mínimos Parciais (PLSR)

A análise discriminante PLSR (Regressão de Quadrados Mínimos Parciais) é um método apropriado para experimentos como os de análise sensorial, pois atende a uma intercessão dos métodos de modelos matemáticos. Pois gera índices interessantes como os de variância total, refletindo num acordo entre o que é avaliado e a discriminação dos dados. Já os índices VIP (Variante de importância de projeção) são também são de extrema importância e realçam variados atributos. Eles podem ser úteis guiando na seleção de atributos relevantes onde tem-se uma série deles. (Rossini, Verdun, Cariou, Qannari & Fogliatto,2012)

Quadro 7: Variáveis de importância em projeção dos tempos de relaxação obtidos nas análises de 0 hora e 48 horas

Tempos de Relaxação	Variável de importância em projeção (VIP)	
	0 hora	48 horas
T2	1,171	1,220
T2,1	0,986	0,954
T2,2	0,913	0,803
T2,3	0,906	0,978

No tempo “0 hora” todos os valores de VIP foram superiores a 0,8 como pode ser observado no Quadro 7 o que denota que todos os tempos de relaxação são importantes para descrever o aumento da concentração de formol nas modificações que ocorrem no leite devido a adição de formol como a formação do polímero caseína-formol que gerou a separação de fases e um aumento de água livre que foi denotado pelo aumento de T_{2,3}.

Entretanto nas 48 horas observamos que $T_{2,2}$ apresenta um VIP próximo de 0,8 tendo assim uma menor importância. Pois esse tempo de relaxação está relacionado a separação de fases e com o subsequente envelhecimento da amostra ele já não influencia tanto como no tempo 0 onde embora tenham a mesma concentração de formol temos uma maior estabilidade da solução. T_2 apresentou os maiores valores de VIP devido as modificações na mobilidade da água e gordura durante a coagulação que levaram a separação de fases e as modificações nos tempos de relaxação T_2 , onde o aumento do tempo acompanhou o aumento das concentrações de formol. Rossini, Verdun, Cariou, Qannari & Fogliatto, 2012 levaram em consideração valores de VIP maiores que 0,8 considerando um intervalo de confiança de 95% e puderam assim descartar atributos que levariam a um desgaste dos voluntários e um a perda de tempo durante os testes. Ao desconsiderar valores de VIP abaixo de 0,8 a caracterização do produto não foi comprometida.

A Regressão de Quadrados Mínimos Parciais é um tipo de análise multivariada que se utiliza do modelo preditivo de mínimos quadrados parciais de dois blocos para modelar a relação entre duas matrizes X e Y . Essa estruturação de modelo confere resultados mais consistentes do que as abordagens de regressão tradicional fornecendo modelagens multivariadas com possibilidade interferencial semelhante ao teste T, ANOVA e modelo múltiplo de regressão (Svante, Michael & Lennart, 2001).

Métodos para seleção de variáveis têm sido continuamente propostos na literatura (Lazraq *et al*, 2003; Gauchi & Chagnon, 2001; Anzanello *et al*, 2009; Chiang & Pell, 2004; Juliano & Michel, 2011). Entre os métodos para seleção de variáveis com propósito de predição, destacam-se aqueles baseados em regressões PLS (*Partial Least Squares*). A regressão PLS consiste em uma análise multivariada que transforma as variáveis de resposta, Y , e de processo, X , em um número menor de componentes ou estruturas latentes. Seu uso na indústria é justificado por sua habilidade em lidar com um elevado número de variáveis de produto e resposta, dados com elevado nível de ruído, colinearidade, e observações incompletas (Wold *et al.*, 2001; Kourti & Macgregor, 1995; Juliano & Michel, 2011).

Regressão de Quadrados Mínimos Parciais (PLSR) foi utilizado nesse estudo para investigar a relação existente entre os tempos de relaxação e as análises colorimétricas. A matriz X está representada pelos tempos de relaxação obtidos nos tempos de 0 hora e 48 horas e os parâmetros de cor compõem a matriz Y . Foram levados em consideração R^2 que é a qualidade do ajuste do modelo e representa também a porcentagem da informação que X e

Y explicam o modelo e Q^2 é o índice de habilidade preditiva (Donadini, Fumi, Vanoni & Porretta, 2012) (Donadini, Fumi & Porretta, 2013).

Quadro 8: Q^2 , R^2Y e R^2X acumulados obtidos com a regressão de quadrados mínimos parciais das amostras adulteradas em 0 hora.

PLS 0 Hora				
Índice	Componente1	Componente2	Componente3	Componente4
Q^2 acum	0,293	0,550	0,736	0,806
R^2Y acum	0,368	0,680	0,829	0,887
R^2X acum	0,701	0,949	0,990	1,000

Foram encontrados para o modelo PLS 0 hora o componente 1 70,1% de contribuição dos tempos de relaxação e 36,8% dos parâmetros de cor com um $Q^2=0,293$, descritos no Quadro 8. Já o componente 2 94,9% de contribuição dos tempos de relaxação e 68,0% dos parâmetros de cor com um $Q^2=0,550$, componente 3 99,0% de contribuição dos tempos de relaxação e 82,9% dos parâmetros de cor com um $Q^2=0,736$ e o componente 4 100,0% de contribuição dos tempos de relaxação e 88,7% dos parâmetros de cor com um $Q^2=0,806$.

Quadro 9: Q^2 , R^2Y e R^2X acumulados obtidos com a regressão de quadrados mínimos parciais das amostras adulteradas em 48 horas.

PLS 48 horas		
Índice	Componente 1	Componente 2
Q^2 acum	0,478	0,724
R^2Y acum	0,525	0,778
R^2X acum	0,766	0,955

No modelo PLS 48 horas hora o componente 1 76,6% de contribuição dos tempos de relaxação e 52,5% dos parâmetros de cor com um $Q^2=0,478$. Já o componente 2 95,5% de contribuição dos tempos de relaxação e 77,8% dos parâmetros de cor com um $Q^2=0,724$ na Quadro 9.

Nas análises de PLS pode-se observar que ocorreu uma maior contribuição dos componentes no tempo “0 hora” do que em 48 horas. Nesse caso podemos afirmar que em 0 hora temos um índice de habilidade preditiva maior, ou seja, os resultados obtidos para os parâmetros analisados possuem maior influência, pois a separação de fases se tornou mais aguda com o passar das horas e a modificação do conteúdo de água e cor fez com que alguns atributos tivessem menos influência sobre os resultados gerados levando a apenas dois componentes no PLS de 48 horas.

5.5. 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)

Tabela 10: Poder de Modelagem dos parâmetros de Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo.

Parâmetros	Poder Modelagem	
	0h	48 h
T2	0.8506	0.8210
T2,1	0.7380	0.7486
T2,2	0.8100	0.7888
T2,3	0.7450	0.7880

Em termos de poder de modelagem o tempo de relaxação T_2 foi o mais importante para definir o poder de modelagem podendo ser observados na tabela 10, pois T_2 descreve a

relaxação transversal dos prótons pertencentes à água livre (Hürlimann, Burcaw & Song, 2006; Song, 2009; Tellier, Mariette, Guillement & Marchal, 1993). Pois durante o processo de envelhecimento do leite como o de adulteração ocorre um aumento da água livre pela formação do polímero caseína-formol devido à acidificação que levou a coagulação das micelas de caseína. Sendo assim ocorreu uma reorganização nas micelas, pois ocorreu uma mobilidade da água ligada que se tornou água livre.

Tabela 11: Poder Discriminante dos parâmetros de Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo.

Parâmetros	Poder Discriminante	
	0h	48h
T2	2646750.2	737272.4
T2,1	4003615.5	174747.3
T2,2	2346933.2	2448448,0
T2,3	6466853.5	1351014.1

Em termos de poder discriminante para o tempo 0 hora temos $T_{2,3}$ que representa os hidrogênios da água livre, soro e formol, já $T_{2,2}$ possui maior poder após 48 horas de armazenamento pois está envolvido com a relaxação dos hidrogênios da caseína como descrito na tabela 11 por serem os maiores valores para os parâmetros citados. Esse maior poder discriminante provém do aumento da concentração de formol e a consequente separação de fases favorecida pela formação do polímero caseína-formol em ambos os sistemas, porém no período de 48 horas ele gera a variável de maior poder discriminante o que é favorecido pelo envelhecimento da amostra. Com a maior formação de soro o tempo de relaxação $T_{2,3}$ tem maior poder no tempo 0 hora denotado pelo aumento de água livre o que é acelerado pelo aumento da concentração de formol.

Tabela 12: Sensibilidade e Especificidade do SIMCA

Autenticação do Modelo			Nível de adulteração do modelo						
SIMCA	Controle	Adulterado	Controle	1,75%	5,25%	8,75%	12,25%	17,5%	21%
Sensibilidade	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Especificidade	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

O desempenho dos teste de SIMCA foi demonstrada através da tabela 12 com os parâmetros de sensibilidade e especificidade. Pode-se observar que foi obtido sucesso, já que os resultados foram iguais a 1,0 tanto para amostras controle como as adulteradas tanto na autenticação do modelo como no nível de adulteração. A performance das análises em RMN demonstrou-se melhor quando comparada a outros métodos de análise como espectroscopia de infra-vermelho e imagem digital (Poliana, Edenir & Luis, 2013a; Poliana & Edenir, 2013b).

6. Conclusão

Os tempos de relaxação variaram em relação à concentração de formaldeído, ou seja, quanto maior a concentração do adulterante maior será o deslocamento. Pois as modificações na mobilidade da água e gordura durante a coagulação que levam a separação de fases ocasionaram um aumento nos tempos de relaxação transversal T_2 .

Através da utilização de técnicas quimiométricas como análise de componentes principais (PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi possível relacionar o aumento da concentração de formaldeído no leite adulterado em ambas as técnicas analíticas utilizadas Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo e análise colorimétricas. Sendo assim o RMN de baixo campo pode ser utilizado no processo de detecção de adulteração de formaldeído em leite bovino nas faixas de concentração utilizadas no presente trabalho por apresentar maior sensibilidade que a análise colorimétrica.

Através do presente trabalho poderão ser desenvolvidos novos trabalhos com a comparação entre a faixa de concentração alcançada pelo método oficial comparado a análise em RMN de baixo campo e posterior aplicação das técnicas quimiométricas com os dados.

7. Referências

- Abrantes, M.R., Campêlo, C.S., Silva, J.B.A. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 73, 244-251, 2014.
- Afzal, A., Mahmood, M.S., Hussain, I. & Akhtar, M. Adulteration and microbiological quality of milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10, 1195–1202, 2011.
- Akhtar S. Food safety challenges - a Pakistan's perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 219–226, 2015.
- Alonso-Salces, R. M., Holland, M. V., Moreno-Rojas, J.M., Mariani, C., Bellan, G., Reniero, F., et al. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118, 956–965, 2014.
- Alonso-Salces, R. M., Moreno-Rojas, J. M., Holland, M. V., Reniero, F., Guillou, C., & Heberger, K. Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ¹H NMR fingerprints and ^δ13C and ^δ2H data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5586–5596, 2010.
- Anzanello, M. J.; Albin, S. L. e Chaovalitwongse, W. A. Selecting the best variables for classifying production batches into two quality levels, *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 97, 111-117, 2009.
- Armstrong, D.J. Food chemistry and U.S. food regulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8180–8186, 2009.
- Ayub, M., Q. Ahmad., M. Abbas., I. M. Qazi and I. A. Hattak. Composition and adulteration analysis of milk samples. *Sarhad Journal of Agriculture*, 23, 1127-1130, 2007.
- Balthazar, C. F.; Gaze, L. V.; Silva, H. L. A.; Pereira, C. S.; Franco, R. M.; Conte Junior, C. A.; Freitas, M. Q. & Silva, A. C. O. Sensory evaluation of ovine milk yoghurt with inulin addition. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 281-290, 2015.
- Bansal, S., Singh, A., Mangal, M., Mangal, A.K. & Kumar, S., Food Adulteration: Sources, Health Risks and Detection Methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1040-8398, 2015.
- Barham, G.S., Khaskheli, M., Soomro & A.H., Nizamani ZA. Risk of adulteration in milk consumed at Shaheed Benazirabad District of Sindh. *International Journal of Adulteration*, 1, 31–37, 2015.
- Barham, G.S., Khaskheli, M., Soomro, A.H. & Nizamani, Z.A. Extent of extraneous water and detection of various adulterants in market milk at Mirpurkhas, Pakistan. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7, 83–89, 2014.
- Behmer, M.L.A. Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 15ª ed., São Paulo, 1987.
- Bhatt, S.R., Singh, A. & Bhatt, S.M. Assessment of synthetic milk exposure to children of selected population in Uttar Pradesh, India. *Indian Journal of Medical Research*, 7, 22–34, 2008.

Bhatt, S.R., Singh, A., Bhatt, S.M. Assessment of synthetic milk exposure to children of selected population in Uttar Pradesh, India. *Indian Journal of Medical Research*, 7, 22–34.

Bluemich, B., Casanova, F., & Appelt, S. NMR at low magnetic fields. *Chemical Physics Letters*, 477, 231–240, 2009.

Bosset, J.O. & Blanc, B. Die Messung der Farbe von Milch und Milchprodukten mittels Remissionsphotometrie (Tristimulus-Methode, System Hunter). XX International Dairy Congress, Paris, 1978.

Brasil, Lei n. 9.677, de 03 de julho de 1998. Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos, crimes contra a saúde pública, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 3 jul.1998.

Brasil, Lei n. 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 ago.1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado tipo C refrigerado. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de setembro de 2002. Seção 1

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.

Brasil. Decreto-Lei nº 2848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Operação Leite Adulterado I e II. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/08/operacao-leiteadulterado-i-eii>>. Acessado em 07 de outubro de 2016.

Brasil. Ministério da Agricultura. Decreto nº 30.691 de 29/03/1952 e alterado pela última vez pelo Decreto nº 6.385, de 27 de fevereiro de 2008. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 27 fev. 2008. Seção 1, p. 10785.

Brasil. Ministério da Justiça. Lei nº 8.137 de 27 de dezembro de 1990 – Define crimes contra a ordem tributária, econômicas e contra as relações de consumo e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 dez. 1990. Sec. 1, pt. 176.

BRC. British retail consortium global standard food Safety.Issue 7. BRC: London, 2015.

Brito, L. M. & Tavares, M. I. B. Desenvolvimento de nanocompósitos à base de amido de batata. *Polímeros*, 23, 771-777, 2013.

Centre for Food Safety. Abuse of hydrolysed leather protein in milk products. Centre for Food Safety. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, 2011.

(http://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_pub/multimedia_pub_fsf_56_03.html). Acessado em 25 de setembro de 2016.

Chen, J.. A worldwide food safety concern in 2008—melamine contaminated infant formula in China caused urinary tract stones in 290,000 children in China. *Chinese Medical Journal*, 122, 243–244, 2009.

Chiang, L. H. e Pell, R. J., Genetic algorithms combined with discriminant analysis for key variable identification, *Journal of Process Control*, 14, 143-155, 2004.

Christophoridou, S., Dais, P., Tseng, L. H., & Spraul, M. Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4667–4679, 2005.

Cornillon, P., Salim, L.C. Characterization of water mobility and distribution in low- and intermediate-moisture food systems. *Magnetic Resonance Imaging*, 18, 335–34, 2000.

Croall H. White collar crime, consumers, and victimization, crime, law, and social change. *Crime, Law and Social Change*, 51, 127–146, 2009.

d’Avila, M.A., Powell, R.L., Phillips, R.J., Shapley, N.C., Walton, J.H. & Dungan, S.R. Magnetic resonance imaging (MRI): a technique to study flow an microstructure of concentrated emulsions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22, 49–60, 2005.

Davies, R.C. Effects of regular formalin foot baths on the incidence of foot lameness in dairy cattle. *Veterinary Record*, 111, 394, 1982.

D’Amico, P., Armani, A., Castigliero, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D. & Guidi, A.. Seafood traceability issues in Chinese food business activities in the light of the European provisions. *Food Control*, 35, 7-13, 2014.

Damodaran, S., Parkin, K.L. & Fennema, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 692, 2010.

de Oliveira, V.C.S.P., Tavares, M.I.B., Silva, E.M.B., Lima, B.N.B. & NETO, R.P.C. Uso do RMN de baixa resolução na avaliação da dinâmica molecular do *Origanum vulgare*. *Química Nova*, 38, 351-355, 2015

Du, Z. and Sun, S. Determination of SUDAN Red I-IV in duck egg yolk using ultra 709 performance liquid chromatography-tandem mass. *Chinese Journal of Chromatography*, 25, 705- 710, 2007.

El-Bakry, M., Duggan, E., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M. Casein hydration and fat emulsification during manufacture of imitation cheese, and effects of emulsifying salts reduction. *Journal of Food Engineering*, 103, 179–187, 2011.

Elliott, C. Elliott Review into the Integrity and Assurance of Food Supply Networks Final Report, A National Food Crime Prevention Framework, 1-146, 2014.

Executive summary on national survey on milk adulteration. Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI), 2012.

Disponível em: [http://www.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/sample_analysed\(02-01-2012\).pdf](http://www.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/sample_analysed(02-01-2012).pdf). Acessado em nove de setembro de 2016.

FAO. January 2015. Milk facts. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/assets/infographics/FAO-Infographic-milk-facts-en.pdf>. Acessado em 15 de setembro de 2016.

FAOSTAT. 2014. FAO statistical database. Food supply quantity. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/610/DesktopDefault.aspx?PageID=610#ancor>. Acessado 15 de setembro de 2016.

Faraz, A., Lateef, M., Mustafa, M.I., Akhtar, P., Yaqoob & M., Rehman, S.. Detection of adulteration, chemical composition and hygienic status of milk supplied to various canteens of educational institutes and public places in Faisalabad. *Journal of Animal and Plant Science*, 23, 119–124, 2013.

Ferreira G. The Brazilian milk fraud scandal involving the Italian food conglomerate Parmalat. A brief case study on a transnational corporation in your home country. International Public Relations – PUR6608 class, 2014. University of Florida. 1–12. Disponível em: <https://www.scribd.com/doc/235456313/The-Brazilian-Milk-Fraud-Scandal-Involving-the-Italian-Food-Conglomerate-Parmalat>. Acessado em 07 de outubro de 2016.

Gartner, L.M., Morton, J, Lawrence, R.A., Naylor, A.J., O’Hare, D. & Schanler, R.J. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 115, 496-506, 2005.

Gauchi, J.-P. e Chagnon, P., Comparison of selection methods of explanatory variables in PLS regression with application to manufacturing process data, *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 58, 171-193, 2001.

Giangiacorno, R. & Messina, G. Determinazione oggettiva dei colore dei latte alimentare mediante colorimetria tristimolo. *Sci Tec LattGasearia*, 39, 21-39, 1988.

Giangiacomo, R. & Messina, G. Applicabilità della colorimetria tristimolo per la valutazione della struttura dei coagulo di yogurt. *Ind Latte*, 25, 67-79, 1989.

Grace F. 10th May 2004. Arrests in fake baby formula case. Disponível em: <http://www.cbsnews.com/news/arrests-in-fake-baby-formula-case/>. Acessado em 01 de outubro de 2016.

Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 563-571, 2011.

Guo, S., Fu, X., Scherpbier, R.W., Wang, Y., Zhou, H. & Wang, X. Breastfeeding rates in central and western China in 2010: implications for child and population health. *Bulletin of the World Health Organization*, 91, 322- 331, 2013.

Gwin, M.C., Lienert, G., Kennedy, J.. Formaldehyde exposure and asthma in children: a systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 118, 313–317, 2010.

Handford, C. E.; Campbell, K. & Elliott, C. T.. Impacts of Milk Fraud on Food Safety and Nutrition with Special Emphasis on Developing Countries. *Comprehensive Review and Food Science Food Safety*, 15, 130–142, 2016.

- Hanson, L.A. Breastfeeding Provides Passive and Likely Long-Lasting Active Immunity *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 81, 537 – 534, 1998.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W. & Gilman, A.G. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. United States of America: McGraw-Hill, 1673-1696, 1996.
- Hashemi, R.H., Bradley, W.G. & Lisanti, C.J. MRI: the basics. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2010
- Hau, A.K., Kwan, T.H. & Li, P.K.. Melamine toxicity and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 20, 245–250, 2009.
- Huber, W.G. Antissépticos e desinfetantes. Farmacologia e terapêutica em veterinária. 4ª ed . Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 620-642, 1983.
- Hürlimann, M.D., Burcaw, L. & Song, Y.Q., Quantitative characterization of food products by two-dimensional D- and - distribution functions in a static gradient, *Journal of Colloid and Interface Science*, 297 (1), 303-311, 2006.
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. International Agency for Research on Cancer. Geneva. 29, 345-389, 2004.
- J.C. Moore, J. Spink, & M. Lipp. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010, *Journal of Food Science*, 77, 118–126, 2012.
- Kandpal, S.D., Srivastava, A.K. & Negi, K.S. Estimation of quality of raw milk (open & branded) by milk adulteration testing kit. *Indian Journal of Community Health* , 24, 188–192, 2012.
- Kirtil. E & Oztop. M. H. ^{1H} Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry and Magnetic Resonance Imaging and Applications in Food Science and Processing, *Food Engineering Reviews*, 8, 1-22, 2016.
- Kneifel. W, Ulberth, F. & Schaffer, E. Tristimulus colour reflectance measurement of milk and dairy products. *Lait*, 72, 383 – 391, 1992.
- Konez, O. Manyetik Rezonans Görüntüleme: Temel Bilgiler, 2011. Disponível em: http://konez.com/e_main.htm Acessado em 10 de outubro de 2016
- Konuspayeva, G., Faye, B. & Loiseau, G. The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition Analysis*, 22, 95–101, 2009.
- Kourti, T. & Macgregor, J. F., Process analysis, monitoring and diagnosis, using multivariate projection methods, *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 28, 3-21, 1995.
- Lazraq, A., Cléroux, R. & Gauchi, J.-P. Selecting both latent and explanatory variables in the PLS1 regression model, *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 66, 117-126, 2003.

Litao, Z. & Seng L.T. The tainted milk formula: another hard lesson for China. EAI Background Brief No. 406, 2008. Disponível em: <http://www.eai.nus.edu.sg/BB406.pdf>. Acessado em 01 de outubro de 2016.

Malik, V.S., Schulze, M.B. & Hu, F.B. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 274–288, 2006.

M.H. Hurlimann, L. Burcaw, Y.-Q. Song. Quantitative characterization of food products by two-dimensional D–T2 and T1–T2 distribution functions in a static gradient. *Journal of Colloid and Interface Science*, 297, 303-311, 2005.

Manning, L. & Soon, J.M. Food Safety, Food Fraud, and Food Defense: A Fast Evolving Literature. *Journal of Food Science*, 81, 823-834, 2016.

Matera, J. A., Cruz, A. G., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Nogueira, L. C., Quitério, S. L., & Júnior, C. C. Discrimination of Brazilian artisanal and inspected pork sausages: Application of unsupervised, linear and non-linear supervised chemometric methods. *Food Research International*, 64, 380-386, 2014.

McGee, H. *On Food and Cooking*, Scribner, New York, 2004.

Medhammer, E., Wijesinha-Bettoni, R, Stadlmayr, B, Nilsson, E, Charrondiere, U.R. & Burlingame B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 92, 445–74, 2011.

Miklos, R., Cheong, L.-Z., Xu, X., Lametsch, R., & Larsen, F. H. Water and fat mobility in myofibrillar protein gels explored by low-field NMR. *Food Biophysics*, 10, 316–323, 2015.

Montague-Jones, G. China promises to target leather protein in milk tests, 2011. Disponível em: <http://www.foodproductiondaily.com/Safety-Regulation/China-promises-to-target-leather-protein-in-milk-tests>. Acessado em 04 de outubro de 2016.

Moore, J.C., Spink, J. & Lipp, M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77, 108–116, 2012.

Mota, F.J., Implvo, M.F., Cunha, S.C., Beatriz, M. & Oliveira, P.P. Optimization of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. *Food Chemistry*, 3, 469–473, 2003.

Muniz, L.C., Madruga, S.W. & Araújo, C.L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. *Ciência Saúde Coletiva*, 18, 3515-3522, 2013.

Nahmias, T.. The milk industry in Brazil: insecurity in a shaken market, 2008. Disponível em: <http://www.frost.com/prod/servlet/market-insight-print.pag?docid=117832008>. Acessado em 04 de outubro de 2016.

Parry J. China's tainted milk scandal spreads around the world. *British Medical Journal*, 337, a1890, 2008.

- Qi, P., Hong, H., Liang, X. & Liu, D.. Assessment of benzoic acid levels in milk in China. *Food Control*, 20, 414–418, 2009.
- Ribeiro, R.O.R., Mársico, E.T., Carneiro, C.S., Monteiro, M.L.G., Conte Júnior, C., & Jesus, C.S. Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF 1H NMR). *Journal of Food Engineering*, 135, 39–43, 2014.
- Rideout, T.C., Liu, Q., Wood, P. & Fan, M.Z. Nutrient utilization and intestinal fermentation are differentially affected by consumption of resistant starch varieties and conventional fibers in pigs. *British Journal of Nutrition*, 99, 984–992, 2008.
- Rosa-Campos, A.A., Rocha, J.E.S., Borgo, L.A. & Mendonça, M.A. Avaliação físico-química e pesquisa de fraude em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 66, 30-34, 2011.
- Rossini, K., Verdun, S., Cariou, V., Qannari, E.M. & Fogliatto, F.S.. PLS discriminant analysis applied to conventional sensory profiling data, *Food Quality and Preference*, 231, 18-24, 2012.
- Ryan, F., Witherow, H., Mirza, J. & Ayliffe, P.. The oral implications of caustic soda ingestion in children. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101, 29–34, 2006.
- Salomonsen, T., Sejersen, M. T., Viereck, N., Ipsen, R., & Engelsen, S. B. Water mobility in acidified milk drinks studied by low-field 1H NMR. *International Dairy Journal*, 17, 294–301, 2007.
- Sanchez-Alonso, I., Moreno, P., & Careche, M. Low field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) relaxometry in hake (*Merluccius merluccius*, L.) muscle after different freezing and storage conditions. *Food Chemistry*, 153, 250–257, 2014.
- Santos, P.M., Pereira-Filho, E.R. & Rodriguez-Saona, L.E. Application of hand-held and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1205–1211, 2013a.
- Santos, P.M. & Pereira-Filho, E.R. , Digital image analysis—an alternative tool for monitoring milk authenticity, *Analytical Methods*, 5, 3669–3674, 2013 b.
- 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.
- Saragusty, J., & Arav, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and Vitrification. *Reproduction*, 141, 1–19, 2011.
- Schoder, D. Melamine milk powder and infant formula sold in East Africa. *Journal of Food Protection*, 73, 1709–1714, 2010.
- See, A.S., Salleh, A.B., Bakar, F.A., Yusof, N.A., Abdulmir, A.S. & Heng, L.Y. Risk and health effect of boric acid. *American Journal of Applied Science*. 7, 620–627, 2010.
- Sharma, K. & Paradakar, M. The melamine adulteration scandal. *Food Security*, 2, 97–107, 2010.

- Shen, Y.-G., Xiao, Z.-G., Chen, S.-S., Zhang, Y.-L., Jiang, W., & Lai, K.-G. Application of low field nuclear magnetic resonance on rapid determination of frying oil quality. *Journal of Food Science and Technology*, 31, 37–42, 2013.
- Sicherer, S.H., Burks, A.W., Sampson, H.A. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics*, 102, 1–6, 1998.
- Silva, A.L.B.B & Tavares, M.I.B. Introdução a Relaxação Magnética Nuclear. 1ª edição, Pará de Minas: Editora Virtualbooks, 2011
- Silva, M.C.D., Silva, J.V.L, Ramos, C.S., Melo, R.O. & Oliveira, J.O. Características microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 226-230, 2008.
- Singh, P. & Gandhi, N.. Milk preservatives and adulterants: processing, regulatory and safety issues. *Food Reviews International*, 31, 236–261, 2015.
- Singuluri, H. & Sukumaran, M.K.. Milk adulteration in Hyderabad, India—a comparative study on the levels of different adulterants present in milk. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 5, 1–3, 2014.
- Sinhg, H. & Fox, P.F.. Heat stability of milk: The mechanism of stabilization by formaldehyde. *J.Dairy Res.*, 52, 65–76. *apud* Singh,P. & Gandhi,N. (2015) Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. *Food Reviews International*, 31, 236–261, 1985.
- Skinner, C.G, Thomas, J.D. & Osterloh, J.D.. Melamine toxicity. *Journal of Medical Toxicology*, 6, 50–55, 2010.
- Song, Y.Q. A 2D NMR method to characterize granular structure of dairy products, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 55, 324–334, 2009.
- Soomro, A.A., Khaskheli, M., Memon, M.A., Barham, G.S., Haq, I.U., Fazlani, S.N., Khan, I.A., Lochi, G.M. & Soomro, R.N. (2014). Study on adulteration and composition of milk sold at Badin. *International Journal of Research in Applied in Natural and Social Science*, 2, 57–70.
- Sousa, D.D.P. Consumo de produtos lácteos informais, um perigo para saúde pública. Estudo fatores relacionados a esse consumo no município de Jacareí, SP [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2005.
- Souza, S.S., Cruz, A.G., Walter, E.H.M., Faria, J.A.F, Celeghini, R.M.S., Ferreira, M.M.C., Granato, D. & Sant’Ana, A.D.S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: a chemometric approach. *Food Chemistry*, 124, 692–695, 2011.
- Spink, J. & Moyer, D.C.. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76, 157–163, 2011.
- Stiborov´a M., Mart´inek V., R´ydlov´a H., Hodek P. & Frei E. (2002). Sudan I is a potential carcinogen for humans. Evidence for its metabolic activation and detoxication by human

recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes 1. *Cancer Research*, 62, 5678–5684.

‘Tainted’ milk powder on China market. Sydney Morning Herald, 2010. (<http://news.smh.com.au/breaking-news-world/tainted-milk-powder-on-china-market-20100208-nmxi.html>). Acessado em 21 de setembro de 2016.

Tang, L., Binns, C. W., & Lee, A. H. Infant Formula Crisis in China: A Cohort Study in Sichuan Province. *Journal of Health, Population, and Nutrition*, 33, 117–122, 2015.

Tang, X., Bai, Y., Duong, A., Smith, M.T., Li, L. & Zhang, L. Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environment International*, 35, 1210–1212, 2009.

Tay, M., Fang, G., Chia, P.L. & Li, S.F.Y. Rapid screening for detection and differentiation of detergent powder adulteration in infant milk formula by LC–MS. *Forensic Science International*, 232, 32–39, 2013.

Tellier, C.; Mariette, F.; Guillement, J. P.; Marchal, P. Evolution of water proton nuclear magnetic-relaxation during milk coagulation and syneresis - structural implications. *J. Agric. Food Chem*, 41, 2259–2266, 1993.

Todt, H., Guthausen, G., Burk, W., Schmalbein, D., & Kamlowski, A.. Timedomain NMR in quality control: standard applications in food. *Modern Magnetic Resonance*, 1, 1739–1743, 2008.

Trivedi, U.B., Lakshminarayana, D., Kothari, I.L., Patel, N.G., Kapse, H.N., Makhija, K.K., Patel, P.B. & Panchal, C.J. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. *Sensors Actuators B: Chemical*, 140, 260–266, 2009.

U.S. Pharmacopeial Convention. USP’s food fraud database. Disponível em: <http://www.usp.org/food-ingredients/food-fraud-database>. Acessado em 21 de fevereiro de 2016

UBIC Consulting. Ingredients for infant formula market, 2014. Disponível em: <http://www.ubic-consulting.com/template/fs/documents/Nutraceuticals/Ingredientsin-the-world-infant-formula> -market.pdf). Acessado em 18 de setembro de 2016.

US FDA (2008). FDA advises consumers to avoid toothpaste from China containing harmful chemical. Junho 2007. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108927.htm> Acessado em 09 de outubro de 2016.

US Federal Food, Drug and Cosmetic Act. Section 342. Disponível em: https://www.law.cornell.edu/uscode/pdf/uscode21/lii_usc_TI_21_CH_9_SC_IV_SE_342.pdf Acesso em 25 junho de 2016.

W. Zhu, X. Wang & L. Chen. Rapid detection of peanut oil adulteration using low-field nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Food Chemistry*, 216, 268–274, 2017.

World Health Organization. Expert meeting to review toxicological aspects of melamine and cyanuric acid, Ottawa, Canada, 1-4 December 2008. 1-10 (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_events/en/index.html). Acessado em 10 de setembro de 2016.

- Xiu, C. & Klein, K.K. Melamine in milk products in China: examining the factors that led to deliberate use of the contaminant. *Food Police*, 35, 463–470, 2010.
- Yang, J.; Hauser, R. & Goldman, R.H. Taiwan food scandal: the illegal use of phthalates as a clouding agent and their contribution to maternal exposure. *Food Chemistry Toxicology*, 58, 58362–58368, 2013.
- Zhai, R., Zheng, N., Rizak, J., & Hu, X.. Evidence for Conversion of Methanol to Formaldehyde in Nonhuman Primate Brain. *Analytical Cellular Pathology*, 2016, 1-5, 2016.
- Zach, L., Doyle, M. E., Bier, V. & Czuprynski, C.. Systems and governance in food import 960 safety: A U.S. perspective. *Food Control*, 27, 153-162, 2012.
- Zhang, J., Zhang, X., Dedi, L. & Victor, C. Review of the current application of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China. *Food Control*, 22, 1126-1135, 2011.
- Zhang, Q., Saleh, A. S. M., & Shen, Q. Discrimination of edible vegetable oil adulteration with used frying oil by low field nuclear magnetic resonance. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2562–2570, 2012.
- Zhao, Y., Niu, A.M., Xu, G.F., Garrett, M.J., Greiner, T. Early infant feeding practices in Jinan City, Shandong Province, China. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 12, 104-108, 2003.
- Zhu, W., Xin, W. & Lihua, C. Rapid detection of peanut oil adulteration using low-field nuclear magnetic resonance and chemometrics, *Food Chemistry*, 216, 268-274, 2017.

