

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo da validação de um método de quantificação de
lactose e da adulteração de leite por RMN de ^1H**

**Validation study of lactose quantification method and milk adulteration by ^1H
NMR**

Danyelle Alves da Cunha

Tese de Doutorado em Química

**Vitória
2020**

Danyelle Alves da Cunha

**Estudo da validação de um método de quantificação de lactose
e da adulteração de leite por RMN de ^1H**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Química

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto

**VITÓRIA
2020**

Estudo da validação de um método de quantificação de lactose e da adulteração de leite por RMN de ^1H

Danyelle Alves da Cunha

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química.

Aprovado(a) em 06/03/2020 por:

Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Valdemar Lacerda Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Lúcio Leonel Barbosa
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Emanuele Catarina da Silva Oliveira
Instituto Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Março de 2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES
e elaborada pelo autor

- C972e Cunha, Danyelle Alves da, 1994-
Estudo da validação de um método de quantificação de lactose e da adulteração de leite por RMN de ^1H / Danyelle Alves da Cunha. - 2020. 115 f. : il.
- Orientador: Álvaro Cunha Neto.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.
1. Ressonância magnética nuclear. 2. Leite. 3. Alimentos Adulteração e inspeção. 4. Lactose. I. Cunha Neto, Álvaro. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais e a todas as pessoas que me incentivaram e me ajudaram a alcançar essa importante conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois tudo que sou e tenho, foi me dado por Ele em Sua infinita misericórdia... Sem Ele não chegaria nem perto de onde estou hoje. Que tudo sirva para Sua honra e glória, amém! Agradeço também a minha mãezinha Celeste, Nossa Senhora, por todo amor e interseção. *Totus tuus Mariae, totus tuus!*

Agradeço aos meus pais por todo amor, apoio, carinho e dedicação. Esse trabalho também é fruto do sacrifício de vocês... Essa conquista, em momento algum, é apenas minha, mas de vocês e que, vocês possam ter de mim, o milésimo de orgulho que tenho de vocês. Obrigada por tudo!

Agradeço ao meu namorado, João Francisco, por todo amor, carinho e, principalmente, paciência comigo. Não tenho palavras pra descrever o quão essa caminhada seria mais difícil se não fosse por sua ajuda e apoio. Obrigada!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Álvaro Cunha Neto, pela amizade, compreensão e apoio. Principalmente quando precisei enfrentar novos caminhos acadêmicos e, sem dúvidas, pela excelente orientação. Obrigada por ser um exemplo de pessoa e profissional!

Agradeço ao prof Dr. Valdemar e Dr. Paulo que, desde o mestrado acompanharam a minha jornada até aqui e contribuíram da melhor forma para a profissional que sou hoje. Obrigada por aceitarem novamente o convite de participar da minha banca.

Agradeço ao prof Dr. Lúcio Leonel Barbosa por todos o conhecimento e experiências que adquiri. Obrigada por aceitar o convite de participar da minha banca e continuar contribuindo no meu crescimento profissional.

Agradeço a prof Dra. Emanuele por novamente ter aceitado o convite em participar dessa banca e por toda a contribuição para este trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos, principalmente os que fiz ao longo dessa jornada acadêmica no LabPetro, os do laboratório de Orgânica II e RMN, em especial a Carla, Diana, Geraldo, aos egressos Lucas e Thays (saibam que vocês fazem muita falta) e ao pessoal do laboratório de Massas. Vocês tornaram essa jornada mais leve e a minha rotina mais feliz! Sentirei saudade do dia-a-dia com vocês, mas comigo carrego a certeza que levaremos nossa amizade para além daqui... muito obrigada!

Agradeço ao Alex do PPGQUI por todo apoio e sempre aguentar as minhas

conversas!!

Agradeço à toda minha família por todo amor, apoio e carinho. Sei que vocês não aguentavam mais perguntar quando eu ia terminar o doutorado. Bom... esse dia finalmente chegou e essa conquista também é de vocês.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho. Por fim, agradeço a CAPES, FAPES, ao CNPQ, a PETROBRAS, ao PPGQUI e ao LabPetro/NCQP por todo o suporte financeiro e apoio nesta pesquisa.

“Confia-lhe todas as vossas preocupações, porque Ele tem cuidado de vós. (...) O Deus de toda graça, que vos chamou em Cristo à sua eterna glória, depois que tiverdes padecido um pouco, vos aperfeiçoará, vos tornará inabaláveis, vos fortificará. A Ele o poder na eternidade! Amém.”
I Pedro 5: 7, 11

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Produção (a) e consumo (b) de leite em milhões de toneladas (USDA, 2018).	19
Figura 2-1. Fluxograma básico de processamento de iogurte (NERO, CRUZ e BERSOT, 2017).	27
Figura 2-2. Reação de hidrólise da lactose pela enzima lactase resultando em galactose e glicose.	28
Figura 2-3. Número de publicações envolvendo a intolerância à lactose, de 1962 até os dias de hoje, segundo consulta na base de dados <i>Web of Science</i> com as palavras-chave: “ <i>lactose and intolerance</i> ”	29
Figura 2-4. Ilustração do efeito causado nos momentos magnéticos nucleares pela aplicação do campo B_0 – adaptado (GIL e GERALDES, 2002).	48
Figura 2-5. Diferença de energia para $I = 1/2$, na presença de um campo magnético externo B_0 – adaptado (MACOMBER, 1998; CLARIDGE, 2002).	49
Figura 2-6. Movimento de precessão do núcleo (CLARIDGE, 2002).	49
Figura 2-7. Conjunto de spins nos estados α e β , no equilíbrio, gerando a magnetização resultante na direção de B_0 (CLARIDGE, 2002).	51
Figura 2-8. Efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência de 90° na magnetização resultante M_0 (CLARIDGE, 2002).	52
Figura 2-9. Decaimento de indução livre (DIL) de ^1H de uma amostra, obtido no domínio do tempo, e logo após aplicação da FT para obtenção do espectro.	52
Figura 2-10. Representação da recuperação da magnetização ao longo do eixo longitudinal (MARA, 2006).	54
Figura 2-11. Sequência de pulso da técnica de inversão-recuperação (INVREC) para obtenção do tempo de relaxação longitudinal (T_1) (MARAN, 2006).	55
Figura 2-12. Representação vetorial da sequência de pulso de inversão recuperação (INVREC) (CLARIDGE, 2002).	55
Figura 2-13. Representação vetorial do da sequência de CPMG (GIL e GERALDES, 2002).	56
Figura 2-14. Sequência de pulsos CPMG – adaptado (MARAN, 2006).	57
Figura 2-15. Número de publicações envolvendo a RMN quantitativa, de 1970 até os dias de hoje, segundo consulta na base de dados <i>Web of Science</i> com as palavras-	

chave: “ <i>quantitative and NMR</i> ”	59
Figura 2-16. Áreas de publicações envolvendo a Ressonância Magnética Nuclear quantitativa, de 1945 até os dias de hoje, segundo consulta na base de dados Web of Science com as palavras-chave: “quantitative and NMR”	61
Figura 2-17. Demonstração do cálculo do LD (a) e LQ (b) . – adaptado (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007).....	70
Figura 3-1. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do padrão interno (TSP), lactose e leite UHT puro, a fim de demonstrar a seletividade do método. No detalhe, a estrutura química da lactose, onde o hidrogênio em destaque é referente ao duplete em ~ 5.2 ppm do espectro.....	79
Figura 3-2. a) Curva de linearidade da lactose construída a partir do sinal com deslocamento químico igual a 5.2 ppm do espectro de RMN de ^1H e b) Gráfico de dispersão dos resíduos da curva.....	80
Figura 3-3. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da solução de lactose a $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o leite UHT rotulado como “sem lactose”, a fim de demonstrar a presença de lactose no leite “sem lactose” pela presença do duplete em ~ 5.2 ppm.	83
Figura 3-4. Curvas de decaimento da intensidade normalizada com o tempo, do sinal obtido via CPMG, para os leites 1, 2, 3 e 4 sem a adição de adulterantes.	93
Figura 3-5. Curvas de distribuição obtidas a partir da sequência CPMG, provenientes da adulteração do leite 1, 2, 3 e 4 após as adulterações com a água (a), amido (b), peróxido de hidrogênio (c) e hipoclorito de sódio (d) numa taxa de 5% ao leite até 50%.	95
Figura 3-6. Correlação das curvas de calibração de adulteração dos leites 1, 2, 3 e 4 com água, amido e peróxido de hidrogênio.	96
Figura 3-7. Curva de calibração da concentração do adulterante de 4 leites com hidróxido de sódio e seus respectivos valores de T_2 (a) e a correlação entre os valores de pH e T_2 das amostras adulteradas com NaOH (b)	97
Figura 3-8. Correlação entre a concentração de água adicionada aos leites e a massa específica (ρ) das respectivas amostras	98
Figura 3-9. Correlação entre a concentração de NaOH e a acidez em g ácido láctico/100 mL obtida por meio do ensaio do MAPA “Acidez em leite fluido”	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1. Análise de Variâncias (ANOVA) da regressão.....	80
Tabela 3-2. Valores de exatidão (em %) para os analitos em baixa, média e alta concentração.....	81
Tabela 3-3. Concentração experimental de lactose em leite UHT comercial "sem lactose" obtida por meio da curva de linearidade.....	84
Tabela 3-4. Valores de T_2 das amostras de leites UHT comerciais sem adulterantes.	93
Tabela 3-5. Limites de detecção e quantificação para análises de adulteração.	95
Tabela 3-6. Análise de Variâncias (ANOVA) da regressão.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^1H RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – em inglês, *Association of Official Analytical Chemists*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DIL – Decaimento de Indução Livre

DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

DPR – Desvio Padrão Relativo

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – em inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FID – em inglês, *Free Induction Decay*

FT – em inglês, *Fourier Transform*

HPAEC-PAD – em inglês, *High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*

HPLC – em inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*

HPLC-RID – em inglês, *High-Performance Liquid Chromatography using refractive index detector*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN – Instrução Normativa

INVREC – Inversão Recuperação

ISO – em inglês, *International Organization for Standardization*

LC/MS-MS – em inglês, *Liquid Chromatography tandem-Mass Spectrometry*

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

No-D RMNq – Ressonância Magnética Nuclear sem o uso de solvente deuterado

PLSR – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

RD – em inglês, *relaxation delay*

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN-DT – Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo

RMNq – RMN quantitativo

TF – Transformada de Fourier

UHT – em inglês, Ultra High Temperature

LISTA DE SÍMBOLOS

$\overrightarrow{M_0}$ – Vetor Magnetização Resultante

T_2^* – Tempo de Relaxação Transversal Efetivo

$\vec{\mu}$ – Vetor Momento Magnético de Spin Individual

B_0 – Campo Magnético Externo

B_1 – Campo Magnético Oscilante

L_z – Componente z do Momento Angular de Spin Nuclear

M_0 – Momento Magnético Resultante

M_z – Componente da Magnetização no eixo z

T_1 – Tempo de Relaxação Longitudinal

T_2 – Tempo de Relaxação Transversal

ω_0 – Frequência Angular de Larmor

h – Constante de Planck

Hz – Hertz

I – Número Quântico de Spin Nuclear

E – Energia Magnética Nuclear

I – Intensidade do Sinal na Presença de um Gradiente de Campo Magnético

L – Momento Angular de Spin Nuclear

x – Eixo x

xy – Plano Transversal

z – Eixo z

α – Estado Quântico de Menor Energia

β – Estado Quântico de Maior Energia

γ – Constante Magnetogírica

μ – Momento Magnético Nuclear

RESUMO

Leite pode ser definido como uma mistura homogênea de substâncias como lactose, proteínas, glicerídeos, entre outros. Dentre os carboidratos, destaca-se a lactose, i.e., dissacarídeo composto por glicose e galactose, presente no leite bovino em concentração de 4,6 %. De acordo com a Resolução nº 135 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os produtos lácteos rotulados como “sem lactose” devem conter teor de lactose igual ou menor que 1 mg.mL⁻¹. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método de quantificação do teor de lactose por Ressonância Magnética Nuclear (RMNq). A validação do método desenvolvido seguiu as normas previstas pela Resolução RDC nº 166 da ANVISA, e apresentou excelente linearidade, demonstrada pelo valor de $R > 0,990$ e a homocedasticidade dos resultados, bem como valores de precisão, exatidão e robustez menores que 5 %, além de valores de LD e LQ de 0,135 mg.mL⁻¹ e 0,407 mg.mL⁻¹, respectivamente,. Sendo assim, o método pode ser utilizado como alternativa na quantificação de lactose em leite principalmente devido ao tempo de análise de apenas 36 min. Atrelado ao consumo, o índice de não conformidades e possíveis adulterações do leite e produtos lácteos, no Brasil, também é bastante expressivo, como divulgado no Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), está em torno de 20 %. Dentre as técnicas mais utilizadas para o estudo deste leite estão o infravermelho, Raman, ultravioleta e a RMN. No entanto, de acordo com uma vasta busca em bases de pesquisa, poucos estudos envolvendo leite na RMN, Dessa forma, a realização desse estudo tem o objetivo de detectar a adulteração de leites comerciais UHT por RMN no domínio do tempo (RMN-DT) e comparar os resultados com ensaios realizados pelo MAPA. As análises das adulterações de leite UHT com água, amido, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio apresentaram LD e LQ em torno de 3 % v/v e 10 % v/v, respectivamente e, com hidróxido de sódio foi de 0,06 e 0,19 mg.mL⁻¹, respectivamente. Sendo assim, em uma única análise rápida (2 min) e não destrutiva, a DT-RMN foi capaz de detectar a adulteração de leite com diversos adulterantes, dispensando o laborioso trabalho de realizar diversos experimentos para diferentes adulterações.

Palavras-chave: Leite, RMN, Lactose, Adulteração

ABSTRACT

Milk can be defined as a homogeneous mixture of substances such as lactose, proteins, glycerides, among others. Among carbohydrates, lactose stands out, i.e., a disaccharide composed of glucose and galactose, present in bovine milk in a concentration of 4.6 %. According to Resolution No. 135 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA), dairy products labeled as “lactose free” must contain lactose content equal to or less than 1 mg.mL⁻¹. Thus, the objective of this work was to develop and validate a method for quantifying the lactose content by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The validation of the developed method followed the norms foreseen by Resolution RDC nº 166 of ANVISA, and presented excellent linearity, demonstrated by the value of $R > 0.990$ and the homoscedasticity of the results, as well as values of precision, accuracy and robustness less than 5%, besides of LD and LQ values of 0.135 mg.mL⁻¹ and 0.407 mg.mL⁻¹, respectively. Therefore, the method can be used as an alternative to quantify lactose in milk mainly due to the analysis time of only 36 min. Linked to consumption, the index of non-conformities and possible adulterations of milk and dairy products in Brazil is also quite expressive, as disclosed in the Yearbook of Animal Control Programs of the Animal Products Inspection Department (DIPOA), is around 20 %. Among the most used techniques for the study of this milk are infrared, Raman, ultraviolet and NMR. However, according to a vast search in research bases, few studies involving milk on NMR. Thus, this study has the objective of detecting the adulteration of commercial UHT milks by NMR in the time domain (NMR-DT) and compare the results with tests performed by MAPA. The analysis of UHT milk adulterations with water, starch, hydrogen peroxide and sodium hypochlorite showed LD and LQ around 3 % v/v and 10 % v/v, respectively, and with sodium hydroxide it was 0.06 and 0.19 mg.mL⁻¹, respectively. Thus, in a single rapid (2 min) and non-destructive analysis, DT-NMR was able to detect the adulteration of milk with different adulterants, eliminating the laborious task of carrying out different experiments for different adulterations.

Keywords: Milk, NMR, Lactose, Adulteration

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. OBJETIVOS	21
1.1.1. Objetivo Geral.....	21
1.1.2. Objetivos Específicos	21
1.2. Estrutura da Tese	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. LACTOSE	28
2.2. ADULTERAÇÃO DE LEITE.....	35
2.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	42
2.3.1. Fundamentação Teórica	46
2.3.2. RMN quantitativo (RMNq).....	57
2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODO	64
2.4.1. Seletividade	64
2.4.2. Linearidade.....	65
2.4.3. Exatidão.....	67
2.4.4. Precisão.....	68
2.4.5. Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ).....	68
2.4.6. Robustez	70
3. ARTIGOS PRODUZIDOS	71
3.1. ARTIGO 1: QUANTIFICAÇÃO DE LACTOSE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR SEM O USO DE SOLVENTE DEUTERADO (NO-D RMNQ).....	71
3.1.1. Introdução.....	71
3.1.2. Materiais e Métodos	74
3.1.3. Resultados e Discussão	78
3.1.4. Conclusão.....	84

3.2. ARTIGO 2: DETECÇÃO POR DT-RMN DA ADULTERAÇÃO DE LEITE COMERCIAL UHT	86
3.2.1. Introdução.....	86
3.2.2. Materiais e Métodos	90
3.2.3. Resultados e Discussão	92
3.2.4. Conclusão.....	99
4. CONCLUSÃO GERAL	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICE A.....	113

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), ao longo de 2017 foram produzidos mais de 24 bilhões de litros de leite cru ou resfriado em todo o Brasil, o que ilustra a grande importância deste produto para a economia brasileira (IBGE, 2019). No mesmo ano, de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em 2017, o consumo de leite no Brasil ao longo de todo o ano foi cerca de 166 litros por habitante (EMBRAPA, 2018).

De acordo com o “*United States Department of Agriculture*”, o Brasil está entre os maiores produtores de leite do mundo ocupando a sexta colocação, atrás apenas da União Europeia, Estados Unidos, Índia, Rússia e China, como apresentado na Figura 0-1. Em 2018, a produção de leite no Brasil alcançou aproximadamente 23 milhões de toneladas, enquanto a União Europeia produziu cerca de 154 milhões de toneladas. Em relação ao consumo, o Brasil se encontra na 5ª colocação com quase 10 milhões de toneladas de leite consumidas, atrás da Índia, União Europeia, Estados Unidos e China (USDA, 2018).

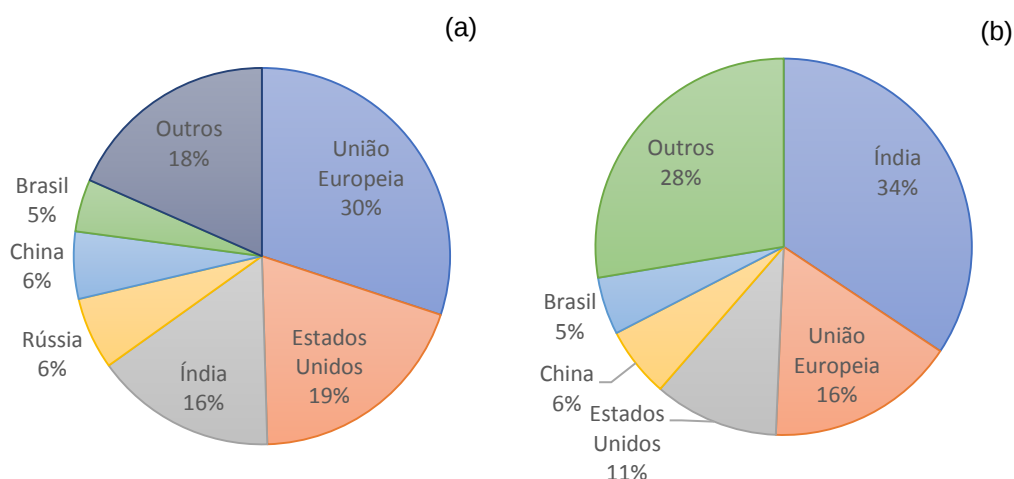


Figura 0-1. Produção (a) e consumo (b) de leite em milhões de toneladas (USDA, 2018).

Arelado ao alto consumo e produção, o índice de não conformidades de leite e produtos lácteos no Brasil é bastante expressivo, em torno de 20 % em ensaios físico-químicos e microbiológicos, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). É importante ressaltar que em tais ensaios é detectada a adição de substâncias proibidas, tais como soro de leite, ureia, açúcares, sais,

conservantes, entre outros (MAPA, 2018). A partir disso é possível observar, portanto, a importância da detecção de não conformidades do leite, visando atender a legislação vigente que busca a qualidade do produto vendido para o consumidor final.

Devido ao alto consumo, ao longo dos anos o controle de qualidade de leite e derivados tem sido alvo de diversos estudos na literatura, bem como a análise de sua composição, em especial estudos envolvendo o teor de açúcares no leite, principalmente a lactose. Os estudos envolvendo esse dissacarídeo aumentaram cada vez mais devido ao alto índice de indivíduos intolerantes. A literatura apresenta a utilização de diversas técnicas para a análise e caracterização de leite, porém as mais utilizadas para este fim são a espectroscopia na região do infravermelho (SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013a; RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013b; AERNOUTS, POLSHIN e SAEYS, 2011; SOYEURT, MISZTAL e GENGLER, 2010) espectroscopia Raman (YAO et al., 2016; LIU et al., 2010; LOU et al., 2011) e a ressonância magnética nuclear (RMN) tanto de alta resolução (HU et al., 2007; ERICH, AZMANN e FISCHER, 2012; ROUGE et al., 2013) quanto no domínio do tempo (SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016; LAMBELET, BERROCAL e RENEVEY, 1992; NASCIMENTO et al., 2017). A utilização da RMN na análise de leite e derivados tem crescido bastante com o passar dos anos, principalmente por apresentar a possibilidade de fornecer simultaneamente informações qualitativas e quantitativas da amostra, por meio de análises rápidas, e dispensar um laborioso preparo de amostra, possibilitando análises do leite *in natura*.

Dessa forma, a fim de obter um estudo químico eficaz sobre o assunto, é necessário conhecer a composição da matriz alimentícia a ser estudada, desenvolver métodos de análise para tal, bem como selecionar a técnica adequada para esse fim (MCGORRIN, 2009; NOVELLINO, RITIENI e RASTRELLI, 2013). Com intuito de regularizar esses métodos, existem alguns órgãos internacionais (como a AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*) e nacionais (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária e MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), que legislam sobre os procedimentos de análise referentes à cada grupo de alimentos (MCGORRIN, 2009; SAMMÁN et al., 2016; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Os principais ensaios exigidos por esses órgãos são sensibilidade, robustez, eficiência e confiabilidade a fim de garantir qualidade e segurança para os consumidores. Todos

esses parâmetros são avaliados para que um método seja validado (GÁRCIA-CAÑAS et al., 2012; SANTOS e COLNAGO, 2013).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo a aplicação da espectroscopia de RMN de alta resolução e no domínio do tempo no estudo da composição e adulteração de leites UHT.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar um método de quantificação de lactose por RMN de ^1H de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 emitida pela ANVISA;
- Quantificar lactose em amostras de leites comerciais UHT (em inglês, *Ultra High Temperature* – UHT) “sem lactose” ou “0 % lactose” por meio do método desenvolvido e validado;
- Detectar a adulteração de leites comerciais UHT por Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo (RMN-DT);
- Correlacionar os resultados do teor de adulterantes com as normas vigentes de controle de qualidade desenvolvido pelo MAPA.

1.2. Estrutura da Tese

Nesta tese está descrito o desenvolvimento de metodologias de análise no controle de qualidade de leite e derivados, tanto em relação ao teor de lactose presente quanto a possíveis adulterantes que podem ser adicionados ao leite. Aqui também está descrito a metodologia para validação de método proposto e sua aplicação em amostras comerciais.

No Capítulo 2 é descrito a fundamentação de todo o estudo, onde é apresentado o estado da arte acerca da matriz utilizada e seus derivados, bem como da lactose, um dos principais constituintes do leite (tópico 2.1). Neste capítulo, no tópico 2.2 também são descritos os métodos de análise de adulteração de leite regulamentados pelo MAPA. No tópico 2.3 é descrito o estado da arte da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), assim como sua fundamentação teórica e aplicações da

técnica na ciência dos alimentos e o uso da RMN quantitativa no estudo de leite e derivados. Já no tópico 2.4 são descritas as principais figuras de mérito utilizadas na validação de um método analítico, bem como as características de cada uma delas.

Já no Capítulo 3 são apresentados os dois artigos do estudo proposto, onde no tópico 3.1 a RMN quantitativa é apresentada como um novo método de quantificação de lactose em leite e alguns derivados. O método proposto foi validado de acordo com as figuras de mérito descritas no tópico 2.4 e, logo depois o método foi aplicado para quantificação do teor residual de lactose em amostras comerciais de leite e alguns derivados UHT rotulados como “sem lactose”.

No tópico 3.2 foi apresentado um método de detecção de adulterantes em leites comerciais UHT pelo uso da Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo (DT-RMN). Os resultados obtidos também foram comparados com métodos oficiais propostos pelo MAPA. Por fim, no Capítulo 4, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

De acordo com o I Congresso Internacional para a Repressão de Fraudes – Genebra (1908), leite pode ser definido como produto integral, não adulterado e sem colostro, proveniente da ordenha completa e higiênica de fêmeas domésticas saudáveis e bem alimentadas (SILVA, 1908). Já do ponto de vista físico-químico, consiste em uma mistura homogênea de diversas substâncias como água, lactose, gordura, proteínas, sais, vitaminas e enzimas, onde algumas se encontram emulsionadas como a gordura e substâncias associadas, outras se apresentam em suspensão, tais como a caseína associada a sais minerais e, por fim, outras se encontram totalmente dissolvidas, como as proteínas do soro, vitaminas hidrossolúveis e a lactose (ORDÓÑEZ et al., 2007).

Dentre os constituintes do leite, a gordura é a que apresenta a maior variação de concentração. Esta pode variar de acordo com a espécie do mamífero, a raça do mesmo, idade da fêmea, fase de lactação, influências sazonais e climáticas e, principalmente, sua alimentação. Já os outros constituintes sintetizados na glândula mamária, possuem concentração mais constante tais como 87,3 % de água, 5 % de açúcar (cerca de 4,6 % é referente a lactose), 3,7 % de gordura, 3,2 % de proteína e 0,8 % de minerais que se apresentam na forma de soluções iônicas (ORDÓÑEZ et al., 2007; FAO/WHO, 2011; FAO/WHO, 2018). Dentre as proteínas, a caseína se apresenta em maior quantidade, cerca de 80 % de toda proteína presente e, ao contrário das demais, não é solúvel no leite o que permite a fabricação de iogurte e a separação desta das demais proteínas. Além disso, esta insolubilidade da caseína possui grande importância na fabricação de queijos, uma vez que a partir da coagulação dela por algumas proteases é formado o gel base da indústria de queijo (ORDÓÑEZ et al., 2007; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Naturalmente, alguns micro-organismos presentes no leite podem trazer benefícios a dieta humana, visto que contribuem nas mudanças físico-químicas e sensoriais do leite, o transformando em produtos lácteos que podem ser consumidos pelo ser humano. No entanto, a atividade microbiológica desordenada e a presença de alguns micro-organismos patogênicos podem ser extremamente prejudiciais para o consumo humano. Para evitar a proliferação de micro-organismos patogênicos e assim garantir sua vida útil, o leite necessita ser armazenado de forma apropriada com a observância de uma série de fatores, tais como local e temperatura de

armazenamento (ORDÓÑEZ et al., 2007; KRACMAROVÁ et al., 2018). Após a ordenha, o leite deve ser armazenado em tanques de aço inoxidável refrigerados com temperatura entre 20 e 25 °C, porém sem ultrapassar o período de 6 horas, uma vez que após esse tempo a acidez do leite pode aumentar a níveis indesejáveis. Ao chegar ao centro de coleta ou de processamento, o leite é resfriado a temperaturas inferiores à 5 °C por até 48 horas para ser processado posteriormente (ORDÓÑEZ et al., 2007).

O tipo de leite de consumo é definido de acordo com o tipo de processamento que este sofre. No Brasil, os tipos de leite de consumo são o pasteurizado, ultrapasteurizado longa vida (em inglês, *Ultra High Temperature* – UHT), leites especiais e em pó (ORDÓÑEZ et al., 2005; NERO, CRUZ e BERSOT, 2017). O leite pasteurizado pode ser classificado como integral, semidesnatado e desnatado, de acordo com o teor de gordura presente e, consiste no leite fluido elaborado a partir do leite cru, refrigerado e que atenda as especificações de produção, coleta e qualidade. A pasteurização consiste em submeter o leite a um tratamento térmico entre 72 e 75 °C por cerca de 15 a 20 segundos, seguido de resfriamento imediato com temperatura inferior à 4 °C e envase antisséptico no menor tempo possível (ORDÓÑEZ et al., 2005; NERO, CRUZ e BERSOT, 2017; CRUZ, et al., 2017). Este procedimento tem o objetivo de eliminar micro-organismos patogênicos, porém os que não são patogênicos permanecem no meio e, portanto, precisam de refrigeração contínua e possuem prazo de validade médio de 10 dias, se mantidos sob refrigeração (CRUZ, et al., 2017).

Já os leites ultrapasteurizados são provenientes da esterilização industrial do leite cru num processo denominado UHT, e podem ser classificados de acordo com o teor de gordura presente, como integral (mínimo de 3 % m/m de gordura), semidesnatado (entre 2,9 e 0,3 % m/m) e desnatado (máximo de 0,3 % m/m) (BRASIL, 2018a). O consumo do leite UHT representa cerca de 76 % de todo o leite fluido consumido no país, onde após o processo UHT a vida útil do leite passa a ser de até 4 meses, além de facilitar o transporte do mesmo por dispensar a refrigeração. Antes de passar pela esterilização, o leite cru é submetido a três processos conhecidos como filtração, padronização e homogeneização (ORDÓÑEZ et al., 2005; CRUZ, et al., 2017). O primeiro consiste em retirar qualquer impureza sólida que possa estar no leite por meio de um filtro, com tamanho de poro entre 25 e 100 µm. A filtração ocorre preferencialmente com o leite morno (40 °C), uma vez que a viscosidade do leite diminui e o processo ocorre de forma mais rápida (ORDÓÑEZ et al., 2005; ORDÓÑEZ

et al., 2007).

Já o processo de padronização é realizado com o objetivo de garantir que a composição do leite esteja de acordo com a legislação vigente e, geralmente, é realizado em relação ao teor de gordura presente. Nesse processo ocorre a remoção quase que total da gordura, na forma de um creme, com teor entre 40 e 50 % m/m que logo depois é reincorporado ao leite desnatado até serem alcançados os valores de gordura desejáveis (ORDÓÑEZ et al., 2007). Para retirada do creme, o leite é encaminhado às centrífugas a temperaturas em torno de 45 °C, ocorre então a separação das fases e os sólidos são depositados no fundo e na lateral. Enquanto o leite sobe pela parte externa dos pratos, o creme segue para o centro por ser mais leve. Por fim, ao leite filtrado e padronizado, é realizado um processo conhecido como homogeneização com o objetivo de estabilizar a emulsão de gordura contra a ação da gravidade, a fim de evitar que a gordura seja separada do restante dos componentes do leite durante o período em que este ficará armazenado. Dessa forma, o leite homogeneizado possui características específicas como composição e consistência uniformes, menor susceptibilidade ao sabor oxidado e coloração mais esbranquiçada que o leite cru, uma vez que quanto menor o número de glóbulos de gordura presentes no leite, maior será a reflexão da luz (ORDÓÑEZ et al., 2007; CRUZ, et al., 2017).

Logo depois, o leite passa pelo processo UHT que consiste em submeter o leite homogeneizado a temperaturas entre 130 e 150 °C por 2 a 4 segundos, resfria-lo imediatamente a temperatura inferior a 32 °C e, por fim, o envasar em embalagens estéreis sob condições assépticas. A partir deste processo, as características físico-químicas e sensoriais são mantidas e micro-organismos, que normalmente se desenvolveriam em condições normais de armazenamento, são destruídos (CRUZ, et al., 2017). Basicamente, existem dois sistemas para a elaboração do leite UHT, o sistema direto e indireto: o primeiro utiliza a injeção de vapor sobre o leite ou a infusão do leite sobre o vapor, por contato direto. Já no sistema indireto, o aumento da temperatura é realizado por meio de trocadores de calor, onde não há contato entre o vapor e o leite (NERO, CRUZ e BERSOT, 2017; CRUZ, et al., 2017).

Os leites que recebem o tratamento UHT também podem passar por outros processos, como o enriquecimento com ferro, fibras ou vitaminas e até mesmo a redução de lactose, que resulta em um produto com baixo teor deste açúcar. O consumo do leite com reduzido teor de lactose é indicado para indivíduos que possuem deficiência na produção de lactase, enzima responsável pela digestão da

lactose. A produção deste leite ocorre por meio de um processo amplamente aceito e consolidado no mercado, que consiste na hidrólise prévia da lactose pela adição da enzima β -galactosidase microbiana, uma lactase derivada do cultivo de fungos e leveduras específicas (ORDÓÑEZ et al., 2007; CRUZ, et al., 2017).

Além de consumido, o leite também é utilizado como matéria-prima na produção de seus derivados, tais como queijo, manteiga, creme de leite, iogurte, entre outros (ORDÓÑEZ et al., 2005; ORDÓÑEZ et al., 2007; CRUZ, et al., 2017). A nata do leite, também conhecida como creme de leite, é amplamente comercializada e consumida no Brasil. O creme de leite consiste no leite enriquecido com gordura, cujo teor varia de 12 a 60 %, e é obtido em desnatadeiras centrífugas com pratos em seu interior onde são depositados os glóbulos de gordura que, por serem mais leves, deslizam até o eixo central do equipamento. É importante ressaltar que a nata e o leite desnatado são obtidos por meio do mesmo processo. Assim como o leite de consumo, o creme de leite pode passar por processos para conservação, tais como pasteurização, esterilização, homogeneização e congelamento (ORDÓÑEZ et al., 2007; CRUZ, et al., 2017).

O processo de pasteurização do creme de leite possui as mesmas características do leite de consumo, porém sob temperaturas ligeiramente maiores pois a gordura forma uma camada protetora em torno dos micro-organismos presentes no meio (NERO, CRUZ e BERSOT, 2017; CRUZ, et al., 2017). Sendo assim, os tratamentos térmicos são realizados sob temperaturas em torno de 72 °C por 15 s para natas leves, pois se submetidas a temperaturas em torno de 100 °C as natas adquirem sabores estranhos semelhantes às natas velhas. Quando preparado para longos períodos de conservação, o creme de leite passa pelo processo de homogeneização com o objetivo de evitar a agregação dos glóbulos de gordura, evitando assim a formação de espumas. Este processo é realizado em duas partes a fim de evitar o aumento da viscosidade pela formação de grumos. Na primeira etapa, o creme de leite é submetido a pressões entre 6 e 7 MPa à 70 °C e, na segunda etapa, a temperatura é mantida constante com redução na pressão para 1,5 Mpa. Assim como o leite, as natas também podem passar por processos semelhantes de esterilização, dentre eles está o UHT, em que a nata é submetida a processos térmicos com temperaturas mínimas de 132 °C por cerca de 2 s e, logo em seguida, são envasadas em embalagens semirrígidas de materiais laminados e estéreis (ORDÓÑEZ et al., 2007; NERO, CRUZ e BERSOT, 2017; CRUZ, et al., 2017).

Além da nata, a partir do leite também podem ser obtidos os leites fermentados, destacando-se o iogurte por ser o mais conhecido e consumido. De acordo com o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, regido pela Instrução Normativa (IN) nº 46 de 23 de outubro de 2007 emitido MAPA, iogurte pode ser definido como o produto de leite fermentado por duas bactérias lácteas específicas, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, podendo ser adicionadas outras bactérias, como a coalhada que, ao contrário do iogurte, é proveniente da fermentação do leite por bactérias lácticas como as *L. lactis lactis* e *cremosis* (BRASIL, 2009; NERO, CRUZ e BERSOT, 2017; CRUZ, et al., 2017). Os ingredientes obrigatórios na produção dos leites fermentados são leite, leite padronizado e as bactérias lácteas, e podem ser adicionados ingredientes opcionais como frutas, carboidratos (açúcares e maltodextrinas), ou substâncias alimentícias como mel, chocolate, café, entre outros. Para produção dos leites fermentados, o leite passa por todo processo de filtração, padronização, homogeneização e, logo depois pelo processo de esterilização UHT para, a partir daí, ser encaminhado ao processo de inoculação e, por fim, o resfriamento para envase, como pode ser observado na Figura 2-1 abaixo. Para produção de qualquer leite fermentado sem lactose, é adicionada a enzima lactase ao leite pasteurizado, padronizado, homogeneizado e esterilizado e, logo depois, é realizada a cultura láctica com o intuito de fermentar o leite e formar o produto desejado (ORDÓÑEZ, 2007; NERO, CRUZ e BERSOT, 2017).



Figura 2-1. Fluxograma básico de processamento de iogurte (NERO, CRUZ e BERSOT, 2017).

De acordo com a RDC nº 135 de 08 de fevereiro de 2017 emitida pela ANVISA, os produtos comercializados no Brasil para dietas com restrição de lactose são classificados como “isentos de lactose” ou “baixo teor de lactose”. Os primeiros devem conter teores de lactose igual ou abaixo de 100 mg por 100 g ou mL do alimento pronto para consumo. Já os alimentos com baixo teor de lactose devem possuir quantidades de lactose maiores que 100 mg por 100 g ou mL e menores que 1 g por 100 g ou mL de produto. É importante ressaltar que os produtos isentos de lactose devem ser rotulados como “zero lactose”, “0 % lactose”, “sem lactose” ou “não contém lactose”.

Já os outros, devem ser rotulados como “baixo teor de lactose” ou “baixo em lactose”, de acordo com a legislação (BRASIL, 2017a).

2.1. LACTOSE

Dentre os carboidratos presentes no leite, destaca-se a lactose que pode ser definida como um dissacarídeo composto por glicose e galactose, cujo teor no leite bovino é de aproximadamente 4,6 % m/m (BRASIL, 2018a). Normalmente, o ser humano realiza a digestão da lactose por meio de sua clivagem a partir da ação da lactase, uma enzima presente no organismo humano (Figura 2-2) (BRASIL, 2007).

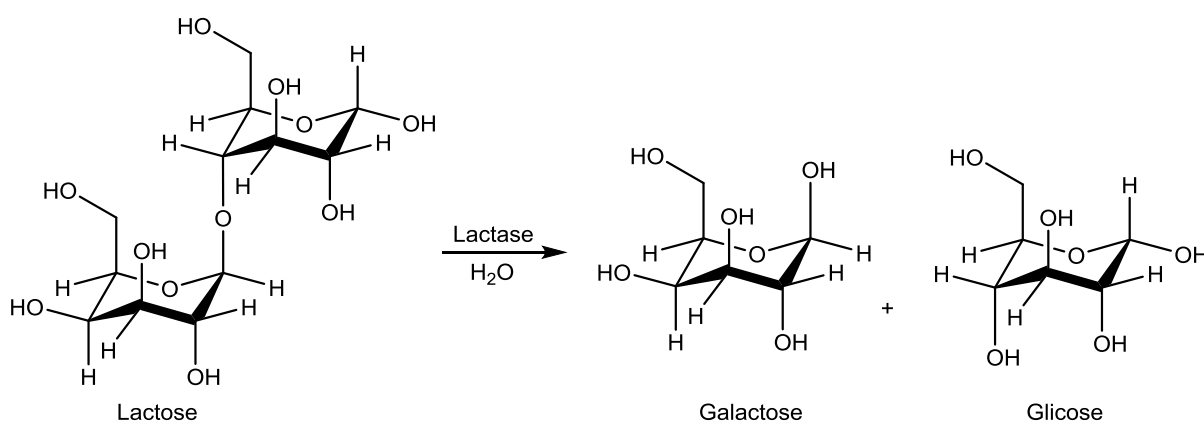


Figura 2-2. Reação de hidrólise da lactose pela enzima lactase resultando em galactose e glicose.

No entanto, tal digestão decresce após o desmame, uma vez que os níveis de lactase também diminuem num fenômeno conhecido como hipolactasia primária. Indivíduos com deficiência de lactase não são capazes de hidrolisar completamente a lactose e, este carboidrato não hidrolisado atrai água para o intestino e o leva a motilidade gastrointestinal, ocasionando dores abdominais e diarreia (GARBALLO-RUBIO et al., 2018; GILLE et al., 2018). Além disso, parte do carboidrato não clivado passa a ser degradado por bactérias intestinais, em meio ácido, liberando gás carbônico e resultando em cólicas intestinais, náuseas, diarreia, flatulência, entre outros sintomas. Dessa forma, indivíduos que não são capazes de hidrolisar a lactose, podem ser considerados intolerantes a esse dissacarídeo (GARBALLO-RUBIO et al., 2018; GILLE et al., 2018; FAO, 2013). De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a intolerância à lactose afeta cerca de 70 % da população adulta mundial, e na América do Sul essa porcentagem chega a 50 % da população adulta (FAO, 2013).

De acordo com informações da base de dados *Web of Science*, a intolerância à lactose é base para diversos estudos ao redor do mundo, com um crescimento quase que exponencial, como pode ser observado na Figura 2-3. É possível observar que desde o primeiro estudo voltado a esse assunto, em 1962, a pesquisa envolvendo este tema só cresceu, especialmente na última década onde mais de 1000 publicações abordaram a intolerância à lactose. E apenas nos dois primeiros meses de 2020, cerca de 10 artigos já foram publicados, o que demonstra a preocupação dos grupos de pesquisa ao redor do mundo com a saúde dos indivíduos intolerantes à lactose.

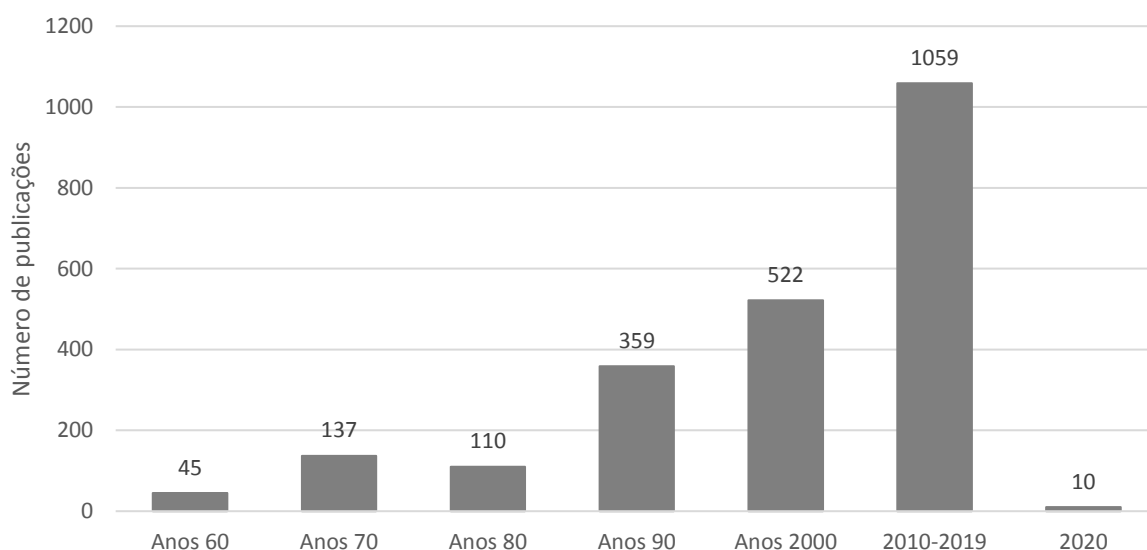


Figura 2-3. Número de publicações envolvendo a intolerância à lactose, de 1962 até os dias de hoje, segundo consulta na base de dados *Web of Science* com as palavras-chave: "*lactose and intolerance*".

Em 1962, foi publicado o primeiro estudo envolvendo a intolerância à lactose, desenvolvido por Holzel e colaboradores (1962), no qual foi discutida a intolerância em crianças. Logo depois, diversos estudos foram desenvolvidos, tais como o de Kern e colaboradores (1963) que estudaram a deficiência de lactase no organismo de adultos, além de Dahlqvist e colaboradores (1963), que no mesmo ano estudaram a deficiência intestinal de lactase e a relação com a intolerância à lactose também em adultos (HOLZEL, MEREU e THOMSON, 1962; KERN et al., 1963; DAHLQVIST et al., 1963). Em 1964, foi desenvolvido um estudo envolvendo a intolerância em indivíduos com atividade normal de lactase em seu organismo. Os autores acreditavam que era uma doença intrínseca de crianças, as quais apresentam como sintomas, vômitos e diarreia após o consumo de alimentos contendo lactose. O trabalho foi o primeiro estudo reportado de intolerância à lactose no Japão, e levantou

a possibilidade da existência de 2 tipos de intolerância: o primeiro devido a permeabilidade anormal da lactose na mucosa intestinal mesmo com atividade normal de lactase e, o segundo tipo devido a um defeito na atividade da enzima lactase (ARAKAWA, AKABANE e AKABANE, 1964).

Já em 1967, em uma publicação na revista Nature, Davis e Bolin (1967) afirmam que a intolerância a lactose era influenciada pela raça, onde negros e aborígenes australianos apresentavam menos sintomas que caucasianos e, em seu estudo, avaliaram a intolerância em asiáticos. Os autores concluíram que a doença foi mais comum em grupos de indianos e chineses, uma vez que estes apresentaram maior deficiência da enzima lactase, provavelmente devido a alguma mutação genética (DAVIS e BOLIN, 1967). Logo depois, McGuilivray (1968) refuta o trabalho de Davis e Bolin, uma vez que haviam sido registrados diversos casos de não caucasianos com intolerância a lactose e, propõe alguns outros testes a fim de confirmar a relação da deficiência de lactase com a diferença racial e, levantam a possibilidade desta condição ser rara em adultos de qualquer raça (MCGUILIVRAY, 1968).

Já na década de 70, alguns estudos começaram a propor o uso de leite sem lactose como solução dos problemas com a intolerância. O estudo pioneiro a envolver esse assunto foi o de Skála e colaboradores (1971), que tiveram o intuito de estudar a tolerância de indivíduos, previamente denominados de intolerantes à lactose, após a ingestão de leite sem lactose, e os resultados foram comparados com a tolerância desses indivíduos após a ingestão de leites sem qualquer tipo de modificação. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que os indivíduos apresentaram maior tolerância ao consumirem leite sem lactose, diferentemente do leite comum, onde após o consumo deste último, os indivíduos apresentaram todos os sintomas de intolerância. Sendo assim, os autores concluíram que uma dieta a base de alimentos sem lactose, poderia ser uma alternativa a intolerância a lactose para que indivíduos intolerantes não precisassem abrir mão do consumo de produtos lácteos (SKÁLA, LAMACOVÁ e PIRK, 1971).

Em 1973 foi realizado o primeiro estudo envolvendo a utilização da hidrólise de β -galactosídeos por meio do uso de polímeros a fim de produzir leite sem lactose. Nesse trabalho, a enzima lactase era encapsulada em poliacrilamida para o preparo do leite sem lactose. A enzima foi adicionada a solução de leite com cerca de 10 g de lactose em 100 mL de amostra e, cerca de 55 % (m/v) da lactose no meio foi

hidrolisada, comprovando a atividade enzimática da lactase. Até então, acreditava-se que 5 g de lactose em 100 mL de leite seria o limite máximo de consumo para indivíduos intolerantes e, os resultados obtidos foram abaixo desse valor (4,5 g/100 mL de leite). No entanto, apesar de resultados promissores, ainda seriam necessários maiores estudos a fim de otimizar o seu processo de produção (DAHLQVIST, MATTIASSON e MOSBACH, 1973).

A fim de garantir o consumo de leite com quantidades seguras de lactose, por indivíduos intolerantes, sua quantificação se tornou bastante necessária. Tanto que a partir da década de 90, diversos estudos passaram a ser desenvolvidos em busca de um método que fosse capaz de quantificar o teor de lactose em leite. De acordo com a *Web of Science*, os trabalhos envolvendo a determinação e quantificação de lactose foi crescente nos últimos anos. Dentre as diversas técnicas utilizadas na quantificação, as primeiras e mais utilizadas são: Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (*High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC, em inglês), Cromatografia de troca iônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (*High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* - HPAEC-PAD, em inglês), método enzimático, entre outros. Além disso, de acordo com o MAPA, a cromatografia líquida de alta eficiência regida pela Organização Internacional de Normalização (em inglês, *International Organization for Standardization* – ISO) 22662, o método enzimático descrito na ISO 26462 e a cromatografia iônica são considerados métodos oficiais para quantificar teor de lactose em leite (BRASIL, 2018b).

A primeira análise envolvendo a CLAE no estudo da lactose, foi desenvolvida por Euber e Brunner, em 1979, onde os autores propuseram um método de determinação e quantificação de lactose em produtos lácteos. A quantificação foi realizada por meio da injeção sequencial de padrão de lactose e adição da mesma nas amostras. Após isso, o método foi validado por meio dos experimentos de recuperação e, as análises foram realizadas por um sistema CLAE com detecção por índice de refração. A partir dos resultados, observou-se que o método foi capaz de quantificar teores de lactose presentes no leite e em seus derivados, em torno de 5,28 % (m/v) e 10,60 % (m/v), respectivamente, com exatidão e precisão de 0,68 %. O método proposto é mais rápido que os encontrados na literatura, no entanto, cada corrida durou cerca de 45 minutos além do laborioso preparo prévio de amostras (EUBER e BRUNNER, 1979).

Logo depois, diversos estudos foram realizados com o mesmo propósito, dentre eles está o de Jeon e colaboradores (1984) onde foi desenvolvido um método rápido, capaz de quantificar lactose, glicose e galactose em amostras de soro de leite. A quantificação foi realizada por meio de um sistema CLAE com detecção por índice de refração e, a validação do método foi realizado por meio da avaliação da precisão e exatidão. De acordo com resultados dos desvios padrão e, conseqüentemente, os valores de precisão, em torno de 98 % (lactose) e 101,5 % (glicose e galactose) e, exatidão entre 0,27 e 3,20 %, foi possível concluir que o método foi capaz de quantificar o teor de lactose presentes nas amostras. No entanto, o que os autores abordam como um método rápido (cerca de 30 minutos de corrida, preparo de amostra de 15 minutos e, por fim, tempo de hidrólise de 4 horas) pode ser considerado um método demorado e laborioso (JEON, GALITZER e HENNESSY, 1984).

Já no século XXI, Chávez-Servin e colaboradores (2004), por sua vez, desenvolveram um método a fim de detectar e quantificar 6 carboidratos (frutose, glicose, galactose, sacarose, lactulose e lactose) por meio da CLAE com índice de refração. O método foi aplicado em amostras de fórmulas infantis e, além disso, foi validado por meio dos seguintes parâmetros: linearidade observada por meio do coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão. O método apresentou linearidade ($R^2 = 0,99$) e foi capaz de quantificar com confiabilidade os açúcares propostos, com valores de LD e LQ para lactose de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente e, para este açúcar, a exatidão foi mantida com erro em torno de 7 e 10 % e precisão com erro de 0,46 %. No entanto, o tempo gasto entre o preparo de amostra e a corrida foi de pelo menos 3 horas para cada análise (CHÁVEZ-SERVIN, CASTELLOTE e LÓPEZ-SABATER, 2004).

A busca por métodos mais rápidos e eficientes é constante, tanto que Xinmin e colaboradores (2008) desenvolveram um estudo com o objetivo de diminuir o tempo de análise de quantificação de lactose e glicosamina por CLAE com detector por índice de refração. O método foi aplicado em amostras de leite em pó suplementadas com glicosamina e, por fim, passou por processo de validação seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão. A linearidade foi avaliada por meio do R^2 que apresentou valores maiores que 0,99 para a lactose; a sensibilidade foi demonstrada por meio do LD = $0,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ e LQ = $0,24 \text{ mg.mL}^{-1}$ para lactose; precisão avaliada pela repetibilidade com desvio padrão relativo em

torno de 1,06 % e, por fim, a exatidão com valores em torno de 98 % de recuperação. O tempo de preparo de amostra e aquisição dos resultados foram de 40 minutos e, frente a outros estudos utilizando a mesma técnica, esse estudo apresentou menor tempo de análise para a mesma técnica cromatográfica (XINMIN et al., 2008).

A cromatografia de troca iônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD, em inglês) teve seu primeiro estudo aplicado na determinação e quantificação de lactose em leite no trabalho de Herber e Robinett (1994). Neste trabalho, os autores utilizaram a técnica na determinação de açúcares, dentre eles a galactose, glicose, frutose, lactose, entre outros. A quantificação foi realizada por meio da área dos sinais cromatográficos e, a validação foi obtida pela análise da sensibilidade, avaliada pelo valor de $LQ = 2,12 \text{ mg.mL}^{-1}$, linearidade ($R^2 = 0,995$) e precisão, avaliada pela reprodutibilidade com desvio padrão relativo de 0,5 %. A partir dos resultados de validação, os autores concluíram que o método foi capaz de determinar os teores de açúcares, com um tempo de análise de 46 minutos. No entanto, ainda seriam necessários mais alguns estudos a fim de diminuir o tempo de análise (HERBER e ROBINETT, 1994).

Além dos leites com teor reduzido de lactose, alguns trabalhos na literatura buscaram outras alternativas para indivíduos intolerantes, como o estudo de Martinez-Ferez e colaboradores (2006), que desenvolveram um método de determinação do teor de lactose em leite de cabra e o compararam com o leite bovino, com o intuito de inserir o leite de cabra na dieta humana. O método necessitou de uma purificação prévia, com o objetivo de isolar a lactose, uma vez que inicialmente foram detectados cerca de 15 oligossacarídeos. O teor de lactose determinado no leite de cabra foi de 45 g.L^{-1} , pouco menor que o encontrado no leite bovino (46 g.L^{-1}), sendo assim, o leite de cabra não é uma alternativa viável para dieta de indivíduos intolerantes à lactose (MARTINEZ-FEREZ et al., 2006).

Van Scheppingen e colaboradores (2017) desenvolveram um método para quantificação de lactose em leite e produtos lácteos rotulados como “sem lactose”, tais como achocolatado, iogurte, *cream cheese* e manteiga. Inicialmente, as amostras passaram por um preparo prévio com o objetivo de isolar a lactose presente, para isso as amostras foram diluídas, centrifugadas e ultrafiltradas. O método foi validado por meio de parâmetros como seletividade, de acordo com o isolamento do pico no tempo de retenção da lactose (36 min); linearidade, avaliada por meio do coeficiente de correlação ($R = 0,997$), precisão, de acordo com o desvio padrão relativo ($DPR =$

2,1 % para o leite e DPR de 1,1 %, 1,4 % e 1,9 % para *cream cheese*, achocolatado e iogurte, respectivamente; exatidão, de acordo com a recuperação que variou entre 93,4 e 97,5 % para o leite e seus derivados; e, por fim, o limite de quantificação da lactose para cada amostra, variou entre 0,4 mg.mL⁻¹ (achocolatado e iogurte) e 1,0 mg.mL⁻¹ (leite). Devido aos excelentes resultados, o método pode ser considerado uma boa alternativa na quantificação de lactose em produtos lácteos com baixo teor de lactose. No entanto, apenas o preparo de amostra durou 55 minutos, fora o tempo de corrida que foi de cerca de 50 minutos, ou seja, o método é bastante demorado e vai contra o desejo de um método de quantificação rápido e eficaz (VAN SCHEPPINGEN et al., 2017).

Outro exemplo de aplicação da técnica para quantificação de lactose em derivados foi o estudo de Monti e colaboradores (2017), que desenvolveram um método de quantificação de lactose, galactose e glicose, por HPAEC-PAD, em queijo Grana Padano “livre de lactose”. Os valores de limite de detecção e quantificação obtidos pelo método para a galactose e glicose foram os menores, em torno de 0,15 mg/100 g e 0,26 mg/100 g, respectivamente, para ambas as amostras. Já os limites de detecção e quantificação para lactose foram 0,25 mg/100 g e 0,41 mg/100 g, respectivamente. No entanto, as amostras passaram por um longo preparo prévio que envolveu filtração e centrifugação para isolamento da lactose, por um período de 35 minutos, enquanto a análise durou cerca de 60 minutos (MONTI et al., 2017).

O método enzimático consiste na hidrólise da lactose por meio de uma enzima e, a partir da quantificação da glicose livre após a clivagem, é possível determinar o teor de lactose inicial presente na amostra. Diversos estudos envolvendo a aplicação desse método na quantificação de lactose foram desenvolvidos ao longo dos anos. Puchades e colaboradores (1993), por exemplo, aplicaram o método enzimático para quantificação da lactose em amostras de leite. Inicialmente, foram realizados ensaios de interferência a fim de determinar se outros açúcares como glicose, frutose, maltose e sacarose influenciariam na determinação do teor de lactose, pois tais sacarídeos também poderiam ser hidrolisados. Entretanto, os resultados obtidos confirmaram a capacidade do método na quantificação, por meio da linearidade ($R = 0,995$), exatidão (98-102 % de recuperação) e precisão (DPR = 0,49 %), e pode ser explicado pela seletividade da enzima (PUCHADES, MAQUIEIRA e TORRO, 1993).

Já Trani e colaboradores (2017) desenvolveram um estudo com o intuito de comparar HPLC-RID (em inglês, *High-Performance Liquid Chromatography using*

refractive index detector), LC/MS-MS (em inglês, *Liquid Chromatography tandem-Mass Spectrometry*) e o método enzimático na quantificação de lactose em leites UHT comerciais. Foram analisadas amostras de leite UHT de diferentes marcas, dentre essas, leites sem lactose e leite semidesnatados. O método demonstrou que os níveis de lactose em amostras de leite comercial, leite 0,01 % de lactose e leite 0,1 % de lactose, foram de 5,024 g/100 mL, 0,01 g/100 mL e 0,0132 g/100 mL, respectivamente (TRANI et al., 2017). Gille e colaboradores (2018) quantificaram a lactose em leite e derivados lácteos “sem lactose” a partir de um método no qual ela não fosse ofuscada pela presença de glicose e galactose, presentes devido a utilização do método enzimático. De acordo com os autores, para análises da lactose em leite, o método apresentou LD = 0,25 mg.mL⁻¹ e LQ = 0,57 mg.mL⁻¹ com exatidão de 94 % (ensaios de recuperação). No entanto, ao ser aplicado a amostras derivadas do leite como iogurte e queijo, o método apresentou valores de exatidão entre 64 e 125 % e, dessa forma, não pode ser aplicado em derivados (GILLE et al., 2018). Fusch e colaboradores (2011) descrevem em seu trabalho que o método enzimático não é capaz de diferenciar a galactose proveniente entre a clivagem da lactose e a galactose livre presente no leite, o que pode gerar resultados não tão confiáveis e, portanto, apresenta sinais de desuso (FUSCH et al., 2011).

Além das técnicas já citadas na quantificação de lactose, a RMN tem dado seus primeiros passos em tais estudos e sua aplicação será melhor discutida no tópico 2.3.2 – RMN quantitativo (RMNq).

2.2. ADULTERAÇÃO DE LEITE

A inspeção e fiscalização de todo o processo de produção de produtos de origem animal é de responsabilidade do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, pertencente ao MAPA, que regulamentou todas as análises laboratoriais que devem ser realizadas no controle de qualidade do produtos de origem animal, por meio do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, com o objetivo de reunir, uniformizar e atualizar as metodologias analíticas de diversos regulamentos técnicos de análise nacionais (BRASIL, 2018b). O manual traz os métodos químicos de análise de carnes e seus produtos, leites e derivados, mel e produtos apícolas, ovos e derivados, e pescados e seus produtos, além dos métodos de análises microbiológicas. Este manual substituiu principalmente

a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 que regulamentava boa parte das análises físico-químicas e microbiológicas dos produtos de origem animal (BRASIL, 2006).

O controle de qualidade de tais alimentos transcende as análises de inspeção e fiscalização de rotina, mas busca também a identificação da adulteração de tais alimentos, uma vez que tal ato é considerado como fraude. Em 2007, a polícia federal brasileira iniciou uma operação conhecida como “Operação Ouro Branco” com o intuito de identificar os diversos tipos de fraudes realizadas no leite. Neste mesmo ano, duas cooperativas mineiras foram alvo de investigação por fraude no leite beneficiado por elas, cerca de 120 mil litros/dia, porém apenas os leites UHT foram adulterados. Nesta ocasião, haviam sido adicionados soda cáustica, sal, água, entre outros, ao leite comercializado e, cerca de 28 pessoas responderam pelo crime contra à saúde pública e configurou na primeira prisão, no Brasil, por adulteração de leite (BRASIL, 2012). Já em 2013 foi deflagrada a “Operação Leite Compen\$ado” que em sua primeira etapa, desmontou um esquema no Rio Grande do Sul onde cerca de 100 milhões de litros de leite foram adulterados com água e ureia, com o intuito de aumentar o volume e disfarçar perdas nutricionais no leite a ser beneficiado. Já em sua oitava etapa, em algumas cooperativas no Rio Grande do Sul, foram detectadas adulterações de leite com sal, açúcar ou amido de milho com o intuito de mascarar as adulterações com água que alteram a densidade do leite (G1, 2015). Em sua décima segunda etapa, foram apreendidos milhões de litros de leite com amido, água e água oxigenada com o intuito de aumentar a vida útil do produto (MPRS, 2016).

Os adulterantes do leite podem ser classificados em reconstituintes, neutralizantes, sanitizantes e conservantes, de acordo com o objetivo de sua adição. Os adulterantes reconstituintes são adicionados com o objetivo de mascarar as outras adições ao leite, principalmente a água, uma vez que tal adição diminui os valores de densidade original do leite. Sendo assim, para que os valores de densidade não fiquem fora do permitido pela legislação, são adicionadas substâncias que reconstituem os valores de densidade, ou seja, aumentam a densidade para os valores exigidos pela legislação. Os reconstituintes mais utilizados são o cloreto de sódio, a sacarose e, principalmente, o amido de milho e o soro de leite (SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013a; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013b; SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016; GONDIM et al., 2017).

Os adulterantes neutralizantes, são adicionados com o objetivo de mascarar a acidez elevada do leite, em relação ao permitido pela legislação. O aumento na acidez do leite pode ser proveniente da alimentação do gado, mas principalmente pela ação de micro-organismos. O uso de neutralizantes pode acarretar na alteração da composição do leite provocando a saponificação da gordura, desintegração das proteínas, além de promover um meio favorável para o surgimento de micro-organismos que não sobreviveriam em meio ácido. Sendo assim, com o surgimento de mais micro-organismos, estes aumentam a acidez do meio, fazendo necessário o uso de mais neutralizantes, o que leva a um ciclo vicioso de adulteração e exige o desenvolvimento de fraudes cada vez mais sofisticadas, com o intuito de inibir a proliferação microbiana, sem que afete a acidez do material fraudado. Os principais neutralizantes utilizados são os hidróxidos de metais alcalinos, bem como carbonatos e bicarbonatos, em especial o hidróxido de sódio e o bicarbonato de sódio, por serem facilmente encontrados em supermercados (GONDIM, et al., 2017; AIELLO et al., 2019).

A adição de adulterantes sanitizantes é realizada com o objetivo de minimizar a ação microbiana excedente, além de aumentar o volume do leite, assim como a adulteração com água. No entanto, acima de determinadas concentrações promove a desintegração das proteínas, além de alterar a cor do leite comercializado. O principal agente sanitizante é a água sanitária (hipoclorito de sódio) e o cloro, que são amplamente utilizados no processo de sanitização dos equipamentos de estocagem do leite (GONDIM, et al., 2017). Por fim, os adulterantes conservantes são adicionados com o objetivo de aumentar a vida útil do leite, impedindo ou retardando as alterações realizadas por micro-organismos. A água oxigenada por exemplo, um dos mais utilizados, é empregada com o intuito de impedir a atividade microbiana que poderiam deteriorar o leite, além de atribuir sabor estranho e adstringente (SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013a; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013b; SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016; ASSEIS NETO et al., 2019; IVANOVA et al., 2019).

Dentre os principais adulterantes utilizados pode-se destacar a água, soro de leite, hidróxido de sódio, amido, água sanitária e o peróxido de hidrogênio. De acordo com o manual do MAPA, as análises para tais adulterantes são apenas qualitativas, ou seja, apontam apenas resultados positivos ou negativos para presença da substância adicionada, tais como amido, água sanitária, hidróxido de sódio e peróxido

de hidrogênio. Já os experimentos indicados para avaliar a adição de água e soro de leite, podem ser tanto qualitativos quanto quantitativos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2018b).

A análise para identificação de amido no leite, de acordo com o manual do MAPA, consiste na formação de um composto de coloração azul por meio da adição de uma solução de lugol ao leite, após aquecimento. Tal solução é obtida a partir da dissolução do iodo (I_2) ou do iodeto de potássio (KI) em água. O amido é constituído por dois polímeros: a amilose e a amilopectina, onde a primeira é formada pela forma cíclica da glicose e conferem à molécula uma estrutura helicoidal que, após o aquecimento, é aberta permitindo assim a adsorção do iodo presente na solução de lugol. O complexo formado, após resfriamento à temperatura ambiente, possui coloração azul, caracterizando assim a presença de amido na amostra. Por não ser um constituinte natural o leite, o teste para amido é representado como positivo, se a solução apresentar coloração azul acinzentado (■) ou azul (■), ou negativo (BRASIL, 2006; BRASIL, 2016a; BRASIL, 2018b).

A análise para identificação de água sanitária no leite é fundamentada na reação entre o cloreto presente na amostra adulterada com o nitrato de prata na presença de cromato de potássio, utilizado como indicador. Nesta reação, os íons cloretos reagem o nitrato de prata, formando o cloreto de prata e, o final da reação, é identificado pela reação do excesso de nitrato de prata com o cromato de potássio que forma um precipitado marrom. O método é qualitativo e, basicamente, colorimétrico, uma vez que se baseia na intensidade da cor do precipitado formado, ou seja, quanto maior a presença de íons cloreto na amostra, menos intensa será a cor, uma vez que o excesso de nitrato de prata será menor. O resultado desta análise será positivo se for observada a cor amarela sem precipitados vermelhos/marrom (BRASIL, 2006; BRASIL, 2016b; BRASIL, 2018b).

Segundo o MAPA, a adulteração com hidróxido de sódio é detectada por meio da análise de acidez titulável em leite fluido. O leite sem qualquer beneficiamento é levemente ácido devido sua composição natural, além da fermentação da lactose em ácido láctico, realizada pelos micro-organismos ali presentes. Dependendo da alimentação do animal e das equivocadas condições de higiene e refrigeração do leite, a acidez deste pode aumentar ainda mais o que o torna impróprio para consumo humano e, a fim de diminuir essa acidez para teores de acordo com a legislação, adiciona-se uma base como o hidróxido de sódio, por exemplo. O método de

verificação de tal adição se fundamenta na titulação do leite com uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando a fenolftaleína como indicador (BRASIL, 2006; BRASIL, 2016c; BRASIL, 2018b). Por possuir diversos fatores que podem contribuir com a variação da acidez no leite, o MAPA alerta para que esse método seja utilizado com cautela. De acordo com a Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018, a acidez do leite UHT, assim como o pasteurizado, deve estar entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/100 mL de amostra (BRASIL, 2018a).

A adulteração com a água pode ser detectada por meio do ensaio de densidade com o uso do termolactodensímetro, que é responsável pelas medidas de densidade e temperatura do leite. A densidade do leite está associada com a quantidade de gordura suspensa presente que apresenta densidade menor que a da água. Dessa forma, quanto maior o teor de gordura no leite, menor será a densidade do mesmo, sendo assim, se houver a adição de água no leite, a densidade dele diminuirá para valores próximos aos da água. O método pode ser utilizado para amostras de leite in natura, pasteurizados ou longa vida (UHT) e, consiste na imersão do termolactodensímetro no líquido que provocará um deslocamento deste e marcará a densidade real do leite. Pela legislação, a densidade do leite deve estar entre 1,028 g.L⁻¹ e 1,033 g.L⁻¹ (BRASIL, 2006; BRASIL, 2016d; BRASIL, 2016e; BRASIL, 2018b).

Por fim, a adulteração de leite com peróxidos pode ser tanto detectada quanto quantificada. O peróxido de hidrogênio quando adicionado ao leite previne a proliferação dos micro-organismos que hidrolisam a lactose e a transformam em ácido láctico. O ensaio de detecção do peróxido de hidrogênio é fundamentado na oxidação do indicador tetraguaiacol pelo produto da degradação do peróxido de hidrogênio pela enzima peroxidase, já presente no leite. O teste é considerado positivo para presença de peróxido de hidrogênio quando apresentar coloração salmão. No entanto, este ensaio apresenta algumas limitações, pois pode ocorrer a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, fornecendo um resultado negativo (BRASIL, 2006; BRASIL, 2016f; BRASIL, 2018b).

A adulteração de leite é bastante explorada na literatura, os mais recentes estudos envolvem o desenvolvimento de novas técnicas para detecção e quantificação de adulterantes em amostras de leite, principalmente de vaca. Dentre os adulterantes utilizados, o primeiro método de quantificação de peróxido de hidrogênio foi desenvolvido em um trabalho de Ivanova e colaboradores (2019) com

o uso da CLAE em amostras de leite pasteurizado comercial desnatados, semidesnatados e integrais adulterantes. Os autores validaram o método de acordo com análises de linearidade, que apresentaram valores de coeficiente de correlação (R) igual a 0,9995 e coeficiente angular diferente de zero; exatidão com valores de recuperação de 99,7 %; precisão cujo desvio padrão foi 1,06 %; limite de detecção ($LD = 0,28 \text{ mg.mL}^{-1}$) e quantificação ($LQ = 0,94 \text{ mg.mL}^{-1}$). No entanto, o método apresenta algumas limitações, tais como o tempo de análise de aproximadamente 2 horas, além do laborioso preparo de amostra realizado antes da análise (IVANOVA et al., 2019).

No mesmo ano, Aiello e colaboradores (2019) também utilizaram a cromatografia líquida para detectar a adulteração de leite com hidróxido de sódio por meio da determinação do teor de ácido láctico presente na amostra. Para desenvolver o método, foram adicionados teores de hidróxido de sódio em amostras de leite acidificadas com ácido láctico e, posteriormente, o método foi validado pela análise dos seguintes parâmetros: linearidade, avaliada pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$); precisão, determinada pelo desvio padrão relativo (DPR) de análises realizadas no mesmo dia (DPR = 0,092 %) e em dias diferentes (DPR = 0,123 %); limites de detecção ($LD = 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) e quantificação ($LQ = 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). O método possui algumas limitações que devem ser destacadas como o tempo total de corrida de 30 minutos e, aplicação do método que deve ser utilizado apenas em leites com pH entre 6,5 e 6,7 (AIELLO, 2019).

Segundo Nascimento et al. (2017) e Valand et al. (2020), o infravermelho é uma das técnicas mais utilizadas na detecção da adulteração, com diversos estudos publicados ao longo dos últimos dez anos (NASCIMENTO et al., 2017a; VALAND et al., 2020). Dentre eles estão o de Cassoli et al. (2011) que realizaram um estudo da capacidade do infravermelho em identificar a adulteração de leite cru com bicarbonato de sódio, soro de leite e citrato de sódio por infravermelho médio. O objetivo do trabalho era apenas identificar a presença ou não do adulterante e, a partir do método desenvolvido foram identificadas todas as concentrações dos adulterantes adicionados com $LD = 0,05 \%$. No entanto, logo depois foram realizadas as validações do método com análise de amostras com concentrações conhecidas de adulterantes e, cerca de 7 % delas apresentaram resultados falsos-positivos e os autores não apresentaram possíveis explicações para o ocorrido (CASSOLI et al., 2011).

Santos e colaboradores (2013a) desenvolveram um método de detecção e

quantificação da adulteração de leite UHT com urina, ureia, soro de leite e leite sintético — produzido pela emulsão de óleo vegetal, detergentes e ureia — por infravermelho médio. As amostras passaram por um laborioso preparo prévio com o objetivo de retirar a gordura e proteína do leite e, em seguida os espectros foram obtidos e, a região utilizada para detecção foi $1450\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. Os teores de adulterantes foram obtidos por meio da curva de calibração para cada um deles, cuja linearidade foi comprovada pelo coeficiente de determinação (R^2) que variou entre 0,94 e 0,98 para leite sintético e urina/ureia, respectivamente. O limite de detecção de cada adulterante foi $0,78\text{ g.L}^{-1}$ para ureia e urina, $7,5\text{ g.L}^{-1}$ para o soro de leite e $0,1\text{ g.L}^{-1}$ para o leite sintético (SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013a). Já Asseis Neto et al. (2019) também utilizaram o infravermelho médio na identificação da adulteração de leite com açúcar, bicarbonato de sódio, peróxido de hidrogênio e formol. Os adulterantes foram adicionados nas seguintes proporções: 10, 25 e 50 % e foram analisadas a linearidade do método pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,80$) e exatidão que variou entre 86,09 e 98,76 % (ASSEIS NETO et al., 2019).

A técnica de RMN no domínio do tempo (DT-NMR) tem se destacado bastante por possuir uma análise rápida, não ser destrutiva e dispensar o preparo de amostra. Na análise de alimentos, a técnica está se consolidando como uma excelente alternativa na determinação da qualidade de alimentos como mel (RIBEIRO et al., 2014), carne (SÁNCHEZ-ALONSO et al., 2012), frutas (RODRIGUEZ et al., 2013), entre outros. Nos últimos anos, a DT-RMN tem se mostrado bastante promissora quando aplicada no estudo de leite e derivados (SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016; CASTELL-PALOU et al., 2011; CASTELL-PALOU et al., 2013).

Santos et al., (2016) desenvolveram um estudo a fim de detectar e quantificar a adulteração de leite com soro, peróxido de hidrogênio, urina sintética, ureia e leite sintético (emulsão de óleos vegetais, detergentes e ureia). Os adulterantes foram adicionados nas seguintes proporções: 5, 15, 25, 35 e 50 % (v/v), e as amostras adulteradas foram analisadas por infravermelho médio ($4000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e 18 *scans*) e para ajudar na compreensão dos resultados foram utilizados modelos quimiométricos, onde a Regressão Parcial dos Mínimos Quadrados (PLSR) mostrou erros muito pequenos para quantificação do cinco adulterantes nas misturas. Dessa forma, os autores concluíram que a técnica proposta foi capaz de detectar e quantificar os adulterantes nas amostras de leite comercial (SANTOS, PEREIRA-

FILHO e COLNAGO, 2016).

2.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido amplamente utilizada no estudo de alimentos, cuja fundamentação se dá na absorção seletiva de ondas de radiofrequência por amostras imersas em um campo magnético (GIL e GERALDES, 2002). A história da RMN teve início nos anos 20, com o experimento realizado por Stern e Gerlach onde verificou-se que um determinado feixe de átomos, quando exposto a um campo magnético, é desviado de acordo com a orientação deste campo. A partir daí, com o intuito de explicar tal experimento, Pauli (1924) sugeriu a existência de núcleos magnéticos. No início dos anos 30, ainda Stern e Gerlach, determinaram a existência dos momentos magnéticos nucleares, e em 1933, introduziram a ideia de que existe um momento de dipolo magnético para núcleos de hidrogênio (GIL e GERALDES, 2002; BECKER, 1993). Em 1939, Rabi e colaboradores desenvolveram um experimento onde submeteram um feixe de moléculas de hidrogênio a um campo magnético não homogêneo e, logo depois, o mesmo feixe foi submetido a um campo magnético homogêneo. Além do campo magnético, o feixe foi submetido a radiação no domínio das radiofrequências e, a partir daí puderam concluir que a uma determinada frequência, o feixe de hidrogênios absorvia energia e sofria um pequeno desvio (GIL e GERALDES, 2002; BECKER, 1993).

Já em 1945, Bloch, Purcell e colaboradores, na tentativa de obterem melhores resultados nas medidas dos momentos magnéticos nucleares, observaram sinais de absorção de radiofrequência (r.f) para a água (Bloch) e parafina (Purcell) (GIL e GERALDES, 2002; BECKER, 1993). No início dos anos 50, Packard e alguns assistentes substituíram a água por etanol e registraram três sinais, ao invés do sinal único da água. Isso deve-se aos núcleos de H, com intensidades nas proporções 3:2:1, correspondentes a estrutura $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--OH}$ (GIL e GERALDES, 2002).

Porém, importantes avanços foram feitos após a introdução de técnicas de pulsos de r.f, tais como a descoberta da influência do ambiente químico do núcleo na frequência de ressonância do mesmo e, o aumento da resolução do espectro por meio da rotação da amostra, uma vez que esta aumenta a homogeneidade do campo. Já em 1953, com boa sensibilidade e melhor resolução do espectro, o primeiro espectrômetro de RMN surgiu e, desde então começou a ser aplicado em diversas áreas (GIL e GERALDES, 2002; CLARIDGE, 2009).

Em 1955, Weinberg e Zimmerman observaram dependência da concentração nas análises de RMN em uma mistura de água e etanol. Foram analisadas as seguintes concentrações de água em etanol: 0,1 %, 13 %, 20 % e 50 %. A partir daí, observou-se que a variação da concentração ocasionou variações no sinal referente ao grupo CH_2 . Enquanto no etanol puro ocorre um efeito combinado das interações do CH_3 e OH com o grupo CH_2 , nas amostras com água foi observada alteração no acoplamento entre os grupos CH_2 e OH , o que mostra a influência do ambiente químico nas análises de RMN. Após essa região, as interações spin-spin entre ambos os grupos são desfeitas. Os autores também sugeriram maiores estudos a fim de determinar a influência da temperatura nos experimentos, onde seria necessária melhor resolução do espectro (WEINBERG e ZIMMERMAN, 1955).

Em 1957, Anderson e McConnel (1957) desenvolveram um estudo a fim de determinar a influência do ambiente químico nos cálculos dos momentos magnéticos e das constantes de acoplamento. Foram utilizados no estudo, ambientes com 1, 2 e 3 grupos químicos e, a partir daí foram realizados os cálculos citados anteriormente. Os autores observaram que por meio desses cálculos foi possível determinar de forma rápida e direta informações químicas das amostras utilizadas. Os autores concluíram também que ainda seriam necessários novos estudos a fim de aprimorar os espectros obtidos bem como a razão sinal/ruído dos mesmos (ANDERSON e MCCONNEL, 1957).

A partir da década de 60, a RMN começou a ser associada a computadores a fim de aumentar a sensibilidade da técnica, por meio da combinação dos espectros obtidos repetidas vezes e, por fim a realização da média do sinal obtido. A partir desse aumento na sensibilidade, foi possível realizar análises de amostras em quantidades cada vez menores. Além disso, a melhora na razão sinal/ruído ocorreu após a introdução do processo conhecido como Transformada de Fourier (em inglês, *Fourier Transform* – FT), a qual tornou a obtenção do sinal um procedimento mais rápido e eficiente (BECKER, 1993; GIL e GERALDES, 2002; CLARIDGE, 2009). Já em 1970, alguns experimentos foram realizados com o intuito de aplicar à amostra técnicas de pulsos de radiofrequência em detrimento da aplicação contínua do campo magnético, método utilizado desde o início da implementação da técnica. A aplicação de tais pulsos permitiu o estudo de amostras mais diluídas e o estudo de outros núcleos além do H como sondas magnéticas em RMN. Esses avanços contribuíram para o surgimento da RMN bidimensional (BECKER, 1993; GIL e GERALDES, 2002).

A aplicação da RMN em alimentos, teve início ainda na década de 70. Em 1977, por exemplo, houve o primeiro registro de RMN aplicada no controle de alimentos, onde Hester e Quine (1977) utilizaram a técnica de RMN pulsada com o intuito de determinar o teor de água em diferentes tipos de farinha e, os teores de água e óleo em alimentos para animais. Para as análises, um espectrômetro de 10,72 MHz foi utilizado, onde a intensidade do sinal FID (em inglês, *Free Induction Decay*) foi correlacionada com o teor de água presente na amostra. Tal correlação apresentou uma tendência linear onde a intensidade do sinal foi diretamente proporcional ao teor de água, cujo desvio padrão ficou em torno 0,2 %, com boa repetibilidade (em torno de 0,02 %). No entanto, enfrentaram dificuldades em determinar o teor de óleo nas outras amostras de alimentação animal, devido às limitações da técnica utilizada na época e, portanto, sugeriram maiores estudos a fim de aprimorar a técnica que se mostrou bastante promissora em tal área de aplicação (HESTER e QUINE, 1977).

Já em 1979, Leung e Steinberg (1979) determinaram as propriedades de ligação da água por desidratação, congelamento e por RMN em alguns constituintes alimentares comuns. As propriedades de ligação da água foram determinadas utilizando RMN, do que eles chamaram de “linhas largas”, a fim de estudar a distribuição de prótons. As propriedades de RMN da água, tanto livre quanto ligada, foram discutidas em termos de tempos de relaxamento nuclear e mobilidades moleculares. Os autores determinaram a forte correlação entre o sinal de RMN e o teor de água na amostra, além da dependência do sinal com a temperatura. A partir daí, os autores concluíram que os valores para o teor de água em alimentos determinados por RMN estavam de acordo com a literatura, mostrando assim a capacidade da RMN em prever os teores de água em alimentos. Além disso, a alteração do sinal em alimentos congelados, levou os autores a concluir que o sinal de RMN varia de acordo com a mobilidade molecular da água presente em tais alimentos quando comparado a não congelados, apontando assim a estudos futuros sobre mobilidade molecular e a RMN (LEUNG e STEINBERG, 1979).

A partir daí, a técnica passou a ser aplicada no estudo de leite e derivados. Brosio e colaboradores (1983), por exemplo, estudaram a técnica de RMN pulsada no estudo do mecanismo de hidratação de leite em pó. Os resultados demonstraram que as curvas de decaimento são capazes de determinar a mobilidade da água presente na amostra. Os autores observaram que a mobilidade da água livre nas amostras foi reduzida assim como o tempo de relaxação devido às interações intermoleculares

entre a água e a matriz sólida, bem como às trocas químicas entre os dois tipos de água (a livre e a que já está presente na amostra). Foi possível observar também que o ponto de congelamento das amostras com água livre também foi menor que aquelas com apenas a água inerente da amostra (BROSIO et al., 1983).

Eads e Bryant (1986), por sua vez, decidiram explorar a possibilidade e utilizar a RMN em amostras com alto teor de água em sua composição, no intuito de suprimir o intenso sinal da água. Neste estudo foram analisados leite, suco de laranja e suco de maçã. Para suprimir o sinal, os autores utilizaram um reagente paramagnético a fim de diminuir o tempo de relaxação da amostra, logo depois o espectro é adquirido após a magnetização da água retornar para o eixo longitudinal, sendo assim, o sinal da água não é lido. Dessa forma, o sinal da água é reduzido e, a partir daí os outros sinais da amostra, que antes eram ofuscados pelo sinal da água, podem agora ser observados com maior resolução e sensibilidade. De acordo com os autores, o estudo obteve sucesso nas três amostras, especialmente no leite onde a região dos açúcares, majoritariamente a lactose, se mostrou melhor definida que o espectro sem o reagente paramagnético. Dessa forma, após a supressão do sinal da água, foi possível identificar com maior clareza os outros constituintes do leite, em especial, a lactose (EADS e BRYANT, 1986).

No século XXI, a composição do leite continua atraindo a atenção de pesquisadores, e a RMN (agora mais sensível e moderna) pode contribuir com informações qualitativas muito mais precisas e também quantitativas. Andreotti e colaboradores (2000), por exemplo, investigaram a presença de triglicerídeos em dois diferentes tipos de leite: vaca e búfala por RMN de ^{13}C . Foram adicionados padrões de triglicerídeos às amostras de leite de vaca e búfala, a fim de identificar e quantificar os grupos acilas por meio do sinal dos triglicerídeos. As informações quantitativas foram obtidas por meio de técnicas quimiométricas e, a partir daí os resultados foram comparados com valores da literatura, obtidos por cromatografia gasosa. Os autores puderam concluir que os leites de vaca e de búfala possuem teores de triglicerídeos bem próximos entre si e, além disso, destacaram a importância do uso da RMN nos estudos a qual foi capaz de diferenciar a origem do leite (ANDREOTTI et al., 2000).

Já Lamanna e colaboradores (2011) desenvolveram um estudo a fim de identificar o perfil de misturas de leite por RMN de ^1H . Para os estudos, foram utilizados dois tipos de leite, o de vaca e o de ovelha, bem como uma mistura de ambos. Os autores notaram que ambos os leites possuem perfil espectral bastante

semelhante, uma vez que a constituição é basicamente a mesma e, para realizar a distinção dos tipos de leite por RMN, foram utilizadas técnicas quimiométricas. A partir dos resultados obtidos pelas componentes principais, os autores concluíram que a técnica foi eficaz na distinção entre o leite de vaca e o de ovelha (LAMANNA et al., 2011).

2.3.1. Fundamentação Teórica

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) estuda a interação da matéria com a radiação eletromagnética emitida e se fundamenta na absorção seletiva de ondas de radiofrequência (r.f) ao submeter a amostra a um campo magnético externo. Para serem estudadas pela RMN, é necessário que as amostras possuam núcleos com propriedades magnéticas, ou seja, núcleos com número atômico ímpar, massa ímpar ou ambos. Tais núcleos apresentam propriedades intrínsecas tais como massa, momento magnético (μ), spin nuclear (I), entre outros, onde este último é a combinação de todos os momentos angulares das partículas presentes nos núcleos. O spin nuclear realiza um movimento de rotação em torno do seu próprio eixo e, associado a ele tem-se um vetor do momento angular do spin nuclear ($\vec{L}$) que está relacionado ao momento magnético nuclear ($\vec{\mu}$) e a constante magnetogírica (γ), de acordo com a Equação 2-1 abaixo (CLARIDGE, 2009):

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L} \quad \text{Eq. 2-1}$$

A constante magnetogírica apresenta um valor específico para cada núcleo, e pode apresentar valores tanto positivos (momento magnético e momento angular apresentam mesmo sentido) quanto negativos (sentidos opostos). Assim como o spin nuclear, o momento angular gerado por ele também se configura como uma propriedade intrínseca de cada núcleo, e seus valores podem ser quantizados em unidades de energia relacionados com I , segundo a Equação 2-2, onde h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s):

$$L = [I(I + 1)]^{\frac{1}{2}} \frac{h}{2\pi} \quad \text{Eq. 2-2}$$

A ocorrência ou não do fenômeno de ressonância depende do valor do spin

nuclear (I) que pode assumir valores positivos inteiros ou semi-inteiros ou igual a zero, e variam de acordo com a quantidade de prótons (Z), nêutrons (N) e a massa (A) de um núcleo. O valor de I será inteiro se A for par e Z for ímpar, igual a zero quando A e Z forem números pares, ou semi-inteiro se A for ímpar. É importante ressaltar que apenas núcleos com $I \neq 0$ apresentam propriedades magnéticas e, apenas estes podem ser estudados pela RMN. Núcleos com valor de spin maior que $\frac{1}{2}$ apresentam momento quadrupolo elétrico diferente de 0, que surge pela interação dos núcleos com o campo externo aplicado por meio do momento dipolo magnético e, tais núcleos também experimentam interações eletrostáticas pela presença de seus momentos multipolares elétricos. Dessa forma, o momento magnético quadrupolar é responsável pela interação entre o núcleo e os gradientes de campo elétrico que são gerados pelos átomos vizinhos e pelo próprio átomo, sendo assim, tais núcleos não apresentam forma esférica e, conseqüentemente, sua distribuição de carga é heterogênea. Já os núcleos que apresentam $I = \frac{1}{2}$ possuem forma esférica, bem como a homogeneidade e uniformidade em sua distribuição de carga, o que facilita a obtenção de espectros com resultados mais limpos e claros. Sendo assim, os núcleos com $I = \frac{1}{2}$ são os mais utilizados na RMN, principalmente, o ^1H devido a sua alta abundância na atmosfera (GIL e GERALDES, 2002; MACOMBER, 1998).

Tanto o momento angular quanto o magnético apresentam direção e magnitude e, na ausência de um campo magnético externo, os momentos magnéticos se apresentam de forma aleatória, desorientada e no mesmo estado de energia, ou seja, degenerados. No entanto, ao ser aplicado um campo externo, B_0 , ocorre a quebra da degenerescência e o surgimento de diferentes estados de energia, o que resulta na interação entre B_0 e os momentos magnéticos dos núcleos se orientam na mesma direção do campo aplicado, com sentido igual ou oposto ao de B_0 , como pode ser observado na Figura 2-4 (GIL e GERALDES, 2002).

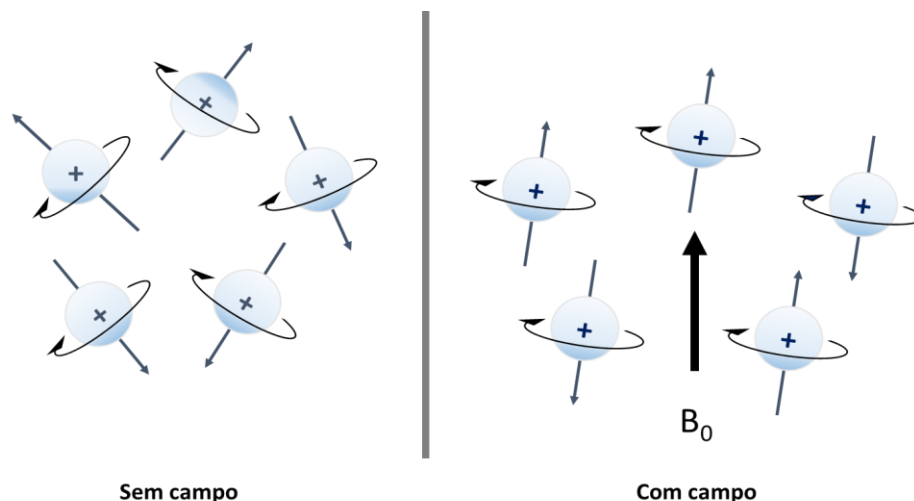


Figura 2-4. Ilustração do efeito causado nos momentos magnéticos nucleares pela aplicação do campo B_0 – adaptado (GIL e GERALDES, 2002).

Além de definir a ocorrência do fenômeno de RMN e a existência dos efeitos quadrupolos, o valor do spin nuclear (I) também determina a quantidade de níveis de energia possíveis para um determinado núcleo de acordo com a Equação 2-3. Na ausência de um campo magnético externo, B_0 , os spins se encontram no mesmo estado de energia, ou seja, degenerados. No entanto, após a aplicação de um campo magnético externo (B_0) essa degenerescência é quebrada e, para um núcleo com $I = \frac{1}{2}$ como o hidrogênio (^1H), por exemplo, existem dois possíveis estados de energia que podem ser caracterizados por um outro número quântico m , que segundo a mecânica quântica, é restrito a valores entre $-I$ e I . Dessa forma, para núcleos com $I = \frac{1}{2}$, m assume valores entre $-\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{2}$ que, por convenção, são denominados de estado α e β , respectivamente. Para tais núcleos, o estado α é o de menor energia, como pode ser observado na Figura 2-5. No estado α os momentos magnéticos dos núcleos estarão orientados no mesmo sentido do campo magnético aplicado, já no estado β os momentos magnéticos estarão orientados no sentido contrário ao do campo externo (MACOMBER, 1998; KEELER, 2002; LEVITT, 2008).

$$s = 2I + 1$$

Eq. 2-3

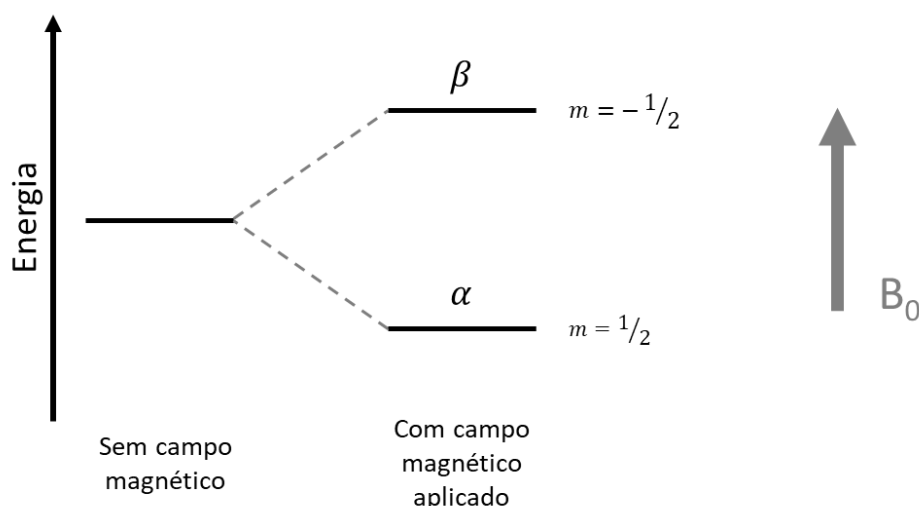


Figura 2-5. Diferença de energia para $I = 1/2$, na presença de um campo magnético externo B_0 – adaptado (MACOMBER, 1998; CLARIDGE, 2002).

Essa separação em estados de energia também é conhecida como efeito *Zeeman*, e pode ser considerado a base do estudo da RMN, pois é essa diferença de energia entre os estados que permite observar as transições dos spins nucleares por meio da absorção ou liberação de energia e, tais transições servem como base para o fenômeno de RMN (LEVITT, 2008).

De acordo com a mecânica clássica, o campo externo B_0 interage com o momento magnético do núcleo ($\vec{\mu}$) e confere um torque ao momento que, por consequência, inicia um movimento de rotação em torno de B_0 em forma de cone. Tal movimento rotacional também é conhecido como precessão de Larmor, que pode ser observado na Figura 2-6 (CLARIDGE, 2002; LEVITT, 2008).

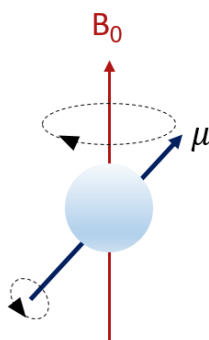


Figura 2-6. Movimento de precessão do núcleo (CLARIDGE, 2002).

A frequência desse movimento de precessão (ω_0) pode ser descrita pela Equação 2-4, onde γ é a constante magnetogírica e B_0 o campo magnético externo (CLARIDGE, 2002).

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad (\text{rad.s}^{-1}) \quad \text{Eq. 2-4}$$

Para os spins nucleares, a frequência com que estes rotacionam também é conhecida como frequência de Larmor e pode ser expressa em Hertz (Hz), ciclos por segundo e, para isso, a Equação 2-4 será dividida por 2π , resultando na Equação 2-5, abaixo (CLARIDGE, 2002):

$$\omega_0 = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{Hz}) \quad \text{Eq. 2-5}$$

Após a aplicação de um campo externo, os momentos magnéticos dos núcleos se apresentam alinhados ao campo, no mesmo sentido que este ou em sentido oposto. Para que o fenômeno de RMN ocorra, é necessário que os spins dos núcleos mudem seus estados de energia ao absorverem um quantum de energia na forma de ondas de radiofrequência (r.f), emitida pelo espectrômetro. Essa mudança energética só ocorre quando a frequência de energia emitida pelo equipamento se iguala com a frequência de Larmor do núcleo estudado (MACOMBER, 1998; CLARIDGE, 2002; KEELER, 2002). Essa energia envolvida pode ser quantizada, segue a condição da frequência de Bohr, conforme a Equação 2-6 (PAVIA, et al., 2010).

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Eq. 2-6}$$

Sendo assim, depreende-se que a frequência de Larmor é também a frequência ressonante de um spin. Normalmente, a frequência do espectrômetro é referida de acordo com a frequência ressonante do núcleo de hidrogênio (^1H), por exemplo, ao utilizar um espectrômetro de 400 MHz, este também opera para o núcleo ^{13}C com frequência de 100 MHz, uma vez que a razão magnetogírica do H é 4 vezes maior que a do C (CLARIDGE, 2002).

Para um núcleo com $I = \frac{1}{2}$, os spins dos núcleos se encontram em dois estados de energia, α e β . No entanto, como o estado α é o de menor energia e consequentemente o mais estável, há um pequeno excesso de spins neste estado, ou seja, um excesso de spins orientados no mesmo sentido do campo B_0 . Tal diferença populacional é descrita pela Equação de Boltzman, conforme a Equação 2-7, onde N_α

e N_β representam a população de spins no estado α e β , respectivamente, ΔE se refere a diferença de energia entre os dois estados (J), K_B é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K) (GIL e GERALDES, 2002; CLARIDGE, 2002).

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\Delta E / K_B T} \quad \text{Eq. 2-7}$$

Como há um excesso populacional de spins nucleares no estado α , ou seja, orientados no mesmo sentido que B_0 , ocorre a geração de uma magnetização resultante dos spins (M_0) com a mesma orientação e sentido que o campo B_0 , como pode ser visto na Figura 2-7 (MACOMBER, 1998; CLARIDGE, 2002).

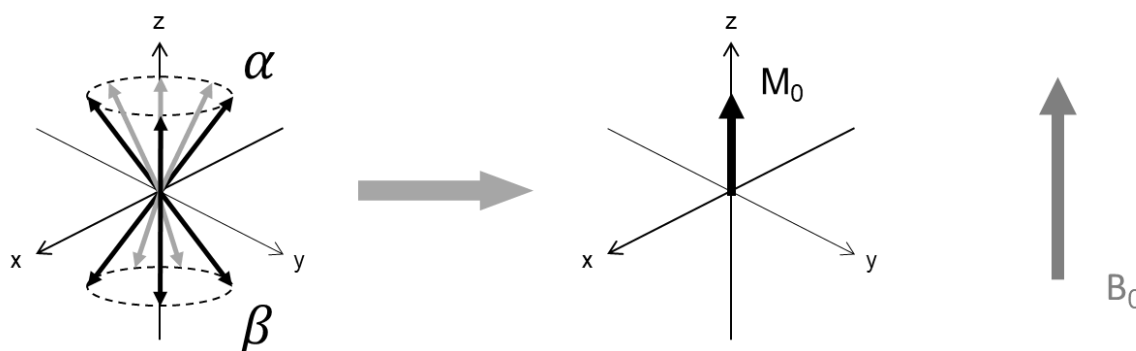


Figura 2-7. Conjunto de spins nos estados α e β , no equilíbrio, gerando a magnetização resultante na direção de B_0 (CLARIDGE, 2002).

As ondas de radiofrequência (r.f) emitidas pelo espectrômetro, são aplicadas na forma de pulsos de radiofrequência (r.f), que são gerados da seguinte forma: a radiação r.f com amplitude definida, é ligada por um determinado período de tempo t , logo depois, esta é desligada, o que é denominado de pulso de r.f. Dessa forma, ocorre a aplicação de um campo magnético oscilatório dependente do tempo, chamado de B_1 , que está perpendicular ao campo estático B_0 e, portanto, disposto no plano transversal oscilando na mesma frequência de Larmor que o spin (GIL e GERALDES, 2002; CLARIDGE, 2002). Como pode ser observado na Figura 2-8, a magnetização resultante M_0 está alinhada ao campo B_0 , no entanto, quando o campo oscilatório B_1 é aplicado, ocorre uma alteração na distribuição dos momentos magnéticos dos spins. Sendo assim, M_0 sofre um deslocamento com angulação θ em relação ao eixo z , gerando uma magnetização no plano transversal xy , com componentes M_x e M_y , a qual será lida pela mesma bobina que aplica o campo B_1 , é responsável por detectar

o sinal da amostra que se dá no plano transversal xy. Dessa forma, o sinal do equipamento é lido no plano transversal x-y (GIL e GERALDES, 2002).

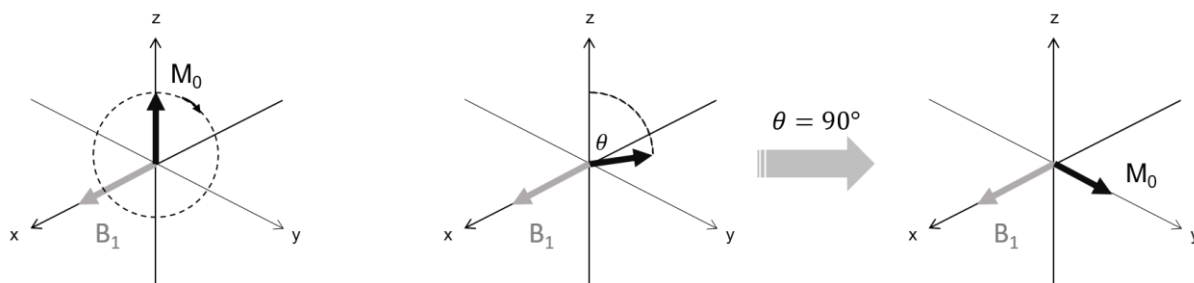


Figura 2-8. Efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência de 90° na magnetização resultante M_0 (CLARIDGE, 2002).

Após a aplicação e interrupção do pulso de radiofrequência, os momentos magnéticos dos núcleos que foram excitados retomam a sua posição de equilíbrio no eixo z. Sendo assim, a magnetização M_0 que havia decaído para o plano transversal, tende a retornar sua posição inicial, o eixo longitudinal emitindo a energia inicialmente absorvida num fenômeno chamado de relaxação. Uma molécula possui distintos núcleos e, conseqüentemente, diversas frequências de radiação eletromagnética são emitidas simultaneamente. Essa emissão é chamada de decaimento de indução livre (DIL) ou, em inglês, FID (*Free Induction Decay*) e sua intensidade diminui com o passar do tempo, uma vez que a excitação dos núcleos diminui ao longo do tempo, como pode ser observado na Figura 2-9. Após a obtenção do FID no domínio do tempo, aplica-se a Transformada de Fourier (TF) ou, em inglês, *Fourier Transform* (FT) que o transforma no espectro de RMN em função da frequência (Figura 2-9) (PAVIA et al., 2010).

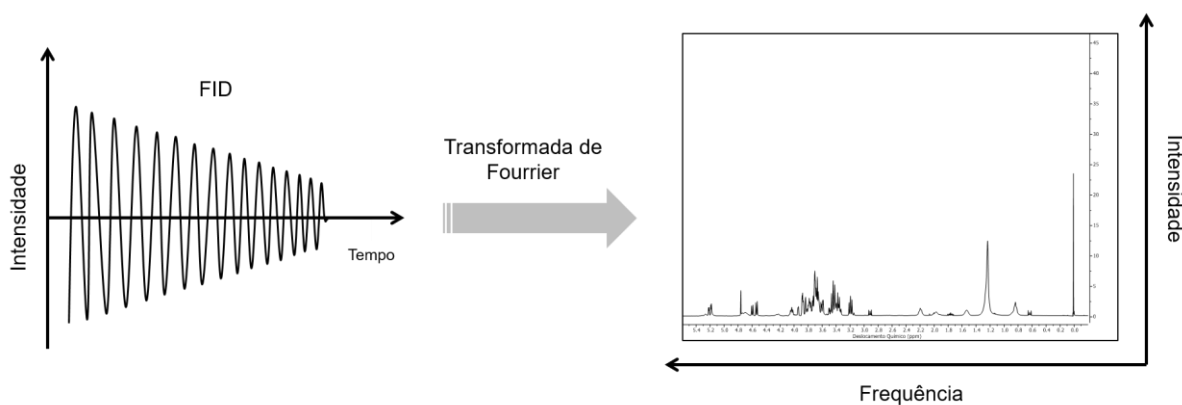


Figura 2-9. Decaimento de indução livre (DIL) de ^1H de uma amostra, obtido no domínio do tempo, e logo após aplicação da FT para obtenção do espectro.

A forma como diferentes núcleos presentes em uma amostra, ou até mesmo núcleos semelhantes, experimentam o campo magnético aplicado (B_0) varia de acordo com a contribuição dos elétrons no campo magnético total “sentido” pelo núcleo. Isso ocorre pois em um campo magnético aplicado B_0 , os elétrons que circulam geram um campo magnético induzido (B_{induzido}), de direção contrária a B_0 , num efeito conhecido como anisotropia. Quanto maior a densidade eletrônica ao redor do núcleo, maior será o B_{induzido} que blindará o núcleo e diminuirá, portanto, o efeito de B_0 no mesmo núcleo, o que resulta na diminuição da frequência de precessão dos spins e estes, conseqüentemente, absorvem a radiação r.f. nesta mesma frequência (CLARIDGE, 2002; PAVIA et al., 2010). Sendo assim, a absorção e emissão de energia na forma de r.f. depende do ambiente eletrônico ao redor dos núcleos.

Pela proximidade dos valores de frequência de precessão dos núcleos, é difícil medi-las com tamanha precisão e, para isso, um composto de referência conhecido é utilizado a fim de medir as frequências de cada próton em relação ao do padrão. O tetrametilsilano (TMS), $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, é bastante utilizado para este fim, uma vez que apresenta grupos metila com alta blindagem e, por ser simétrico, apresenta um único sinal de absorção, fino e intenso no espectro de RMN. Porém, além do TMS, outras substâncias também podem ser usadas como padrão interno, tais como o ácido maleico e o 3-trimetilsilil propiônico (TSP), por exemplo (GIL e GERALDES, 2002; SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2006; PAVIA et al., 2010).

A ressonância dos prótons dos compostos presentes na amostra analisada é informada em relação aos prótons do composto padrão, pela diferença de frequência de tais prótons e é dada em termos de deslocamento, em Hertz. No entanto, este deslocamento é obtido em função da intensidade do campo magnético B_0 e, portanto, pode variar dependendo da intensidade do campo. Com o intuito de obter valores de deslocamento específicos para grupos de núcleos, pela Equação 2-8, foi definido a obtenção do deslocamento químico (δ) independente da intensidade de B_0 aplicado. Como pode ser observado pela equação abaixo, para um determinado grupo de núcleos, os valores de δ serão sempre os mesmos independente da frequência do espectrômetro utilizado (CLARIDGE, 2002; PAVIA et al., 2010).

$$\delta = \frac{\text{deslocamento em Hz}}{\text{frequência do espectrômetro em MHz}} \quad \text{Eq. 2-8}$$

Antes da aplicação do pulso, os núcleos se encontram em equilíbrio e, após a aplicação do pulso de r.f, os núcleos se encontram no estado excitado, ou seja, com excesso de energia que, posteriormente, será liberada. Sendo assim, a magnetização resultante M_0 que, inicialmente, estava no eixo z, após a aplicação do pulso de r.f será deslocada para o plano transversal x-y e, logo depois, tal magnetização irá retornar ao seu estado inicial num processo chamado de relaxação. Existem dois processos de relaxação que ocorrem simultaneamente, conhecidos como relaxação longitudinal (T_1) e relaxação transversal (T_2) (GIL e GERALDES, 2002).

2.3.1.1. Relaxação Longitudinal (T_1)

A relaxação longitudinal ou relaxação spin-rede consiste na recuperação da magnetização M_0 dos spins nucleares excitados ao longo do eixo longitudinal (z), conforme representado na Figura 2-10. Nesse processo, os spins que foram excitados, transferem o excesso de energia para a vizinhança, também conhecida como rede, e esta sofre, portanto, um ínfimo aumento em sua temperatura, praticamente insignificante. A relaxação longitudinal é governada pelo tempo T_1 , conhecido como tempo de relaxação longitudinal ou tempo de relaxação spin-rede, que consiste no tempo necessário para que toda magnetização M_0 retorne ao estado de equilíbrio no eixo z após a aplicação de um pulso r.f, conforme Figura 2-10 (GIL e GERALDES, 2002; CLARIDGE, 2002).

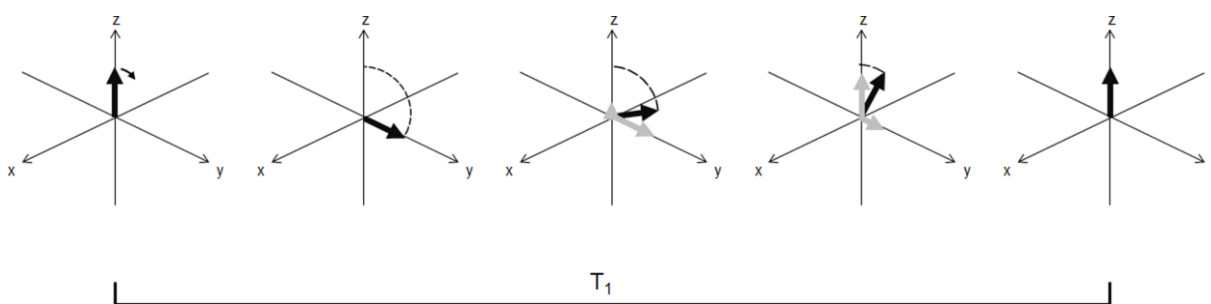


Figura 2-10. Representação da recuperação da magnetização ao longo do eixo longitudinal (MARA, 2006).

A técnica mais utilizada para obtenção de T_1 é a sequência de pulso de inversão recuperação (INVREC) representada na Figura 2-10. Inicialmente, é aplicado um pulso de 180° a fim que a de inverter o sentido da magnetização M_0 ainda no eixo z, logo depois após a espera de um tempo τ para que a relaxação ocorra, é aplicado um pulso de 90° com o intuito de medir a intensidade da magnetização, como pode ser

observado vetorialmente na Figura 2-11. Sendo assim, o experimento continua para que ocorra a relaxação dos spins e, para isso, admite-se valores maiores de τ , ou seja, o experimento é repetido n vezes para n valores de τ e fornece uma curva exponencial (Figura 2-12). Para τ igual a zero, a magnetização M_0 terminará com uma única componente no eixo $-y$. É importante ressaltar que a recuperação só é iniciada após a inversão da recuperação do sinal e, antes da sequência ser reiniciada é esperado um tempo d_1 chamado de tempo de espera, que pode ser conhecido também como *relaxation delay* (RD). Além disso, a pequena interação dos núcleos com a vizinhança resulta em lentas trocas de energia, resultando em longos T_1 (CLARIDGE, 2002).

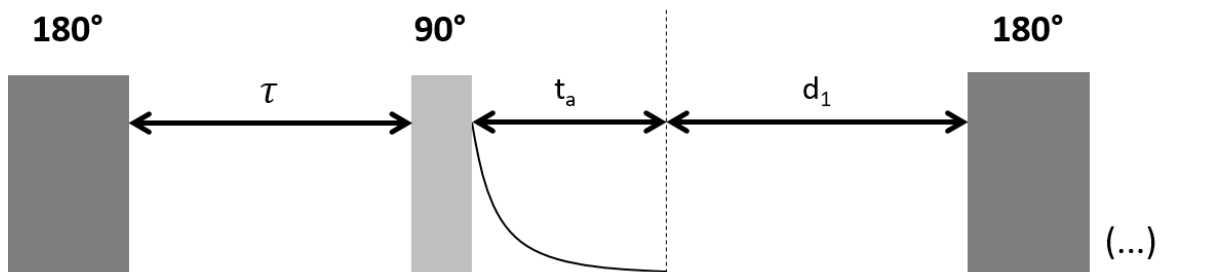


Figura 2-11. Sequência de pulso da técnica de inversão-recuperação (INVREC) para obtenção do tempo de relaxação longitudinal (T_1) (MARAN, 2006).

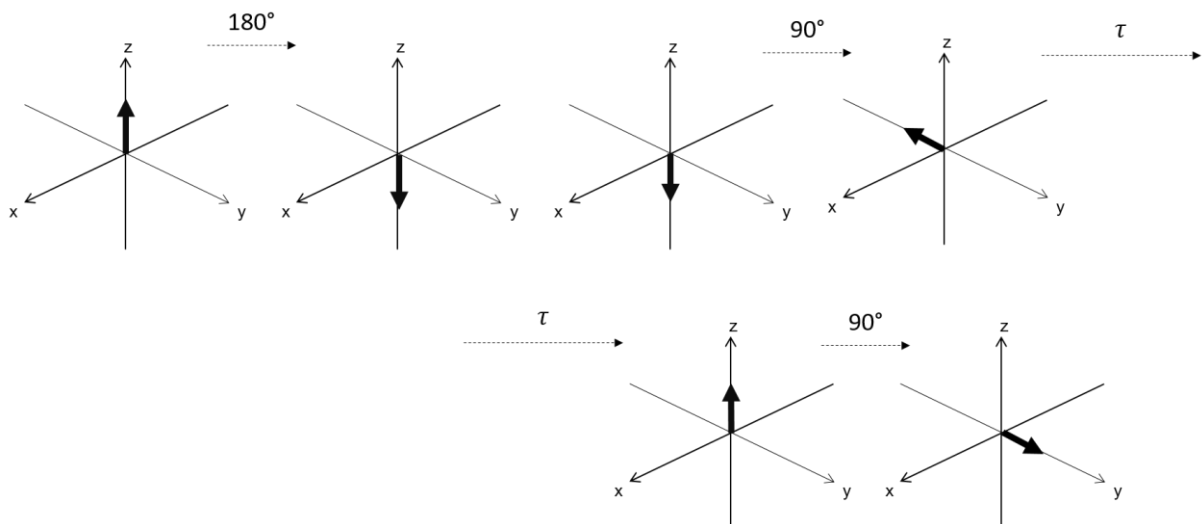


Figura 2-12. Representação vetorial da sequência de pulso de inversão recuperação (INVREC) (CLARIDGE, 2002).

A intensidade da magnetização detectada, M_t , pode ser descrita pela Equação 2-9, onde τ representa o tempo de espera após a aplicação do pulso inicial e, M_t é a

magnetização detectada. A partir desta equação é possível observar que ao esperar um tempo de d_1 cinco vezes maior que τ , cerca de 98,9 % da magnetização é recuperada no eixo z. Este parâmetro é extremamente importante pois, se este período não for respeitado, o sinal diminuirá com o passar do experimento devido a saturação do sinal, uma vez que a sequência será aplicada à magnetização sem esta ter retornado completamente ao seu estado inicial, gerando assim um valor equivocado de T_1 (CLARIDGE, 2002).

$$M(t) = M_0 \left(1 - 2e^{-\tau/T_1}\right) \quad \text{Eq. 2-9}$$

2.3.1.2. Relaxação Transversal (T_2)

O processo de relaxação transversal ou relaxação spin-spin consiste na perda da magnetização no plano transversal x-y governada pela constante de tempo T_2 , denominado tempo de relaxação transversal. Esse processo ocorre de forma simultânea a relaxação longitudinal, porém ao contrário desta, a relaxação transversal se baseia na perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos de cada núcleo durante o movimento de precessão, sem alterar a energia do sistema (LEVITT, 2008). A heterogeneidade do campo ao longo da amostra provoca diferença na intensidade de B_0 e, conseqüentemente, causa diferença nas frequências de precessão dos spins, que resulta na perda de coerência de fase sem que sequer tenha existido a interação spin-spin. Sendo assim, ocasiona o surgimento de um tempo de relaxação efetivo (T_2^*) que leva em consideração todos os efeitos que podem acelerar a relaxação e tornam, portanto, seu valor menor que o verdadeiro T_2 , pois leva à diminuição da magnetização resultante no plano transversal x-y, como pode ser observado na representação vetorial na Figura 2-13 (GIL e GERALDES, 2002).

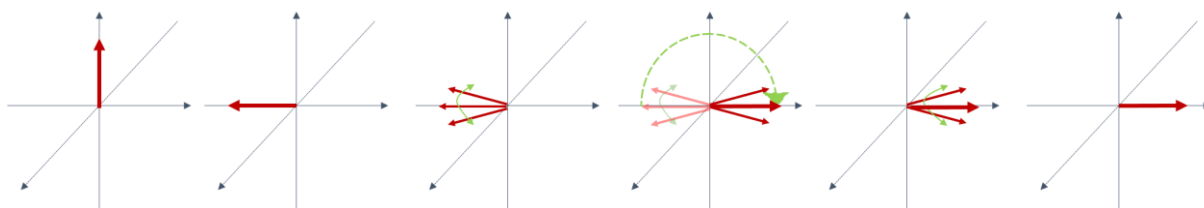


Figura 2-13. Representação vetorial da sequência de CPMG (GIL e GERALDES, 2002).

A fim de diminuir tais efeitos indesejados, utiliza-se o método de CPMG (*Carr-*

Purcell-Maiboom-Gill), que consiste na aplicação de um pulso de 90° que transfere a magnetização do eixo longitudinal (eixo z) para o plano transversal x-y, seguido de pulsos de 180° aplicados n vezes que, após a espera de um tempo T_2 , ocorra a refocalização do sinal e o surgimento de ecos de spin. Este tempo T_2 é necessário para que os spins percam a fase que tinham no início e a recuperem na formação de um eco. Esse processo ocorre até o decaimento total da magnetização transversal. O esquema da sequência, pode ser observado na Figura 2-14 (GIL e GERALDES, 2002).⁶²

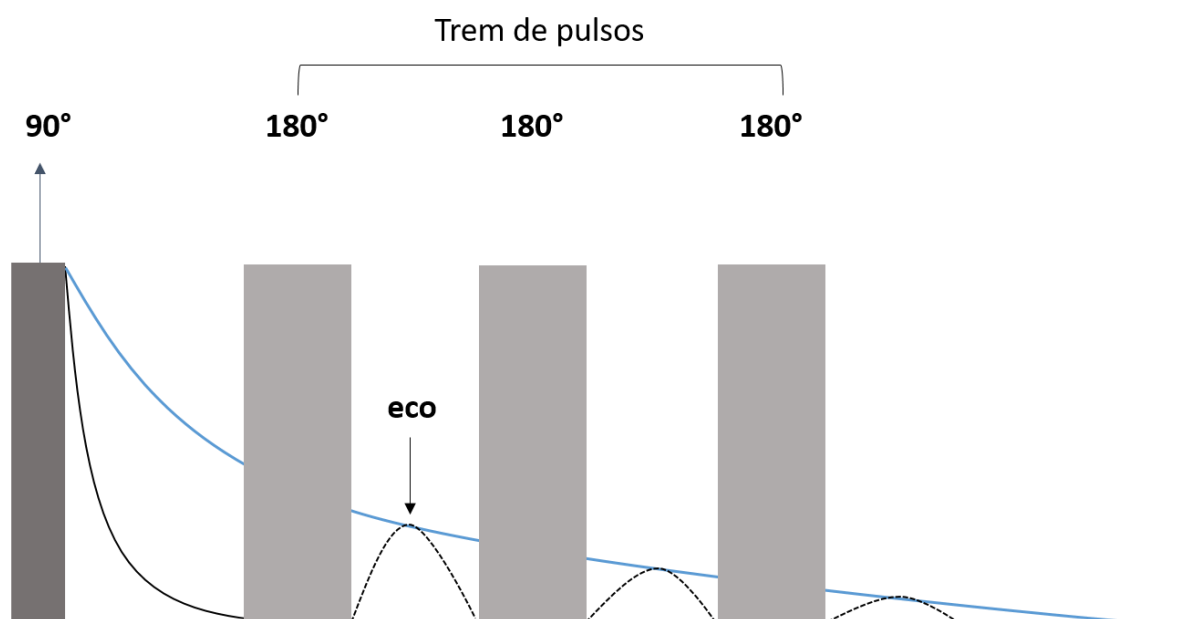


Figura 2-14. Sequência de pulsos CPMG – adaptado (MARAN, 2006).

2.3.2. RMN quantitativo (RMNq)

Desde a sua descoberta a RMN sempre foi e continua sendo bastante utilizada em análises qualitativas, principalmente, na elucidação estrutural de substâncias químicas. No entanto, com o passar dos anos, sua aplicação em análises quantitativas tem sido altamente empregada por ser capaz de fornecer, de forma simultânea, informações qualitativas e quantitativas da amostra, além de ser uma técnica rápida e eficiente para esse tipo de análise. Por fim, a RMN oferece a possibilidade de quantificar diferentes compostos em uma única amostra sem necessitar utilizar padrões internos semelhantes a cada composto (NAZARI et al., 2007; LI e HU, 2017).

A história da RMNq teve início em 1963, com o experimento realizado por Jungnickel e Forbes (1963) que a utilizaram com o objetivo de verificar a exatidão da integração dos sinais e, a partir daí, determinar a composição percentual de 26

compostos puros. Após a determinação do teor de hidrogênio de cada composto, tais valores percentuais foram comparados com a literatura e, o desvio padrão das medidas em relação ao seu valor teórico foi obtido. A partir dos baixos valores de desvio padrão apresentados, os autores notaram que a técnica apresentou excelente exatidão em seus resultados, além de ter sido capaz de quantificar os 26 compostos (JUNGNICHEL e FORBES, 1963). No mesmo ano, inclusive no mesmo volume do periódico da *Analytical Chemistry*, Donald Hollis (1963) quantificou misturas de aspirina, fenacetina e cafeína por RMN. O autor destaca a rapidez da análise como uma vantagem, além do fato da RMN não necessitar de uma curva de calibração na quantificação dos compostos. Para quantificação, a integral do sinal de interesse de cada amostra foi obtida e, logo depois, relacionada com uma amostra padrão de cafeína. Por fim, o autor correlaciona o teor de cada composto presente na amostra com o valor adicionado no preparo das amostras. A partir dos baixos valores de desvio padrão, o autor mostra a boa exatidão do método proposto por ele e, assim, sugere a RMN como uma excelente alternativa dentre as técnicas de quantificação (HOLLIS, 1963).

Com o estudo de outros núcleos além do hidrogênio, diversos trabalhos envolvendo tais núcleos começaram a ser aplicados na RMN quantitativa também. O'Neill e Pringuer (1974), por exemplo, realizaram análises quantitativas de misturas isoméricas de diisocianato de tolueno por RMN de ^{13}C sem a adição de reagentes paramagnéticos. A partir dos resultados, os autores observaram que a razão sinal/ruído dos espectros estava levemente elevada, no entanto, eles ressaltam que isso seria resolvido com o aumento do número de *scans*. No entanto, apesar disso, a RMN foi capaz de quantificar com boa exatidão os teores de cada substância em cada mistura estudada (O'NEILL e PRINGUER, 1974).

Desde o estudo de Hollis em 1963, o uso da RMNq em análises farmacêuticas foi cada vez maior com o passar dos anos, principalmente na década de 80. Exemplo disso é o estudo de Kwakye (1985) que utilizou um espectrômetro de RMN de 60 MHz e optou por utilizar 4 padrões internos diferentes, onde cada um era escolhido de acordo com sua semelhança de intensidade de sinal ao analito estudado e que não houvesse sobreposição de sinal com os sinais da amostra. Foram analisados um total de 20 amostras de medicamentos e, também foram realizadas análises em métodos oficiais para comparar com os resultados obtidos pela RMN. O autor destaca que a RMN é bem mais simples e rápida que os métodos oficiais com baixos valores de

desvio padrão e boa exatidão em seus resultados. O autor também ressalta que, além das análises quantitativas, a RMN ainda é capaz de controlar a qualidade de tais medicamentos, uma vez que esta pode ser utilizada para quantificar as impurezas presentes na amostra (KWAKYE, 1985).

Em 1986, Eberhart e colaboradores (1986), assim como Hollis em 1963, também quantificaram misturas contendo aspirina, fenacetina e cafeína, só que agora utilizando o 1,3,5-trioxano como padrão interno. Os autores escolheram tal padrão interno por ser barato, relativamente estável, com pureza satisfatória e, não possuir sinais que sobrepõe aos sinais das amostras. Nesse estudo, porém, os autores decidiram comparar a RMNq com o método padrão de obtenção do teor de cafeína, além de utilizar sinais diferentes de Hollis para quantificação. Os autores ressaltam que o estudo de Hollis, apesar de apresentar ótimos valores de precisão, poderiam ser melhorados com o uso de um padrão interno. A partir dos resultados, os autores concluíram que o uso de um padrão interno diferente das amostras de interesse, resultou em desvios padrão ainda menores e mais precisos que os de Hollis (EBERHART, HATZIS e ROTHCHILD, 1986).

De acordo com informações da base de dados *Web of Science*, a utilização da RMNq teve um enorme crescimento no início da década de 90. Como é possível observar na Figura 2-15, o número de publicações utilizando a técnica teve um grande salto desde a sua primeira aplicação e o fim da década supracitada. Além disso, sua utilização não parou de crescer nas décadas seguintes. Na última década, o número de publicações utilizando a RMNq foi ainda maior, com quase 6000 publicações. Apenas nos quatro primeiros meses de 2020, a base de dados já apresenta 293 publicações com a técnica.

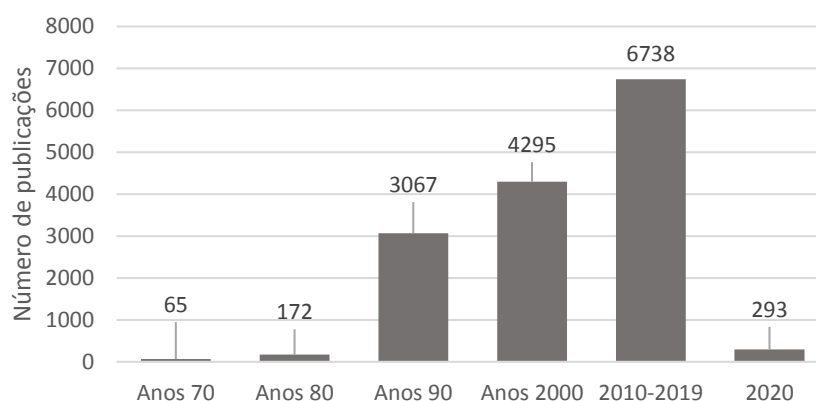


Figura 2-15. Número de publicações envolvendo a RMN quantitativa, de 1970 até os dias de hoje, segundo consulta na base de dados *Web of Science* com as palavras-chave: “*quantitative and NMR*”

Na revisão bibliográfica feita por Barthi e Roy (2012) eles destacam a fundamentação teórica da RMN quantitativa, os principais parâmetros que podem influenciar na precisão e exatidão do método, como otimizá-los a partir dos parâmetros de aquisição, além das propriedades físico-químicas que afetam as análises da RMNq. Os autores ressaltam a importância do padrão interno nos resultados da RMNq, bem como utilização da RMN bidimensional nas análises quantitativas e, por fim todo o processo de validação da RMNq. Neste último, os parâmetros de validação são explicitados e explicados, a saber: exatidão, precisão, linearidade, reprodutibilidade, seletividade, limites de quantificação e detecção, e robustez, bem como quais fatores podem influenciar em cada um desses parâmetros. Por fim, a ampla aplicação da análise quantitativa de RMN, também foi abordada na publicação, onde foi discutido sobre suas aplicações nas análises farmacêuticas, no estudo de produtos naturais, síntese orgânica, metabolômica, análises cinéticas e no monitoramento das reações (BARTHI e ROY, 2012).

É importante ressaltar que para que um método seja eficaz na quantificação de um determinado analito, esse precisa ser validado. Dessa forma, diversos trabalhos na literatura abordam a validação de métodos utilizando a RMNq. Godecke e colaboradores (2013), por exemplo, investigaram a influência dos parâmetros de aquisição e processamento nos resultados da validação e, a partir daí propuseram um método eficaz e otimizado de quantificação de produtos naturais com excelente precisão e exatidão, além de ótimos valores de limite de detecção e quantificação, LD e LQ, respectivamente. Os autores ressaltam que o método proposto por eles apresentou erros abaixo de 1 %, confirmando assim a otimização do método (GÖDECKE et al., 2013). Cerceau e colaboradores (2016), por sua vez, validaram um método de análise de RMNq de ^1H no estudo de óleos essenciais utilizados em cosméticos e medicamentos. Os autores ressaltaram a importância da utilização de um novo método de controle de qualidade de tais óleos na área, uma vez que este substituiria técnicas mais demoradas e que utilizam solventes tóxicos como a cromatografia gasosa (CG). O estudo mostra de maneira descritiva a forma como foi calculado cada parâmetro utilizado para a validação, além de comprovar que a RMNq é uma excelente alternativa na quantificação dos óleos essenciais (CERCEAU et al., 2016).

Um dos estudos mais recentes envolvendo a RMNq foi o de Rocha e colaboradores (2018), que a utilizaram na quantificação de cocaína e alguns

adulterantes, além da validação do método proposto, sem o uso de solventes deuterados. Os solventes deuterados são amplamente utilizados na RMN, no entanto, são mais caros que solventes comuns. Os autores realizaram uma purificação prévia da cocaína a fim de utilizá-la como padrão e, a partir daí poder quantificá-la em outras amostras, bem como seus adulterantes. Todos os parâmetros utilizados na validação foram detalhados, demonstrando cada procedimento realizado (ROCHA et al., 2018).

De acordo com o *Web of Science*, as principais áreas que utilizaram a RMNq foram a físico-química, bioquímica, ciência de polímeros, analítica química, entre outros. Segundo a base de dados, a aplicação da RMNq na análise de alimentos, ainda é relativamente baixa quando comparada com as outras áreas supracitadas. A aplicação da RMNq na ciência dos alimentos representa apenas 10,14 % das publicações envolvendo análises quantitativas por RMN, conforme a Figura 2-16. Dentre os trabalhos mais relevantes, se destacam a quantificação de lignina por RMNq (CAPANEMA, BALAKSHIN e KADLA, 2004), o controle de qualidade do salmão durante o processo de estocagem (SHUMILINA et al., 2016), além da determinação do teor de adulterantes de azeites de oliva (FRANKEL et al., 2010), entre outros.

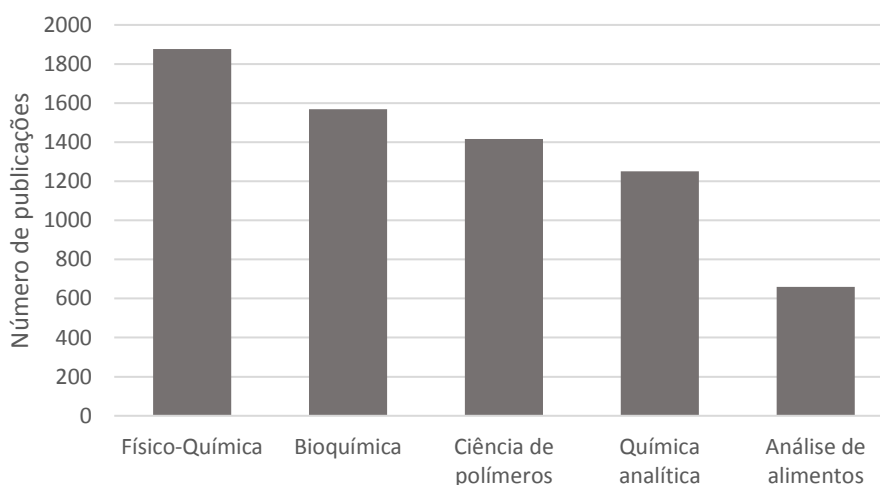


Figura 2-16. Áreas de publicações envolvendo a Ressonância Magnética Nuclear quantitativa, de 1945 até os dias de hoje, segundo consulta na base de dados *Web of Science* com as palavras-chave: “quantitative and NMR”

Simmler e colaboradores (2014), por exemplo, descreveram a rapidez e a simplicidade da RMNq e como essas características levaram ao avanço do seu uso na ciência alimentícia. Os autores ressaltam que o crescente uso dessa técnica ocorre devido à suas vantagens frente aos métodos cromatográficos, uma vez que além de fornecer informações estruturais, possui análises mais rápidas e sem o uso de

solventes tóxicos. Os autores citam o uso da RMNq na análise de vinho, leite, chá e alimentos (SIMMLER et al., 2014). Diversos outros trabalhos se destacam na literatura, tais como o uso da RMNq na análise de produtos como vinho (LÓPEZ-RITUERTO et al., 2009), sucos (BONNEAU, CYNOBER e JULLIAN, 2017), café (CHARLTON, FARRINGTON e BRERETON, 2002; TAVARES e FERREIRA, 2006), ovo (FONTANA et al., 1992; HOHMANN et al., 2015), pimentas (CATCHPOLE et al., 2003).

Já a aplicação da técnica no estudo de leite ainda é bem reduzida, no entanto, os resultados de estudos já realizados mostram a RMNq como uma excelente alternativa na quantificação da composição do leite (MERKX et al., 2107), teor de gordura no leite (BELLOQUE e RAMOS, 1999; SACCHI et al., 2018), além do estudo de seus derivados, como o monitoramento da fermentação de leites fermentados (LU et al., 2018), iogurtes (LU et al., 2016), queijos (LAMANNA et al., 2008). Bouteille e colaboradores (2013) desenvolveram um estudo com o intuito de monitorar a produção de ácido láctico durante a fermentação do leite por RMNq. Neste trabalho, os autores desenvolveram dois métodos de análise, onde o primeiro consistiu na quantificação por meio da determinação do grupo metila do ácido láctico e, o segundo foi realizado por meio da quantificação do teor de lactose, uma vez que durante o processo de fermentação, as bactérias convertem parte da lactose em ácido láctico e, dessa forma, o teor de ácido possui relação direta com o dissacarídeo. Os autores ressaltaram a simplicidade e rapidez nas análises de RMNq, bem como o fato de não precisar de preparo prévio de amostra. O decréscimo do teor de lactose e o aumento no teor de ácido láctico mostraram uma razão bastante condizente com os resultados apresentados na literatura e, dessa forma, concluíram que ambos os métodos podem ser utilizados com sucesso no monitoramento da produção de ácido láctico (BOUTEILLE et al., 2013).

Hu e colaboradores (2007) estudaram a composição do leite integral sem preparo de amostra por RMNq, com o intuito de quantificar os teores de gordura saturada, mono e poli-insaturada, ácido butírico e o teor de lactose. Como conclusão do estudo, os autores ressaltam que os resultados estavam de acordo com os valores reportados na literatura e, a RMNq se mostrou bastante eficaz ao quantificar compostos presentes em baixos teores no leite (HU et al., 2007). Já Monakhova e colaboradores (2012), desenvolveram um método de quantificação de lactose em leites a base de soja e grãos, uma vez que estes são bastante utilizados pelos

consumidores intolerantes a lactose. Além disso, o método foi validado por meio dos seguintes parâmetros: LD, LQ, exatidão e precisão. Os autores ressaltam que a RMN foi capaz de quantificar teores de lactose em torno de $0,51 \text{ mg.mL}^{-1}$ nos leites estudados, bem como valores de desvio padrão de 1,43 % e, valores de exatidão entre 0,8 e 1,7 % (MONAKHOVA et al., 2012).

A RMNq se baseia na relação elementar entre a área do sinal de interesse de um espectro de ^1H (A_x) e a quantidade de núcleos que absorvem energia na mesma radiofrequência que esse sinal (N_x). Essa relação é dada pela Equação 2-10, onde K é a constante do espectrômetro (JUNGNICKEL e FORBES, 1963):

$$Ax = K.N_x \quad \text{Eq. 2-10}$$

Para que a Equação 2-10 seja válida, é necessário que o tempo de repetição entre os pulsos aplicados sejam pelo menos 5 vezes o valor do tempo de relaxação longitudinal (T_1), a fim de que os *spins* dos prótons alcancem o equilíbrio térmico (BHARTI e ROY, 2012; SANTOS e COLNAGO, 2013; ROCHA et al., 2018;). A relação entre a magnetização longitudinal no equilíbrio térmico (I_0) e o tempo de relaxação longitudinal (T_1) é representada pela Equação 2-11. Tal tempo de espera garante que 99 % dos spins tenham voltado ao seu estado fundamental antes do próximo pulso aplicado (LI e HU, 2017).

$$I(t') = I_0(1 - e^{\frac{-t}{T_1}}) \quad \text{Eq. 2-11}$$

Além das relações citadas acima, para as análises quantitativas, é de suma importância que o sinal de interesse do analito seja mais intenso que os outros sinais do espectro e não se sobreponha aos demais (SANTOS e COLNAGO, 2013). Conforme a Equação 2-12, o teor do analito na solução é calculado pela razão molar do analito e um padrão interno de massa conhecida, que não precisa ser semelhante ao analito de interesse. Na referida Equação, n é referente ao número de mols, A refere-se a área do sinal espectral, N é atribuído ao número de núcleos que absorvem na frequência do sinal de ressonância, x corresponde ao analito de interesse, e PI é o padrão interno (TURCZAN e MEDWICK, 1977; ROCHA et al., 2018).

$$\frac{n_x}{n_{PI}} = \frac{A_x}{A_{PI}} \cdot \frac{N_{PI}}{N_x} \quad \text{Eq. 2-12}$$

Para obtenção do teor de um analito em uma mistura, é realizada a quantificação absoluta por meio da correlação da pureza conhecida de um padrão interno com a pureza do analito presente na mistura. Tal correlação é dada pela Equação 2-13, onde P corresponde a pureza, M a massa molar, e m é referente a massa da amostra (LIU e HU, 2007; SUGIMOTO et al., 2012):

$$P_x = \frac{A_x \cdot N_{PI} \cdot M_x \cdot m_{PI}}{A_{PI} \cdot N_x \cdot M_{PI} \cdot m} \cdot P_{PI} \quad \text{Eq. 2-13}$$

É importante ressaltar que a RMNq pode ser considerada um método de padronização primária, uma vez que não necessita a utilização de padrões de referência dos analitos de interesse e, além disso, dispensa a construção de uma curva de calibração para obtenção do teor de um analito em uma mistura. Sendo assim, a RMNq se mostra mais vantajosa frente as técnicas cromatográficas, uma vez que estas necessitam da construção de uma curva de calibração para quantificação (SANTOS e COLNAGO, 2013; ROCHA et al., 2018).

2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODO

A fim de tornar a RMNq em uma alternativa na quantificação de lactose em leite, é necessária a validação do método proposto. No Brasil, a validação de métodos analíticos para insumos farmacêuticos e alimentícios é realizada por meio da resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A fim de garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, tal resolução pede a análise das seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2017b).

2.4.1. Seletividade

De acordo com a ANVISA RDC nº 166, a seletividade do método é a capacidade do mesmo de detectar ou quantificar exclusivamente o analito de interesse mesmo na presença de outros componentes, como impurezas e outros componentes da matriz de trabalho. Para métodos quantitativos, a seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que o sinal de interesse utilizado é

correspondente exclusivamente ao analito de interesse presente na amostra, sem interferência de outros compostos presentes, tais como matriz, impurezas, entre outros (BRASIL, 2017b). A seletividade quando aplicada a RMN, é comprovada quando o sinal do analito de interesse não está sobreposto a nenhum outro sinal do espectro, garantindo assim a seletividade da técnica.

2.4.2. Linearidade

Corresponde a relação direta entre a concentração do analito (lactose) na amostra e a resposta analítica obtida no RMN (razão da integral do sinal do analito e do padrão interno). De acordo com a ANVISA, devem ser utilizadas ao menos 5 concentrações diferentes, em triplicata, para construção da curva de linearidade, onde cada solução deve ser preparada de forma independente, podendo estas serem diluídas a partir de uma solução mãe. Para análise dessa figura de mérito a partir de análises realizadas no RMN, a curva a ser construída deve apresentar como eixo y a razão entre a área do sinal do analito e a área do sinal do padrão interno, e no eixo x a concentração do analito na amostra (BRASIL, 2017b).

Para validação desta figura de mérito, a ANVISA exige a apresentação dos seguintes dados (BRASIL, 2017b):

- Representação gráfica da curva;
- Gráfico de dispersão dos resíduos bem como sua avaliação estatística;
- Equação da reta de regressão estimada pelo método dos mínimos quadrados;
- Avaliação dos coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2);
- Investigação da homocedasticidade dos dados por um teste adequado;
- Para todos os ensaios estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5 %;
- Por fim, o coeficiente de correlação (r) obtido deve ser maior que 0,990.

A obtenção do coeficiente de correlação (r) é realizada por meio da Equação 2-14, onde R é o coeficiente de correlação, x é referente a concentração do analito, $\bar{x}$ é a média das concentrações, y é a razão das áreas e $\bar{y}$, a média das razões de áreas (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007).

$$R = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}} \quad \text{Eq. 2-14}$$

A fim de avaliar a adequabilidade do método proposto são realizadas algumas análises baseadas nos resíduos. Para os modelos de regressão linear, o método dos mínimos quadrados ordinários é o mais utilizados uma vez que minimiza a soma dos quadrados das diferenças entre os valores obtidos das amostras e os valores esperados, ou seja, minimiza os resíduos das análises e, assim, fornece estimadores centrados com variância mínima (VIEIRA, 2006; RIBEIRO et al., 2008). A partir daí, inicialmente, é necessário rejeitar a hipótese nula e aceitar a hipótese alternativa, ou seja, provar que realmente há uma relação entre a concentração do analito e a resposta analítica do equipamento. A hipótese nula consiste em afirmar que o coeficiente angular da curva é igual a zero, já a hipótese alternativa considera o coeficiente angular diferente de zero e, portanto, confirma a veracidade da curva analítica (MAGALHÃES e LIMA, 2001; VIEIRA, 2006).

Para tal confirmação, é realizada a análise das variâncias (ANOVA) que determina se há diferença entre as médias de três ou mais grupos por meio de diversos testes estatísticos, dentre eles destaca-se o teste de Fischer (teste F) que consiste na razão da variação entre médias da amostra e a variação dentro das amostras. A hipótese alternativa é aceita se, para um determinado grau de significância escolhido, o valor F obtido pela ANOVA é maior que um valor tabelado para os níveis utilizados na construção da curva. Este valor tabelado assume a hipótese nula, logo, quanto maior o valor de F obtido, mais distante o modelo está da hipótese nula, aumentando a probabilidade de a hipótese alternativa ser aceita. Essa probabilidade de rejeição da hipótese nula é dada pela ANOVA e é chamada de p-valor. Sendo assim, quanto menor o p-valor, maior será a diferença entre os resultados e a hipótese nula, ou seja, maior a probabilidade de rejeitá-la e aceitar a hipótese alternativa. Portanto, quanto menor o p-valor mais significativa e linear é a regressão (MAGALHÃES e LIMA, 2001; VIEIRA, 2006).

Além do teste F e do p-valor, a ANVISA exige a investigação da homocedasticidade dos dados, ou seja, um estudo da homogeneidade da variância dos erros. A homocedasticidade do método é avaliada com o intuito de demonstrar que o método escolhido é apropriado para o uso preterido e, para isso, inicialmente é necessário verificar a normalidade e independência da variância dos resíduos por meio do gráfico de resíduos, o qual representa os resíduos em função dos valores

estimados da variável dependente em relação aos valores de uma das variáveis independentes. A homocedasticidade dos resíduos pode ser observada quando os resíduos se apresentam de forma dispersa e aleatória em torno da variável independente (MAGALHÃES e LIMA, 2001; VIEIRA, 2006). Além disso, a homogeneidade da variância dos resíduos também pode ser verificada por meio de alguns testes estatísticos, tais como o de Cochran que compara as variâncias de cada ponto da curva de linearidade com a maior variância. De acordo com tal teste, a homocedasticidade dos dados é observada quando o valor do teste (C) calculado é menor que o valor tabelado, para um determinado nível de significância, de acordo com a quantidade de níveis utilizados na construção da curva e a quantidade de réplicas para cada nível. O teste de Cochran pode ser calculado de acordo com a Equação 2-15 demonstrada abaixo, onde s_i^2 representa a variância amostral do i -ésimo ponto, s_{max}^2 representa a maior variância e n representa o número de réplicas em cada nível (MAGALHÃES e LIMA, 2001; VIEIRA, 2006).

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} \quad \text{Eq. 2-15}$$

$$s_i^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad \text{Eq. 2-16}$$

2.4.3. Exatidão

A exatidão indica o quão próximo os valores obtidos por um determinado método estão dos valores de referência. Esta é verificada a partir de no mínimo 9 determinações, ou seja, a análise de 3 concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas em cada nível, onde tais amostras devem ser as mesmas utilizadas na construção da curva de linearidade (BRASIL, 2017b).

O resultado obtido pode ser expresso por meio do percentual de recuperação, tanto do analito de concentração previamente conhecida adicionado à amostra, quanto pela relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica, de acordo com a Equação 2-17, o qual deve ser inferior a 5 %. De acordo com a Equação abaixo, $C_{experimental}$ referente a concentração experimental, ou seja, a concentração obtida a partir da curva analítica e C é referente a concentração teórica (RIBEIRO et al., 2008; BRASIL, 2017b).

$$Exatidão \% = \frac{C_{experimental}}{C} \times 100 \quad \text{Eq. 2-17}$$

2.4.4. Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio dos ensaios com as amostras utilizadas na construção da curva de linearidade. Esta pode ser expressa por meio da repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade, e devem ser utilizadas no mínimo 9 determinações de cada concentração a ser analisada (baixa, média e alta), ou seja, cada concentração deve ser preparada em triplicata e cada nível analisado 3 vezes. Na determinação da repetibilidade, as amostras devem ser analisadas sob as mesmas condições de operação, no mesmo equipamento, realizadas pelo mesmo analista em uma única corrida analítica. Já na precisão intermediária as amostras são analisadas no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes e realizada por operadores distintos. Por fim, na reprodutibilidade as amostras são analisadas em laboratórios e equipamentos distintos e, geralmente, é verificada em estudos de colaboração entre laboratórios ou na padronização de métodos analíticos para inclusão destes em compêndios oficiais (BRASIL, 2017b; ROCHA et al., 2018).

precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resíduos e expressa por meio do desvio padrão relativo (*DPR*), obtido a partir da Equação 2-18, onde *s* é referente ao desvio padrão e $\bar{x}$ representa a concentração média do analito (BRASIL, 2017b).

$$DPR = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 2-18}$$

2.4.5. Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada. Este pode ser obtido das seguintes formas (BRASIL, 2017b):

- Razão sinal/ruído - para métodos instrumentais, é utilizada razão sinal/ruído, maior ou igual a 2:1, em relação a análise de um branco;
- Método visual

- Parâmetros da curva de linearidade construída, com um intervalo de confiança de 95 %.

Esta última forma de obtenção apresenta maior confiabilidade estatística, uma vez que não depende da análise de parâmetros qualitativos (RIBEIRO et al., 2008; BRASIL, 2017b; ROCHA et al., 2018). Esse intervalo de confiança é graficamente expresso por duas hipérboles representadas acima e abaixo da curva analítica. A interseção da hipérbole superior, ou seja, do limite superior com o eixo y é conhecida como y crítico (y_c) e é expresso pela Equação 2-19, onde a_0 corresponde ao coeficiente linear da curva analítica, a_1 é referente ao coeficiente angular da mesma curva, N é o número total de amostras utilizadas na curva e s_y é correspondente ao desvio padrão. A projeção do y_c na hipérbole inferior é considerada o LD (Figura 2-17a), e pode ser expresso pela Equação 2-20 (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007).

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 2-19}$$

$$LD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 2-20}$$

Assim como o LD, o limite de quantificação (LQ) também é calculado a partir do intervalo de confiança da curva, por meio da Equação 2-23, e pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada pelo método. A projeção do valor da concentração (x_c) no ponto em que um valor a_0 intercepta a linha de regressão, quando projetado no limite superior e intercepta o eixo y, é conhecida como y_h . Este último quando projetado no limite inferior fornece o valor de LQ, como pode ser observado na Figura 2-17 (b). Os valores de y_h , x_c e LQ são expressos nas Equações 2-21, 2-22 e 2-23 (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007).

$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 2-21}$$

$$x_c = \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 2-22}$$

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 2-23}$$

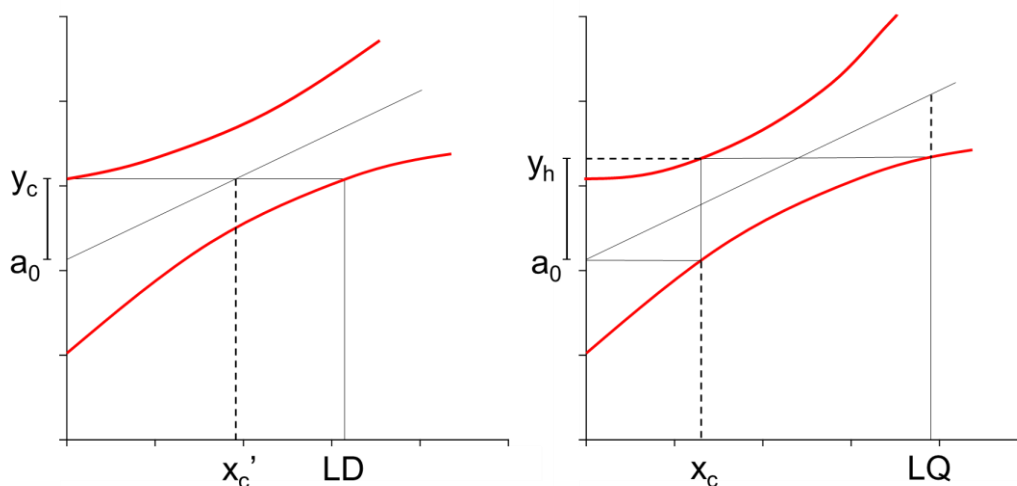


Figura 2-17. Demonstração do cálculo do LD **(a)** e LQ **(b)**. – adaptado (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007).

2.4.6. Robustez

A robustez demonstra a capacidade do método em resistir a pequenas variações nas condições analíticas, tais como variação de temperatura, analista, dia de análise, entre outros, sem perda de confiabilidade. Para métodos quantitativos, deve ser verificado se tais variações interferem na resposta analítica do equipamento, ou seja, no caso do RMN, se essas variações influenciam na razão entre a área do sinal do analito e a área do sinal do padrão interno. Este impacto das variações deve ser avaliado e expresso da mesma forma que a exatidão para as mesmas concentrações (BRASIL, 2017b; ROCHA et al., 2018).

3. ARTIGOS PRODUZIDOS

3.1. ARTIGO 1: QUANTIFICAÇÃO DE LACTOSE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR SEM O USO DE SOLVENTE DEUTERADO (NO-D RMNQ)

RESUMO

O leite pode ser definido como uma mistura homogênea de substâncias como lactose, proteínas, glicérides, entre outros. Dentre os carboidratos, destaca-se a lactose, i.e., dissacarídeo composto por glicose e galactose, presente no leite bovino em concentração de 4,6 %. De acordo com a Resolução nº 135 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os produtos lácteos rotulados como “sem lactose” devem conter teor de lactose igual ou menor que $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um método de quantificação do teor de lactose por Ressonância Magnética Nuclear (RMNq). A validação do método desenvolvido seguiu as normas previstas pela Resolução RDC nº 136 da ANVISA, a partir das figuras de mérito de seletividade, linearidade, limite inferior de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez. Os resultados obtidos foram capazes de validar o método, devido a excelente linearidade, demonstrada pelo valor de $R > 0,990$ e a homocedasticidade dos resultados, bem como valores de precisão, exatidão e robustez menores que 5 %, além de valores de LD e LQ de $0,135 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,407 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente, valores esses menores que a menor concentração da curva e bem menores que o exigido pela legislação. Além disso, a técnica de RMNq ainda foi capaz quantificar o teor de lactose em leites comerciais “sem lactose”.

Palavras-chave: RMN de ^1H , quantificação de lactose, validação de método, qualidade do leite, leite sem lactose, intolerância à lactose, RMNq.

3.1.1. Introdução

O leite mais consumido ao redor do mundo é o leite proveniente da ordenha de vaca, o qual é constituído de 87,25 % de água, 5 % de açúcar (lactose), 3,7 % de gordura, 3,25 % de proteína (onde cerca de 2,5 % é proveniente da caseína), todos

sintetizados na glândula mamária e 0,8 % de minerais que se apresentam na forma de soluções iônicas (FAO/WHO, 2011; FAO, 2018).

Dentre os carboidratos, destaca-se a lactose, um dissacarídeo composto por glicose e galactose, cujo teor no leite bovino é de aproximadamente 4,6 % (PERATI et al., 2016). O ser humano realiza a digestão da lactose via hidrólise pela enzima lactase, porém tal digestão diminui após o desmame, cujo fenômeno é conhecido como hipolactasia primária. Indivíduos com deficiência de lactase não são capazes de hidrolisar completamente a lactose, apresentando intolerância a esse carboidrato (GARBALLO-RUBIO et al., 2018; GILLE et al., 2018). A lactose não hidrolisada atrai água para o intestino e, por efeito osmótico levam a motilidade gastrointestinal, ocasionando dores abdominais e diarreia. Além disso, parte do carboidrato é degradado por bactérias intestinais em meio ácido, liberando gás carbônico e resultando em cólicas intestinais, náuseas, diarreia, flatulência, entre outros sintomas (FAO, 2013; GARBALLO-RUBIO et al., 2018). De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a intolerância à lactose afeta cerca de 70 % da população adulta mundial, já na América do Sul essa porcentagem chega a 50 % da população adulta (FAO, 2013).

De acordo com a literatura, diversas técnicas têm sido bastante empregadas na detecção e quantificação de lactose em produtos lácteos livres de lactose, dentre elas estão a cromatografia líquida de alta eficiência, a espectrometria de massas, o método enzimático, a cromatografia iônica, entre outros (FUSCH, CHOI e ROCHOW, 2011; TRANI et al., 2017; AUSTIN e BÉNET, 2018; GARBALLO-RUBIO et al., 2018; GILLE et al., 2018).

De acordo com o Ministério da Agricultura e Pecuária Animal (MAPA), a cromatografia líquida de alta eficiência regida pela ISO 22662, o método enzimático descrito na ISO 26462 e a cromatografia iônica são considerados métodos oficiais para quantificar teor de lactose em leite (BRASIL, 2018b). A FAO recomenda o uso da ISO 22662 na determinação do teor de lactose presente em leite fluido, no entanto, o Comitê de Métodos de Análise e Amostragem (CCMAS) não indica o uso da ISO 22662 para determinação do teor de lactose em outros produtos derivados do leite, uma vez que tal método exige alteração na massa da amostra analisada (FAO, 2018).

Diversos trabalhos presentes na literatura contestam os métodos padrão supracitados. O método mais utilizado na literatura é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (HPLC-RID, em inglês). No entanto, o

RID além de ser bastante sensível a variações de temperatura e pressão, não permite gradiente de solventes, o que o torna menos específico que outros detectores (MONTI et al., 2017). Já o método enzimático, apesar de possuir menos custo atrelado, não é capaz de diferenciar a galactose proveniente entre a clivagem da lactose e a galactose livre presente no leite, o que pode gerar resultados não tão confiáveis (FUSCH et al., 2011). Por fim, o uso da cromatografia iônica na detecção e quantificação de lactose não é tão consolidada para leite, mas já tem sido estudada quando aplicada a derivados do mesmo. Monti e colaboradores, por exemplo, desenvolveram um estudo a fim de detectar e quantificar lactose, galactose e glicose, por cromatografia de troca iônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD, em inglês), em queijo Grana Padano “livre de lactose”. Os valores de limite de detecção e quantificação para a galactose e glicose foram os menores, em torno de 0,15 mg/100 g e 0,26 mg/100 g, respectivamente, para ambas as amostras. Já os limites de detecção e quantificação para lactose foram 0,25 mg/100 g e 0,41 mg/100 g, respectivamente. No entanto tal estudo não foi aplicado para leite fluido (MONTI et al., 2017).

Já Trani e colaboradores desenvolveram um estudo a fim de comparar HPLC-RI, LC/MS-MS e o método enzimático na quantificação de lactose em leites UHT (*Ultra High Temperature*, em inglês) comerciais. Foram analisadas amostras de leite UHT de diferentes marcas, dentre essas, leites sem lactose e leite semidesnatados. Os resultados mostraram que os métodos enzimático e por HPLC-RI não foram capazes de quantificar a lactose presente nas amostras analisadas, diferente do método utilizando LC/MS-MS. Tal método demonstrou que os níveis de lactose em amostras de leite comercial, leite 0,01 % de lactose e leite 0,1 % de lactose, foram de 5,023 g/100 mL, 0,01 g/100 mL e 0,0132 g/100 mL, respectivamente (TRANI et al., 2017).

Dentre as principais técnicas utilizadas nos estudos de alimentos, se destaca a Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq), principalmente no controle de qualidade de alimentos e bebidas tais como vinho, cerveja, sucos, café, graviola, ovo, pimentas, leite, entre outros (FONTANA et al., 1992; CHARLTON, FARRINGTON e BRERETON, 2002; LACHENMEIER et al., 2005; TAVARES e FERREIRA, 2006; NAZARI et al., 2007; LÓPEZ-RITUERTO et al., 2009; MONAKHOVA et al., 2014; ERICH et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2017b).

É importante ressaltar que além de fornecer informações estruturais e qualitativas, a RMN ainda oferece dados quantitativos simultaneamente. Dessa forma,

a RMNq apresenta diversas vantagens em relação a outras técnicas analíticas, como não precisar de padrões de referências altamente puros e, conseqüentemente, mais caros; além de dispensar o uso de padrões internos semelhantes ao analito estudado e, por fim, possibilita a análise de baixas concentrações de um analito. Além disso, a RMNq possibilita análises rápidas, não destrutivas e sem laborioso preparo de amostra.

Além disso, a RMNq pode ser considerada um método de padronização primária, uma vez que não necessita a utilização de padrões de referência dos analitos de interesse e, além disso, dispensa a construção de uma curva de calibração para obtenção do teor de um analito em uma mistura (SANTOS e COLNAGO, 2013; ROCHA et al., 2018). Sendo assim, a RMNq se mostra mais vantajosa frente as técnicas cromatográficas, uma vez que estas necessitam da construção de uma curva de calibração para quantificação (SANTOS e COLNAGO, 2013; ROCHA et al., 2018). Dessa forma, este trabalho tem o objetivo de validar a técnica de RMN de ^1H na quantificação de lactose em leites comerciais UHT sem o uso de solvente deuterado.

3.1.2. Materiais e Métodos

3.1.2.1. Amostras

O padrão de lactose monoidratada de classificação analítica foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A lactose monoidratada foi diluída em água ultrapura purificada utilizando um sistema MiliQ da Millipore. Para aplicação do método a ser validado, foram compradas 5 marcas diferentes de leite UHT, bem como iogurte, coalhada e creme de leite, com a descrição “sem lactose” em sua embalagem, comercializadas em todo Brasil. Tais leites comerciais foram comprados em supermercados locais.

As amostras utilizadas na construção do modelo de validação, tiveram as seguintes concentrações de lactose: 0,25 mg.mL⁻¹ (Ponto 1), 0,50 mg.mL⁻¹ (Ponto 2), 0,75 mg.mL⁻¹ (Ponto 3), 1,0 mg.mL⁻¹ (Ponto 4), 2,0 mg.mL⁻¹ (Ponto 5), 3,0 mg.mL⁻¹ (Ponto 6), 4,0 mg.mL⁻¹ (Ponto 7) e 5,0 mg.mL⁻¹ (Ponto 8). Inicialmente, a solução de 5,0 mg.mL⁻¹ foi preparada em triplicata e, logo em seguida, as outras concentrações foram preparadas por diluição, utilizando água ultrapura, a partir dessa solução inicial. Como padrão interno, foi utilizado 200 µL de uma solução de ácido 3-trimetilsilil propiônico (TSP) em água deuterada, numa concentração de 8,3 mg.mL⁻¹, colocadas

em tubo de inserção coaxial. Para todas as análises, foram utilizados 500 μL de amostra.

3.1.2.2. Análises de RMN

3.1.2.2.1. Instrumentação

As análises de RMN foram realizadas em um espectrômetro 9.4 T Varian Agilent®, modelo VNMRs400 a uma temperatura de 26 °C. O software usado foi o VNMRj na versão 4.2.

Antes de realizar as análises quantitativas, inicialmente foi necessária a obtenção do tempo de relaxação longitudinal (T_1) o qual foi obtido por meio da sequência de pulso de inversão recuperação (INVREC) após a supressão do sinal da água ($\sim 4,6$ ppm) pela sequência de saturação do sinal (PRESAT). O tempo de relaxação longitudinal (T_1) foi medido para a lactose em sua menor ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$) e maior ($5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) concentração. A fim de garantir o retorno da magnetização de cerca de 99,8 % dos núcleos de hidrogênio estudados, após a aplicação de um pulso utilizou-se um tempo de espera (d_1) de $7 \times T_1$. Dessa forma, tendo em vista que o maior T_1 foi referente ao TSP (~ 4 s), para as análises de validação e das amostras comerciais, o tempo de espera utilizado foi de 28 s. Para todas as amostras foram utilizados 64 *scans* com uma janela espectral de 6410,3 Hz, resultando em um tempo total de análise de 35 min. O processamento dos espectros de RMN foi feito com as correções manuais de fase e linha base, quando necessário.

3.1.2.3. RMN quantitativo (RMNq)

A fim de tornar a RMNq em uma alternativa na quantificação de lactose em leite, foi necessária a validação do método proposto. No Brasil, a validação de métodos analíticos para insumos farmacêuticos e alimentícios é realizada por meio da resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A fim de garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, tal resolução pede a análise das seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2017b).

3.1.2.3.1. Linearidade

Neste estudo, a linearidade foi obtida a partir das 8 concentrações citadas anteriormente, todas em triplicata. A curva foi construída pela correlação entre a razão da área do sinal do analito com a área do sinal do padrão interno (TSP) e a concentração do analito na amostra (RIBEIRO, et al., 2008). Para que o método seja validado, a ANVISA estipula três condições: o coeficiente de correlação (R) deve ser maior que 0,990, o coeficiente angular da curva deve ser diferente de zero e o nível de significância utilizado nos testes estatísticos deve ser de 5 % (BRASIL, 2017b).

3.1.2.3.2. Exatidão

As triplicatas das concentrações referentes aos pontos 1, 4 e 8 foram analisadas três vezes cada. A exatidão é expressa pela Equação 3-1, onde $C_{experimental}$ é referente a concentração obtida a partir da curva analítica e C é referente a concentração teórica (BRASIL, 2017b; ROCHA, et al., 2018).

$$Exatidão \% = \frac{C_{experimental}}{C} \times 100 \quad \text{Eq. 3-1}$$

3.1.2.3.3. Precisão

Assim como nos ensaios de exatidão, as triplicatas das concentrações referentes aos pontos 1, 4 e 8 foram analisadas três vezes cada (BRASIL, 2017b). A precisão é expressa por meio do desvio padrão relativo (DPR), obtido a partir da Equação 3-2, onde s é referente ao desvio padrão e $\bar{x}$ representa a concentração média do analito.

$$DPR = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3-2}$$

3.1.2.3.4. Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

O limite de detecção (LD) foi obtido por meio da curva analítica com intervalo de confiança de 95 %. Essa forma de obtenção apresenta maior confiabilidade estatística frente a parâmetros qualitativos como relação sinal-ruído e o método visual

(RIBEIRO, et al., 2008; BRASIL, 2017b; ROCHA, et al., 2018). O LD foi obtido por meio da Equação 3-4, onde s_y corresponde ao desvio padrão, a_1 referente ao coeficiente angular da curva, N é o número total de amostras utilizadas e y_c é o y crítico obtido pela Equação 3-3. Onde a_0 corresponde ao coeficiente linear da curva analítica (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007; RIBEIRO, et al., 2008).

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 3-3}$$

$$LD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 3-4}$$

O limite de quantificação (LQ) também é calculado a partir do intervalo de confiança da curva, por meio da Equação 3-7 (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007; RIBEIRO, et al., 2008).

$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 3-5}$$

$$x_c = \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 3-6}$$

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Eq. 3-7}$$

3.1.2.3.5. Robustez

A robustez demonstra a capacidade do método em resistir a pequenas variações nas condições analíticas, tais como variação de temperatura, analista, dia de análise, entre outros, sem perda de confiabilidade. Tais variações são expressas da mesma forma que a exatidão. Neste estudo, os testes de robustez foram realizados variando os dias de análise, utilizando as mesmas amostras analisadas nos testes de precisão e exatidão e re-analisados um mês depois (GONZÁLEZ e HERRADOR, 2007; RIBEIRO, et al., 2008; BRASIL, 2017b).

3.1.2.4. Análises de leites e derivados comerciais UHT “sem lactose”

Foram analisadas amostras de leite comerciais UHT de cinco marcas diferentes de circulação nacional, bem como iogurte, coalhada e creme de leite, cujas embalagens os rotulam como “sem lactose ou 0 % lactose”. No Brasil, de acordo com a Resolução nº 135 da ANVISA, os produtos lácteos rotulados como “zero lactose” ou “0 % lactose” devem conter teor de lactose igual ou menor que 100 mg a cada 100 g ou 100 mL do produto. Produtos com este teor são considerados “seguros” para o consumo por pessoas intolerantes à lactose, sendo importante que tais produtos estejam de acordo com a legislação vigente citada anteriormente (BRASIL, 2017a). Após a homogeneização do conteúdo, foram retiradas alíquotas de 500 µL do topo, do meio e do final da embalagem, a fim de garantir amostras mais homogêneas entre si. Como padrão interno, foi utilizado 200 µL de uma solução de TSP em água deuterada, em uma concentração de 8,3 mg.mL⁻¹, colocadas em tubo de inserção coaxial. Para todas as análises, foram utilizados 500 µL de amostra.

3.1.3. Resultados e Discussão

3.1.3.1. Validação do método

3.1.3.1.1. Seletividade

A fim de verificar a seletividade do método, os espectros de RMN de ¹H da solução de 5,0 mg.mL⁻¹ e do padrão interno utilizado, TSP, foram obtidos e sobrepostos, como pode ser observado na Figura 3-1. A partir desta sobreposição é possível observar que os sinais não se sobrepõem, uma vez que o sinal referente ao TSP apresenta deslocamento químico entre 0 e 0,2 ppm e, portanto, não interfere na obtenção dos sinais da lactose. Além disso, na Figura 3-1, foi feita a sobreposição da solução de lactose e leite puro UHT comercial, a fim de verificar quais são os sinais referentes a lactose que estão presentes no espectro de leite, com o intuito de escolher o sinal que será utilizado na quantificação de lactose no leite.

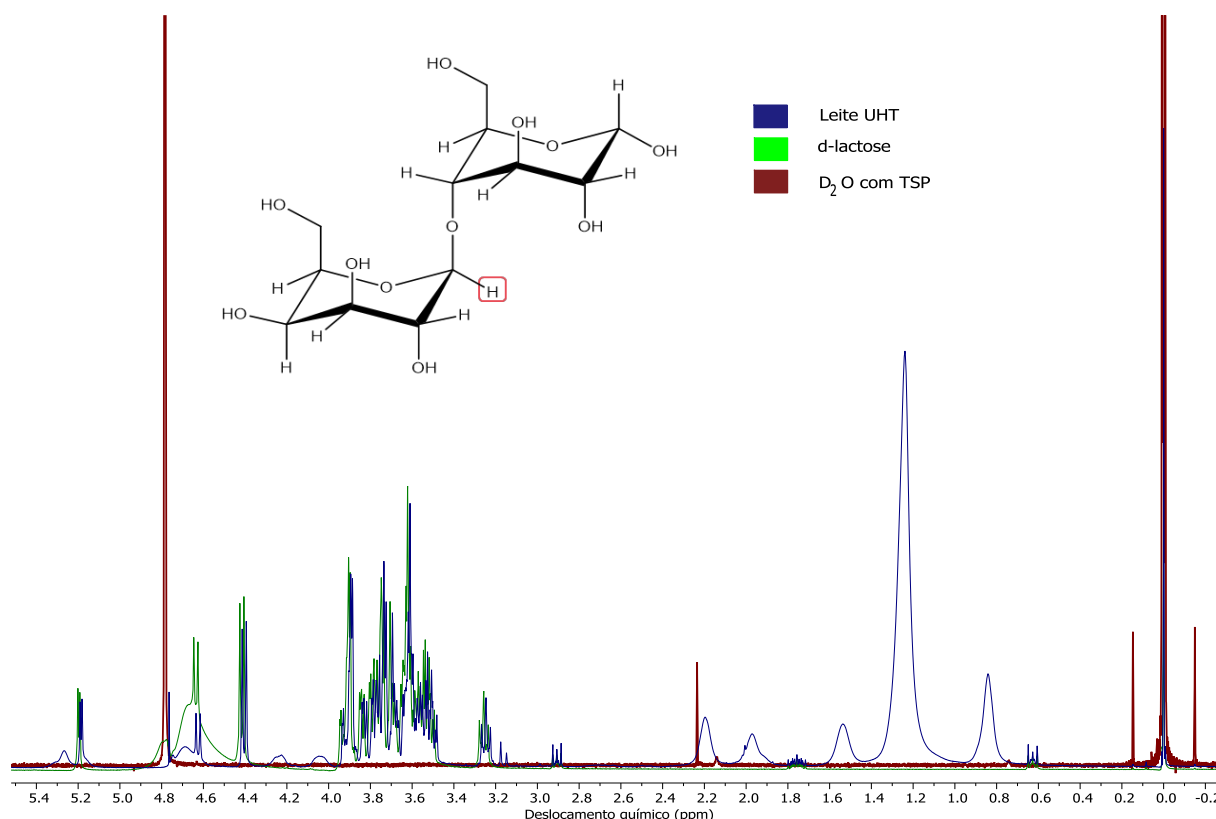


Figura 3-1. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H do padrão interno (TSP), lactose e leite UHT puro, a fim de demonstrar a seletividade do método. No detalhe, a estrutura química da lactose, onde o hidrogênio em destaque é referente ao duplete em ~ 5.2 ppm do espectro.

É possível observar que a região entre 0,6 ppm e 4,8 ppm há muita sobreposição dos sinais e, dessa forma, a escolha do sinal para integração não é possível. No entanto, tal sobreposição não ocorre na região após 5,0 ppm, onde se encontra apenas um duplete em $\sim 5,2$ ppm, o qual está presente tanto na amostra de lactose quanto na amostra de leite, logo será o sinal utilizado para quantificação da lactose em leite. Tal duplete é referente ao hidrogênio da lactose destacado na Figura 3-1.

3.1.3.1.2. Linearidade

A partir da curva de linearidade (Figura 3-2a) foram obtidos os coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (R), onde este último deve ser maior que 0,990, de acordo com a ANVISA. O valor de R obtido a partir da curva foi de 0,9995, ou seja, valor maior que o exigido pelo órgão de regulamentação. Além disso, a linearidade também foi avaliada com base no teste da Análise das Variâncias (ANOVA), representado na Tabela 3-1, e na obtenção do gráfico de dispersão dos resíduos (Figura 3-2b). Para determinar se o modelo poder utilizado para quantificação, é a fim

preciso avaliar se ele apresenta caráter homocedástico com base na homogeneidade da variância dos erros experimentais. O teste de Cochran foi utilizado para verificar se o valor da variação dos erros experimentais calculado é menor que o valor teórico. Com um nível de significância de 5 %, o valor teórico obtido do teste de Cochran para 8 níveis a partir de 8 concentrações, em triplicata, foi de 0,516, enquanto o valor calculado foi de 0,156, o que confirma o caráter homoscedástico do modelo e o gráfico de dispersão residual mostrado em Figura 5-2b. O teste de Fischer (teste F) — razão de variação entre médias da amostra e variação dentro das amostras — também foi realizada para verificar a significância entre a concentração e a razão analito / integrações padrão internas. A Tabela 3-1 mostra que os valores calculados de F foram 10.000 vezes superiores aos valores de F fixados para 71 graus de liberdade. Assim, a equação da linha de tendência pode ser usada para determinar o conteúdo de lactose.

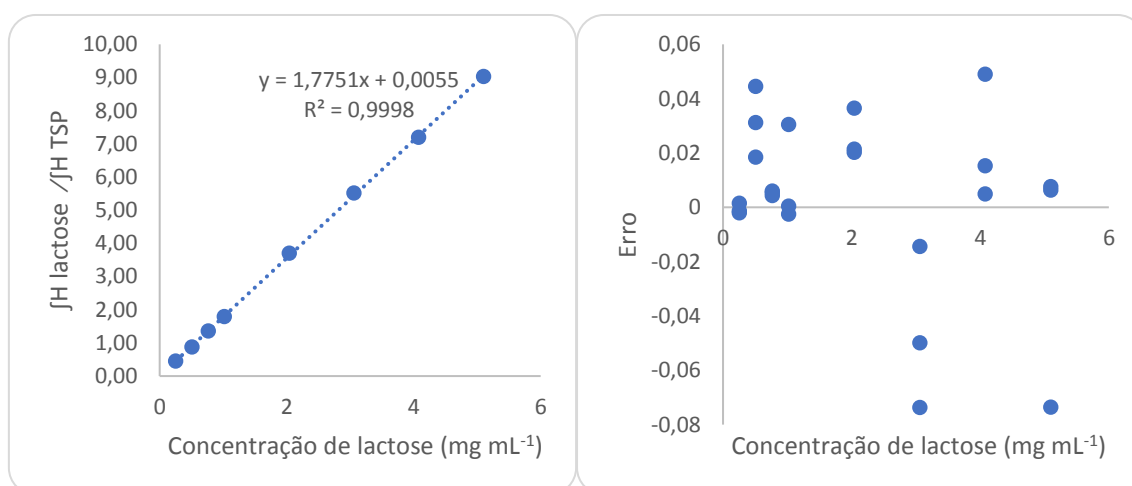


Figura 3-2. a) Curva de linearidade da lactose construída a partir do sinal com deslocamento químico igual a 5.2 ppm do espectro de RMN de ^1H e **b)** Gráfico de dispersão dos resíduos da curva

Tabela 3-1. Análise de Variâncias (ANOVA) da regressão

	Grau de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	Homocedasticidade
Regressão	1	204,5	204,50	3,904E4	0,156
Residual	70	0,0366	5,237E-4		
Total	71	204,536			
Valores tabelados				3,98	0,516

3.1.3.1.3. Exatidão

A exatidão foi determinada a partir da análise de três pontos da curva de

linearidade, que representam as concentrações baixa ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$), média ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e alta ($5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). A

Tabela 3-2 mostra que todos os pontos apresentaram erro abaixo de 5 %, conforme pede a legislação. No entanto, nota-se que o ponto 8 apresentou erros quase nulos, em detrimento dos pontos 1 e 4 que apresentaram erros pouco maiores, porém ainda menores que 5 %. Essa diferença nos valores também pode ser atribuída a erros nas etapas de diluição a fim de alcançar menores valores de concentração.

Tabela 3-2. Valores de exatidão (em %) para os analitos em baixa, média e alta concentração.

Concentração (mg.mL^{-1})	Exatidão (%)	Precisão (%)	Robustez (%)
0,25 (Ponto 1)	104,6	0,616	95,9
1,00 (Ponto 4)	102,7	0,138	97,4
5,00 (Ponto 8)	100,6	0,006	101,4

3.1.3.1.4. Precisão

O cálculo da precisão foi realizado baseado no parâmetro de repetibilidade, conforme recomenda a ANVISA, na RDC no 166 (BRASIL, 2017b). A partir daí, foram obtidos os desvios padrão relativo (DPR) e, os mesmos estão descritos na

Tabela 3-2. A ANVISA regulamenta que o desvio padrão relativo deve ser abaixo de 5 %, atendendo assim a legislação vigente.

3.1.3.1.5. Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Segundo a ANVISA, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) podem ser obtidos por meio do método visual, da relação sinal-ruído (baseado na determinação do branco) ou pela curva de linearidade (BRASIL, 2017b). Nesse estudo, os limites foram obtidos por meio da curva de linearidade, a partir das Equações 3-9 e 3-12. Os valores de LD e LQ foram $0,135 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,407 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Isso mostra que o LD obtido é menor que a menor concentração usada na construção da curva. É importante observar que ambos os limites são muito inferiores à menor concentração de lactose permitida, por legislação, em leites UHT rotulados como “isentos de lactose” ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). Além disso, o valor LQ mostra que a técnica RMNq pode quantificar, com excelente confiabilidade, as concentrações de lactose pela metade do exigido pela legislação (BRASIL, 2017a).

3.1.3.1.6. Robustez

A avaliação desta figura de método foi realizada a partir das análises dos pontos 1, 4 e 8 em dias diferentes. As amostras foram armazenadas na geladeira à temperatura de -3 °C ao abrigo da luz, e foram novamente analisadas após 30 dias. A partir daí, novos espectros e, conseqüentemente, novas integrações foram obtidas e os resultados foram comparados, conforme

Tabela 3-2. A partir dos resultados, é possível observar uma variação menor que 5 % nos valores obtidos da segunda análise em relação à primeira. Isso mostra que a variação das condições citadas, tiveram pouca influência nos resultados pelo método proposto para a RMNq, explicitando a robustez do método e da técnica.

3.1.3.2. Quantificação da lactose em amostras de leite UHT comercial “sem lactose”

Após o estudo de validação do método de quantificação de lactose por RMNq, foi possível observar que o método atendeu a todas as exigências do órgão legislador. A partir daí o método foi então aplicado na quantificação de lactose em leite, iogurte, coalhada e creme de leite UHT comerciais rotulados como “sem lactose” ou “0 % lactose”. De acordo com a RDC nº 135 da ANVISA, para que o leite UHT seja rotulado como “sem lactose” ou “0 % lactose”, estes devem conter no máximo 1,0 mg.mL⁻¹ de lactose (BRASIL, 2017a).

Dessa forma, o método de quantificação proposto foi aplicado a 5 marcas de leite UHT e aos derivados comerciais rotulados como “sem lactose” adquiridos em supermercados locais. Logo depois, as amostras foram analisadas em triplicata por RMN de ¹H, e a sequência de presaturação (PRESAT) saturando-se o sinal da água (~ 4,6 ppm). Na Figura 3-3, é possível observar a sobreposição dos espectros da lactose a 5,0 mg.mL⁻¹ e um leite rotulado como “sem lactose”. Nota-se que o duplete em ~ 5,2 ppm está presente em ambas as amostras, ou seja, o sinal referente a lactose também está presente no leite “sem lactose”.

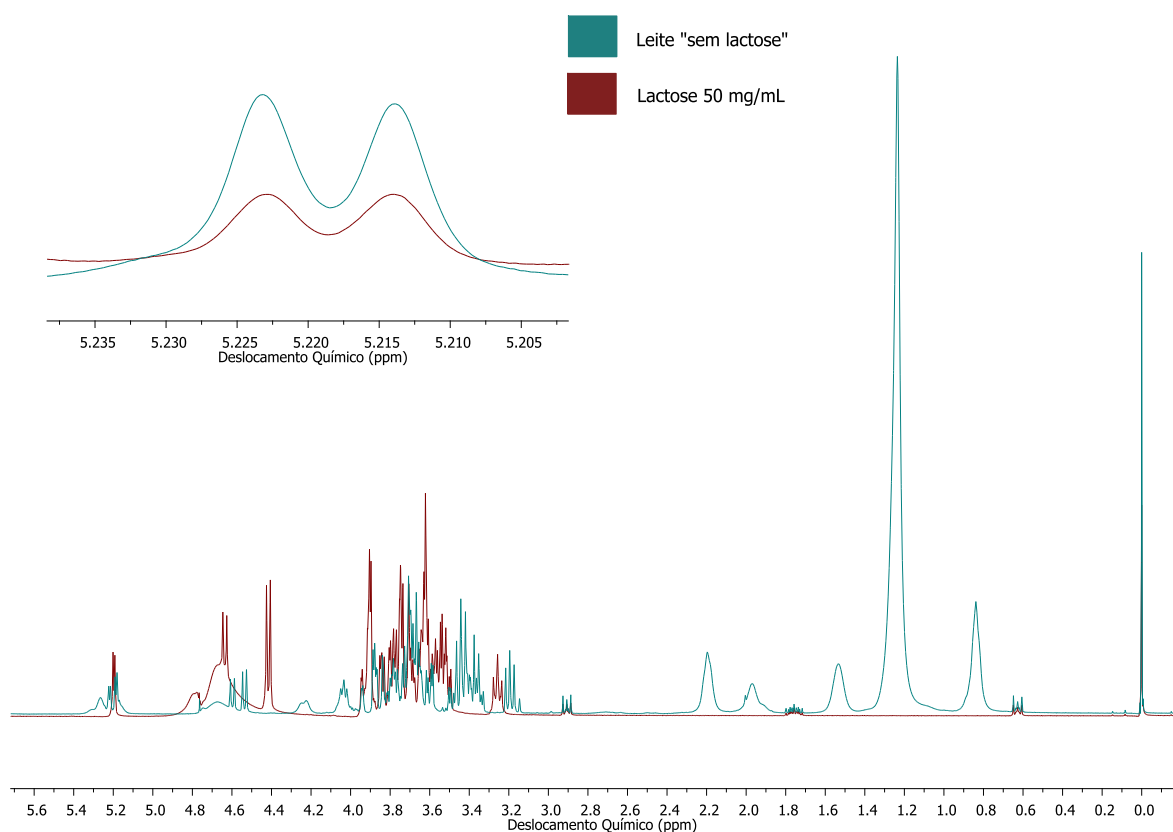


Figura 3-3. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da solução de lactose a $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o leite UHT rotulado como “sem lactose”, a fim de demonstrar a presença de lactose no leite “sem lactose” pela presença do duplete em $\sim 5,2 \text{ ppm}$.

Após isso, os sinais presentes no leite “sem lactose” em $\sim 5,2 \text{ ppm}$ foram integrados e a concentração da lactose foi obtida a partir desta integração em relação à integração do TSP, utilizado como padrão interno. Para o cálculo do teor de lactose no leite, os cálculos foram realizados através da curva de linearidade ($y = 1,7751x + 0,0055$) obtida para o sinal em $\delta = 5,2 \text{ ppm}$, uma vez que não foram identificados sinais que o sobrepõe, como pode ser observado na expansão do sinal na Figura 3-3. As concentrações experimentais (C_{exp}) obtidas por meio da equação da reta, em mg.mL^{-1} , estão dispostas na Tabela 3-3.

Tabela 3-3. Concentração experimental de lactose em leite UHT comercial "sem lactose" obtida por meio da curva de linearidade.

Amostras	Integração	C _{exp} (mg.mL ⁻¹)	Desvio Padrão (%)
Leite 1	0,524	0,231	0,717
Leite 2	0,464	0,167	0,377
Leite 3	0,451	0,153	0,478
Leite 4	0,458	0,167	0,204
Leite 5	0,456	0,159	0,0436
Iogurte	0,501	0,279	0,214
Coalhada	0,505	0,281	0,222
Creme de leite	0,472	0,263	0,209

A partir da Tabela 3-3, é possível observar que todas as amostras de leite, iogurte, coalhada e creme de leite UHT comercial rotuladas como “sem lactose” ou “0 % lactose” possuem lactose em sua composição teores permitidos pela legislação (1,0 mg.mL⁻¹). De acordo com a ANVISA, o valor determinado pela legislação é o limite seguro de consumo de lactose para intolerantes ao mesmo, uma vez que o consumo acima do permitido pode causar cólicas intestinais, náuseas, diarreia e flatulência. Sendo assim, frente aos resultados obtidos pode-se afirmar que a RMNq também pode ser usada como um instrumento de quantificação de lactose em leites UHT comerciais.

3.1.4. Conclusão

A partir do estudo realizado, foi possível observar que o método de quantificação de lactose por RMN de ¹H sem o uso de solvente deuterado mostrou ser bastante eficaz. Tal eficácia pôde ser observada por meio dos excelentes resultados das figuras de mérito utilizadas na validação do método proposto. Além da excelente linearidade, demonstrada pelo valor de R > 0,990 e a homocedasticidade dos resultados, bem como valores de precisão, exatidão e robustez menores que 5 %,

além de valores de LD e LQ em torno de $0,135 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,407 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente, valores esses menores que a menor concentração da curva e bem menores que o exigido pela legislação na comercialização de leites UHT rotulados como “sem lactose” ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). É importante ressaltar que o método de RMNq de ^1H obteve resultados bastantes satisfatórios em sua validação e, portanto, pode ser utilizado como alternativa na quantificação de lactose em leite, em detrimento das outras técnicas já utilizadas atualmente com suas limitações citadas anteriormente, principalmente devido ao tempo de análise de apenas 36 min.

Além disso, após a validação do método, este foi aplicado na quantificação de lactose em leites, iogurte, coalhada e creme de leite UHT comerciais rotulados como “sem lactose” ou “0 % lactose”. Estes, de acordo com a RDC nº 135 da ANVISA, devem ser menores que 1 mg.mL^{-1} , e após a quantificação da lactose por meio da curva de linearidade da validação, foram obtidos valores de lactose dentro do limite permitido pela legislação em todas as amostras analisadas. Qualquer alteração nesta concentração pode ser bastante nociva aos intolerantes a esse dissacarídeo, uma vez que estes são os principais consumidores de produtos “sem lactose”. Dessa forma, nota-se a importância de tal quantificação em leites e derivados UHT e o impacto de tal alteração na saúde de pessoas intolerantes a lactose.

3.2. ARTIGO 2: DETECÇÃO POR DT-RMN DA ADULTERAÇÃO DE LEITE COMERCIAL UHT

RESUMO

Leite sem outra especificação pode ser definido, de acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), como o produto oriundo da completa ordenha de vacas sadias, em condições de higiene. Atrelado ao alto consumo, o índice de não conformidades do leite e produtos lácteos, no Brasil, também é bastante expressivo, como divulgado no Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), está em torno de 20 % em ensaios físico-químicos e microbiológicos. É importante ressaltar que em tais ensaios foi visado a detecção da adição de substâncias proibidas, tais como soro, açúcares, sais, conservantes, entre outros. Dentre as técnicas mais utilizadas para o estudo deste leite estão o infravermelho, Raman, ultravioleta e a ressonância magnética nuclear (RMN). No entanto, de acordo com uma vasta busca em bases de pesquisa, poucos estudos envolvendo leite na Ressonância Magnética Nuclear, tanto de alta resolução quanto de baixa resolução, foram publicados, o que torna este projeto um desafio. Dessa forma, a realização desse estudo espera trazer imensas contribuições para difusão da técnica aplicada ao leite e derivados.

Palavras-chave: Ressonância Magnética Nuclear, leite, laticínios

3.2.1. Introdução

O leite oriundo da completa ordenha de vacas sadias, em condições de higiene, é composto, principalmente, por água, gordura, proteínas, carboidratos e alguns minerais que se apresentam na forma de soluções iônicas. Algumas destas substâncias, como gordura e associados, se apresentam na forma de emulsões, algumas em suspensão e outras em verdadeira dissolução, tais como lactose, sais e proteínas do soro (ORDOÑEZ et al., 2007). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), ao longo de 2017, foram produzidos mais de 24 bilhões de litros de leite cru ou resfriado em todo o Brasil e, dessa forma, passou a ser o quarto maior produtor mundial de leite, o que ilustra a grande importância deste produto na economia brasileira (IBGE, 2019).

De acordo com o “*United States Department of Agriculture*”, o Brasil está entre os maiores produtores de leite do mundo, ocupando a sexta colocação, atrás apenas da União Europeia, Estados Unidos, Índia, Rússia e China. Em 2018, a produção de leite no Brasil alcançou aproximadamente 23 milhões de toneladas de leite, enquanto a União Europeia produziu cerca de 154 milhões de toneladas. Já em relação ao consumo, o Brasil se encontra na 5ª colocação, com quase 10 milhões de toneladas de leite consumidas, atrás da Índia, União Europeia, Estados Unidos e China (USDA, 2018). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em 2017, o consumo de leite no Brasil ao longo de todo o ano foi cerca de 166 litros por habitante (EMBRAPA, 2018).

Atrelado ao alto consumo e produção, o índice de não conformidades de leite e produtos lácteos, no Brasil, também é bastante expressivo, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, está em torno de 20% em ensaios físico-químicos e microbiológicos. É importante ressaltar que em tais ensaios foi visado a detecção da adição de substâncias proibidas, tais como soro, açúcares, sais, conservantes, entre outros (BRASIL, 2018c). A partir de tais dados é possível observar, portanto, a importância da detecção da adulteração do leite, visando a qualidade do produto vendido para o consumidor final.

A adulteração de leite visa principalmente a diluição do mesmo ou adição de produtos de mais baratos e de menor qualidade, visando aumentar o volume do leite, mascarar a qualidade ruim do leite, aumentar a sua vida útil, entre outros. Inicialmente, a adulteração mais comum no leite era feita com água, uma vez que isto aumenta o volume de leite (NASCIMENTO et al., 2017b). Muitas vezes tais adulterantes não prejudicam o consumidor apenas financeiramente, mas pode acarretar sérios problemas de saúde, uma vez que muitas vezes são adicionados produtos químicos (SOUZA et al., 2011). No Brasil, dentre os principais adulterantes estão a água, peróxido de hidrogênio, açúcares, urina, entre outros (SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013; SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016).

A literatura apresenta a utilização de diversas técnicas para a análise e caracterização de leite, tais como espectroscopia na região do infravermelho (SOYEURT, MISZTAL e GENGLER, 2010; AERNOUTS et al., 2011; RODRIGUEZ-SAONA e ALLENDORF, 2011; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013a; SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013b), Raman (ZHANG et al., 2010; LOU et al., 2011; YAO et al., 2016) e a ressonância magnética nuclear

tanto de alta resolução (ROUGE et al., 2013; ERICH et al., 2015; AU, WANG e ACEVEDO, 2016).

A técnica de RMN no domínio do tempo (TD-NMR) tem se destacado bastante por possuir uma análise rápida, não ser destrutiva e dispensar o preparo de amostra. A TD-NMR é uma técnica consolidada indústria petrolífera, no estudo de petróleo e qualidade de combustíveis (BARBOSA et al., 2013; MORGAN et al., 2014; CUNHA, CASTRO e BARBOSA, 2016; ROMANEL et al., 2018). No entanto, na indústria alimentícia tal técnica está se consolidando como uma excelente alternativa na análise da qualidade de alimentos como mel (RIBEIRO et al., 2014), carne (SÁNCHEZ-ALONSO et al., 2012), frutas (RODRIGUÉZ et al., 2013), entre outros. Porém, tal técnica tem dado seus primeiros passos quando aplicada no estudo de leite e derivados (CASTELL-PALOU et al., 2011; COLNAGO et al., 2011; SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016).

Aernouts e colaboradores estudaram a capacidade do infravermelho próximo e visível em prever teores de gordura, lactose, proteínas e ureia no leite cru. Foram feitos ensaios utilizando dois modos de medida, o de refletância e de transmitância. A partir dos valores do coeficiente de correlação (R^2), os autores observaram que as medidas de refletância foram capazes de prever apenas os teores de proteína presente no leite. Já as medidas de transmitância foram capazes de prever os teores de gordura e lactose. Porém, nenhuma das duas medidas foi capaz de determinar o teor de ureia no leite (AERNOUTS et al., 2011).

Erich e colaboradores desenvolveram um estudo com o intuito de diferenciar leite UHT orgânico e convencional. As amostras foram coletadas e analisadas por ^1H , ^{13}C NMR e espectrometria de massas de razão isotópica (IRMS), a partir daí os resultados foram combinados com análises quimiométricas. Os autores concluíram que as técnicas combinadas foram capazes de diferenciar os dois tipos de leite com uma taxa de classificação de 95 %, enquanto que apenas por RMN essa taxa foi de 81 % e por IRMS foi de cerca de 90 % (ERICH et al., 2015).

Em 2008, o mundo foi surpreendido com um escândalo na China, onde leite em pó infantil era adulterado com melamina. Na época, cerca de 6 crianças morreram e outras tiveram diversos problemas de saúde, dentre eles alguns tipos de câncer. A partir daí, a fiscalização da qualidade do leite comercializado foi intensificada ao redor do mundo (EFSA, 2010). A fim de contribuir nessa fiscalização, na literatura são encontrados diversos estudos que envolvem a detecção e quantificação da

adulteração de leite comercial. Por exemplo, Santos e colaboradores desenvolveram um estudo a fim de detectar e quantificar a adulteração de leite. Foram utilizadas amostras comerciais de leite e os adulterantes utilizados foram soro, peróxido de hidrogênio, urina sintética, ureia e leite sintético. As amostras foram analisadas por *MIR-microspectroscopy* ($4000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} e 18 scans) e para ajudar na compreensão dos resultados foram utilizados modelos quimiométricos, onde a Regressão Parcial dos Mínimos Quadrados (PLSR) mostrou erros muito pequenos para quantificação do cinco adulterantes nas misturas. Dessa forma, os autores concluíram que a técnica proposta foi capaz de detectar e quantificar os adulterantes nas amostras de leite comercial (SANTOS, PEREIRA-FILHO e RODRIGUEZ-SAONA, 2013a).

A detecção e quantificação da adulteração de leite comercial também foi estudada por TD-NMR num estudo realizado por Santos e colaboradores (2016). Nesse trabalho, os autores tinham como objetivo detectar e quantificar soro, peróxido de hidrogênio, urina sintética e leite sintético por TD-NMR. Inicialmente, os autores observaram que a técnica sozinha não era capaz de diferenciar os tipos de adulterantes entre si, uma vez que os valores do tempo de relaxação transversal (T_2) não tinham diferenças significativas. Para isso, foi utilizado então modelos quimiométricos a fim de distinguir os adulterantes entre si. Os autores utilizaram modelos PLSR e, a partir daí, foi possível concluir que a TD-NMR atrelada a análises quimiométricas é capaz de detectar, quantificar e distinguir os tipos de adulterantes utilizados em leite comercial (SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016).

Em 2007, a polícia federal brasileira realizou a operação nomeada “Ouro Branco” que levou a público diversas adulterações realizadas por cooperativas (BRASIL, 2012). Em uma das fases desta operação, foi descoberto que eram adicionados soda cáustica, peróxido de hidrogênio, sal, açúcar, água, formaldeído, entre outros adulterantes no leite comercializado por grandes marcas brasileiras. A partir daí diversos estudos foram desenvolvidos a fim de fiscalizar melhor a qualidade desse alimento. Tanto que, em 2006, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento emitiu uma instrução normativa com todos os ensaios e suas respectivas metodologias que deveriam ser realizadas no leite cru (BRASIL, 2006). Em 2018, foi emitido pela mesma instituição o Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal com a atualização desses ensaios (BRASIL, 2018b).

Este trabalho teve como objetivo detectar e quantificar a adulteração de leite UHT comercial por TD-NMR a partir do tempo de relaxação transversal (T_2) e comparar os resultados obtidos com as análises propostas pelo Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal.

3.2.2. Materiais e Métodos

Foram selecionadas e coletadas amostras de leite UHT comercial de 4 marcas diferentes em supermercados locais. Os adulterantes utilizados neste estudo foram a água, o hidróxido de sódio, o peróxido de hidrogênio, o amido e hipoclorito de sódio e todos eles foram obtidos em supermercados locais.

Os ensaios de TD-NMR foram realizados no espectrômetro Maran Ultra-2 fabricado pela Oxford Instruments Molecular Biotoools Ltda, de campo magnético de 52 mT, correspondendo a uma frequência de 2,2 MHz para o núcleo ^1H . Para cada porcentagem de adulterante no leite foram realizados três medidas que resultaram em curvas de CPMG (Carr-Purcell_Mayboon-Gil). A partir das curvas de decaimento de CPMG, os valores de tempo de relaxação transversal (T_2) foram obtidos por meio do ajuste monoexponencial realizado no programa WinFit®. Tais valores de T_2 foram posteriormente correlacionados com suas respectivas porcentagens de adulterante. Inicialmente, os pulsos de 90° e 180° são calibrados com cerca de 25 g de água destilada. Logo depois, são realizados experimentos de CPMG a fim de obter medir o tempo de relaxação transversal (T_2) da água destilada, leite UHT comercial, adulterantes e as respectivas misturas de leite e adulterante. Para calibração com água destilada, os parâmetros utilizados foram: NS 4, número de ecos (NECH) de 32768, RD 15 s e TAU 200 μs .

3.2.2.1. Adulteração com água

As amostras de leite UHT comercial foram adulteradas com água destilada nas seguintes proporções: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % e 50 %. Para as análises de DT-RMN, utilizou-se os seguintes parâmetros NS 4, número de ecos (NECH) de 20.480, RD 8 s e TAU 200 μs . As amostras também foram analisadas pelo método “Densidade relativa a 15 °C” proposto pelo MAPA (BRASIL, 2018b). O experimento consiste na imersão do termolactodensímetro na amostra e provocará um deslocamento do líquido, marcando a densidade real do leite em uma dada

temperatura. O termolactodensímetro 15/40 x 1g/mL 285mm calibrado a 15 °C da marca Incoterm, onde a densidade é dada inicialmente em graus Quevenne e depois, convertida para g.mL⁻¹.

3.2.2.2. Adulteração com hidróxido de sódio

As amostras de leite UHT comercial foram adulteradas com soda cáustica comercial 98 %, nas seguintes proporções: 0,1 mg.mL⁻¹, 0,2 mg.mL⁻¹, 0,3 mg.mL⁻¹, 0,4 mg.mL⁻¹ e 0,6 mg.mL⁻¹. Para as análises de DT-RMN, utilizou-se os seguintes parâmetros NS 4, número de ecos (NECH) de 4096, RD 8 s e TAU 200 µs. As amostras também foram analisadas pelo método “Acidez em leite fluido” proposto pelo MAPA (BRASIL, 2018b). O experimento consiste, inicialmente, na diluição de 20 mL da amostra de leite em 40 mL de água ultrapura purificada utilizando um sistema MiliQ da Millipore® e, logo depois, é realizada a titulação da amostra diluída com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹, utilizando 2 mL de fenolftaleína a 1 % (m/v) como indicador. Como padrão de coloração para o final da titulação, em uma solução de leite diluída, utilizou-se 100 µL de uma solução preparada com 0,06 g fucsina básica Vetec® em 100 mL de álcool etílico absoluto.

3.2.2.3. Adulteração com peróxido de hidrogênio

As amostras de leite UHT comercial também foram adulteradas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), obtido a partir de água oxigenada comercial com 3 % de H₂O₂. As adições foram feitas nas seguintes proporções: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % e 50 % (v/v). Para as análises de DT-RMN, utilizou-se os seguintes parâmetros NS 4, número de ecos (NECH) de 4096, RD 8 s e TAU 200 µs. As amostras também foram analisadas pelo método “Detecção de peróxido de hidrogênio” proposto pelo MAPA (BRASIL, 2018b). O experimento consiste, na adição de 2 mL de leite cru a de 10 mL de amostra e posterior aquecimento em banho-maria a 35 °C por 5 minutos para ativação da enzima peroxidase. Logo depois, são adicionados 2 mL de uma solução hidroalcolica de guaiacol a 1 % e, após agitação e espera de 5 minutos, se positivo, é observado o desenvolvimento de coloração salmão na amostra. Por fim, é realizada uma confirmação do positivo, onde são adicionadas 5 gotas de H₂O₂ a 3 % (v/v) e,

caso não desenvolva a coloração azul, deve ser utilizado outro leite cru como fonte de peroxidase.

3.2.2.4. Adulteração com hipoclorito de sódio

As amostras de leite UHT comercial também foram adulteradas com hipoclorito de sódio, obtido a partir de água sanitária comercial. As adições foram feitas nas seguintes proporções: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % e 50 % (v/v). Para as análises de DT-RMN, utilizou-se os seguintes parâmetros NS 4, número de ecos (NECH) de 4096, RD 8 s e TAU 200 μ s. As amostras também foram analisadas pelo método “Cloretos em leite fluido – qualitativo” proposto pelo MAPA (BRASIL, 2018b). O experimento consiste, na adição de 4,5 mL de solução de nitrato de prata (AgNO_3) e, logo depois é feita a agitação e posterior adição de 0,5 mL de cromato de sódio (K_2CrO_4). Se positivo, é observada coloração amarela na amostra sem precipitados vermelhos.

3.2.2.5. Adulteração com amido

As amostras de leite UHT comercial também foram adulteradas com amido de milho de sódio. As adições foram feitas com solução de amido de milho a 1 % (m/v) nas seguintes proporções: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % e 50 % (v/v). Para as análises de DT-RMN, utilizou-se os seguintes parâmetros NS 4, número de ecos (NECH) de 4096, RD 8 s e TAU 200 μ s. As amostras também foram analisadas pelo método “Amido – qualitativo”, proposto pelo MAPA (BRASIL, 2018b). A análise consiste, no aquecimento de 10 mL de amostra do leite adulterado até ebulição, em banho-maria e, após a espera de 5 minutos o tubo contendo a amostra foi resfriada em água corrente. Por fim, foi adicionada 2 a 3 gotas de lugol, preparada pela dissolução de 2,5 g de iodeto de potássio (KI) e diluída para 25mL. O teste é considerado positivo se for observado o aparecimento da coloração entre acinzentado e azul royal.

3.2.3. Resultados e Discussão

Após a coleta das amostras, os quatro leites comerciais UHT denominados 1, 2, 3 e 4 foram analisados na RMN no domínio do tempo (DT-RMN), a fim de conhecer

o tempo de relaxação transversal (T_2) a partir da técnica de CPMG. A Figura 3-4 mostra a curva de variação da intensidade normalizada com o tempo das amostras de leite e, observou-se que, estas possuem decaimento exponencial bem semelhantes entre si. A partir das curvas de decaimento, o programa WinFit® foi utilizado para obter os valores de T_2 das amostras por meio de um ajuste monoexponencial feito nas curvas e, como esperado, os leites apresentaram T_2 bastante semelhantes, entre 0,174 e 0,176 s, como pode ser observado na Tabela 3-4.

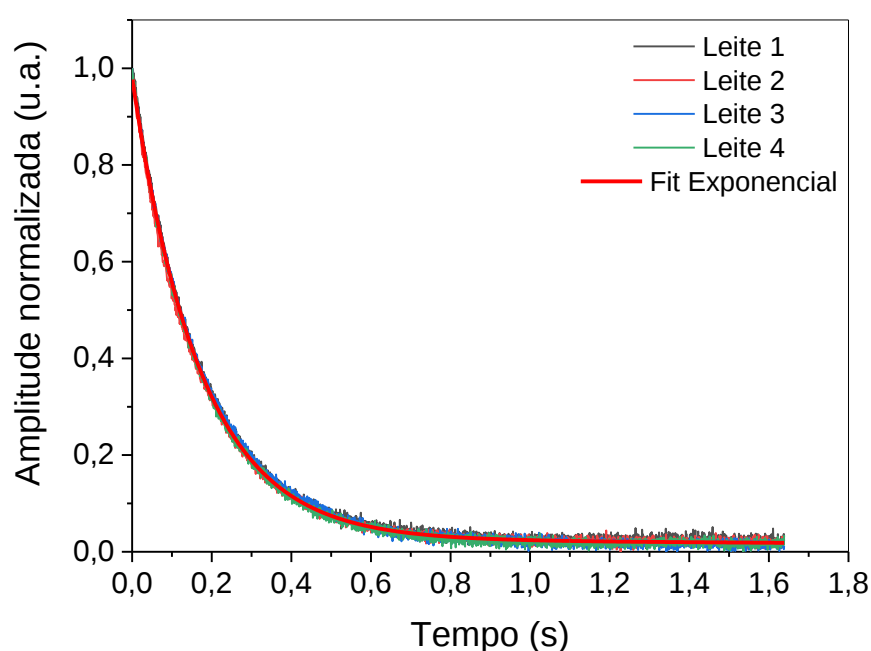


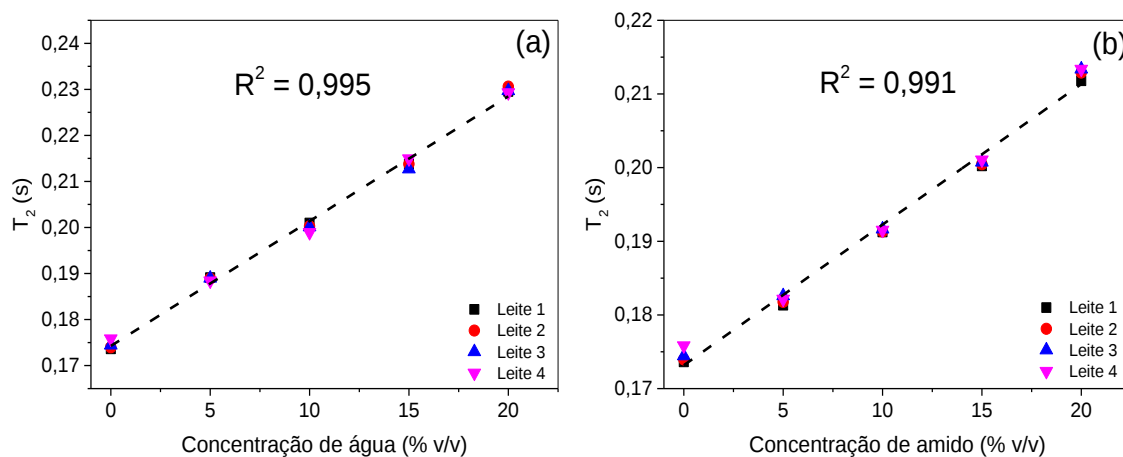
Figura 3-4. Curvas de decaimento da intensidade normalizada com o tempo, do sinal obtido via CPMG, para os leites 1, 2, 3 e 4 sem a adição de adulterantes.

Tabela 3-4. Valores de T_2 das amostras de leites UHT comerciais sem adulterantes.

Amostras	T_2 (s)
Leite 1	0,174
Leite 2	0,174
Leite 3	0,174
Leite 4	0,176

Após a obtenção das curvas de decaimento de CPMG dos leites UHT, foram realizadas as adulterações das 4 marcas de leite com água, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e amido, nas concentrações previstas. A

partir da técnica de CPMG foram obtidas as curvas de decaimento e, logo depois os valores de T_2 que foram plotados em curvas de calibração, de acordo com a respectiva concentração de adulterante adicionada (Figura 3-5). Nesta figura, é possível observar que, as adulterações com água, amido, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio apresentaram valores de T_2 crescentes com o aumento da concentração de seus respectivos adulterantes. Nas adulterações com água, hipoclorito de sódio e amido, esse aumento de T_2 acontece pela maior disponibilidade de prótons (^1H) devido a diluição da amostra que levam ao decréscimo da sua viscosidade, a qual é inversamente proporcional ao valor de T_2 . Esperava-se que os valores do tempo de relaxação transversal das amostras adulteradas com hipoclorito de sódio (NaClO_4) aumentasse, porém com menores intervalos entre uma concentração e outra, entretanto, esse efeito foi minimizado pelo efeito de diluição. Já nas amostras adulteradas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o efeito da diluição pode ser observado em concentrações acima de 15 % do adulterante. Em concentrações inferiores a 15 % o T_2 é governado pelo paramagnetismo do gás oxigênio proveniente da rápida decomposição do H_2O_2 (SANTOS, PEREIRA-FILHO e COLNAGO, 2016).



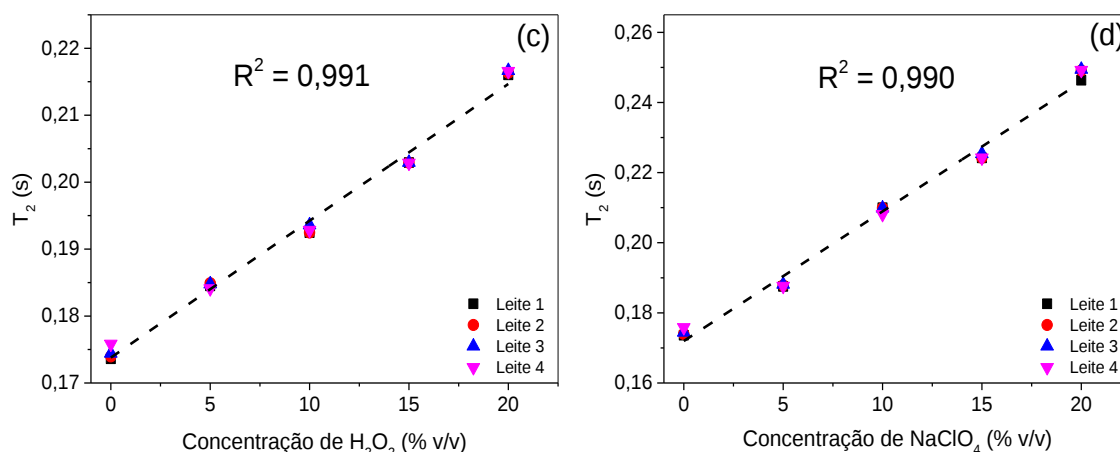


Figura 3-5. Curvas de distribuição obtidas a partir da sequência CPMG, provenientes da adulteração do leite 1, 2, 3 e 4 após as adulterações com a água (a), amido (b), peróxido de hidrogênio (c) e hipoclorito de sódio (d) numa taxa de 5% ao leite até 50%.

Na Figura 3-5, é possível notar a excelente correlação entre o T_2 e a concentração do adulterante na amostra, devido aos excelentes coeficientes de determinação (R^2) obtidos. A partir das curvas de adulteração foram obtidos os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada adulterante, apresentados na Tabela 3-5.

Tabela 3-5. Limites de detecção e quantificação para análises de adulteração.

Adulterante	$y = b_0 + b_1 \cdot x$	LD (% v/v)	LQ (% v/v)
Água	$y = 0,174 + 0,0027 x$	2,531	8,845
Amido	$y = 0,173 + 0,0019 x$	3,495	9,151
Peróxido de hidrogênio	$y = 0,174 + 0,0020 x$	3,842	10,012
Hipoclorito de sódio	$y = 0,172 + 0,0037 x$	2,758	9,054

Por apresentarem o mesmo perfil, as curvas de adulteração com água, amido e peróxido de hidrogênio, foram agrupadas na curva representada na Figura 3-6, cuja equação da reta obtida foi $y = 0,174 + 0,022 x$, e apresentaram bons valores para os coeficientes de determinação ($R^2 = 0,942$) e correlação ($R = 0,973$). Sendo assim, a partir da equação obtida pela curva resultante, obtém-se o teor do adulterante presente na amostra. A curva referente a adulteração com hipoclorito de sódio não foi

plotada com as demais, por ter apresentado perfil distinto das anteriores.

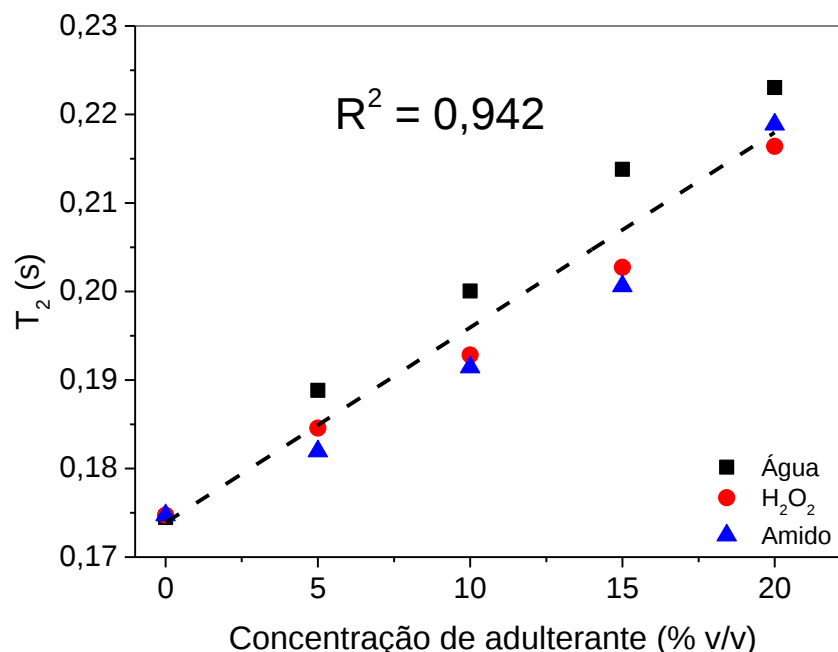


Figura 3-6. Correlação das curvas de calibração de adulteração dos leites 1, 2, 3 e 4 com água, amido e peróxido de hidrogênio.

A eficiência da curva representada na Figura 3-6 foi avaliada por meio do teste Fischer (teste F) da Análise de Variâncias (ANOVA), mostrado na Tabela 3-6, onde observa-se que o valor calculado de F foi 130 vezes superior ao valores de F fixado para 14 graus de liberdade. Sendo assim, a equação da reta obtida na Figura 3-6 pode ser utilizada na determinação da adulteração de leite com água, amido e peróxido de hidrogênio (VIEIRA, 2006).

Tabela 3-6. Análise de Variâncias (ANOVA) da regressão

	Grau de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F
Regressão	1	0,00364	0,00364	229,14
Residual	13	2,67E-4	1,597E-5	
Total	14	0,00385		
Valores tabelados				1,761

As amostras de leite também foram adulteradas com hidróxido de sódio (NaOH) e, a partir da técnica de CPMG foram obtidas as curvas de decaimento. Os valores de T₂ foram plotados de acordo com a respectiva concentração de adulterante adicionada, na curva de calibração representada na Figura 3-7a. É possível observar que os valores de T₂ diminuem com o aumento da concentração de NaOH, uma vez

que este reage com o ácido láctico presente na amostra e diminui a quantidade de próton (^1H) diminuindo, portanto, o tempo de relaxação da amostra. Sendo assim, a acidez da amostra pode ser correlacionada com o valor de T_2 , de acordo com a Figura 3-7b, cuja correlação apresentou bons valores para os coeficientes de determinação ($R^2 = 0,990$) e correlação ($R = 0,995$). Para adulteração com NaOH (Figura 3-7a), a equação da reta obtida foi $y = 0,176 - 0,0455x$ e, a partir dela o limite de detecção e quantificação obtidos foram $0,06$ e $0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente.

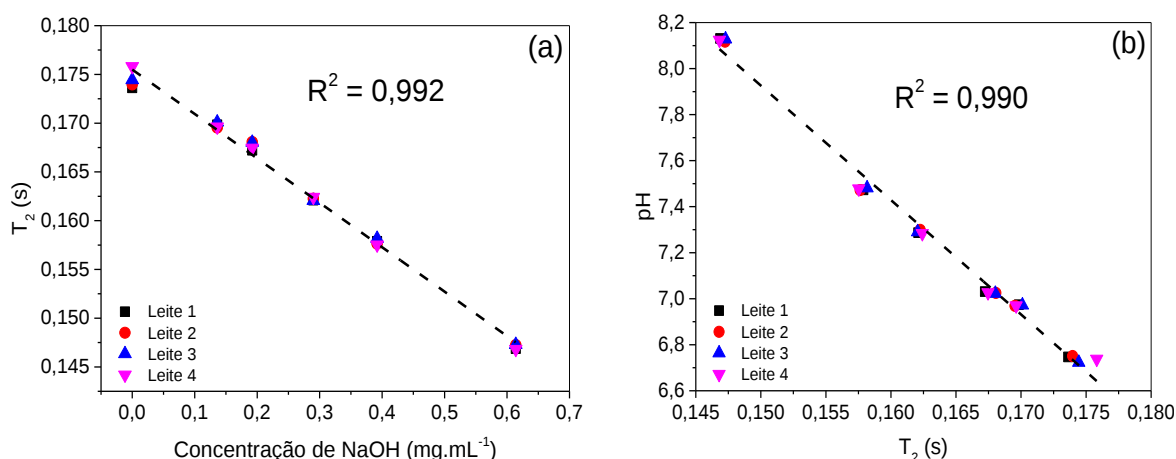


Figura 3-7. Curva de calibração da concentração do adulterante de 4 leites com hidróxido de sódio e seus respectivos valores de T_2 (a) e a correlação entre os valores de pH e T_2 das amostras adulteradas com NaOH (b)

As amostras de leite adulteradas com água, amido, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio também foram submetidas as análises de acordo com o Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, proposto pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a massa específica (ρ) recomendada do leite bovino deve ser entre $1,029$ e $1,033 \text{ g.mL}^{-1}$ que, quando obtida por um lactodensímetro, pode ser expressa entre 29 e 33 graus Quevenne, respectivamente. As quatro marcas de leite foram inicialmente analisadas pelo método e a massa específica obtida a 15°C variou entre 30 e 31 graus Quevenne, todos de acordo com a legislação. O mesmo procedimento foi feito para as amostras adulteradas e o resultado obtido foi expresso na Figura 3-8, onde pode ser observado que o método só foi capaz de detectar a adulteração com teores acima de 15 % (v/v), uma vez que as amostras com 10 % (v/v) ainda estavam muito próximas do limite inferior determinado pela EMBRAPA. Tais valores foram bem acima do limite

de detecção das análises de DT-RMN que foi capaz de detectar a adulteração com água em teores próximos a 3 % (v/v) (BRASIL, 2018a).

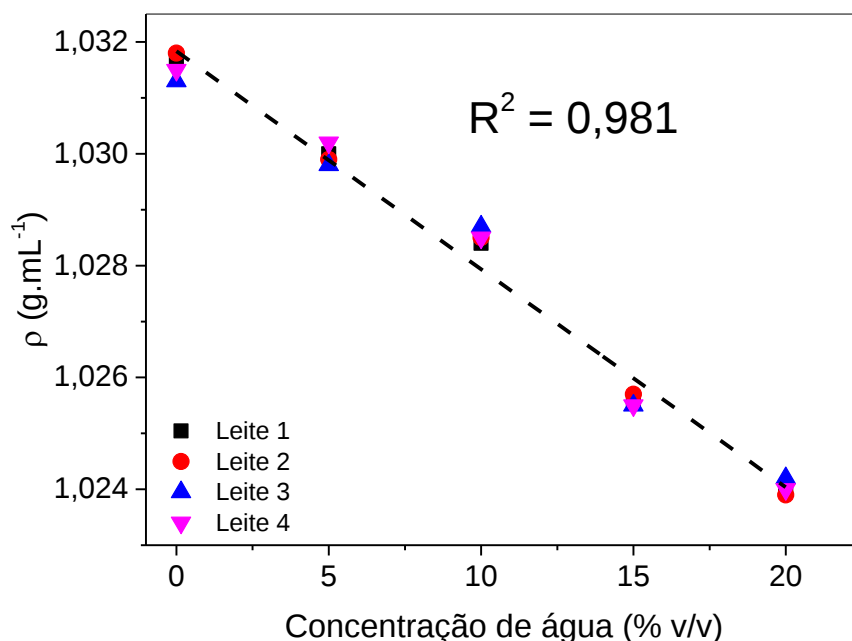


Figura 3-8. Correlação entre a concentração de água adicionada aos leites e a massa específica (ρ) das respectivas amostras

As amostras adulteradas com amido, foram analisadas pelo método “Amido – qualitativo” que consiste em um método colorimétrico, onde a amostra apresenta coloração azul quando adulterada. As amostras de leite foram analisadas pelo método e, como esperado, não houve alteração de cor na amostra, enquanto as amostras adulteradas só apresentaram leve mudança de cor quando adicionados teores acima de 10 % (v/v) de amido, conforme Apêndice A. Sendo importante ressaltar que a DT-RMN obteve teores de detecção em torno de 3 % (v/v) desse determinado tipo de adulterante. Já as adulterações com peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio foram analisadas pelo método “Detecção de peróxido de hidrogênio” e “Cloretos em leite fluido – qualitativo”, no entanto tais amostras não apresentaram mudanças de coloração de forma coerente, pois para ambos os testes as amostras apresentaram resultados positivos de formas aleatórias, sem qualquer relação com o teor de adulterante adicionado. Por exemplo, resultados positivos para amostras com 20 % (v/v) de adulterante e negativos para amostras com 50 % (v/v) de adulterante, conforme Apêndice A.

Por fim, as amostras adulteradas com hidróxido de sódio foram analisadas pelo método “Acidez em leite fluido” e os resultados foram expressos em g de ácido láctico/

100 mL de amostra. As amostras de leite foram submetidas ao método e apresentaram teores de acidez entre 0,143 e 0,15 g de ácido láctico/ 100 mL de amostra, em conformidade com a Instrução Normativa (IN) nº 76 de 26 de novembro de 2018, cuja acidez do leite UHT, assim como o pasteurizado, deve estar entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/ 100 mL de amostra (BRASIL, 2018a).

Já as amostras adulteradas também foram analisadas e representadas na Figura 3-9 e, assim como as análises de DT-RMN, foi possível identificar a adulteração de cerca de 0,1 mg.mL⁻¹ de NaOH na amostra. No entanto, quantificação se torna impossível para teores acima de 0,6 mg.mL⁻¹, pois ao adicionar a fenolftaleína, a amostra já apresenta a cor rosada, indicando a presença excessiva de NaOH. Apesar de apresentar bons resultados na detecção de NaOH no leite, o método é específico para este adulterante, ao contrário da DT-RMN, que apresenta a vantagem de identificar outros adulterantes no meio além do hidróxido de sódio.

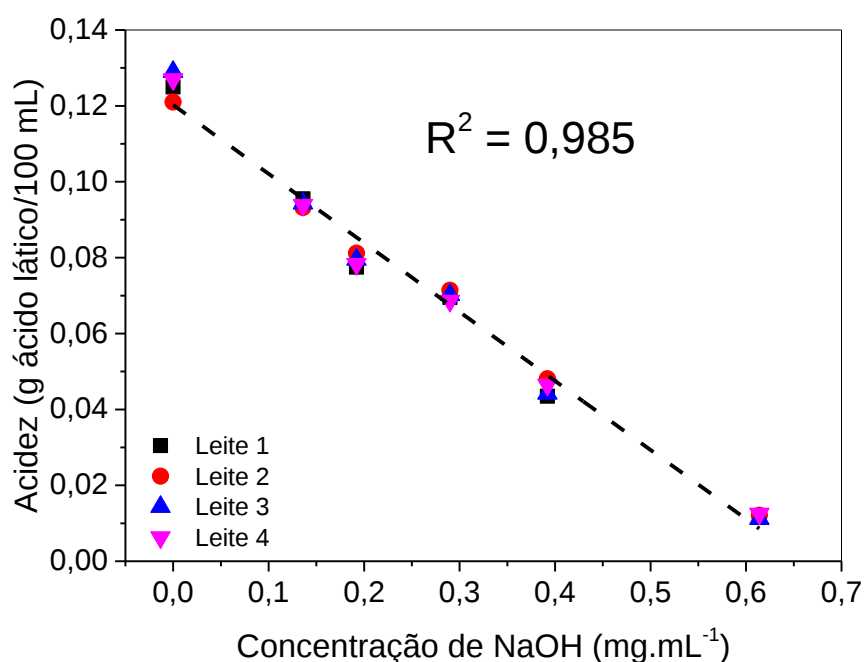


Figura 3-9. Correlação entre a concentração de NaOH e a acidez em g ácido láctico/100 mL obtida por meio do ensaio do MAPA “Acidez em leite fluido”

3.2.4. Conclusão

Neste estudo foi verificado o potencial da DT-RMN na detecção da adulteração de amostras comerciais de leite UHT com água, amido, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio em análises, principalmente por dispensar o mínimo preparo de amostra, possibilitando análises *in natura* do leite, em análises que

realizadas em cerca de 2 min. Os leites apresentaram valores de T_2 em torno de 1,7 s e, as excelentes correlações entre as concentrações dos adulterantes e seus respectivos valores de T_2 , mostram a capacidade da DT-RMN em detectar a adição de adulterantes no leite e quantificá-los em determinadas concentrações. As amostras adulteradas também foram analisadas por métodos definidos pelo Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, proposto pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e seus resultados foram comparados com os obtidos pela DT-RMN. Foi possível observar que a DT-RMN se mostrou mais eficiente na detecção que os métodos oficiais para as adulterações com água, amido, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio com LD e LQ em torno de 3 % (v/v) e 10 % v/v, respectivamente. Para as adulterações com hidróxido de sódio, a DT-RMN se mostrou tão eficiente quanto o método oficial “Acidez em leite fluido”, com LD e LQ de 3 % v/v e 9 % v/v. Por fim, para as adulterações de leite UHT com hidróxido de sódio, a DT-RMN se mostrou uma excelente alternativa à análise padrão visto que foi capaz de quantificar teores de adulterante com LD e LQ 0,06 e 0,19 mg.mL⁻¹. Portanto, em uma única análise rápida e não destrutiva, a DT-RMN é capaz de detectar a adulteração de leite com diversos adulterantes, dispensando o laborioso trabalho de realizar diversos experimentos para diferentes adulterações.

4. CONCLUSÃO GERAL

A Ressonância Magnética Nuclear tem se mostrado uma excelente alternativa no estudo de leite e derivados, principalmente por apresentar a possibilidade de fornecer simultaneamente informações qualitativas e quantitativas da amostra, por meio de análises rápidas, e dispensar um laborioso preparo de amostra, possibilitando análises *in natura* da amostra láctea. É importante ressaltar que o método de RMNq de ^1H proposto na quantificação de lactose, obteve resultados bastantes satisfatórios em sua validação demonstrados pelo valor de $R > 0,990$ e homocedasticidade dos resultados, bem como valores de precisão, exatidão e robustez menores que 5 %, além de valores de LD e LQ de $0,135 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,407 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Tais valores foram menores que a menor concentração da curva e bem menores que o exigido pela legislação na comercialização de leites UHT rotulados como “sem lactose” ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). Sendo assim, o método pode ser utilizado como alternativa na quantificação deste açúcar em leite e derivados como iogurte, coalhada e creme de leite UHT, em detrimento das outras técnicas já utilizadas atualmente com suas limitações citadas anteriormente, principalmente devido ao tempo de análise de apenas 36 min.

Já em relação aos estudos de adulteração, em uma única análise rápida (2 min) e não destrutiva, a DT-RMN foi capaz de detectar a adulteração de leite com diversos adulterantes como água, amido, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, dispensando o laborioso trabalho de realizar diversos experimentos para diferentes adulterações. As análises de DT-RMN para esses adulterantes apresentaram LD e LQ em torno de 3 % v/v e 10 % v/v, respectivamente e, para adulteração com NaOH foi possível detectar e quantificar teores em torno de $0,06$ e $0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$. Sendo assim, em uma única análise rápida e não destrutiva, a DT-RMN é capaz de detectar a adulteração de leite com diversos adulterantes, dispensando o laborioso trabalho de realizar diversos experimentos para diferentes adulterações. Portanto, este trabalho visou contribuir na consolidação da RMN no estudo de alimentos, principalmente de leite e derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERNOUTS, B.; POLSHIN, E.; SAEYS, W.. Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: Reflectance or transmittance?. *J. Dairy Sci*, **94**, 5315–5329, 2011.
- AIELLO, A. et al. A New Method to Distinguish the Milk Adulteration with Neutralizers by Detection of Lactic Acid. *Food Anal. Methods*, **12**, n. 11, p. 2555–2561, 2019.
- ANDERSON, W.; MCCONNELL, H. M. Analysis of High Resolution NMR Spectra. *J. Chem. Phys.*, **26**, n. 6, p. 1496–1504, 1957.
- ANDREOTTI, G. et al. Milk Identification of Different Species: ¹³C-NMR Spectroscopy of Triacylglycerols from Cows and Buffaloes Milks. *J. Dairy Sci.*, **83**, n. 11, p. 2432–2437, 2000.
- ARAKAWA, T.; AKABANE, J.; AKABANE, M. Lactose Intolerance with Normal Activity of Lactase. *TOHOKU J. Exp. Med.*, **83**, p. 365–374, 1964.
- ASSEISS NETO, H. et al. On the utilization of deep and ensemble learning to detect milk adulteration. *BioData Min.*, **12**, n. 1, p. 1–13, 2019.
- AUSTIN, S.; BÉNET, T. Quantitative determination of non-lactose milk oligosaccharides. Quantitative determination of non-lactose milk oligosaccharides. *Anal. Chim. Acta*, **1010**, p. 86–96, 2018.
- BECKER, E. D. A brief history of Nuclear Magnetic Resonance. *Anal. Chem.*, **65**, n. 6, p. 295–302, 1993.
- BELLOQUE, J.; RAMOS, M. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. *Trends in Food Science and Technology*, **10**, p. 313–320, 1999.
- BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC - Trends Anal. Chem*, **35**, p. 5-26, 2012.
- BONNEAU, N. et al. ¹H qNMR quantification of Annonaceous acetogenins in crude extracts of *Annona muricata* L. Fruit Pulp. *Phytochem. Anal.*, **28**, n. 4, p. 251-256, 2017.
- BOUTEILLE, R. et al. Monitoring lactic acid production during milk fermentation by in situ quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, **96**, n. 4, p. 2071–2080, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 135** de 8 de fevereiro de 2017. Brasília, 2017a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 166** de 24 de julho de 2017. Brasília, 2017b.

BRASIL. **Justiça condena acusados de adulterar leite presos na operação Ouro Branco**, 2012. Disponível em: <<http://www.pf.gov.br/agencia/noticias/2012/marco/justica-condena-acusados-de-adulterar-leite-presos-na-operacao-ouro-branco-1>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. **MET POA 09 02 - Pesquisa de densidade em leite fluido**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 20 dez. 2016d. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. **MET POA 12 01 - Pesquisa de amido em leite fluido e desidratado**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 20 dez. 2016a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. **MET POA 15 02- Determinação de Peróxido de hidrogênio em leite fluido**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 20 dez. 2016f. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. **MET POA 17 02 - Pesquisa de cloretos em leite fluido**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 20 dez. 2016b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. **MET POA 20 01 - Pesquisa de acidez em leite**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 20 dez. 2016c. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. **MET POA SLAV 06 03 - Determinação de Densidade a 15 °C em Leite Fluido**. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 20 dez. 2016e. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. 1. ed. Brasília: Secretaria da Defesa Agropecuária, 2018b.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA**. vol 4. Brasília, 2018c.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, 30 dez. 2011. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=6&data=30/12/2011>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, 27 nov. 2018a. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26de-novembro-de-2018-52749894IN%2076> Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Diário Oficial da União**, 24 out. 2007. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-46-de-23de-outubro-de-2007-52749894IN%2046> Acesso em: 22 fev. 2020.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, 13 dez. 2006.

BROSIO, E. et al. A pulsed low resolution NMR study of water binding to powdered milk. *J. Food Technol.*, **18**, p. 219–226, 1983.

CAPANEMA, E. A.; BALAKSHIN, M. Y.; KADLA, J. F. A Comprehensive Approach for Quantitative Lignin Characterization by NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, n. 7, p. 1850–1860, 2004.

CASSOLI, Laerte D. et al. An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *Int. Dairy J.*, **64**, n. 4, p. 480–485, 2011.

CASTELL-PALOU, A. et al Simultaneous Quantification of Fat and Water Content in Cheese by TD-NMR. *Food and Biop Tech*, **6**, n. 10, p. 2685–2694, 2013.

CASTELL-PALOU, A. et al. Moisture profiles in cheese drying determined by TD-NMR: Mathematical modeling of mass transfer. *J. Food Eng.*, **104**, n. 4, p. 525–531, 2011.

CATCHPOLE, O. J. et al. Extraction of chili, black pepper, and ginger with near-critical CO₂, propane, and dimethyl ether: analysis of the extracts by quantitative nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem*, **51**, n. 17, p. 4853–4860, 2003.

CERCEAU, C. I. et al. A validated ¹H NMR method for quantitative analysis of α-bisabolol in essential oils of *Eremanthus erythropappus*. *Talanta*, **161**, p. 71–79, 2016.

CHARLTON, A. J.; FARRINGTON, W. H.; BRERETON, P. Application of ¹H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity

of instant coffee. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, n. 11, p. 3098-3103, 2002.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Analysis of mono and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chromatogr. A*, **1043**, n. 2, p. 211–215, 2004.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2. Ed. Oxford: Elsevier, 2009.

CRUZ, Adriano Gomes da et al. **Processamento de leites de consumo**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 255 p.

DAHLQVIST, A. et al. Intestinal lactase deficiency and lactose intolerance in adults - preliminary report.pdf. *Gastroenterology*, **45**, p. 488–491, 1963.

DAHLQVIST, A.; MATTIASSON, B.; MOSBACH, K. Hydrolysis of β -galactosides using polymer-entrapped lactase. A study towards producing lactose-free milk. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, n. 2, p. 395–402, 1973.

DAVIS, A.; BOLIN, T. Lactose Intolerance in Asians. *Nature*, **216**, n. 5121, p. 1244–1245, 1967.

EADS, T. M.; BRYANT, R. G. High-Resolution Proton NMR Spectroscopy of Milk , Orange Juice , and Apple Juice with Efficient Suppression of the Water Peak. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, p. 834–837, 1986.

EBERHART, S. T.; HATZIS, A.; ROTHCHILD, R. Quantitative NMR assay for aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures with 1,3,5-trioxane as internal standard. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **4**, n. 2, p. 147–154, 1986.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **O mercado de leite em 2017**: Circular Técnica 118. Juiz de Fora, 2018.

ERICH, S. et al..Combined chemometric analysis of (1)H NMR, (13)C NMR and stable isotope data to differentiate organic and conventional milk. *Food Chem.*, **188**, 1–7, 2015.

ERICH, S.; ANZMANN, T.; FISCHER, L. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. *Food Chem*, **135**, n. 4, p. 2393–2396, 2012.

EUBER, J. R.; BRUNNER, J. R. Determination of Lactose in Milk Products by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Dairy Sci.*, **62**, n. 5, p. 685–690, 1979.

FAO. **Milk and dairy products in human nutrition**: Nutrition and Biochemistry of Milk/maintenance. Rome: ONU, 2013.

FAO/WHO Codex Alimentarius. **Milk and milk products**. 2 ed. Rome: Secretariat of the Codex Alimentarius Commission. 2011.

FAO/WHO Codex Alimentarius. **Report of the 39th session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling**. 1 ed. Rome: ONU. 2018.

FONTANA, A. et al. High-Resolution NMR Detection of Cholesterol Spray-Dried Egg Yolk. *J. Food Sci.*, **57**, n. 4, p. 869, 1992.

FRANKEL, E. N. Chemistry of extra virgin olive oil: Adulteration, oxidative stability, and antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, n. 10, p. 5991–6006, 2010.

FUSCH, G. et al. Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **879**, n. 31, p. 3759–3762, 2011.

G1. **Nova fase de operação contra fraude no leite cumpre mandados no RS**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2015/05/operacao-leite-compensado-cumpre-9-mandados-de-prisao-no-norte-do-rs.html>> Acesso em: 22 fev. 2020.

GARBALLO-RUBIO, A. et al. Determination of residual lactose in lactose-free cow milk by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to tandem mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.*, **66**, n. August 2017, p. 39–45, 2018.

GARCÍA-CAÑAS, V. et al. Present and future challenges in food analysis: Foodomics. *Anal. Chem.*, **84**, 10150–10159, 2012.

GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. 2a Ed. Lisboa: Fundação Calouste, 2002.

GILLE, D. et al. Detection of lactose in products with low lactose content. *Int. Dairy J.*, **83**, p. 17–19, 2018.

GÖDECKE, T. et al. Validation of a generic quantitative ^1H NMR method for natural products analysis. *Phytochem. Anal.*, **24**, n. 6, p. 581-597, 2013.

GONDIM, Carina de Souza et al. Detection of several common adulterants in raw milk by MID-infrared spectroscopy and one-class and multi-class multivariate strategies. *Food Chem.*, **230**, p. 68–75, 2017 .

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, A.. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends Anal. Chem*, **26**, 3, p. 227-238, 2007.

HERBER, W. K.; ROBINETT, R. S. R. Determination of carbon sources in fermentation media using high-performance anion-Exchange Liquid Chromatography and Pulsed Amperometric Detection. *J. Chromatogr. A*, **676**, p. 287–295, 1994.

- HESTER, R. E.; QUINE, D. E. C. Quantitative Analysis of Food Products by Pulsed N.M.R. Rapid Determination of Oil and Water in Flour and Feedstuffs. *J. Sci. Food Agric.*, **28**, p. 624–630, 1977.
- HOHMANN, M. et al. Quantitative ^1H NMR analysis of egg yolk, alcohol, and total sugar content in egg liqueurs. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, n. 16, p. 4112–4119, 2015.
- HOLLIS, D. P. Quantitative Analysis of Aspirin, Phenacetin, and Caffeine Mixtures by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chem.*, **35**, n. 11, p. 1682–1684, 1963.
- HOLZEL, A.; MEREU, T.; THOMSON, M.. Severe lactose intolerance in infancy. *The Lancet*, **2**, p. 1346–1348, 1962.
- HU, F. et al. Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, n. 11, p. 4307–4311, 2007.
- HU, F.; FURIHATA, K.; KATO, Y.; TANOKURA, M.. Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, n. 11, p. 4307–4311, 2007.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE**: Estatística da Produção Pecuária. 4 trim. Rio de Janeiro, 2019.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020.
- IVANOVA, A, S. et al. Method for determination of hydrogen peroxide in adulterated milk using high performance liquid chromatography. *Food Chem.*, **283**, p. 431–436, 2019.
- JEON, I. J.; GALITZER, S. J.; HENNESSY, K. J. Rapid Determination of Lactose and Its Hydrolyzates in Whey and Whey Permeate by High Performance Liquid Chromatography. *J. Dairy Sci.*, **67**, n. 4, p. 884–887, 1984.
- JUNGNICKEL, J. L.; FORBES, J. W. Quantitative Measurement of Hydrogen Types by Integrated Nuclear Magnetic Resonance Intensities. *Anal. Chem.*, **35**, n. 8, p. 938–942, 1963.
- KEELER, J. **Understanding NMR Spectroscopy**. 1 ed. Cambridge: Wiley, 2002.
- KERN, F. et al. Lactose Intolerance as Cause of Steatorrhea in an Adult. *Gastroenterology*, **44**, n. 6, p. 836–840, 1963.
- KRACMAROVÁ, M.; STIBOROVÁ, H.; HORÁCKOVÁ, Š.; DEMNEROVÁ, K.. Rapid

- detection of microbial contamination in UHT milk: Practical application in dairy industry. *Czech J. Food Sci.*, **36**, 357–364, 2018.
- KWAKYE, J. K. Use of NMR for quantitative analysis of pharmaceuticals. *Talanta*, **32**, n. 11, p. 1069–1071, 1985.
- LACHENMEIER, D. W. et al. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. *Eur. Food Res. Technol.*, **220**, n. 2, p. 215–221, 2005.
- LAMANNA, R. et al. A preliminary study of soft cheese degradation in different packaging conditions by ^1H -NMR. *Magn. Reson. Chem.*, **46**, n. 9, p. 828–831, 2008.
- LAMANNA, R. et al. Identification of milk mixtures by ^1H NMR profiling. *Magn. Reson. Chem.*, **49**, p. S22–S26, 2011.
- LAMBELET, P.; BERROCAL, R.; RENEVEY, F. Low-field nuclear magnetic resonance relaxation study of thermal effects on milk proteins. *J. Dairy Res.*, **59**, n. 4, p. 517–526, 1992.
- LEUNG, H. K.; STEINBERG, M. P. Water binding of food constituents as, determined freezing, sorption and dehydration by NMR, materials & methods *J. Food Sci.*, **44**, n. 1212–1220, 1979.
- LEVITT, M. H. **Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance**. 2^a Ed. Southampton: John Wiley & Sons, 2008. 713 p.
- LI, X.; HU, K. Quantitative NMR Studies of Multiple Compound Mixtures. *Annu. Reports NMR Spectrosc.*, **90**, p. 85–143, 2017.
- LIU, F. et al.. Detection of melamine in liquid milk using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, **41**, n. 12, 1655–1660, 2010.
- LIU, S. Y.; HU, C. Q. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods. *Anal. Chim. Acta*, **602**, n. 1, p. 114–121, 2007.
- LÓPEZ-RITUERTO, E.; CABREDO, S.; LÓPEZ, M.; AVENOZA, A.; BUSTO, J. H.; PEREGRINA, J. M. A Thorough Study on the Use of Quantitative ^1H NMR in Rioja Red Wine Fermentation Processes. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, n. 6, p. 2112–2118, 2009.
- LOU, T. et al. Rapid detection of melamine with 4-mercaptopyridine-modified gold nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 333–338, 2011.
- LU, Y. et al. Complex mixture analysis of organic compounds in yogurt by NMR spectroscopy. *Metabolites*, **6**, n. 2, p. 18–29, 2016.

- LU, Y. et al. Real-Time Monitoring of Chemical Changes in Three Kinds of Fermented Milk Products during Fermentation Using Quantitative Difference Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, n. 6, p. 1479–1487, 2018.
- MACOMBER, R.S. **A complete introduction to modern NMR spectroscopy**. New York: Wiley-Interscience, 1998. 6-20p.
- MACOMBER, R.S. **A complete introduction to modern NMR spectroscopy**. New York: Wiley-Interscience, p.6-20, 1998.
- MAGALHÃES, M. N.; LIMA, A. C. P.. **Noções de Probabilidade e Estatística**, 3 ed, São Paulo: Editora USP, 2011.
- MARAN ULTRA PULSE PROGRAMMING AND PULSE SEQUENCE USER MANUAL. Abingdon, 2006. 76 p.
- MARTINEZ-FEREZ, A. et al. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.*, **16**, n. 2, p. 173–181, 2006.
- MCGILLIVRAY, W.. Lactose Intolerance. *Nature*, **219**, p. 615–616, 1968.
- MCGORRIN, R. J. One Hundred Years of Progress in Food Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 8076–8088, 2009.
- MERKX, D. W. H. et al. Quantification of food polysaccharide mixtures by ¹H NMR. *Carbohydr. Polym.*, **179**, p. 379–385, 2017.
- MONAKHOVA, Y. B. et al. NMR spectroscopy as a screening tool to validate nutrition labeling of milk, lactose-free milk, and milk substitutes based on soy and grains. *Dairy Sci. Technol.*, **92**, n. 2, p. 109–120, 2012.
- MONAKHOVA, Y. B. et al. Validation studies for multicomponent quantitative NMR analysis: the example of apple fruit juice. *Accredit. Qual. Assur.*, **19**, n. 1, p. 17–29, 2014.
- MONTI, L. et al. Lactose, galactose and glucose determination in naturally “lactose free” hard cheese: HPAEC-PAD method validation. *Food Chem.*, **220**, p. 18–24, 2017.
- MPRS. **Leite compen\$ado 11 e queijo compen\$ado 4 cumprem prisões pela produção e venda de produtos impróprios ao consumo**. Disponível em: <<https://www.mprs.mp.br/noticias/41910/>>. Acesso em: 22 fev. 2020.
- NASCIMENTO, Carina F. et al. Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chem.*, **221**, p. 1232–1244, 2017a.
- NASCIMENTO, P.A.M. et al.. Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) and Chemometrics for Determination of Fat Content in Commercial Products of Milk

- Powder. *J. AOAC Int.* **100**, 330–334, 2017b.
- NAZARI, F. et al. Multivariate optimisation of microwave-assisted extraction of capsaicin from *Capsicum frutescens* L. and quantitative analysis by ^1H -NMR. *Phytochem. Anal.*, **18**, n. 4, p. 333–340, 2007.
- NERO, L. A.; CRUZ, A. G.; BERSOT, L. S. **Produção, processamento e fiscalização de leite e derivados**. São Paulo: Atheneu, 2017.
- NOVELLINO, E.; RITIENI, A.; RASTRELLI, L. Recent trends and advances in food chemistry and analysis: Research highlights from the IX Italian congress of food chemistry. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 1599–1603, 2013.
- O'NEILL, I. .; PRINGUER, M. A. Quantitative ^{13}C NMR Analysis of Mixtures of 2,4-Di-isocyanatotoluene and 2,6-Di-isocyanatotoluene. *Org. Magn. Reson.*, **6**, p. 398–399, 1974.
- ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- PAVIA, D. L., LAMPMAM, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª Ed. Washington: Cengage Learning, 2010.
- PERATI, P. ; BORBA, B. D. ; ROHRER, J. Determination of Lactose in Lactose-Free Milk Products by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Thermo Fish. Sci.*, **248**, 1–8, 2016.
- PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; TORRO, L. Enzymic Flow Injection Determination of Lactose in Milk with On-line Dialysis. *Analyst*, **118**, n. July, p. 855–858, 1993.
- RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha De Validação: Uma Nova Ferramenta Para Estimar Figuras De Mérito Na Validação De Métodos Analíticos Univariados. *Quim. Nova*, **31**, n.1, p. 164–171, 2008.
- RIBEIRO, R. O. R. et al. Classification of Brazilian honeys by physical and chemical analytical methods and low field nuclear magnetic resonance (LF ^1H NMR). *LWT - Food Sci. Technol.*, **55**, n. 1, p. 90–95, 2014.
- ROCHA, W. W. F. et al. Quantification of cocaine and its adulterants by nuclear magnetic resonance spectroscopy without deuterated solvents (No-D qNMR). *Anal. Methods*, **10**, n. 15, p. 1665–1790, 2018.
- RODRÍGUEZ, O. et al. Validation of a diffusion model using moisture profiles measured by means of TD-NMR in apples (*Malus domestica*). *Food Bioprocess*

Technol., **6**, n. 2, p. 542–552, 2013.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **2**, n. 1, p. 467–483, 2011.

ROUGE, P. et al. Identification of quinoline, carboline and glycinamide compounds in cow milk using HRMS and NMR. *Food Chem.*, **141**, 1888–1894, 2013.

SACCHI, R. et al. Assessment of milk fat content in fat blends by ^{13}C NMR spectroscopy analysis of butyrate. *Food Control*, **91**, p. 231–236, 2018.

SAMMÁN, N. C. et al. Validation of a sampling plan to generate food composition data. *Food Chem.*, **193**, 141–147, 2016.

SÁNCHEZ-ALONSO, I. et al. Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius*, L.) by low field NMR. *Food Chem*, **135**, n. 3, p. 1626–1634, 2012.

SANTOS, M. S., COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas. *Quím. Nova*, **36**, 324–330, 2013.

SANTOS, M.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas. *Quim. Nova*, **36**, n. 2, p. 324–330, 2013.

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

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Application of hand-held and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, n. 6, p. 1205–1211, 2013b.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chem*, **138**, n. 1, p. 19–24, 2013a.

SHUMILINA, E. et al. Quality changes of salmon by-products during storage: Assessment and quantification by NMR. *Food Chem.*, **211**, p. 803–811, 2016.

SILVA, A. J. F.. O I congresso internacional para a repressão das fraudes dos productos alimentares e pharmaceuticos. *Rev. de Chim. Pura e Ap.*, **4**, série I, n 9-10, p. 269–278, 1908.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: LTC , 2006.

SIMMLER, C. et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples.

Curr. Opin. Biotechnol., **25**, p. 51-59, 2014.

SKÁLA, I.; LAMACOVÁ, V.; PIRK, F. Lactose-free milk as a solution of problems associated with dietetic treatment of lactose intolerance. *Digestion*, **4**, p. 326–332, 1971.

SOYEURT, H.; MISZTAL, I.; GENGLER, N. Genetic variability of milk components based on mid-infrared spectral data. *J. Dairy Sci*, **93**, 1722–1728, 2010.

SUGIMOTO, N. et al. Absolute quantification for benzoic acid in processed foods using quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, **99**, p. 342–348, 2012.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G.. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. *Quím. Nova*, **29**, n. 5, p. 911-915, 2006.

TRANI, A. et al. Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. *Food Chem.*, **233**, p. 385–390, 2017.

TURCZAN, J. W.; MEDWICK, T. Qualitative and quantitative analysis of amygdalin using NMR spectroscopy. *Anal. Letters*, **10**, n. 7–8, p. 581–590, 1977.

USA. United States Department of Agriculture: Foreign Agricultural Service. **Dairy: World Markets and Trade**, dez. 2018. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2020.

VALAND, Reema et al. A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, **37**, n. 1, p. 19–38, 2020.

VAN SCHEPPINGEN, W. B. et al. Selective and sensitive determination of lactose in low-lactose dairy products with HPAEC-PAD. *J. Chromatogr. B*, **1060**, n. 3, p. 395–399, 2017.

VIEIRA, S. **Análise de variância: ANOVA**, São Paulo: Atlas, 2006.

WACHTER, H. et al. Quantitative ¹H NMR Analysis of Egg Yolk, Alcohol, and Total Sugar Content in Egg Liqueurs. *J. Agric. Food Chem*, **63**, n.16, p. 4112–4119, 2015.

WEINBERG, I.; ZIMMERMAN, J. R. Concentration Dependence of Chemical Exchange and NMR Multiplet Structure in Water Ethanol Mixtures. *J. Chem. Phys.*, **23**, n. 4, p. 748–749, 1955.

XINMIN, W. et al. Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography. *J. Food Compos. Anal.*, **21**, n. 3, p. 255–258, 2008.

YAO, Y. et al. Milk fat globules by confocal Raman microscopy: Differences in human, bovine and caprine milk. *Food Res. Int.*, **80**, 61–69, 2016.

APÊNDICE A



Figure 0-1. Adulteração com hipoclorito de sódio.

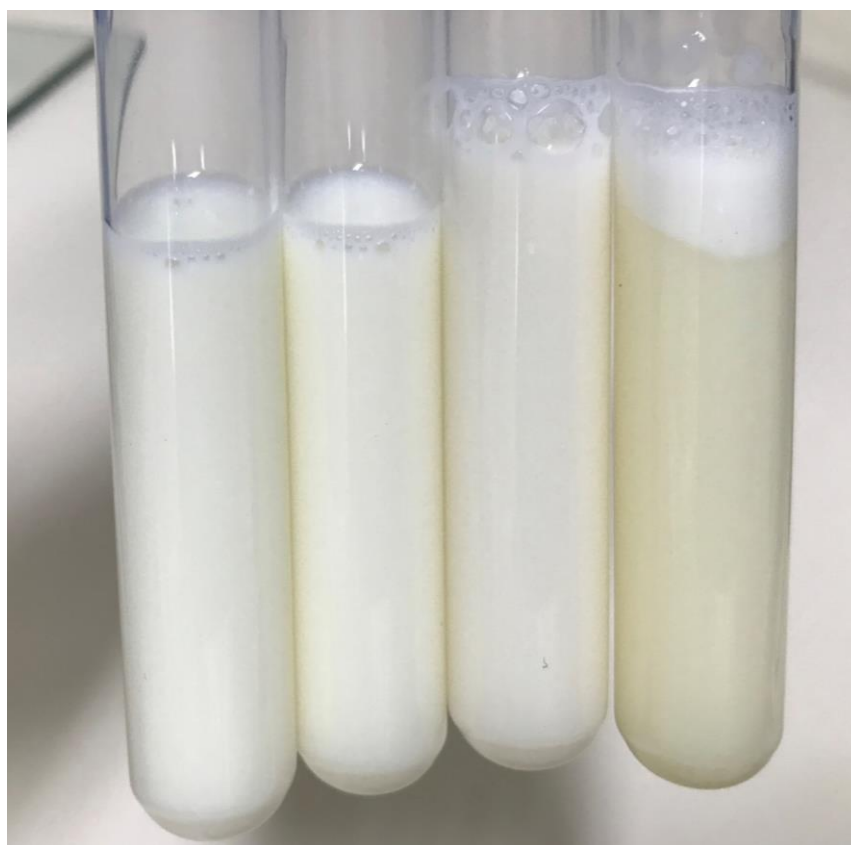


Figure 0-2. Adulteração com peróxido de hidrogênio.

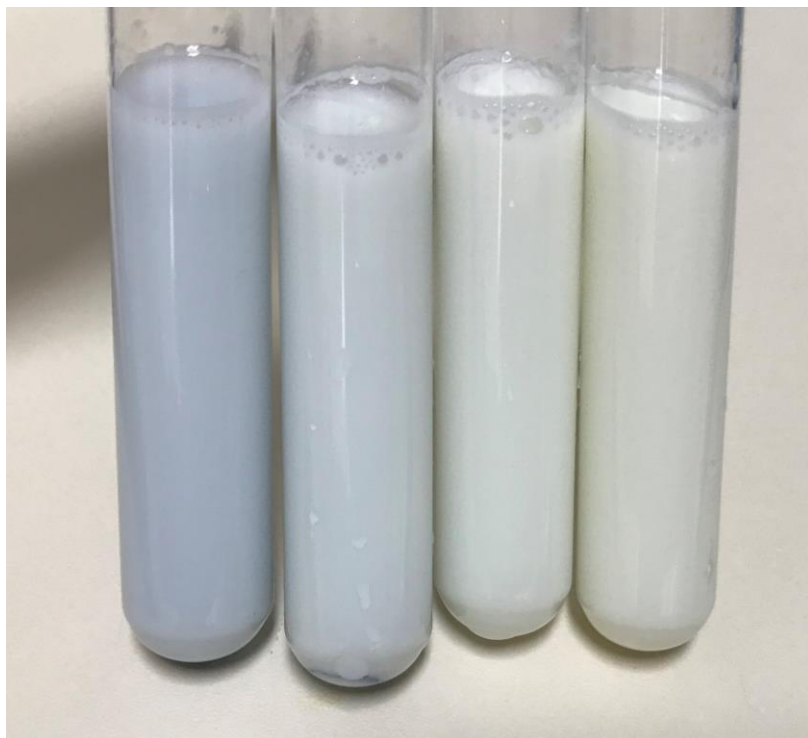


Figure 0-3. Adulteração com amido.