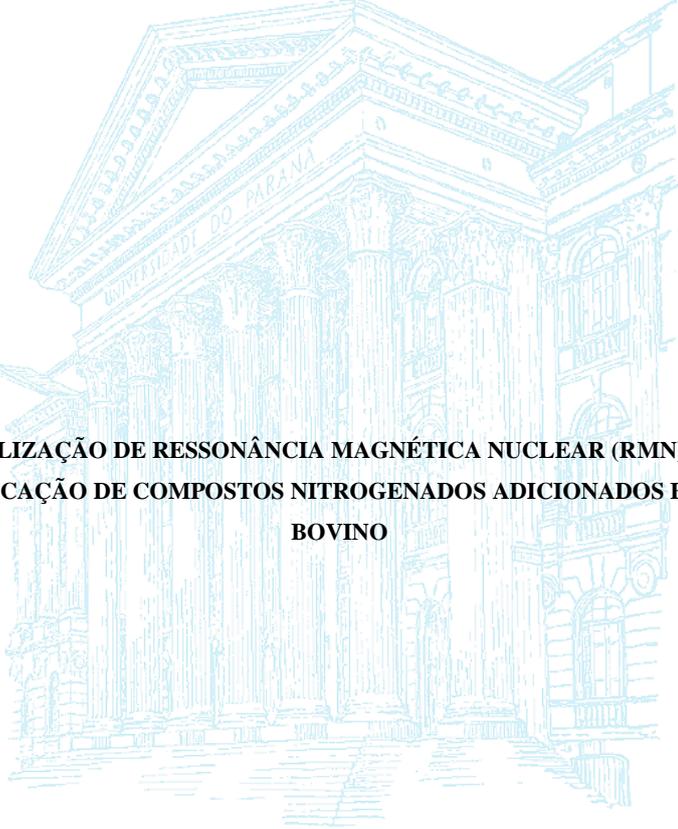


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA THIEMI ASANO NASCIMENTO



**UTILIZAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) NA
IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS ADICIONADOS EM LEITE
BOVINO**

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA THIEMI ASANO NASCIMENTO

**UTILIZAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) NA
IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS ADICIONADOS EM LEITE
BOVINO**

Trabalho de Conclusão apresentado para
avaliação da disciplina TCC II do curso de
graduação em Biomedicina, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Guilherme Lanzi Sasaki

CURITIBA

2016

RESUMO

O leite bovino é amplamente consumido e comercializado em todo o mundo, e por isso, é alvo de adulterações alimentares que tem por objetivo aumentar o lucro sobre sua produção. Dentre as mais comuns está a adição de água e compostos nitrogenados, como a Melamina, Uréia e Sulfato de Amônio, com o intuito de aumentar o volume de leite produzido sem diminuir o teor aparente de proteínas. Esse tipo de adulteração ocorre pela limitação do método Kjeldahl, regulamentado para a análise de teor proteico, de diferenciar nitrogênios proteicos de não proteicos, quantificando apenas o nitrogênio total presente na amostra. O intuito deste trabalho foi utilizar a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, na identificação destes compostos em leite UHT. Foram realizadas adulterações em leite ajustado para pH 2, nas concentrações 0,05%, 0,1%, 0,3%, e 0,8%, gerando um total de 16 amostras. Os espectros ^1H -RMN foram obtidos através do aparelho BRUKER, modelo AVANCE III 600 MHz, a -10°C (263K). Os resultados obtidos demonstraram a eficácia do método desenvolvido como ferramenta na identificação e quantificação dos 3 analitos, sendo capaz de discriminar e identificar seus picos característicos de maneira rápida e eficaz.

ABSTRACT

The bovine milk consumption is widely spread all over the world, what makes it a target for frauds that aims to increase the gain above its production. Among the most common frauds, is the addition of water and nitrogen compounds, like Melamine, Urea and Ammonium Sulphate, in order to increase the production volume without decrease the apparent protein content. This kind of adulterations occurs by the limitation of the Kjeldahl method, which is the regulated method for the analysis of protein content, in distinguish protein nitrogen of non-protein nitrogen, quantifying only the total amount. The aim of this paper was to use the Nuclear Magnetic Resonance to identify this compounds in UHT bovine milk samples. 4 sample concentration (0,05%, 0,1%, 0,3%,0,8%) of which adulterant were prepared, using a pH 2 precipitated milk, in a total of 16 samples. The ^1H -NMR spectra were obtained from a NMR BRUKER, AVANCEE II 600MHz, in -10°C (263K) The presented results show the efficiency of the developed method as a tool for identification and quantification of the 3 adulterants, being capable of identify and discriminate their characteristics peaks in a fast and efficiency way.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.1. Leite.....	6
1.2. O Leite no Brasil e no Mundo.....	7
1.3. Qualidade do Leite.....	9
1.4. Fraudes Alimentares.....	10
1.4.1. Tipos de fraudes.....	10
1.5. Fraudes no Leite.....	12
1.5.1. Melamina.....	13
1.5.2. Uréia e Sulfato de Amônio.....	14
1.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	15
1.6.1. Princípio de Funcionamento.....	15
1.6.2. Utilização de RMN na Análise de Alimentos.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Leite integral.....	22
5.2. Leite precipitado.....	23 22
5.2.1 Leite precipitado adulterado.....	24
5.3 Integrais dos picos.....	29 28
6. CONCLUSÃO.....	33 30
7. REFERÊNCIAS.....	34 31

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Leite

O leite, segundo a Instrução Normativa nº51 de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é o produto da ordenha ininterrupta e completa de vacas leiteiras saudáveis, em repouso, bem alimentadas e em condições de higiene adequadas. (BRASIL, 2002)

O leite bovino tem como seus principais componentes água (87,30%), lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%) e minerais (0,72%). As partículas suspensas na fase líquida do leite são gotículas de gordura e micelas de caseína (SGARBIERI, 2004). O leite produzido pelo animal pode variar quanto ao volume e quanto aos seus diversos componentes e as variações dependem de fatores como animal, raça, intervalo entre as ordenhas, períodos de lactação, influência das estações, doenças, temperatura, idade do animal, condições climáticas, entre outros. (JÚNIOR, 2008).

Em virtude da sua complexa composição, o leite é uma matéria prima de alta versatilidade tecnológica, onde seus constituintes, em conjunto ou isoladamente, proporcionam a obtenção de uma gama imensa de derivados. (FUKUDA, 2003). Em circulação no mercado brasileiro, existe uma grande variedade de leites fluidos. Leites pasteurizados de diversos tipos, esterilizados, ultrapasteurizados, com baixo teor de lactose, com adição de vitaminas e sais minerais, com substituição da gordura animal por vegetal, que diferem entre si em relação aos aspectos higiênicos-sanitários da produção, e aos aspectos tecnológicos do beneficiamento. (OLIVEIRA, 2009). Entende-se por beneficiamento do leite, seu tratamento tecnológico desde o recebimento, a seleção até o acondicionamento final, compreendendo processos de seleção, filtração, pré-resfriamento, pré-aquecimento, pasteurização, refrigeração, envase, acondicionamento e outras práticas tecnicamente aceitáveis de transformação. (RIO GRANDE DO SUL, 2000)

Hoje, o leite fluido mais comercializado no Brasil é o leite UHT. UHT (do inglês, *ultra high temperature*), é um processo pelo qual o leite homogeneizado é submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, e imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C. Após esse processo, é envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. (BRASIL, 1997)

No Brasil, a produção de leite UHT em escala comercial se iniciou em 1972, no Rio de Janeiro, com um volume aproximado de um milhão de litros. Porém, apenas nos anos 90 é que

o crescimento se tornou significativo no mercado nacional de leite fluido. Entre 1990 e 1997, a produção passou de 184 milhões de litros para 2,450 bilhões, representando um aumento percentual de 1.231,5% (MARTINS, et al, 2004). No ano de 2008, o leite UHT correspondia a 75% do total de leite fluido formal consumido no país, totalizando 5,3 bilhões de litros comercializados. (ABLV, 2009)

Diversos fatores podem explicar o crescimento do leite UHT no mercado brasileiro. No âmbito industrial, os menores custos logísticos, como distribuição e comercialização do produto final, e a maior facilidade de estocagem, em função de sua embalagem em caixa de material semi-rígido estão entre os principais deles. Além disso, o leite UHT possui uma maior facilidade de estocagem, já que esta pode ser feita à temperatura ambiente, podendo ser armazenado por até 4 meses enquanto fechado. Isso acaba sendo atrativo aos consumidores, que podem incluir o leite UHT em sua compra mensal, diferente do leite pasteurizado, que precisa ser adquirido diariamente já que possui um prazo de validade muito menor. (MAGALHÃES, 2008).

Além de sua importância econômica, o leite, sob o aspecto nutricional, é considerado um dos alimentos mais equilibrados e completos. É consumido em todas as partes do mundo, tanto na sua forma líquida como na forma de seus mais diversos derivados, proporcionando o atendimento de grande parte de nossas necessidades diárias (MAGALHÃES, 2008).

1.2. O Leite no Brasil e no Mundo

Segundo dados de 2010 da EMBRAPA, os países que ocupam os 6 primeiros lugares no ranking de produção leiteira são Estados Unidos, Índia, China, Rússia, Alemanha e Brasil, sendo responsáveis por 56% da produção de todo o leite produzido no mundo. A China se destaca como o país que mais cresceu na última década, registrando um aumento de 3.152% na produção leiteira, o que significou um incremento de 27,3 milhões de toneladas entre os anos 2000 e 2008. (SIQUEIRA et.al, 2010)

O Brasil vem continuamente ampliando sua produção. Em 2008, o País produziu 27,5 bilhões de litros de leite, gerando uma renda de R\$ 17 bilhões, o que corresponde a 10% do valor gerado pela agropecuária brasileira e 76% do valor gerado pela pecuária (IBGE, 2010). Considerando o valor da produção, o leite ocupa o 4º lugar entre as commodities agropecuárias produzidas no Brasil, perdendo apenas para soja, cana-de-açúcar e milho. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção leiteira no Brasil, em 2012, foi 49,2% maior do que em 2002, como consta na tabela 1. (IBGE, 2013)

Tabela 1. Produção de leite no Brasil entre os anos 2002 e 2013.

Ano	Produção (em 1000 litros)
2002	21.642.780
2003	22.253.863
2004	23.474.694
2005	24.620.869
2006	25.398.219
2007	26.137.266
2008	27.585.346
2009	29.085.495
2010	30.715.460
2011	32.096.214
2012	32.304.421
2013	34.255.000

Fonte: IBGE, 2013

Internamente, as regiões que mais se destacam na produção leiteira são o Sul e o Sudeste (Tabela 2). Nos últimos anos, o Sul do Brasil cresceu tanto em volume de leite produzido quanto em relevância, apresentando uma expansão de 68,6% entre os anos 2000 e 2008. (EMBRAPA, 2008). Isso fez com a diferença em relação a região Sudeste diminuísse para apenas 2,7%, o fazendo ocupar uma importante posição no cenário nacional do leite (IBGE, 2012). Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais se mantém em primeiro lugar no ranking de produção, seguido por Rio Grande do Sul, Goiás, Paraná, Santa Catarina e São Paulo (IBGE, 2012)

Tabela 2: Produção de leite no Brasil/regiões brasileiras em milhões de litros nos anos de 2012 e 2013

	Produção	Participação na produção	
		2012	2013
Norte	1658.315	5,1	5,4
Nordeste	3.501.316	10,8	10,5
Centro – Oeste	4.4818.006	14,9	14,6
Sul	10.735.645	33,2	34,4
Sudeste	11.591.140	35,9	35,1
Brasil	32.304.421	-	-

Fonte: IBGE, 2013

A cadeia produtiva do leite, tida como a mais complexa dentro do Agronegócio, brasileiro, vem sofrendo mudanças significativas nos últimos anos. Já apresenta um dos maiores rebanhos do mundo, tendo grande potencial de abastecimento de leite nos mercados interno e externo. Além disso, representa um papel importante na geração de emprego e renda para população, bem como relevância no suprimento de alimentos. As mudanças vêm acontecendo na geografia de produção primária, nas indústrias laticinistas e no destino dos produtos lácteos. (IBGE, 2013)

1.3. Qualidade do Leite

Todo o leite comercializado formalmente no país passa por um rigoroso processo de controle de qualidade, sendo uma constante preocupação de órgãos de autoridade e técnicos ligados à área da saúde e laticínios. Devido à importância que representam na alimentação humana, o leite e seus derivados estão entre os alimentos mais testados e avaliados no mundo. Os testes utilizados na qualidade do leite fluido constituem normas regulamentares em todos os países, havendo apenas pequenas diferenças referentes a parâmetros/testes utilizados. (BRASIL, 1999)

A qualidade do leite é definida por diversos parâmetros, que em conjunto, demonstram a boa procedência do material analisado. São realizadas análises quanto sua composição química, como teores de proteína, gordura, carboidratos, lactose, sais minerais e vitaminas. Quanto a integridade, onde é analisado se o leite em questão sofreu adição e/ou remoção de algum de seus componentes. Quanto às características sensoriais, como odor, sabor e aspecto. Quanto a parâmetros microbiológicos, como ausência/presença de patógenos. (DURR, 2004).

Em 1952, o regulamento de Inspeção Industrial foi publicado e estabeleceu os parâmetros de qualidade para produtos de origem animal. Em 2002, por meio da Instrução Normativa 37 instituiu-se a Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite (RBQL), com o objetivo de realizar e regulamentar as análises laboratoriais. Em setembro de 2002, por meio da publicação da Instrução Normativa nº51 (IN 51) (BRASIL, 2002), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) definiu novos parâmetros de qualidade e estabeleceu critérios de avaliação. Em dezembro de 2011, foi criada uma nova Instrução Normativa 62/2011 (IN 62/2011), que preconiza alguns testes para estabelecer os padrões de qualidade. Contagem de células somáticas (CCS), Contagem total de bactérias (CTB), composição química e caracterização física do leite, como a estabilidade térmica. Estabelece

também que o leite cru refrigerado deve conter no mínimo 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4% de extrato seco desengordurado (ESD), estabelecendo prazos para atingir CCS e CTB (BRASIL, 2011).

A ausência de fraudes, atualmente, também é um importante parâmetro na determinação da qualidade do leite. (SÁ, 2004). Por definição, fraude é a adição/subtração total ou parcial de qualquer substância na composição original do produto, em condições tais que o produto perca suas características normais. (BRASIL, 2008). No início, o intuito das fraudes eram apenas aumentar o volume total do leite produzido, mas hoje, visam também modificar as características e os componentes, como o teor de proteína do produto. O objetivo é receber bonificações em sistemas de pagamento por qualidade, (VIOTTO & CUNHA, 2006) gerando um lucro ilícito e uma competição desleal com outros produtores, o que gera um impacto negativo na economia local e até mesmo internacional. (GUAN et al., 2005).

1.4. Fraudes Alimentares

Por definição, fraudes alimentares são “modificações, adulterações e falsificações realizadas com o intuito de obtenção de maiores lucros. Estas operações visam ocultar ou mascarar as más condições estruturais e sanitárias dos produtos, e/ou atribuir-lhes requisitos que não possuem”. (KOLICHESKI, 1994). Na maioria dos casos, as fraudes comprometem o valor nutricional dos alimentos, e também suas características sensoriais, sempre indo de encontro aos interesses dos consumidores. (EVANGELISTA, 1989).

Praticamente todos os alimentos possuem uma Norma Técnica Especial para Alimentos (NTA), na qual constam todas as especificações padrão que devem ser seguidas. Qualquer alimento que apresente, por algum motivo, características fora das especificações legais é considerado fraudado. (KOLICHESKI, 1994)

1.4.1. Tipos de fraudes

As fraudes são praticadas em diversas modalidades, desde as mais grosseiras, que levam a uma percepção imediata, até as mais elaboradas e difíceis de serem identificadas. (EVANGELISTA, 1989). Podem ser classificadas de um modo geral em 4 grandes grupos, sendo eles por alteração, por falsificação, por sofisticação e por adulteração.

Nas fraudes por alteração, há destruição parcial ou total das características essenciais do alimento, comprometendo suas qualidades físico-químicas e capacidade nutritiva (EVANGELISTA, 1989). Ocorrem pela ação de agentes físico – químicos, microbianos e enzimáticos, não sendo, portanto, resultado de interferência direta de indivíduos. Entretanto, geralmente acontecem por negligência e não o cumprimento de normas estabelecidas durante etapas de processamento, conservação e armazenamento dos produtos. (KOLICHESKI, 1994). A alteração só é considerada fraude se o vendedor, sabendo que o produto se encontra em condições impróprias, efetua ou ordena a sua comercialização (KOLICHESKI, 1994).

Por definição, alimento falsificado é o que tenha a aparência e características gerais do produto legítimo, protegido ou não por marca registrada e se denomina como este sem sê-lo, ou que não proceda de seus verdadeiros fabricantes ou zona de produção conhecida e/ou declarada. Dessa maneira, nas fraudes por falsificação, o intuito é enganar o consumidor, de modo a fazê-lo pensar estar consumindo um produto de qualidade superior ao que realmente está. Pode proceder diretamente quanto a qualidade do produto, e quanto ao peso, à apresentação, à procedência e à propaganda. (EVANGELISTA, 1989).

Na sofisticação, uma variante da falsificação, os fraudadores fazem o aproveitamento de rótulos, etiquetas, garrafas, latas e outros tipos de embalagens, na maioria das vezes de origem estrangeiras, para a utilização em produtos falsificados. Muito usada em bebidas, os comprados, em sua maioria, não são capazes de perceber sua falta de autenticidade. Além disso, exaltar qualificações que o alimento não possui, como “integral”, “diet” “importado”, também é considerada fraude por sofisticação. (EVANGELISTA, 1989).

Um produto adulterado é aquele que foi privado de forma parcial ou total de seus elementos característicos, os quais foram substituídos por outros inertes ou estranhos. Que tenha sofrido adição de aditivos não autorizados, ou que tenham sido submetidos a qualquer tratamento com a intenção de mascarar ou ocultar deficiência na qualidade na matéria prima utilizada ou falhas na elaboração e fabricação. (EVANGELISTA, 1989). A adulteração é sempre realizada intencionalmente, e embora afete de maneira muito sutil os caracteres sensoriais dos alimentos, afeta profundamente seu valor nutritivo. De maneira geral, é um tipo de fraude que passa despercebida aos olhos do consumidor, já que as alterações macroscópicas são muito pouco observadas, o que exige a realização de análises específicas para a sua detecção. (EVANGELISTA, 1989)

1.5. Fraudes no Leite

O artigo 543 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) considera fraudado, adulterado ou falsificado, o leite que foi adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição (BRASIL, 1952).

Existem diversos fatores que podem influenciar a complexa composição do leite bovino. Raça, alimentação, idade, número de parições, tempo de lactação, sendo que existem limites determinados por lei para essas variações, que servem tanto para controlar a qualidade na produção, quanto para detectar adulterações no produto (BHEMER, 1999). Os parâmetros oficiais utilizados para este controle incluem densidade a 15°C, acidez, índice crioscópico, índice proteico, percentual de gordura e de sólidos não solúveis (BRASIL, 2011)

Dentre as fraudes mais comuns, está a adição de água durante o beneficiamento do leite, com o intuito de aumentar o volume final produzido, gerando um lucro bruto maior. Esse tipo de adulteração altera parâmetros físico-químicos da amostra, além de reduzir significativamente o valor nutritivo do leite. (CAVALCANTI, 2011)

A redução dos níveis proteicos do leite é um dos principais impactos observados. O leite, que sofre a adição de água, torna-se mais “diluído”, o que é um grave problema para os fraudadores em virtude dos parâmetros mínimos exigidos pelos órgãos fiscalizadores. O teor de proteína, de acordo com a legislação brasileira, precisa ser de no mínimo 2,9% (m/m) (BRASIL, 2002). Para driblar a fiscalização, produtores de todo o mundo encontraram como alternativa a adição de compostos nitrogenados como a Melamina, Uréia e Sulfato de Amônio, com o intuito de aumentar o percentual proteico aparente da amostra adulterada. (BRASIL, 2006). Há também uma estimulação da indústria de laticínio para a produção de leite com maior teor de sólidos totais, principalmente proteínas, pois reflete diretamente no lucro, rendimento e qualidade de produtos lácteos derivados. Dessa maneira, leites que possuam um maior teor proteico total são comercializados com maior preço, o que se torna mais um estímulo para esse tipo de adulteração. (DOMINGO, 2013)

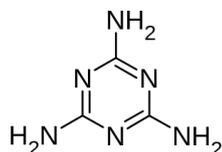
Um dos motivos que levaram a adulteração com compostos nitrogenados foi sua dificuldade de detecção. O método regulamentado hoje para mensurar o teor proteico do leite é o método Kjeldahl. Esse método se baseia na transformação do nitrogênio total da amostra em sulfato de amônio, através da digestão com ácido sulfúrico, e posterior destilação com liberação de amônio, que é fixada em solução ácida e titulada. (BRASIL, 2006). Uma de suas maiores

limitações, e a que abre brechas para esse tipo de fraude, é que ele não é capaz de diferenciar nitrogênios proteicos de não proteicos. (FINETE, 2013) Dessa maneira, adicionar compostos ricos em nitrogênio causa um aumento do teor proteico aparente, já que a mensuração se dá através do nitrogênio total presente na amostra (DOMINI, 2009)

1.5.1. Melamina

A melamina ou 2,4,6-triamino-1,3,5 triazina (Figura 1) é um composto orgânico alcalino, trímero da cianamida, encontrada principalmente na forma de cristais brancos inodoros, (GUAN, 2013), com massa molecular de 126g/mol, composta por 66% de nitrogênio. Por apresentar um alto teor de nitrogênio e baixo custo, a melamina é utilizada como adulterante em alimentos como rações, leites e derivados, com o intuito de aumentar o valor de proteína bruta, já que adição de 1% de melamina é capaz de aumentar em 4,16% o teor proteico. (BISAZ, 1983). É um composto comercial, que pode ser sintetizado através da uréia, gerando um produto com até 99% de pureza. (SHARMA, 2010). Devido sua estabilidade e resistência a altas temperaturas, é utilizado na fabricação de resinas, plásticos, laminados, revestimentos, colas, louças, corantes, fertilizantes, entre outros. (LE, 2013).

Figura 1. Estrutura Molecular da Melamina



Fonte: Wikipedia

O primeiro caso de adulteração com melamina foi detectado em 1970, na Itália, onde foram encontrados resíduos dessa substância em peixes. (LACHENMEIER, 2009). Em 2007, nos EUA, após um surto de morte de animais de pequeno porte, foi identificada a presença de melamina em rações, oriunda de matéria prima contaminada importada da China (DOBSON, 2008). Ainda em 2007, na China, após a morte de 6 bebês com mais de 300 mil doentes evidenciaram a adulteração com melamina, que dessa vez ocorreu na formulação de leites em pó destinados ao público infantil. (SHARIFI, 2009). Os principais danos causados ao organismo devem-se ao fato de que a melamina não é metabolizada pelo corpo humano, e por isso pode se

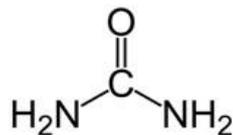
acumular na forma de cristais insolúveis no sistema urinário, podendo levar a insuficiência renal, e em casos extremos, à morte. (SUN, 2010)

Após os surtos de contaminação, agências reguladoras como o *Food and Drug Administration* (FDA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram limites de ingestão diária para a melamina, de 2,5mg/kg para adultos e 1 mg/kg para crianças, para leite e seus derivados. (EHLING, 2007).

1.5.2. Uréia e Sulfato de Amônio

A Uréia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) é um composto orgânico cristalino e incolor, com massa molar de 60g/mol, sendo 45% de sua massa composta por nitrogênio. É um componente natural do leite, sendo encontrada entre 180 e 400mg/L e constitui grande parte dos compostos nitrogenados não proteicos. Acima de 700mg/L, pode causar diversos problemas no ser humano, como úlceras e problemas renais. É utilizada principalmente como fertilizante, sendo empregada também na fabricação de colas, tintas, adesivos, papéis resistentes, entre outros. (GOWARIKER, 2009). Por apresentar alto teor de nitrogênio, baixo custo e fácil acesso, a uréia, assim como a melamina, é utilizada na adulteração de alimentos com o intuito de aumentar o teor de proteína aparente. (FINETE, 2013).

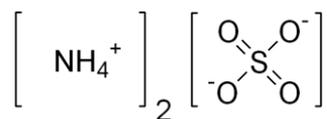
Figura 2. Estrutura Molecular da Uréia



Fonte:Wikipedia

O sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é um composto inorgânico, com massa molecular de 132,14 g/mol, e apresenta 21,18% de sua massa composta por nitrogênio, sendo utilizado principalmente como fertilizante. (FINETE, 2013)

Figura 3. Estrutura molecular do Sulfato de Amônio.



Fonte: Wikipedia

Um incremento de 1% de ureia e sulfato de amônio no leite, aumenta em aproximadamente 1% o teor de proteína aparente na amostra. (FINETE, 2013).

1.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Descoberta em 1945 por Bloch e Purcell, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica analítica que permite a obtenção de informações físico-químicas das matérias, baseando-se na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos atômicos e no fenômeno de ressonância magnética nuclear. (EVANS, 1995). Pode prover informações detalhadas sobre a estrutura, dinâmica, estado de reação e ambiente químico das moléculas.

A Espectroscopia de RMN é uma técnica analítica sofisticada, que possui aplicações em diferentes áreas, sendo utilizada tanto para análise qualitativa como quantitativa, e suas aplicações vão desde a análise de compostos químicos simples a seres vivos inteiros, de um modo não destrutivo e não invasivo. (LUZYANIN, 2010)

A RMN é aplicada não apenas na elucidação estrutural de pequenas moléculas, como também no estudo de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, pode ser utilizada no estudo de processos dinâmicos de moléculas, e para estudar interações entre elas. (EVANS, 1995)

1.6.1. Princípio de Funcionamento

A RMN explora as propriedades magnéticas dos átomos, onde os seus núcleos podem ser vistos como peões com carga, que rodopiam em torno de seu eixo, gerando um pequeno campo magnético. (LUZYANIN, 2010)

De maneira geral, esses núcleos dispõem-se de maneira aleatória. Porém, quando expostos a um forte campo magnético, são forçados a alinhar-se em orientações específicas, caracterizadas por terem diferentes níveis energéticos. Em seguida, são expostos a uma radiação eletromagnética. No momento em que a frequência do aparelho corresponde a exata frequência de ressonância dos núcleos (frequência de Larmor), eles mudam para outra orientação, mais energética. Desligando a fonte de radiação eletromagnética, os núcleos retornam para a sua orientação original, emitindo radiação característica que é convertida num sinal elétrico, que, após tratamento matemático, pode ser convertido para um gráfico de

intensidade do sinal X frequência aplicada, conhecido como espectro de RMN. (LUZYANIN, 2010)

As frequências de ressonância dos núcleos não dependem só da natureza do átomo em estudo, mas também do ambiente químico em questão, aparecendo em pontos diferentes do espectro de RMN. Essas frequências são expressas numa unidade dada pelo desvio químico (expressa em ppm), e são comparadas em relação a um padrão, que por convenção é igual a 0 ppm. O desvio químico, dessa forma, indica a localização do sinal no espectro, sendo possível determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto, sendo, portanto, uma técnica valiosa na obtenção de informações sobre a estrutura das moléculas. (LUZYANIN, 2010).

De maneira geral, a observação do núcleo de ^1H em solução é o tipo mais comum de espectroscopia de RMN, por apresentar características favoráveis, como elevada abundância natural e elevada razão giromagnética, possibilita medições de alta sensibilidade e baixo tempo de aquisição, sendo responsável pelo vasto número de aplicações dessa técnica, que vai desde compostos muito simples, com baixo peso molecular, até grandes moléculas como proteínas. (LUZYANIN, 2010).

1.6.2. Utilização de RMN na Análise de Alimentos

Por ser uma técnica não invasiva, onde não há necessidade de preparações complexas das amostras, a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear vem sendo cada vez mais utilizada no âmbito da análise de alimentos. Em comparação a outras técnicas espectroscópicas como a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), a Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia Gasosa (CG), a RMN apresenta maior seletividade e sensibilidade qualitativa, gerando informações muito mais detalhadas sobre a amostra. (LACHENMEIER, 2007).

Nos últimos anos, diversos autores publicaram trabalhos utilizando a RMN como ferramenta para análise de diferentes matrizes alimentares, como vinho (OGRINC, 2003), cerveja, sucos de frutas, carnes, (KEETON, 2003) e produtos derivados do leite (MARIETTE, 2009) além de trabalhos focados em segurança e autenticidade alimentar (MANNINA, 2002) e análises de umidade em diferentes alimentos. (KEETON, 2003).

Em virtude de a maioria dos alimentos ser rica em prótons, por conter elementos como água, gordura, carboidratos e proteínas, a RMN de próton (H^1 -RMN) é a escolha mais comum

para esse tipo de análise, principalmente na determinação de abundância desses componentes. (MARCONE, 2013). Colnago e colaboradores demonstraram a capacidade da RMN de, além de quantificar a gordura total presente em diferentes alimentos, identificar a composição de ácidos graxos nas amostras. (COLNAGO, 2011). A RMN também é utilizada na análise estrutural dos alimentos, através do tempo de relaxação, que permite visualizar possíveis mudanças estruturais que ocorrem no processamento e estocagem. (MARCONE, 2013).

Outra possível aplicação é na inspeção microbiológica de frutas e vegetais (PYKETT, 2000), bem como de carnes (GUDJÓNSDÓTTIR, 2011), onde a RMN oferece maior confiabilidade do que as técnicas normalmente utilizadas, já que a representatividade das análises depende da distribuição dos microrganismos nas amostras, e a RMN é capaz de prover imagens em tempo real da amostra por completo. (MARCONE, 2013).

As maiores barreiras na implementação da RMN na análise de alimentos ainda são, em primeiro lugar, os altos custos dos equipamentos. Além disso, a operação dos equipamentos necessita de profissionais com expertise para tanto, e medidas de segurança relacionadas à manutenção do campo magnético. Um dos passos chave na passagem do RMN do âmbito da pesquisa para o âmbito industrial é a criação de procedimentos operacionais padrão (POPs), onde seja possível normatizar essas análises e compará-las com as análises já regulamentadas, num processo de comprovar sua eficiência. Apesar de muitas melhorias ainda serem necessárias para esse avanço, a RMN, com suas inúmeras utilizações e aplicações, é uma ferramenta extremamente promissora para a análise de alimentos. (MARCONE, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

O leite é um alimento completo do ponto de vista nutricional, sendo produzido e consumido em todo o mundo. Movimenta bilhões de reais todos os anos, sendo um alimento chave na geração de lucro no ramo alimentício e por isso, torna-se alvo frequente de fraudes que visam a diminuição no valor de produção com consequente aumento de lucro bruto.

As fraudes, realizadas durante o processo de beneficiamento do leite, estão se tornando cada vez mais sofisticadas e difíceis de serem detectadas. Se, antigamente as adulterações se davam apenas pela adição de água para aumentar o volume total produzido, hoje em dia já focam em alterar a composição do produto, modificando suas características físico-químicas, para enganar a fiscalização.

Uma das adulterações mais comuns hoje, é a adição de compostos nitrogenados como a Ureia, Melamina, e Sulfato de amônio, com o intuito de aumentar o conteúdo aparente de proteína, já que o método Kjeldahl, regulamentado para a determinação do teor de proteína do leite, não é capaz de detectar esse tipo de fraude. Isso permite aos produtores burlarem as fiscalizações, já que, seus produtos, que normalmente não se enquadrariam nos valores padrão, passam a apresentar um teor proteico dentro do limite permitido.

Sendo assim, se faz necessária a busca por ferramentas mais sofisticadas, precisas e rápidas para a análise de alimentos. A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear vem sendo cada vez mais utilizada para este fim, uma vez que necessita de pouca preparação da amostra, além de ser uma técnica não invasiva e que possibilita a utilização dos alimentos *in natura*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Utilizar a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na identificação e análise de adulterantes nitrogenados (Melamina, Sulfato de Amônio, Uréia) em amostras de leite UHT.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter os espectros RMN-¹H dos adulterantes.
- Identificar os compostos adulterantes em amostras de leite UHT previamente contaminadas com 4 diferentes concentrações.
- Quantificar os adulterantes através da integração dos picos marcados para cada substância em todas as concentrações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras Utilizadas

Leite UHT integral.

4.2 Adulterantes

Os adulterantes utilizados foram a Melamina (>99% Sigma-Aldrich) o Sulfato de Amônio P.A. (Vetec) e a Uréia P.A. (Vetec).

4.3 Espectroscopia de RMN

As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonâncias Magnética Nuclear, no departamento de Bioquímica, alocado no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os espectros de RMN-1H, foram obtidos em um aparelho BRUKER, modelo AVANCE III 400 MHz e 600 MHz. Os espectros foram analisados através do programa Bruker TopSpin 3.1.

4.4 Preparação das amostras em leite integral

Foram preparadas amostras adulteradas de leite integral nas concentrações de 1% para a Uréia e o Sulfato de Amônio e 0,3% para a Melamina, além de uma amostra contendo apenas o leite. 200µl de cada solução foram transferidos para eppendorfs contendo 300 µl de DMSO-d₆. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para os tubos de análise. A leitura foi realizada a 20°C (293K).

4.5 Preparação do leite

Foi adicionado ácido clorídrico P.A. ao leite integral UHT até que atingisse pH 2. O meio ácido favorece a precipitação da maioria das proteínas do leite, e após centrifugação 5000_rpm por 10 minutos, ocorreu a separação dos componentes precipitados e do sobrenadante, que foi utilizado na preparação das amostras.

4.6 Adulteração do leite

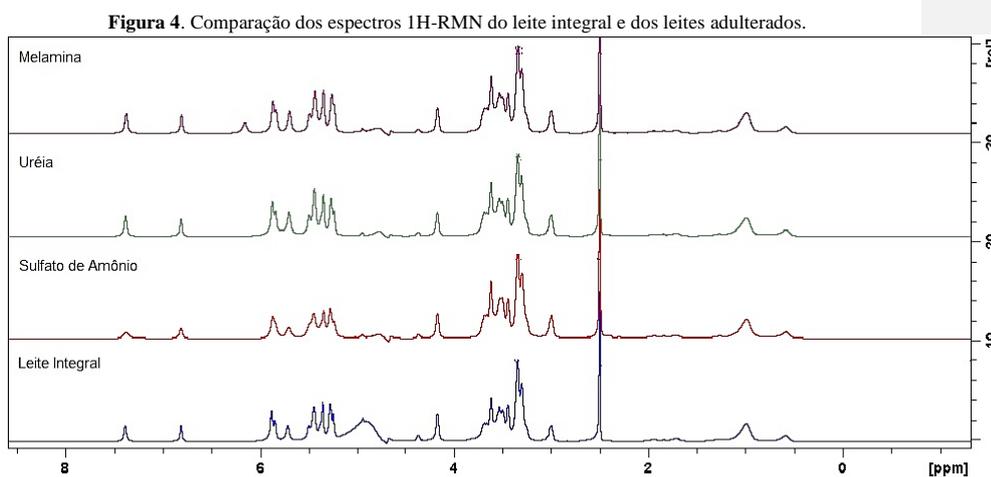
Foram preparadas amostras adulteradas nas concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,3%, e 0,8%, para cada um dos adulterantes utilizados. Além disso, foram preparadas amostras contendo os 3 adulterantes simultaneamente, nas mesmas concentrações, gerando um total de 16 amostras. As concentrações foram escolhidas com base em dados da literatura, e correspondem a concentrações de adulterantes necessárias para um incremento de no mínimo 0,05% do teor proteico bruto no caso da Uréia e do Sulfato de Amônio e 0,2% no caso da melamina. (FINETE, 2013).

Na preparação, foi utilizado apenas o sobrenadante, obtido conforme descrito no item 4.5. 200µl de cada solução foram transferidos para eppendorfs contendo 300µl de DMSO-d6. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para os tubos de análise. As leituras foram realizadas numa temperatura aproximada de -10°C (263K) usando a sequência de preé-saturação do pico de água zgesgp (¹H excitation sculpting).

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Leite integral

Inicialmente, os adulterantes foram adicionados ao leite integral, sem nenhuma preparação prévia da amostra, e em concentrações já utilizadas na literatura (FINETE, 2013). Além disso, as análises por RMN foram realizadas a uma temperatura de 20°C. Foram obtidos 4 espectros, sendo 3 do leite adulterado com cada uma das substâncias, e 1 do leite integral sem adulteração (Figura 4).



O espectro da melamina apresentou um pico, na faixa de 6ppm, que o difere do espectro do leite sem adulteração. Lachenmeyer e colaboradores analisaram amostras de leite chinesas contaminadas com melamina, e obtiveram um pico na mesma faixa, correspondente aos grupamentos NH₂ da substância. (LACHENMEYER, 2009).

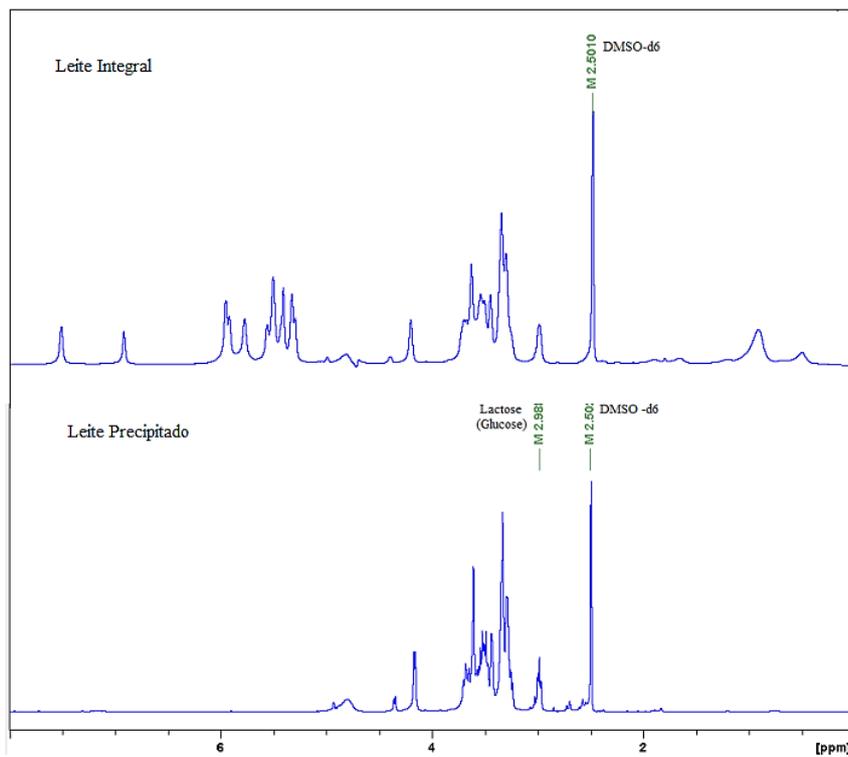
De maneira geral, se observou a incapacidade dessa metodologia, sem preparação da amostra, de identificar os 3 adulterantes presentes nas amostras de leite pois com exceção da melamina, não foi possível discriminar o espectro do leite sem adulteração dos demais.

5.2. Leite precipitado

O leite, por ser uma matriz complexa e rica em nutrientes, geralmente necessita de algum nível de preparação para a realização de análises experimentais. (NASCIMENTO, 2014) A elevada concentração de proteínas parece ter influenciado na identificação dos adulterantes nas amostras, e por isso, foi realizado um pré-preparo do leite antes da contaminação com os adulterantes. A adição de ácido clorídrico ao leite, até que seu pH seja 2, faz com que a maioria das proteínas solúveis precipite, e com centrifugação a ~~5000RPM~~ 5000 rpm por 10 minutos, é possível separar o precipitado do sobrenadante, utilizado na preparação das amostras para análise. Dessa forma, além da diminuição de uma possível interferência das proteínas no espectro, ainda há a influência do pH ácido, que tende a deslocar os sinais dos adulterantes, possibilitando uma melhor visualização.

O pico marcado em 2.9_ppm é referente à lactose, mais especificamente ao CH₂ do carbono beta da glicose (BUBB, 2006), e foi utilizado como referência, já que está presente em todos os espectros, no mesmo desvio químico e com aproximadamente a mesma intensidade. O pico 2.5_ppm é referente ao DMSO-d₆ (CAMBRIDGE, 2008)

Figura 5. Comparação do leite com e sem precipitação.

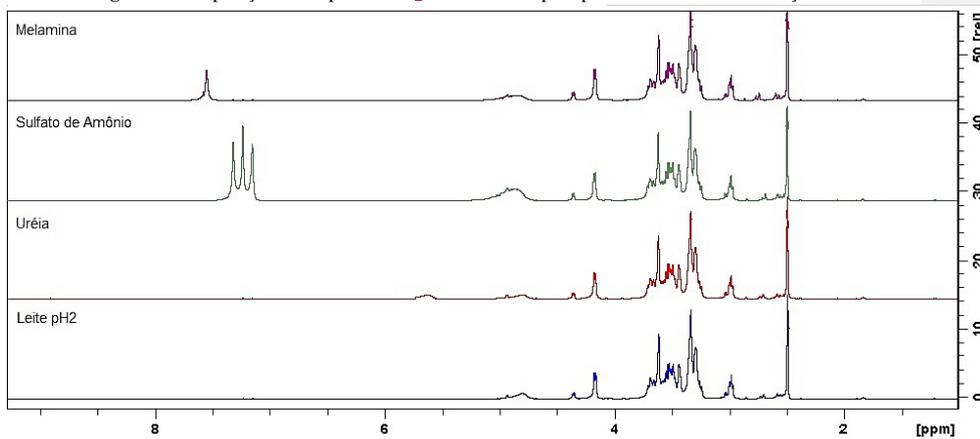


5.2.1 Leite precipitado adulterado

Foram obtidos 16 espectros ^1H -RMN referentes a cada uma das 4 concentrações para cada um dos adulterantes, além de 4 espectros referentes a mistura dos 3 adulterantes em cada concentração. Nessas condições de pH e temperatura, foi possível discriminar picos característicos para cada um dos adulterantes escolhidos (Figura 6)

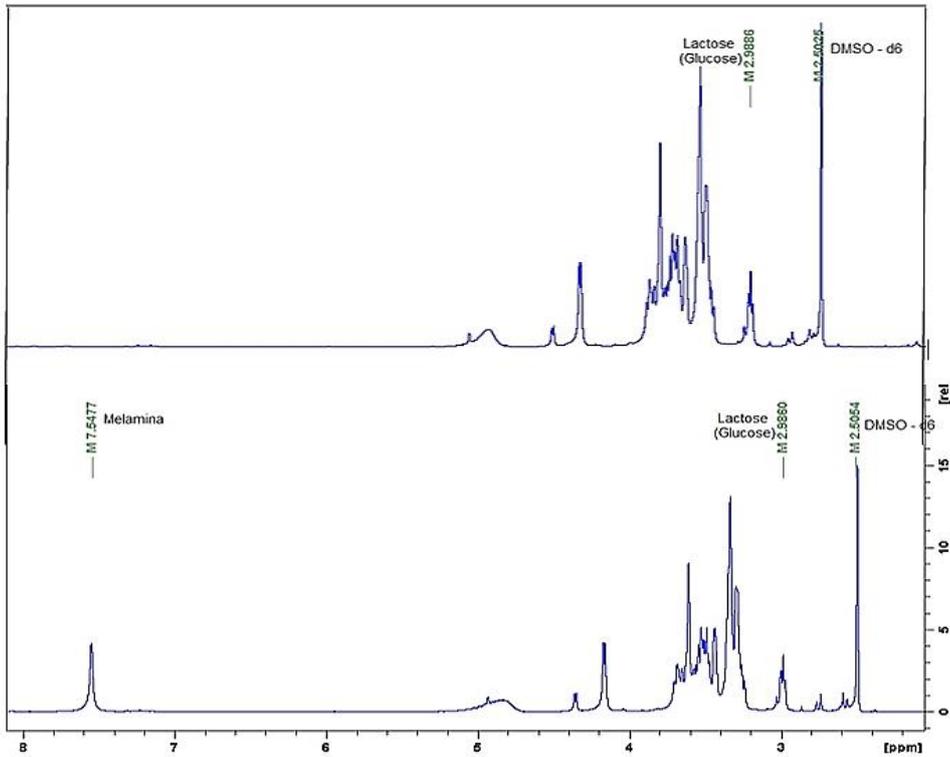
A adição dos adulterantes não causou nenhuma modificação efetiva aos picos do leite sem adulteração. O pico da lactose, tomado como referência, manteve a mesma intensidade e desvio químico. (Figura 6)

Figura 6. Comparação dos espectros ^1H -RMN do leite precipitado com e sem adulteração.



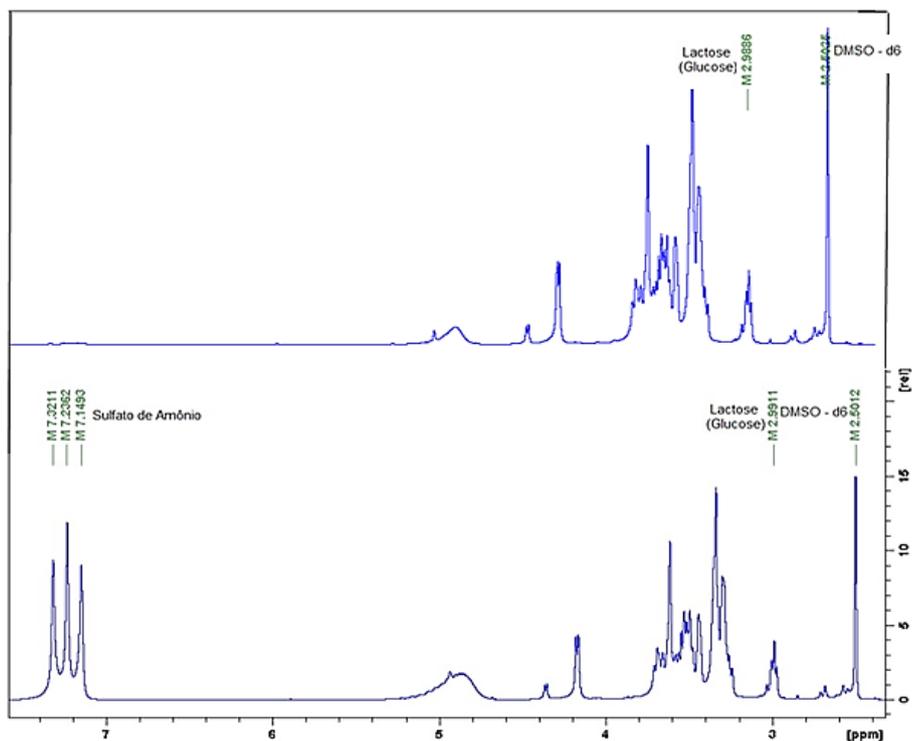
Antes da precipitação, assim como em dados da literatura (LACHENMEYER, 2009), o pico da melamina estava próximo a 6 ppm. A adição de ácido e a baixa temperatura parecem tê-lo deslocado, uma vez que, após a segunda leitura, foi possível identifica-lo a 7.5 ppm. (Figura 7)

Figura 7. Leite pH 2 e Melamina 0,3%



Similarmente à melamina, o sulfato de amônio apresentou um sinal característico, em torno de 7,52 ppm, que pode ser usado como um sinal discriminativo, já que não é possível observá-lo no espectro do leite sem adulteração, estando presente em todas as amostras de leite adulteradas com a substância. (Figura 8)

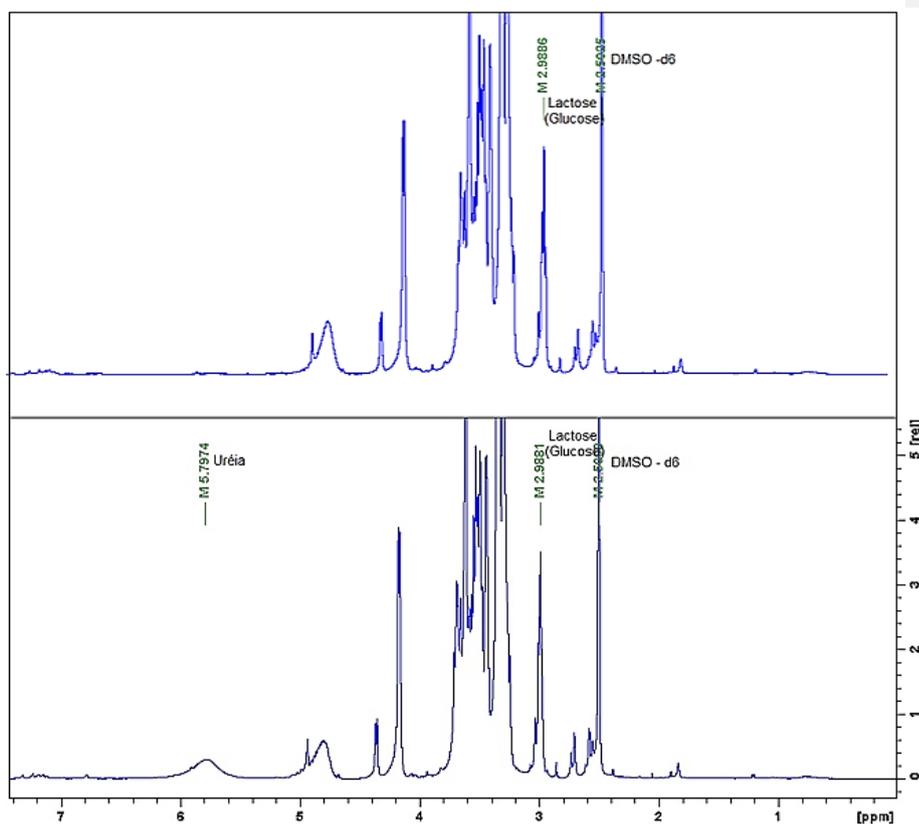
Figura 8. Leite pH 2 e Sulfato de Amônio 1%



O menos evidente dos sinais foi o da uréia (Figura 9). Mesmo na maior concentração (8mg/ml) utilizada, o pico em torno de 5,7 ppm possui baixa intensidade quando comparado ao dos outros adulterantes. Entretanto, apesar da visualização menos evidente, ainda parece ser possível utiliza-lo para identificar essa substância.

Aparentemente, a baixa temperatura e pH não influenciaram no pico da ureia, pois dados preliminares da literatura demonstram seu desvio químico em torno de 6 ppm (LIU, 2012) assim como os dados obtidos nesse trabalho. O ponto chave na sua visualização parece ter sido a precipitação das proteínas pela adição de ácido clorídrico, já que, no espectro do leite sem precipitação, há grande intensidade de sinais justamente na faixa de 5 a 6 ppm.

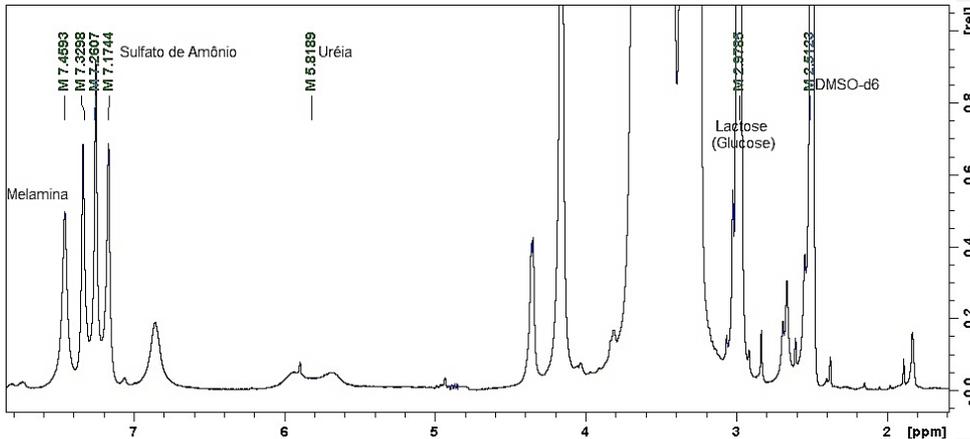
Figura 9. Leite pH 2 e Uréia 1%



Na mistura dos 3 adulterantes, foi possível observar os mesmos picos marcados nos espectros de cada substância, além do pico de referência a 2,9_ppm. (Figura 10). Porém, parece haver algum tipo de sobreposição entre os picos da Melamina e do Sulfato de Amônio, não sendo possível a quantificação do sinal nesse caso. Isso proporcionaria alguma dificuldade no caso de análise de material contendo mais de um dos adulterantes simultaneamente

O sinal da uréia manteve-se bem mais discreto do que os outros dois, assim como quando analisada separadamente.

Figura 10. Leite adulterado com Melamina, Sulfato de Amônio e Ureia.



5.3 Integrais dos picos

A intensidade do sinal 1H-RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos ressonantes que causam esse sinal (REICH, 2016), e pode ser mensurada através integração dos picos num dado espectro. Em outras palavras, quanto maior for a concentração de núcleos de hidrogênio numa amostra, maior será a intensidade do seu sinal.

Os picos marcados como discriminativos para cada uma das substâncias em todas as 4 concentrações foram integrados e quantificados e além deles, o “pico referência” da lactose a 2,9 ppm. A escolha desse pico se deu pelo fato de não haver variação significativa na intensidade do sinal dentre todos os espectros obtidos.

Com esses valores, foi calculada uma razão, dada pelo valor da integral do pico do adulterante dividida pelo valor da integral do pico de referência. Essa razão foi calculada para cada um dos picos, em todas as 4 concentrações. (Figura 11).

Figura 11. Quantificação da intensidade dos picos (integrals).

Melamina				Sulfato de Amônio			
Concentração (%)	Área dos picos (Integral)	Área Pico Padrão	Razão	Concentração (%)	Área dos picos (Integral)	Área Pico Padrão	Razão
0,05	46.298.452	364.914.885	0,12687466	0,05	159.938.925,44	374.930.897,50	0,42658241
0,1	100.672.489,38	333.225.477,44	0,30211522	0,1	372.791.092,75	351.697.758,12	1,05997574
0,3	290.963.062,31	341.412.110,69	0,85223416	0,3	774.530.149,19	345.432.112,19	2,24220656
0,8	860.761.877,44	343.411.343,34	2,50650392	0,8	1.776.548.491	351.879.284,09	5,04874419

Uréia			
Concentração (%)	Área dos Picos (Integral)	Área Pico Padrão	Razão
0,05	27.115.585,62	364.035.343,69	0,07448613
0,1	74.122.898,12	341.366.599,06	0,21713577
0,3	166.091.793,94	347.951.024,62	0,47734245
0,8	286.421.195,44	348.854.398,88	0,82103364

As áreas do pico padrão mantiveram-se muito semelhantes entre si, e as razões obtidas mostram uma relação direta entre concentração da amostra e a área. Essa relação foi comprovada através de 3 gráficos da concentração do adulterante pela razão (Área dos Picos/Área do Pico Padrão). (Figuras 12, 13 e 14), com adição da linha de tendência (linha pontilhada) e cálculo do R².

Esse resultado era esperado, uma vez que, quanto maior o número de núcleos ressonantes, maior a intensidade do sinal ¹H-RMN. Além disso, ajudam a confirmar os resultados obtidos referentes aos picos marcados para a Melamina, a Uréia e o Sulfato de Amônio, e demonstram a capacidade da técnica de, além de identificar esses compostos no leite, quantificá-los.

Dos resultados obtidos, foram plotados 3 gráficos da Concentração do adulterante pela Razão (Área dos Picos/Área do Pico Padrão). (Figuras 12, 13 e 14).

Formatado: Espaço Depois de: 6 pt

Figura 12. Gráfico Concentração (%) X Razão - Melamina

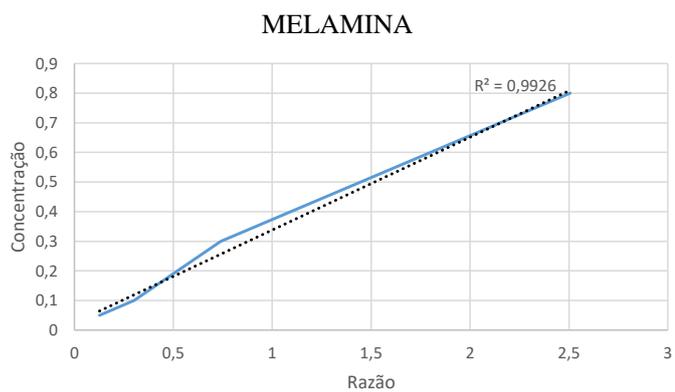


Figura 13. Gráfico Concentração (%) X Razão - Sulfato de Amônio

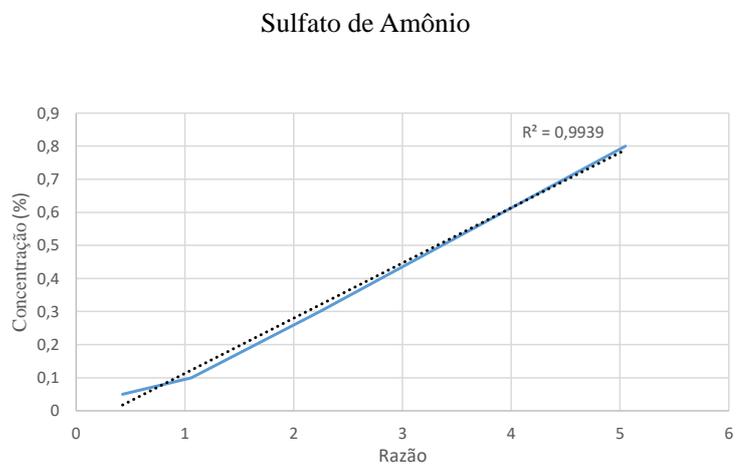
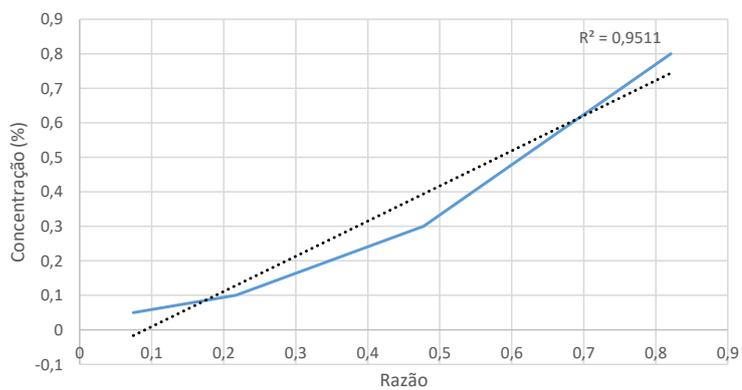


Figura 14. Gráfico Concentração (%) X Razão - Uréia

URÉIA



8.6. CONCLUSÃO

Pelos dados obtidos, pode-se dizer que a técnica utilizada é, no mínimo promissora para a identificação dos 3 compostos nitrogenados adicionados ao leite bovino. Os espectros de RMN indicam a existência de picos específicos para cada substância, uma vez que, em todas as concentrações testadas, eles possuem o mesmo desvio químico. No caso da mistura dos 3 adulterantes, talvez por interação entre si, a visualização foi mais difícil, e a quantificação não foi possível, o que indica a necessidade de uma busca por melhores condições experimentais para o caso da análise simultânea das três substâncias.

Estudos posteriores são necessários, talvez com a utilização de leite cru como matriz, e com condições que possibilitem a separação mais evidente dos picos de cada substância. Porém, este trabalho concluiu que é possível utilizar a Ressonância Magnética Nuclear para esta finalidade específica, sem preparações complicadas da amostra, de maneira rápida e eficaz.

9-7.REFERÊNCIAS

1. ABLV - Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida. Indústria de leite longa vida prevê crescer 4% este ano. Disponível em <http://www.ablv.org.br/21-Releases-Industria-de-leite-longa-vida-prevecrescer-4-este-ano.aspx>. Acesso em: 10 de junho de 2016.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos Origem Animal - RIISPOA**. Decreto nº 30.691, 29 mar. 1952. Alterado pelos Decretos nº 1236 de 02/09/1994, nº 1812 de 08/02/1996, nº 2244 de 04/06/1997, nº 6385 de 27/02/2008. Disponível em: ☰. Acesso em 25 de Maio de 2016.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, 4 de Setembro de 1997. **Diário oficial da União**, 18 de Setembro de 1997. Disponível em <http://www.saocaetanoprojetos.com.br/pdf/LeiteUHT.pdf>. Acesso em 10 de junho de 2016.
4. BRASIL. Portaria nº 56, de 07 de dezembro de 1999. Submete à consulta pública os regulamentos técnicos sobre produção, identidade e qualidade de todos os tipos de leite e coleta de leite cru resfriado e transporte a granel. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, n.234, p. 34-49, 8 dez. 1999. Seção 1.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51 de 18 set. 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos aplicados aos leites cru e pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, n.183, 46p.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 14 dez. 2006.

7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p. 6.
8. BHEMER, M. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**. 13a ed. São Paulo (SP): Nobel; 1999.
9. BISAZ, R.; KUMMER, A. Determination of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine (melamine) in potatoe proteins. **Mitt. Gebiete Lebensm.** V. 74, p. 7, 1983
10. Bubb, William. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. **School of Molecular and Microbial Biosciences**. Australia, 2006.
11. Cambridge Isotope Laboratories. NMR Solvent Data Charts, 2010. Disponível em <http://www2.chem.umd.edu/nmr/reference/isotope_solvent.pdf>. Acesso em 14 de dezembro de 2016.
12. CAVALCANTI, VR. **Avaliação físico-química e microbiológica de leite cru recebido em tanques comunitários**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba. 2011.
13. COLNAGO, L. A., AZEREDO, R. B. V., MARCHI NETTO, A., ANDRADE, F. D., & VENÂNCIO, T. Rapid analyses of oil and fat content in agri-food products using continuous wave free precession time domain NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. S113–S120, 2011
14. DOMINGO, E.; TIRELI, A.; NUNES, CLEITON.; PINTO. Riscos de contaminação em produtos lácteos e a influência na saúde dos consumidores. **Acervo Saúde**, v. 5(1), p. 390-401. Lavras, 2013
15. DOMINI, C.; VIDAL, L.; CRAVOTTO, G.; CANALS, A. A simultaneous, direct, microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v 16, p. 564-569, 2009
16. DÜRR. J.W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do leite: uma oportunidade única. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Editora Passo Fundo, 2004. p. 38-55

17. EMBRAPA. 2008a. Produção de Leite, Vacas Ordenhadas e Produtividade Animal no Brasil – 1980/2008. Disponível em: http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0_230.php. Acesso em: 15 de junho de 2016
18. EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989. p.577-584.
19. FINETEM V.; GOUVEA, M.; MARQUES, F.; NETTO, A. Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? **Food Chemistry**, Rio de Janeiro, v. 141, p.3649-3655, 2013
20. FUKUDA, S.P.; **Estudo da correlação entre o método da ninidrina acida e cromatografia liquida de alta eficiência para a dosagem de Glicomacropéptido e Caseinomacropéptido em leite**. 2003. 135f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2003).
21. GOWARIKER, V.; KRISHNAMURTHY, V. N.; GOWAIKER, S.; DHANORKAR, M.; PARANJAPPE, K. *The Fertilizer Encyclopedia*. [S.l.]: Wiley., p 880 2009
22. GUAN, R.; LIU, D.; YE, X.; YANG, K. Use of fluometry for determination of skim milk powder adulteration in fresh milk. **Journal of Zhejiang University**, v.6, n.11, p.1101-1106, 2005.
23. GUAN, H.; YU, J.; CHI, D.; Label-free colorimetric sensing of melamine based on chitosan-stabilized gold nanoparticles probes. **Food control**, Guilford, v. 32, p. 35-41, 2013
24. GUDJÓNSDÓTTIR, M., JÓNSSON, Á., BERGSSON, A. B., ARASON, S., & RUSTAD, T, Shrimp processing assessed by low field nuclear magnetic resonance, near infrared spectroscopy, and physicochemical measurements—The effect of polyphosphate content and length of prebrining on shrimp muscle. **Journal of Food Science**, v. 76(4), p. E357–E367, 2011
25. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v 41, p 1-108, 2013. Disponível em:< ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/pp%20%20m2013.pdf%3E
26. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 40, p 1- 71, 2012. Disponível em

27. J.N.S. EVANS, Biomolecular NMR Spectroscopy, **Oxford University Press**, Oxford, 1995.
28. Keeton, J. T., Hafley, B. S., Eddy, S. M., Moser, C. R., McManus, B. J., & Leffler, T. P. Rapid determination of moisture and fat in meats by microwave and nuclear magnetic resonance analysis—PVM 1:2003. **Journal of AOAC International**, v. 86(6), p. 1193–1202, 2003
29. KOLICHESKI, Mônica Beatriz. **Fraudes em Alimentos. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 12, n. 1. Curitiba. 1994.
30. LACHENMEIER, D. W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. **Food Chem.** V. 101 (2) p. 825–832, 2007
31. LACHENMEIER, D.; W HUMPFER, E.; FANG, F.; SCHUTZ, B.; DVORTSAK, P.; SPROLL, C.; SPRAUL, M.; NMR-Spectroscopy for Non-Targeted Screening and Simultaneous Quantification of Health-Relevant Coumpounds in Foods: The example of melamine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 7194-7199, 2009
32. LE, T.; YAN, P.; XU, J.; HAO, YA.; Novel colloidal gold-based lateral flow immunoassay for rapid simultaneous detection of cyromazine and melamine in foods of animal origin. **Food Chemistry**, Barking, v. 138, p.1610-1650, 2013
33. LIU, Lingyan, MO, Huaping, WEI, Siwei, RAFTERY, Daniel. Quantitativa analysis urea in human urine and sérum by 1H NMR. **Royal society of Chemistry**, West Lafayette, v. 137, p 595 – 600, 2012.
34. MAGALHÃES, M.A. **Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008
35. MANNINA, L., & SEGRE, A. High resolution nuclear magnetic resonance: From chemical structure to food authenticity. *Grasas Y Aceites*, v. 53(1), p. 22–33, 2002
36. MARIETTE, F. Investigations of food colloids by NMR and MRI. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.14(3),p. 203–211, 2009
37. MARCONE, M; WANG, S.; ALBABISH, W.; NIE, S.; SOMNARAIN, D.; HILL, A. Diverse Food-based Applications of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technology, *Food Research International*, Ontario, v. 51, p.729 – 747, 2013

38. MARTINS, R.S.; SANTOS, C.V.; TEIXEIRA, S.R. **Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.madainoticias.com.br/ma_atualidades20.html> Acesso em 25 de maio de 2016.
39. OGRINC, N., KOSIR, I. J., SPANGENBERG, J. E., & KIDRIC, J. The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376(4), p.424–430, 2003
40. OLIVEIRA, Maricê Nogueira. **Tecnologia de Produtos Funcionais**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
41. PYKETT, I. L. NMR — A powerful tool for industrial process control and quality assurance. **IEEE Transactions on Applied Superconductivity**, v.10(1), p. 721–723, 2003
42. RIO GRANDE DO SUL, **Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado**. Departamento de produção animal coordenadoria de inspeção sanitária dos produtos de origem animal – CISPOA. Resolução 001/2000, 17 de agosto de 2000. Normas técnicas de instalações e equipamentos para micro usinas de beneficiamento e industrialização de leite. Disponível em [http://www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/12675565331178624369Micro Usinas de Beneficiamento e Industrializacao de Leite.pdf](http://www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/12675565331178624369Micro_Usinas_de_Beneficiamento_e_Industrializacao_de_Leite.pdf). Acesso em 3 de junho de 2016.
43. ROMA JÚNIOR, L.C. **Características quantitativas e qualitativas da proteína do leite produzido na região Sudeste**. 2008. 150 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
44. SÁ, E. Análises para detectar fraudes em leite. **Leite & Derivados**, n.78, 2004.
45. SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004
46. SHARMA, K.; PARADAKAR, M.; The melamine adulteration scandal. **Food Security**, Heidelberg, v. 2, p. 97-107, 2010
47. SIQUEIRA, K.; CARNEIRO, A.; ALMEIDA, M.; SOUZA, R.;; O mundo lácteo brasileiro no contexto mundial. **Circular Técnica Embrapa**, Juiz de Fora. 2010. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886169/1/CT104Kennya.pdf>>. Acesso em 30 de maio de 2016

48. VIOTTO, W.H.; CUNHA, C.R. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. **Anais Goiânia: Talento**, p.241-258, 2006