

**TAIZ ALANA MINETTO**

**ESTUDO DA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO DO LEITE COM UREIA  
ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do  
Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial  
para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia  
em Alimentos.

Orientador: Weber da Silva Robazza

**PINHALZINHO/SC**

**2020**

**TAIZ ALANA MINETTO**

**ESTUDO DA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO DO LEITE COM UREIA  
ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina.

**Banca Examinadora**

Orientador:



---

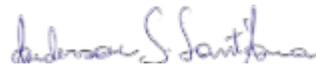
Prof. Dr. Weber da Silva Robazza  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

**Membros**



---

Prof. Dr. Alessandro Cazonatto Galvão  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)



---

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'ana  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)



---

Prof. Dr. Vasco Augusto Pilão Cadavez  
Instituto Politécnico de Bragança (IPB)

**Membro Suplente**

---

Profa. Dra. Heveline Enzweiler  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

**PINHALZINHO/SC, Setembro de 2020**

Dedico este trabalho à minha família e ao meu  
Pai Vicente Minetto ( em memória ).

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Minetto, Taiz

Estudo da Identificação de Adulteração do Leite com Ureia através da Espectroscopia de Impedância Elétrica / Taiz Minetto. -- 2020.

68 p.

Orientador: Weber da Silva Robazza

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2020.

1. Espectroscopia de Impedância Elétrica. I. Robazza, Weber da Silva. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Weber da Silva Robazza meu especial agradecimento, tem toda minha admiração pelo excelente profissional que demonstrou ser nesses anos. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação, disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Alessandro Cazonatto Galvão, pela disponibilidade do laboratório ApTher - Termofísica Aplicada. Sem sua ajuda e organização das análises realizadas para este trabalho, todo nosso estudo não seria possível. Obrigada pelo apoio e dedicação. Obrigada por todo o esforço investido.

À Empresa Bionexus Tecnologia Ltda. por ceder o espectrômetro e pelo interesse em manter parcerias com a Universidade.

À empresa Aurora Alimentos pela disposição e liberação para frequentar as aulas durante os horários do meu trabalho.

A minha família, em especial a minha mãe Iracema, minha irmã Claudia e meu sobrinho Murilo, pela paciência de entender minha ausência durante este período de estudo e pelo incentivo de sempre buscar mais conhecimento.

Ao meu namorado, Patrick. Obrigada pelo companheirismo, pela paciência, pelo incentivo nas horas difíceis, por seu afeto, carinho e por sua amizade.

A todos, novamente, obrigada de coração!

## RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a aplicação da técnica de espectroscopia de impedância elétrica para detecção de adulteração de amostras de leite cru com ureia. Para cumprir este objetivo, foram empregadas 10 concentrações diferentes de ureia e para a obtenção do espectro, as frequências dos sinais de corrente alternada variaram entre 100 Hz e 850 kHz. Foram selecionados quatro modelos de circuitos elétricos equivalentes para estimar o comportamento do eletrodo, do leite cru e ureia, frente as equações dos circuitos equivalentes foi utilizado o *software* R para realizar a modelagem matemática. Em geral, a técnica se mostrou eficiente para a detecção de ureia em concentrações a partir de 0,048 mol/kg. Foi observada uma relação linear entre a resistência elétrica equivalente da solução formada por leite e ureia com a fração mássica de ureia presente na solução. Os resultados indicam que a técnica pode ser uma metodologia promissora, dada a sua facilidade de aplicação e o seu baixo custo, para a detecção rápida de leite adulterado com ureia.

**Palavras-chave:** Espectroscopia de impedância elétrica, adulteração de leite, circuito equivalente, ureia.

## **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the application of electric impedance spectroscopic to detect the intentional addition of urea in raw milk. To accomplish this task, there were used 10 different urea concentrations and the frequencies adopted ranged from 100 Hz and 850 KHz. Four models of equivalent electrical circuits were selected to estimate the behavior of the electrode, raw milk and urea. In view of the equivalent circuit equations, software R was used to perform the mathematical modeling. Overall the technique allowed the detection of urea in concentrations above 0.048 mol/kg. A linear dependence of the equivalent electric resistance of the milk-urea solution on the mass fraction of urea in the solution. Results suggest that impedance electric spectroscopy can be a valuable technique to a rapid detection of raw milk fraud mainly due to its low cost and easiness of application.

**Keywords:** Electric Impedance Spectroscopy, milk adulteration, equivalent circuit, urea.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da camada dupla formada na interface entre eletrodo e solução iônica. Neste diagrama encontram-se moléculas de água, íons positivos e negativos, além de macroíons presentes em soluções coloidais.....	34
Figura 2 – Diagrama do circuito equivalente de Becchi-Helmholtz.....	37
Figura 3 – Diagrama do circuito equivalente com o elemento de fase constante.....	38
Figura 4 – Diagrama do circuito com dois capacitores para a camada dupla.....	39
Figura 5 – Diagrama do circuito ressonante em paralelo.....	40
Figura 6 – Espectros da impedância elétrica em função da frequência em (a) escala normal e (b) escala logarítmica.....	42
Figura 7 – Resultados obtidos para o erro absoluto médio (MAE) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.....	43
Figura 8 – Resultados obtidos para a raiz do erro quadrático médio (RMSE) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.....	44
Figura 9 – Resultados obtidos para o critério de informação de Akaike (AIC) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.....	44
Figura 10 – Resultados obtidos para o critério de informação bayesiano (BIC) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.....	45
Figura 11 – Gráficos dos parâmetros ajustados (a) $R_{sol}$ e (b) $C_{dl}$ em função da concentração de ureia.....	47
Figura 12 – Diagramas da componente (a) real e (b) imaginária da impedância elétrica em função do logaritmo da frequência para as diferentes amostras estudadas.....	48
Figura 13 – Diagrama de Bode para as diferentes amostras estudadas.....	48
Figura 14 – Diagrama de Nyquist para as diferentes amostras estudadas.....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrões de análise para recebimento de leite cru.....	35
Tabela 2 – Massas e concentrações das soluções de ureia em leite usadas no estudo.....	36
Tabela 3 – Valores estimados dos parâmetros após ajuste do modelo do circuito composto por dois capacitores para a camada dupla aos dados experimentais.....	45
Tabela A1 – Índices estatísticos obtidos após o ajuste dos modelos de circuitos equivalentes.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Elemento</b>	<b>Descrição</b>
AIC	Critérios de Informação de Akake
BIC	Critérios de Informação Bayesiano
CA	Corrente Alternada
CE	Eletroforese Capilar
CPE	Elemento de Fase Constante
DC	Corrente Contínua
EIS	Espectroscopia por Impedância Elétrica
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Deseempenho
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAE	Erro Médio Absoluto
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCA	Análise dos Componentes Principais
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSE	Raiz do Erro Quadrático Médio

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. A PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL.....	19
3.2. A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE.....	20
3.3. ADULTERAÇÃO DE LEITE.....	22
3.4. TIPOS DE ADULTERAÇÃO NO LEITE.....	23
3.4.1. Adulteração para aumentar a vida útil.....	24
3.4.2. Adulteração por substâncias reconstituintes da densidade.....	25
3.4.3. Adulteração para aumentar o teor de gordura.....	25
3.4.4. Adulteração para aumentar o volume.....	26
3.4.5. Adulteração no teor de proteína.....	26
3.4.5.1. Adulteração com melamina e soro do leite.....	26
3.4.5.2. Adulteração por adição de ureia.....	27
3.5. TÉCNICAS PARA IDENTIFICAR ADULTERAÇÕES.....	28
3.5.1. Técnicas que envolvem medidas elétricas.....	29
3.6. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA.....	30
3.6.1. Fundamentos.....	30
3.6.2. Circuitos equivalentes.....	32
3.6.3. Diagramas de Bode e Nyquist.....	32
3.6.4. Interface eletrodo-líquido.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. MATERIAIS.....	34
4.1.1. Coleta das amostras.....	34
4.1.2. Adulteração com ureia.....	36
4.2. MÉTODOS.....	36
4.2.1. Medidas do espectro.....	36
4.2.2. Circuitos equivalentes.....	37
4.2.2.1. Circuito equivalente de Becchi-Helmholtz.....	37
4.2.2.2. Circuito equivalente com o elemento de fase constante.....	37
4.2.2.3. Circuito contendo dois capacitores para a camada dupla.....	38

4.2.2.4. Circuito ressonante em paralelo.....	39
4.2.3. Regressão não linear.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA.....	41
5.2. COMPARAÇÃO DOS MODELOS DOS CIRCUITOS EQUIVALENTES.....	42
5.3. DIAGRAMAS DE BODE E NYQUIST.....	47
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICE A – ÍNDICES ESTATÍSTICOS OBTIDOS APÓS O AJUSTE DOS MODELOS DE CIRCUITOS EQUIVALENTES.....	59

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento nutritivo e saudável, sendo considerado uma fonte importante de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais (NEUMANN et al., 2002). Diversas características indicam a boa qualidade do leite. Dentre essas, se incluem a ausência de micro-organismos patogênicos, uma baixa contagem de células somáticas, estar livre de sedimentos e matérias estranhas, apresentar um sabor levemente adocicado livre de sabores e aromas estranhos e estar de acordo com os padrões legais estabelecidos para o mínimo de gordura, sólidos totais e sólidos desengordurados. Os programas de qualidade do leite têm por objetivo assegurar a qualidades nutricionais, que o sabor e a aparência originais sejam preservados e que micro-organismos patogênicos ou deteriorantes não estejam presentes (CHAPAVAL, 2000).

Caso o produto seja adulterado, além do prejuízo econômico, a qualidade do produto é comprometida e o consumidor pode estar sujeito a danos severos à sua saúde. Podem ser encontrados na literatura especializada vários casos de adulteração de leite através da adição de diferentes substâncias (POONIA et al., 2017). Entre os adulterantes utilizados no leite podem ser mencionadas substâncias como água, proteínas e gorduras que fazem parte da constituição original do produto. Além disso, também são adicionados compostos que não fazem parte da composição original do leite, tais como proteínas de soro de leite, melamina e ureia, gorduras de origem vegetais ou animais, agentes reconstituintes (óleos, açúcar de cana, gorduras animais), agentes espessantes (amido, glicose, sal), agentes de conservação (formalina, carbonato de sódio, peróxido de hidrogênio) e muitos constituintes menores da gordura do leite que já foram empregados como potenciais adulterantes do leite e produtos lácteos (POONIA et al., 2017, JAMWAL et al., 2020).

A prática mais comum para adulteração de leite consiste em sua mistura com água seguida da adição de ureia com o objetivo de recompor a porcentagem proteica do produto, a qual foi reduzida devido à adição de água (KHAN et al., 2015; AZAD; AHMED, 2016). Diversos tipos de sensores para detecção de ureia em leite baseados em diferentes técnicas analíticas têm sido estudados. Alguns destes sensores são baseados em medidas de condutância (SADAT et al., 2006), medidas espectrofotométricas (PARADKAR et al., 2000) e medidas potenciométricas (TRIVEDI et al., 2009). Também foram empregadas técnicas mais sofisticadas como cromatografia gasosa (XINHUA DAI et al., 2010), cromatografia

líquida associada com espectrometria de massa (ABERNETHY; HIGGS, 2013) e espectroscopia Raman no infravermelho próximo (KHAN et al., 2015) para identificar ureia no leite.

Entretanto, essas técnicas são limitadas ou pelos altos custos, os quais podem ser proibitivos para empresas de médio ou pequeno porte ou, no caso dos sensores, pela exigência de um pré-tratamento extensivo nas amostras de leite cru, pela faixa estreita de concentração de adulterantes passível de identificação e pela pequena estabilidade operacional, uma vez que é observada uma redução no desempenho dos instrumentos de cerca de 50% em 30 dias (KHAN et al., 2015).

Neste contexto, a Espectroscopia por impedância elétrica (EIS) é um método promissor para a detecção de adulterantes em alimentos. Trata-se de uma técnica não destrutiva, de baixo custo de aplicação e de implementação relativamente simples (LOPES et al., 2018). Essencialmente, a EIS consiste na aplicação de sinais de corrente alternada de diferentes frequências à amostra, sendo que a resposta mensurada é a impedância elétrica, a qual é dependente da frequência (CIUCCI, 2019; STUPIN et al., 2020). O processamento e posterior análise dos dados medidos consiste na construção de um modelo de circuito equivalente composto por elementos capacitivos e resistivos distribuídos de uma forma particular (MIYANO et al., 2020). A impedância elétrica equivalente desse circuito modelo deve exibir a mesma dependência com a frequência que os valores medidos da impedância (SINDHUJA et al., 2016; DAS et al., 2017). Em seguida, os valores dos elementos capacitivos e resistivos são obtidos através do ajuste da impedância equivalente do circuito modelo aos resultados experimentais e os valores obtidos são interpretados assumindo-se um quadro físico do sistema sob estudo (GROSSI; RICCÒ, 2017; MIYANO et al., 2020).

Embora esta técnica tenha mais de um século de existência, seu emprego se tornou mais difundido apenas na década de 1980 graças ao desenvolvimento de equipamentos digitais que possibilitaram a realização de medidas mais rápidas e fáceis, além de proporcionarem uma maior capacidade de processamento e análise de dados (GROSSI; RICCÒ, 2017). A aplicação da EIS na área de Ciência dos Alimentos é ainda mais recente, sendo encontrados estudos descrevendo sua aplicação para determinar o estágio de maturação de kiwis (BAUCHOT et al., 2000), para caracterizar e identificar adulterantes em óleos vegetais (LIZHI et al., 2008; 2010) e para avaliar a qualidade de carne de peixe (FUENTES et al., 2013). No que diz

respeito ao leite e produtos lácteos em geral, conforme será detalhado adiante, podem ser encontrados alguns estudos relacionando a composição do leite com as suas propriedades elétricas. Entretanto, a quantidade de estudos versando sobre a aplicação da EIS para a identificação de adulterantes no leite ainda é escassa e não possibilita a validação e verificação de sua eficiência e seu limite de detecção.

Portanto, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a eficiência da técnica de EIS para identificar a adulteração de leite cru com diferentes concentrações de uréia bem como identificar seu limite de detecção. Espera-se obter um entendimento mais amplo de seus pontos fortes e fracos de forma a possibilitar a aplicação dessa técnica por empresas de pequeno e médio porte do setor lácteo resultando em ganhos econômicos e no consumo de produtos mais seguros pelos consumidores.

## **2 OBJETIVOS**

A seguir serão apresentados os objetivos deste trabalho.

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficiência da aplicação da Espectroscopia por Impedância Elétrica para identificar a adição de ureia como adulterante no leite cru em dez concentrações diferentes.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar qual o modelo de circuito elétrico equivalente que melhor explica os resultados experimentais.
- Identificar a concentração mínima de ureia que pode ser identificada através da técnica.
- Analisar o comportamento da solução coloidal formada por leite e ureia em diferentes concentrações.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção são apresentadas algumas informações sobre a produção de leite, sua composição química, as práticas e técnicas de identificação de adulteração do produto seguido de uma descrição da técnica de espectroscopia de impedância elétrica.

#### 3.1 A PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

O leite é considerado o alimento ideal para o consumo humano devido ao seu alto valor nutritivo. Trata-se de um alimento completo e equilibrado, rico em gorduras, proteínas, vitaminas e minerais (PEREIRA, 2014). As pessoas consomem leite produzido por animais como vaca, búfalo, cabra e ovelha. Produtos lácteos de diferentes animais têm suas próprias composições específicas, sendo que o leite bovino é o mais consumido no mundo (PHAM et al., 2020). O leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, e o agronegócio do leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população brasileira (IBGE, 2018).

No Brasil, segundo a Instrução Normativa Nº 62 do MAPA 2011, entende-se por leite o produto oriundo de ordenha completa e ininterrupta em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. (MAPA, 2011). O leite cru de boa qualidade deve estar isento de detritos e sedimentos, sem sabores, cor e odor anormais, com baixa contagem bacteriana e livre de produtos químicos como, por exemplo, antibióticos, detergente. A qualidade do leite fresco é determinada por medidas dos sólidos do leite, e teor de proteínas que são os principais fatores considerados para o cálculo do pagamento ao fornecedor (ABERNETHY; HIGGS, 2013; KAPAJ; DECI, 2017).

Embora seja um alimento com alto valor nutricional, o leite tem uma vida útil curta, necessitando etapas específicas de processamento, como a pasteurização, para aumentar seu prazo de validade e estar apto para o consumo (KAPAJ; DECI, 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Em linhas gerais, como o leite é uma substância frágil, preservar a sua qualidade desde a ordenha até o processamento na indústria de laticínios sempre foi um desafio.

O Brasil, apesar de ser um grande importador de lácteos, abriga um dos maiores rebanhos leiteiros produtivos comerciais do mundo com 123,5 milhões de cabeças em 2018, atrás apenas da Índia (IBGE, 2018). Neste mesmo ano, a produção brasileira foi de 33,8 bilhões de litros de leite com uma produtividade média de 2.069 litros/vaca/ano. Neste cenário, o estado de Santa Catarina ocupou posição de destaque com produtividade superior a 3.200 litros/vaca/ano (IBGE, 2018).

### 3.2 A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE

O leite bovino é uma suspensão coloidal contendo glóbulos emulsionados de gordura, um conjunto heterogêneo de proteínas maiores e menores, carboidratos, lactose, minerais, vitaminas e enzimas. Embora seus constituintes sejam análogos para o leite da maioria das espécies, existem diferenças consideráveis na concentração de cada constituinte por espécie de animal (TAMIME, 2009).

Mesmo o leite bovino fresco apresenta uma variação considerável na sua composição e propriedades, sendo que os fatores principais que contribuem para a ocorrência dessa variabilidade incluem fatores genéticos (por exemplo, raça e indivíduo), estágio da lactação, estado de saúde do animal e fatores ambientais (por exemplo, alimentação, clima ou método de ordenha). O estado de saúde do animal também exerce influência considerável na produção e composição do leite. O estro e a gestação afetam especialmente a produção de leite. A mastite, por exemplo, que é uma grave inflamação da glândula mamária resultante da entrada de bactérias patogênicas, afeta a composição do leite, bem como a produção de leite. Vários são os fatores ambientais que afetam a produção e composição do leite, tais como climas extremos, estresse, exaustão, alojamento, técnica e frequência de ordenha (TAMIME, 2009).

Dos componentes do leite, o que há em maior proporção é a água, sendo que os demais são formados principalmente pela gordura, proteínas, carboidratos, sendo todos sintetizados na glândula mamária. Existem também pequenas quantidades de substâncias minerais, substâncias hidrossolúveis transferidas diretamente do plasma sanguíneo, proteínas específicas do sangue e traços de enzimas (TRONCO, 2003).

A composição clássica do leite, é de 87,5% de água e 12,5% de matéria seca total. Desse total, 3,6% são de gordura, 3,0% de caseína (proteína), 0,6% de albumina, 4,6% de lactose e 0,7% de minerais, sendo que a concentração destes constituintes varia entre animais e raças. A cor branca deve-se ao resultado da dispersão da luz em proteínas, gorduras, fosfatos e citrato de cálcio (TRONCO, 2003; JENKINS; MCGUIRE, 2006).

A gordura é um dos principais componentes e geralmente constitui de 3 a 5% (m/m) do leite bovino. Ela é composta de 95 a 98% de triglicerídeos e entre 1 e 2% de fosfolipídios, dependendo do animal, da dieta e do estágio da lactação, sendo o componente do leite que apresenta maior variação. Maiores concentrações de ácidos graxos saturados e menores concentrações de ácido graxos insaturados de cadeia longa são encontrados nos triglicerídeos em relação aos fosfolipídios (YE et al., 2002). A gordura tem sido umas das características mais frequentes alvo de adulteração pelo seu valor na produção de derivados de leite e para compensar o efeito de fraudes por diluição (RANI et al., 2015).

O tamanho médio dos glóbulos de gordura é aproximadamente de 4 micrômetros, produzindo uma superfície da aproximadamente 100 m<sup>2</sup>/litro. Esta grande superfície explica a reatividade extremamente alta da gordura e também sua elevada digestibilidade (EVERS, 2004; SMOCZYNSKI et al., 2012). As propriedades de cristalização e o ponto de fusão da gordura são altamente influenciados pela composição de ácidos graxos, pois a temperatura de fusão aumenta com o comprimento da cadeia de ácidos graxos e o nível de saturação. Dessa forma, a composição de ácidos graxos é importante para a produção de derivados lácteos ricos em gordura saturada como a manteiga (SINGH, 2006). A lactação altera significativamente o perfil de ácidos graxos, portanto, grandes variações sazonais na textura da manteiga podem ser percebidas em países onde a produção de leite é sazonal (TAMIME, 2009; TRONCO, 2003).

A proteína total do leite é composta por proteínas sintetizadas na glândula mamária e por proteínas derivadas do sangue. Aproximadamente 90% da proteína total do leite é composta por caseína e proteínas do soro lácteo,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, as quais são sintetizadas a partir de aminoácidos essenciais do sangue e aminoácidos não essenciais produzidos pela própria célula secretora. Dos outros 10% da proteína total, as principais são a albumina e globulinas, as quais não são sintetizados na glândula mamária e são transportadas para o leite via sangue até entrarem no lúmen alveolar (GOULDING et al., 2020).

A caseína é a principal proteína do leite e é definida como uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e ao fosfato que pode ser coagulada por ação de ácidos, coelho e/ou álcool. É um grupo de fosfoproteínas específicas que apresentam baixa solubilidade em pH de 4,6 (REHAN et al., 2019). É formada por várias submicelas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  que são unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas, apresentando comportamento distinto frente ao cálcio: as frações  $\alpha$  e  $\beta$  são sensíveis, enquanto a fração  $\gamma$  é insensível ao cálcio, efeito que desaparece se as duas partes da molécula se separam por ação da renina ou quimosina (TRONCO, 2003).

A lactose é o principal açúcar do leite, sendo que sua concentração é variável, dependendo tanto da raça do animal quanto do grau de infecção do úbere e estágio de lactação. A lactose e os íons solúveis  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são os principais responsáveis pela pressão osmótica do leite (LEITNER et al., 2006).

O leite também é consumido como suporte alimentar por apresentar vitaminas de base para a nutrição humana. Fazem parte de sua composição vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (B e C), além do caroteno precursor da vitamina A e substâncias minerais como cálcio e fósforo que são importantes pela sua função estrutural nos ossos em crescimento do esqueleto dos jovens e na reposição dos idosos (GAUCHERON, 2011). Além disso, também encontram-se no leite teores consideráveis de cloro, fósforo, potássio, sódio, e magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês, formando sais orgânicos e inorgânicos (PEREIRA, 2014).

### 3.3 ADULTERAÇÃO DE LEITE

A adulteração de alimentos é uma prática antiga que se tornou mais sofisticada ao longo das décadas. A autenticidade dos produtos derivados de leite transformou-se em uma questão de suma importância para produtores, indústria, pesquisadores, governantes e consumidores, devido aos crescentes episódios de fraudes que induzem à perda econômica e afetam a confiança dos consumidores na cadeia produtiva (KAMAL; KAROUI, 2015).

Entende-se por adulteração a ação que compromete intencionalmente a qualidade dos alimentos comercializados, pela adição de misturas ou substituição de substâncias inferiores ou pela remoção de algum ingrediente valioso (BREITENBACH et al., 2018). O leite é um dos alimentos mais vulneráveis pela facilidade de ser adulterado, como por exemplo, através da adição de ingredientes com baixo valor como água e soro de leite com o objetivo de aumentar o volume e conseqüentemente o ganho na comercialização (AYVAZ; TEMIZKAN, 2018; DAS et al., 2015; JAISWAL et al., 2017).

A finalidade da adulteração do leite bovino é mascarar os valores reais dos parâmetros de qualidade e/ou aumentar a vida útil do produto. Este procedimento inclui a adição de substâncias tóxicas, como formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito, dicromato, ácido salicílico, melamina e ureia. Também é comum a adulteração por adição de qualquer substância que altere a composição, sendo as mais frequentes a adição de água, misturas de leites de diferentes espécies, como búfalas e cabras, reposição de gordura e modificação da proteína introduzindo um adulterante rico nestes componentes, como melamina e ureia (MONCAYO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2017). Os principais procedimentos de controle de qualidade do leite e seus derivados na indústria incluem análise organoléptica, como aparência, paladar e olfato, análise composicional (gorduras, sólidos e conteúdo de proteínas), ensaios físicos e químicos, tais como a avaliação da densidade, índice crioscópico, porcentagens de gordura e extrato seco desengordurado. juntamente com a análise de adulterantes e detecção de fraude. Entretanto, esses métodos não são capazes de detectar todas as adulterações possíveis e em diferentes concentrações no leite (TOHIDI et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2020).

A prática da adição de substâncias adulterantes especificamente no leite, a fim de aumentar seus lucros não é um assunto novo, uma vez que recentemente tem atraído mais atenção em todo o mundo. No Brasil, os casos recentes de fraude em laticínios, amplamente divulgados pela mídia, criaram um alerta nos setores produtivo e de consumo. Frente a esses acontecimentos, o Ministério Público e o Ministério da Agricultura do Brasil criaram uma operação chamada “Leite Compensado 1” em 2013, que em 2017 estava em sua 12ª fase. Nesta operação foram descobertos casos que investigaram fraudadores em todos os elos da cadeia de produção de leite que tiveram suspensão de suas atividades ou mandados de busca resultando em apreensão e prisões (BOTELHO et al., 2015; BREITENBACH et al., 2018).

Em conformidade com a operação “Leite Compensado 1”, 100 amostras de leite UHT brasileiro foram analisadas e observaram-se altas taxas de não conformidades, sendo 55% para ureia, 44% para formaldeído, 30% para o peróxido de hidrogênio e 12% para o cloro (SOUZA et al., 2011). Uma revisão sistemática recente abordando os casos de adulteração de alimentos no Brasil revelou que 38% dos casos estavam relacionados ao leite e produtos lácteos em geral (TIBOLA et al., 2018).

### 3.4 TIPOS DE ADULTERAÇÃO NO LEITE

Normalmente, a adulteração no leite envolve a diluição e/ou adição de produtos baratos, de baixa qualidade e às vezes perigosos para aumentar o volume como no caso da adição de água. Outras substâncias são frequentemente usadas para para aumentar a vida útil do produto, como formaldeído, peróxido de hidrogênio, hipoclorito, dicromato e ácido salicílico. O teor de gordura também é alvo de fraudes, por se tratar de um componente com alto valor agregado no preço do produto, sendo objeto de adulteração com óleos vegetais e surfactantes. A adulteração quanto ao teor de proteína abrange a adição de compostos com elevado teor de nitrogênio. Neste caso, melamina, ureia e soro de leite são os principais adulterantes devido ao alto teor de nitrogênio e baixo custo destes compostos (LU et al., 2017).

#### 3.4.1 Adulteração para aumentar a vida útil

É um dos procedimentos mais comuns de adulteração do leite e que abrange a adição de substâncias que diminuem o crescimento microbiano e conseqüentemente aumentam a vida útil do produto. Este grupo inclui diversas substâncias, como peróxido de hidrogênio, formaldeído, hipoclorito e ácido salicílico. Essas substâncias são tóxicas para humanos e seu monitoramento é indispensável para um bom controle de qualidade. Entretanto, não é uma tarefa fácil de detecção, dificultada pela diversidade de substâncias utilizadas (NASCIMENTO et al., 2017).

O uso de ácido salicílico em animais produtores de leite para o consumo humano é proibido. Entretanto, este composto pode ser introduzido na cadeia alimentar de animais e baixas quantidades podem ser encontradas no leite para consumo humano. Caso sejam obtidos montantes mais altos, considera-se que houve adulteração (GENTILI et al., 2012).

O formaldeído (HCHO) é adicionado ao leite por ter efeito conservante e propriedades antissépticas. Portanto, ele é capaz de melhorar a aparência do produto apesar de reduzir o seu valor nutricional (WAHED et al., 2016). É um gás incolor à temperatura ambiente, com um odor característico forte e altamente inflamável. Sua adição aos alimentos é altamente tóxica para seres humanos causando danos à saúde incluindo a irritação dos olhos e trato respiratório, dores de cabeça, náusea, sonolência e reações alérgicas da pele. Além disso, o formaldeído é classificado como uma substância cancerígena. Os limites de formaldeído no leite ainda não foram estabelecidos pelas agências reguladoras, mas a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece que a concentração nos alimentos pode variar entre 3 e 27 mg/kg (NASCIMENTO et al., 2015; DE FREITAS REZENDE et al., 2017). No Brasil, a determinação de formaldeído no leite é realizada por um método oficial qualitativo estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2006). Porém, o limite de detecção do método é de cerca de 1 mg/kg. Isso limita sua aplicação para determinar níveis vestigiais de formaldeído (DE FREITAS REZENDE et al., 2017).

O peróxido de hidrogênio é um oxidante que é largamente empregado como agente de branqueamento em alimentos. A adulteração de leite pela adição de peróxido de hidrogênio é usada para estender o prazo de validade do produto devido à sua propriedade conservante. Esta substância é usada para cessar a atividade microbiana no leite próximo do prazo de validade ou já impróprio para consumo. Sua adição reduz o valor nutricional do produto, devido à destruição das vitaminas A e E, podendo ter efeitos prejudiciais à saúde da população em geral, principalmente indivíduos mais fragilizados como crianças, idosos e pessoas imunodeficientes. A adição de peróxido de hidrogênio ao leite pode causar vômitos, leve irritação gastrointestinal e distensão gástrica (LIMA et al., 2020).

### **3.4.2 Adulteração por substâncias reconstituintes da densidade**

Essa adulteração é geralmente associada com outra adulteração, como no caso da adição de amido, a qual ocorre com a intenção de mascarar a adição extra de água. Nesse exemplo, o amido é usado como espessante para aumentar o teor de sólidos do leite adulterado. De modo geral, a detecção desses adulterantes no leite é realizada por métodos físico-químicos baseados em reações específicas ou diferenças no ponto de congelamento e gravidade específica. Estes métodos costumam ser demorados e trabalhosos, além de não produzirem resultados precisos. Os métodos convencionais requerem grande número de testes, reagentes e um longo tempo. Vale a pena ressaltar que eles também geram grandes quantidades de resíduos (BARBANO et al., 2015).

### **3.4.3 Adulteração para aumentar o teor de gordura**

É uma das principais adulterações devido à sua importância em especial na produção de derivados de leite, como a manteiga e também por compensar o efeito de fraudes por diluição. Nesse contexto, os principais adulterantes são os óleos vegetais, como soja, girassol, amendoim, coco, palma e amendoim e gordura animal como sebo de vaca e banha de porco (UPADHYAY et al., 2015).

A gordura do leite é um dos componentes mais caros do leite. Deste modo, a sua caracterização é importante para garantir a qualidade do leite. A detecção da adição intencional de óleos vegetais é difícil devido à variação na composição química desses óleos. Ressalta-se também que o consumo de certas formas de óleo de palma tem sido associado a riscos para a saúde para os consumidores (MBA et al., 2015). Outra dificuldade reside no fato que detectar a adulteração com gordura animal é difícil porque sua composição química é semelhante à gordura do leite (REBECHI et al., 2016). Um método conveniente para identificar a presença de gordura adulterada no leite pode ser a determinação dos perfis de esterol. Neste caso, é considerado que a presença de fitoesteróis deve indicar a presença de gordura adulterada no leite (MARIKKAR et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017).

### **3.4.4 Adulteração para aumentar o volume**

Essa adulteração normalmente envolve a diluição e/ou adição ao leite de produtos baratos, de baixa qualidade e muitas vezes perigosos à saúde. O caso mais comum envolve a adição de água para aumentar o volume da amostra. A adição de água tem apenas efeitos econômicos e nutricionais e não produz nenhum risco à saúde desde que a mesma seja potável (MONCAYO et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2017).

Quando adicionada, a água aumenta o volume do leite mudando sua densidade, o índice de refração do lactoserum e o mais importante, seu ponto de congelamento. Portanto esta fraude pode ser detectada pela determinação do ponto de congelamento, pois a diluição do leite provoca seu aumento para 0 °C (POONIA et al., 2017; TAMIME, 2009).

### **3.4.5 Adulteração no teor de proteína**

Este tipo de adulteração visa promover o aumento do teor de nitrogênio artificialmente do leite fresco pelo acréscimo de compostos ricos deste elemento em sua composição para elevar seu valor econômico (ABERNETHY; HIGGS, 2013). Esse tipo de adulteração é muito comum porque não é possível distinguir-se o nitrogênio não proteico pelos métodos de Kjeldahl e Dumas, que são na maioria das vezes usados para determinar o teor total de proteínas em produtos lácteos devido ao seu baixo custo. Como esses métodos não podem distinguir entre nitrogênio na proteína do leite e outros compostos de nitrogênio, métodos de testes mais sofisticados são necessários para a detecção sensível desses compostos no leite (WU; ZHANG, 2013; NIEUWOUDT et al., 2016). Por essa razão, métodos analíticos que conseguem detectar a quantidade de nitrogênio não proteico no leite podem ser alternativas úteis e têm sido pesquisados com o intuito de sua validação para diferentes concentrações de adulterantes (DEVRIES et al., 2017).

#### **3.4.5.1 Adulteração com melamina e soro do leite**

A melamina é um composto orgânico rico em nitrogênio, o qual é frequentemente usado para aumentar o teor aparente de proteínas do leite líquido e em pó (GUERREIRO et al., 2018). Recentemente, esse adulterante atraiu atenção como resultado de vários incidentes de segurança alimentar, tendo sido relatados casos de insuficiência renal e mortes de crianças devido à ingestão de leite adulterado (DE ARAUJO; PAIXÃO, 2014).

O soro de leite é um subproduto muito barato da fabricação do queijo que é adicionado ao leite líquido, não apenas para aumentar o volume, mas também o teor de proteínas. A adição de soro de leite pode não causar riscos à saúde, mas engloba fatores econômicos, nutricionais e implicações legais (BILGE et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017). Como o soro de leite retém muitas propriedades naturais do leite, a adulteração de leite com soro de leite é difícil de detectar. As metodologias tradicionais para monitorar essa fraude são baseadas na análise de caseinomacropeptídeo (DAS et al., 2015; DE CARVALHO et al., 2015; OLIVEIRA MENDES et al., 2016).

#### **3.4.5.2 Adulteração por adição de ureia**

A ureia é outro composto de baixo custo comumente usado para elevar o teor de nitrogênio do leite, de forma a aumentar o conteúdo aparente de proteínas. Ela também é adicionada ao leite para proporcionar brancura, aumentar a consistência e padronizar o teor de sólidos não gordurosos para o valor esperado do leite natural (POONIA et al., 2017; ZHAO et al., 2019). A concentração desse composto naturalmente presente no leite está na faixa de 18 a 40 mg/dL. A ureia é uma molécula pequena, solúvel em água e que se difunde facilmente do tecido mamário para o leite. O grande número de moléculas de água presentes no leite natural interage com algumas moléculas de uréia formando uma estrutura especial de aglomerado de água-uréia (NAIK et al., 2015; ZHAO et al., 2019). Como tanto a ureia quanto a água são moléculas polares e com estruturas semelhantes, a similaridade no comportamento dielétrico do leite com adição intencional de ureia e o leite natural pode dificultar a detecção e a distinção quantitativa das fraudes (NASCIMENTO et al., 2017).

A adulteração do leite com ureia diminui o valor nutritivo e provoca uma séria preocupação para a saúde humana, sendo especialmente prejudicial para as mulheres grávidas, crianças e doentes. Além disso, a adição de grandes concentrações de ureia pode causar úlcera, câncer, indigestão, acidez e mau funcionamento do rim. Portanto, é necessário que se desenvolvam métodos simples, rápidos e econômicos para detectar adulteração de ureia no leite (RAMESH et al., 2015; MA et al., 2017).

### 3.5 TÉCNICAS PARA IDENTIFICAR ADULTERAÇÕES

O monitoramento contínuo da qualidade da indústria alimentícia é importante para dificultar as ações fraudulentas em produtos alimentícios. Essa tarefa requer o desenvolvimento de novas técnicas capazes de provar a autenticidade dos produtos (DANEZIS et al., 2016). Entretanto, os métodos de rotina geralmente aplicados nas indústrias para garantir a qualidade do leite se restringem a testes microbiológicos e ensaios que verificam se a composição nutricional do produto está dentro dos limites esperados. Por essa razão, em geral, a presença e os efeitos das substâncias adulterantes não são detectados através desses métodos.

As poucas análises voltadas para a detecção de adulterantes são baseadas em determinações físico-químicas que demandam muito tempo, requerem reagentes, geram resíduos tóxicos, contaminam as amostras e, em muitas ocasiões são incapazes de detectar fraudes em concentrações mais baixas (REANPANG et al., 2015). Para detectar possíveis adulterações economicamente motivadas, o ideal seria a realização de análises em cada lote recebido para processamento de todos os fornecedores, o que é uma tarefa desafiadora devido ao grande tamanho das amostras. Assim, é de suma importância principalmente para as indústrias o desenvolvimento de metodologias de detecção que gerem resultados rápidos e precisos (DU et al., 2018).

Neste sentido, devido à sofisticação das práticas de adulteração para leite que foram adotadas por diferentes segmentos da cadeia produtiva, vários procedimentos têm sido propostos para triagem rápida ou confirmação seletiva de qualidade e autenticidade do leite (ABERNETHY; HIGGS, 2013; COITINHO et al., 2017). Para atingir esse objetivo, há um

crescente interesse no desenvolvimento de soluções simples envolvendo instrumentos baratos, rápidos e on-line com o objetivo de detectar adulterações. Tal tendência tornou-se viável com a aplicação de ferramentas não destrutivas de medição, como nariz e língua eletrônicos, medidas de admitância e condução elétrica, biossensores, espectroscopia, processamento de imagem e ultrassom para avaliação da adulteração do leite (GHASEMI-VARNAMKHASTI et al., 2017).

Métodos analíticos também têm sido empregados para examinar a presença de adulterantes no leite. Entre esses métodos se incluem a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE), espectroscopia Raman, ressonância magnética nuclear (RMN) e scanners. Algumas dessas ferramentas são empregadas em combinação com ferramentas quimiométricas, como a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Além disso, elas podem se basear na autenticação de amostras de teste através da comparação com uma biblioteca de dados de amostra autênticos com a expectativa de que amostras adulteradas ou não autênticas sejam classificadas como *outliers* (LIMM et al., 2018; BERGANA et al., 2019). Entretanto, em um ambiente de laboratório, há dificuldade em realizar testes em tempo real, independentemente do método adotado. Portanto, é importante desenvolver metodologias, sensores e interfaces remotas para monitorar a produção de leite (DURANTE et al., 2016).

Conforme os laboratórios analíticos melhoram os métodos de detecção direcionados, os responsáveis pelas fraudes podem encontrar maneiras de enganar o sistema usando novos adulterantes que podem não serem detectados com esses métodos. Assim, é ainda mais necessário o desenvolvimento de ferramentas rápidas e não direcionadas de triagem analítica (ELLIS et al., 2015; KARUNATHILAKA et al., 2018).

### **3.5.1 Técnicas que envolvem medidas elétricas**

Diferentes estudos empregam técnicas envolvendo medidas elétricas para caracterizar o leite. Classicamente, medidas de condutividade elétrica eram utilizadas para avaliar a contagem de células somáticas e a ocorrência de mastite nos animais (NIELEN et al., 1993).

Com o passar do tempo, os trabalhos se voltaram para a avaliação de diferentes propriedades físico-químicas (GOU et al., 2006; LIU et al., 2018; NIKOLAOU et al., 2020) e microbiológicas (MARTIN et al., 2003; MANTZILA et al., 2008) do leite.

Além dos estudos mencionados, podem ser encontrados na literatura alguns trabalhos com a aplicação de sensores dielétricos para a detecção de algumas adulterações no leite, com sistemas de medição associados à quimiometria avançada para rastrear o tipo e o nível de adulteração do leite. Foram analisados sensores dielétricos como sendo uma alternativa simples, barata e não destrutiva para a autenticação das amostras. O baixo custo dos sensores é uma das principais vantagens deste método (MABROOK; PETTY, 2003b; TOHIDI et al., 2018). Neste sentido, um nariz artificial (eletrônico) baseado em oito sensores semicondutores de óxido de metal (MOS) foi desenvolvido para detectar formalina, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio em leite cru. Usando abordagens quimiométricas, vetores de características foram extraídos das respostas da matriz de sensores e usados como entradas nos modelos de reconhecimento de padrões (TOHIDI et al., 2018).

### 3.6 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA

A técnica de espectroscopia de impedância elétrica (EIS) é uma técnica cujos fundamentos remontam ao século 19 (MCDONALD, 2006). Entretanto, foi apenas no início da década de 1980 que o interesse na EIS realmente cresceu substancialmente, graças ao desenvolvimento de instrumentos digitais controlados por computador, os quais permitem medições fáceis, bem como o processamento e análise de dados complexos (GROSSI; RICCÒ, 2017; NAKONIECZNA et al., 2016). Embora medidas de impedância sejam aplicadas para a contagem de micro-organismos desde a década de 1970 (FISTENBERG; EDEN, 1983), somente recentemente é que a técnica começou a ser empregada em sistemas biológicos complexos como alimentos (DURANTE et al., 2016; GROSSI; RICCÒ, 2017).

#### 3.6.1 Fundamentos

A impedância elétrica é a oposição total que um circuito elétrico oferece à passagem de uma corrente elétrica que varia no tempo. Ela é composta por diferentes elementos como a resistência e a reatância. Geralmente, a impedância é denotada por  $Z(\omega)$  para indicar a sua dependência com a frequência angular da corrente elétrica. Do ponto de vista matemático, a impedância é composta por uma componente real e uma componente imaginária (STUPIN et al., 2020).

Caso uma corrente contínua (DC) seja aplicada a um circuito, a impedância resultante será igual à própria resistência. Caso seja aplicada uma corrente alternada (CA), a impedância será uma função da indutância, capacitância e resistência. Analogamente ao caso de um circuito com corrente contínua, as leis de Ohm e de Kirchoff também são válidas para circuitos com correntes alternadas. Entretanto, a impedância é representada por um número complexo para expressar a diferença de fase entre a corrente e o potencial. Caso a corrente esteja adiantada em relação ao potencial, diz-se que trata-se de um elemento capacitivo e caso a corrente esteja atrasada em relação ao potencial elétrico, trata-se de um elemento indutivo (HOLTO et al., 2009).

Essencialmente, a técnica consiste na aplicação de sinais de correntes alternadas com diferentes frequências à amostra e no registro da resposta. A corrente  $I(t)$  e a voltagem  $V(t)$  na amostra no estado estacionário podem ser descritas pelas seguintes expressões:

$$I(t) = \hat{I} \cos(\omega t + \theta_I) \quad (1)$$

$$V(t) = \hat{V} \cos(\omega t + \theta_V) \quad (2)$$

onde  $\omega$  é a frequência angular,  $\hat{I}$  e  $\hat{V}$  são, respectivamente, as amplitudes da corrente e da voltagem,  $t$  é o tempo,  $\theta_I$  e  $\theta_V$  são os ângulos de fase da corrente e da voltagem, respectivamente.

A corrente e a voltagem podem ser expressas no domínio da frequência angular pelas seguintes equações, nas quais  $j = \sqrt{-1}$  é a unidade imaginária.

$$I(j\omega) = \hat{I}e^{j\theta_I} \quad (3)$$

$$V(j\omega) = \hat{V}e^{j\theta_V} \quad (4)$$

A partir das Equações 3 e 4, a impedância resultante,  $Z(j\omega)$ , pode ser calculada como:

$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)} = \frac{\hat{V}}{\hat{I}} e^{j(\theta_V - \theta_I)} = |Z(j\omega)|e^{j\varphi} \quad (5)$$

onde  $|Z(j\omega)|$  é o módulo da impedância complexa e  $\varphi = \theta_V - \theta_I$  é o ângulo de fase da impedância.

A impedância também pode ser expressa em termos de sua componente real,  $Z_{\text{Re}}(\omega)$  e da componente imaginária  $Z_{\text{Im}}(\omega)$ , sendo:

$$Z(\omega) = Z_{\text{Re}}(\omega) + jZ_{\text{Im}}(\omega) \quad (6)$$

Nesse caso, valem as relações:

$$|Z(\omega)| = \sqrt{(Z_{\text{Re}}(\omega))^2 + (Z_{\text{Im}}(\omega))^2} \quad (7)$$

$$\text{tg}\varphi = \frac{Z_{\text{Im}}(\omega)}{Z_{\text{Re}}(\omega)} \quad (8)$$

Na espectroscopia por impedância elétrica, o espectro consiste no registro dos valores do módulo da impedância,  $|Z(\omega)|$ , em função da frequência  $f$ , sendo  $f = \frac{\omega}{2\pi}$ .

### 3.6.2 Circuito equivalente

Uma vez obtido o espectro dos valores da impedância em função da frequência, a etapa seguinte consiste em se construir um circuito elétrico composto por uma configuração particular de elementos resistivos, capacitivos, indutivos ou alguns elementos mais complexos e suas combinações. Esse circuito deve ser escolhido de forma que a impedância resultante do circuito equivalente em função da frequência se aproxime o máximo possível dos dados experimentais obtidos através do espectro.

Os valores numéricos dos elementos de circuito são estimados através de regressão não linear, na qual o módulo da impedância elétrica equivalente é ajustado em função da frequência. Em seguida, cada elemento do circuito é interpretado em termos dos constituintes reais do sistema físico estudado. A maior crítica à essa abordagem é que, muitas vezes, o circuito equivalente pode ser definido de forma totalmente empírica sem conexão com o sistema sob estudo. Além disso, dois circuitos com configurações bem distintas podem fornecer bons ajustes após a regressão não linear (CIUCCI, 2019). Neste caso, deve-se considerar não apenas a qualidade do ajuste, mas também as particularidades físico-químicas da amostra. Portanto, o circuito equivalente deve ser definido tanto a partir da qualidade do ajuste obtido através da regressão quanto da interpretação físico-química dos elementos de circuito em relação à amostra considerada (STUPIN et al., 2020).

### 3.6.3 Diagramas de Bode e Nyquist

Os diagramas de Bode e Nyquist são ferramentas adicionais para caracterizar o ajuste do modelo do circuito equivalente aos dados experimentais. Esses diagramas consistem na construção de gráficos do módulo da impedância equivalente ou do ângulo de fase em função do logaritmo da frequência (Diagrama de Bode) e da componente imaginária da impedância em função da componente real da impedância (Diagrama de Nyquist) (STUPIN et al., 2020). Na verdade, o Diagrama de Nyquist é uma representação paramétrica das duas componentes cujo parâmetro é a frequência. No caso do presente estudo, a comparação dos diagramas das amostras adulteradas em relação à amostra controle pode ser empregada para identificar a presença da substância adulterante.

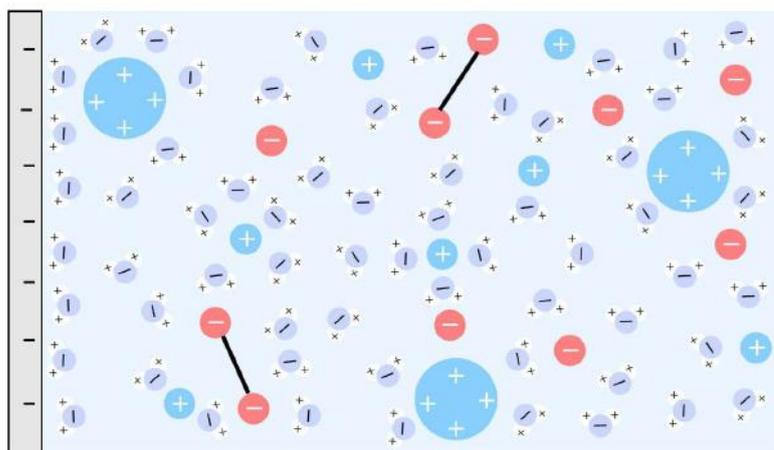
#### 3.6.4 Interface eletrodo-líquido

Um aspecto importante a ser considerado na análise de dados de espectroscopia de impedância envolve as interações na interface eletrodo-líquido. Em soluções iônicas, os íons e as moléculas de água estão em equilíbrio térmico e, na média, as interações entre ambos são independentes da direção e orientação das moléculas/íons. Entretanto, após a imersão de um eletrodo na solução iônica, há uma quebra de simetria na região que leva a um rearranjo das moléculas e íons. Caso os eletrodos sejam eletricamente carregados, os íons de carga contrária são atraídos para suas proximidades o que gera um excesso de carga na interface eletrodo-líquido (TERUYA, 2008).

Existem na literatura diferentes modelos eletroquímicos para descrever a interface eletrodo-solução iônica. Os modelos mais utilizados são aqueles que consideram que os íons solvatados se depositam sobre a superfície do eletrodo e os contra-íons (de carga com mesmo sinal que os eletrodos) são atraídos em direção aos íons solvatados formando assim duas camadas (*double layer*) (BOHINC et al., 2017). O modelo mais simples é o modelo de Helmholtz desenvolvido em 1853. Neste modelo é assumido que os contra-íons adsorvem diretamente sobre a primeira camada formando uma região compacta até que a neutralidade elétrica seja atingida (BOHINC et al., 2017). Posteriormente, modelos mais sofisticados que levam em conta efeitos de agitação térmica dos íons móveis levando a uma camada difusa foram propostos (GROß; SAKONG, 2018). A Figura 1 apresenta uma representação

esquemática do modelo de camada dupla formada na interface entre o eletrodo e a solução iônica.

Figura 1 – Representação da camada dupla formada na interface entre eletrodo e solução iônica. Neste diagrama encontram-se moléculas de água, íons positivos e negativos, além de macroíons presentes em soluções coloidais.



FONTE: BOHINC et al., 2017.

A dupla camada elétrica no circuito equivalente é modelada com a presença de um ou mais capacitores. Nesse caso, assume-se que o espaço entre as placas do capacitor está preenchido por íons de cargas opostas, sendo que cada espécie migra para as proximidades de uma das placas formando assim a dupla camada (TERUYA, 2008).

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção estão descritos os procedimentos experimentais e metodologia para a modelagem empregada.

## 4.1 MATERIAIS

No presente estudo foram utilizadas 10 concentrações diferentes de ureia, além da amostra controle conforme descrito a seguir.

### 4.1.1 Coleta das amostras

As amostras de leite foram cedidas por uma agroindústria do setor de laticínios localizada no município de Pinhalzinho/SC. Esta empresa recebe dos produtores aproximadamente 1,2 milhões de leite/dia.

Para garantir a autenticidade da amostra utilizada nesta dissertação, foram seguidos os padrões estabelecidos pela Agroindústria (ver Tabela 1). De acordo com estes padrões, inicialmente é coletada uma amostra diretamente do tanque de resfriamento das propriedades, a qual é entregue diretamente na indústria, sem passar por nenhuma etapa de resfriamento ou armazenamento em outro local e destinada para análise. A carga somente é liberada para descarga nos reservatórios, para posterior industrialização, após o laudo de recebimento estar de acordo com a legislação vigente. A cada recebimento são realizadas análises de temperatura, acidez, gordura, crioscopia, alizarol, antibióticos Betalactâmicos/Tetraciclina, densidade de extrato seco desengordurado, reconstituente de densidade ou crioscopia, inibidor de crescimento microbiológico, pesquisa de neutralizadores de acidez e antibióticos Sulfas/Aminoglicosídeos/Quinolonas.

Para o presente estudo, foram utilizados 500 mililitros de leite cru que atendiam os padrões de conformidade da empresa, os quais após serem recebidos foram armazenados a 4 °C no laboratório de Termofísica Aplicada (Apher) do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina para posterior medição da impedância elétrica.

Tabela 1 – Padrões de análise para recebimento de leite cru.

<b>ANÁLISES</b>	<b>PADRÕES</b>
Alizarol (% v/v)	Mínimo 72
Acidez (g de ácido láctico/ 100 mL)	0,14 a 0,18
Crioscopia (°H)	-0,530 a -0,555
Antibiótico (Betalactâmicos Tetraciclinas)	Negativo
Temperatura (°C)	Máximo 7,0
Extrato Seco Total (g/100g)	Mínimo 11,40
Extrato Seco Desengordurado (g/100g)	Mínimo 8,40
Gordura (g/100g)	Mínimo 3,0
Densidade a 15 °C (g/mL)	1,028 – 1,034
Reconstituente de Densidade ou Crioscopia	Negativo
Pesquisa de Substâncias Conservadoras	Negativo
Pesquisa de Neutralizadores de Acidez	Negativo

FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

#### 4.1.2 Adulteração com ureia

Foram adicionadas 10 concentrações diferentes de ureia, além da amostra controle. As massas e concentrações das soluções de ureia em leite estão apresentadas na Tabela 2. Lembrando que a ureia está presente naturalmente no leite entre de 18 a 40 mg/dL. (NAIK et al., 2015; ZHAO et al., 2019), para este estudo foram consideradas as concentrações de ureia somente adicionadas intencionalmente como adulterante, não sendo considerada a concentração natural na elaboração das soluções analisadas.

Tabela 2 – Massas e concentrações das soluções de ureia em leite usadas no estudo.

Amostra	$m_{\text{ureia}}$ (g)	$m_{\text{leite}}$ (g)	% (g/g)	[ureia] (mol/kg)	(g/g)
1	0	30	0%	0	0

2	0,2014	30,526	1%	0,1099	0,0066
3	0,5583	30,0416	2%	0,3094	0,0182
4	0,9016	31,1412	3%	0,4821	0,0281
5	1,286	31,566	4%	0,6784	0,0391
6	1,8304	30,0982	6%	1,0126	0,0573
7	2,854	30,3577	9%	1,5654	0,0859
8	3,5976	29,9986	12%	1,9969	0,1071
9	5,3569	32,5973	16%	2,7364	0,1411
10	7,7534	30,4885	25%	4,2345	0,2027
11	9,3688	30,034	31%	5,1941	0,2378

---

FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

## 4.2 MÉTODOS

Esta seção inclui dados das medições espectroscópicas, os circuitos equivalentes utilizados e informações sobre as regressões não lineares empregadas para cada circuito.

### 4.2.1 Medidas do espectro

O espectrômetro de impedância elétrica foi cedido pela empresa Bionexus Tecnologia Ltda. O espectro de impedância foi obtido em triplicata para as 11 amostras diferentes. As frequências empregadas variaram entre 100 Hz e 852000 Hz. Devido à grande variação dos resultados para as mesmas amostras, optou-se por usar a mediana dos três valores na regressão não linear.

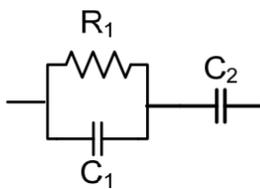
## 4.2.2 Circuitos equivalentes

No presente estudo foram usados quatro modelos de circuitos equivalentes, os quais estão descritos a seguir.

### 4.2.2.1 Circuito equivalente de Becchi-Helmholtz

Este circuito consiste na adaptação do modelo de Helmholtz com a teoria de Becchi, a qual propõe que o capacitor está composto por duas duplas camadas de íons (BECCHI et al., 2005). Nessa situação o circuito equivalente está representado na Figura 2, onde  $R_1$  e  $C_1$  correspondem, respectivamente, à resistência e capacitância da solução e  $C_2$  representa a capacitância da dupla camada elétrica.

Figura 2 – Diagrama do circuito equivalente de Becchi-Helmholtz.



FONTE: TERUYA, 2008.

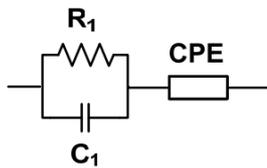
Para este circuito, a impedância equivalente é dada pela seguinte expressão:

$$Z(\omega) = \frac{R_1}{1+(\omega R_1 C_1)^2} - j \left( \frac{\omega C_1 R_1^2}{1+(\omega R_1 C_1)^2} + \frac{1}{\omega C_2} \right) \quad (9)$$

### 4.2.2.2 Circuito equivalente com o elemento de fase constante

Os elementos de fase constante (CPE, na sigla em inglês) são incluídos em um circuito para estimar efeitos como não homogeneidade ou porosidade dos eletrodos, os quais não podem ser descritos em elementos como capacitores, resistores e indutores (JORCIN et al., 2005). O circuito equivalente adotado nesta dissertação está apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Diagrama do circuito equivalente com o elemento de fase constante.



FONTE: TERUYA, 2008.

Neste circuito, a impedância equivalente é dada por:

$$Z(\omega) = \frac{R_1}{1+(\omega R_1 C_1)^2} - j \left( \frac{\omega C_1 R_1^2}{1+(\omega R_1 C_1)^2} \right) + \frac{1}{(j\omega T)^p} \quad (10)$$

onde os termos T e p são parâmetros empíricos.

Na Equação 10, o termo  $\frac{1}{(j\omega T)^p}$  representa a impedância equivalente do elemento CPE. Através da relação de Euler-De Moivre ( $e^{j\theta} = \cos\theta + j\text{sen}\theta$ ), é possível demonstrar a seguinte expressão:

$$\frac{1}{(j\omega T)^p} = \frac{1}{(\omega T)^p} \left[ \cos\left(\frac{p\pi}{2}\right) - j\text{sen}\left(\frac{p\pi}{2}\right) \right] \quad (11)$$

Dessa forma, a impedância equivalente resultante fica igual a:

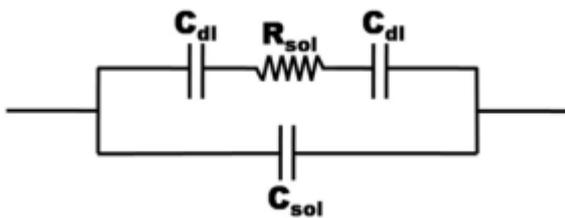
$$Z(\omega) = \frac{R_1}{1+(\omega R_1 C_1)^2} + \frac{\cos\left(\frac{p\pi}{2}\right)}{(\omega T)^p} - j \left( \frac{\omega C_1 R_1^2}{1+(\omega R_1 C_1)^2} + \frac{\sin\left(\frac{p\pi}{2}\right)}{(\omega T)^p} \right) \quad (12)$$

Caso o parâmetro  $p$  seja igual a 1, o elemento de fase constante é equivalente a um capacitor, caso seja igual a 0, trata-se de um resistor e se  $p$  for igual a -1 trata-se de um indutor. Desvios da idealidade levam a valores fracionários (JORCIN et al., 2006).

#### 4.2.2.3 Circuito contendo dois capacitores para a camada dupla

Este circuito já foi previamente empregado para estudar soluções compostas por água e sucrose (CHAKRABORTY et al., 2017) e identificar a adição de sucrose para adulteração de amostras de mel (DAS et al., 2017). A Figura 4 apresenta o diagrama do circuito.

Figura 4 – Diagrama do circuito com dois capacitores para a camada dupla.



FONTE: CHAKRABORTY et al., 2017.

Neste circuito, o módulo da impedância elétrica resultante é dado pelas equações de 13 a 15, nas quais  $C_{dl}$  é a capacitância de camada dupla,  $C_{sol}$  e  $R_{sol}$  são a capacitância e a resistência devidas à natureza dielétrica da solução, respectivamente.

$$|Z(\omega)| = \frac{|Z_1(\omega)||Z_2(\omega)|}{|Z_1(\omega)+Z_2(\omega)|} \quad (13)$$

$$|Z_1(\omega)| = R_{\text{sol}} - j \frac{2}{\omega C_{\text{dl}}} \quad (14)$$

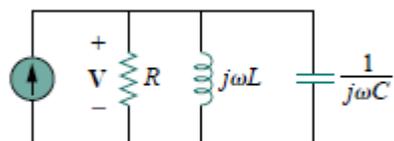
$$|Z_2(\omega)| = -j \frac{1}{\omega C_{\text{sol}}} \quad (15)$$

#### 4.2.2.4 Circuito ressonante em paralelo

Circuitos contendo capacitâncias e indutâncias podem exibir o fenômeno da ressonância, cuja intensidade depende da configuração dos elementos do circuito (ALEXANDER; SADIKU, 1996). Nesta dissertação, optou-se por um circuito constituído por uma resistência, uma capacitância e uma indutância associadas em paralelo (Figura 5). Para este circuito, a impedância equivalente resultante é dada por:

$$Z(\omega) = R - j \left( \frac{\frac{L}{C}}{\omega L + \frac{1}{\omega C}} \right) \quad (16)$$

Figura 5 – Diagrama do circuito ressonante em paralelo.



FONTE: ALEXANDER; SADIKU, 1996.

### 4.2.3 Regressão não linear

Para ajustar os dados do módulo da impedância elétrica resultante dos quatro circuitos em função da frequência foi utilizado o pacote `minpack.lm` (ELZHOV et al., 2016) do software R v. 3.6.1 (R CORE TEAM, 2019). Através deste pacote é possível utilizar o algoritmo de Levenberg-Marquardt para estimar os parâmetros nas regressões não-lineares (MARQUARDT, 1963). As estimativas iniciais dos parâmetros foram obtidas com o auxílio do pacote `nlstools` (BATY et al., 2015). Para se evitar que fossem gerados valores negativos das resistências, capacitâncias e indutâncias, foi estabelecido o vínculo que os valores desses parâmetros fossem maiores ou iguais a zero.

A qualidade dos ajustes dos quatro modelos de circuitos equivalentes foi avaliada através dos seguintes índices estatísticos: Erro Absoluto Médio (MAE, Equação 17), Raiz do Erro Quadrático Médio (RMSE, Equação 18), Critério de Informação de Akaike (AIC, Equação 19) e Critério de Informação Bayesiano (BIC, Equação 20). Nas Equações de 17 a 20,  $Z_{\text{pred},i}$  e  $Z_{\text{obs},i}$  correspondem à  $i$ -ésima predição e observação, respectivamente,  $N$  é o número total de observações experimentais,  $p$  é o número de parâmetros ajustáveis do modelo e  $\text{MSE}$  é o erro quadrático médio dado pela razão entre a soma dos quadrados dos resíduos obtidos após o ajuste do modelo e o número de graus de liberdade do modelo ( $N - p$ ).

$$\text{MAE} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Z_{\text{pred},i} - Z_{\text{obs},i}| \quad (17)$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Z_{\text{pred},i} - Z_{\text{obs},i})^2}{N}} \quad (18)$$

$$\text{AIC} = N \log(\text{MSE}) + 2p \quad (19)$$

$$\text{BIC} = N \log(\text{MSE}) + p \log(N) \quad (20)$$

Dentre esses critérios, o MAE e RMSE são empregados com frequência para avaliar modelos, sendo que ambos têm a mesma dimensão da grandeza mensurada. A aplicação do AIC e do BIC são interessantes no presente estudo porque esses critérios incluem termos que penalizam modelos com maior número de parâmetros. Portanto, a parcimônia dos modelos acaba sendo premiada por esses dois índices.

A seleção do melhor modelo de circuito equivalente que descreve os resultados experimentais envolveu os seguintes critérios: menores valores dos quatro índices estatísticos, os parâmetros estimados deveriam ser estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) e os resíduos gerados pelo modelo deveriam ser normalmente distribuídos após avaliação pelo teste de Shapiro-Wilk.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

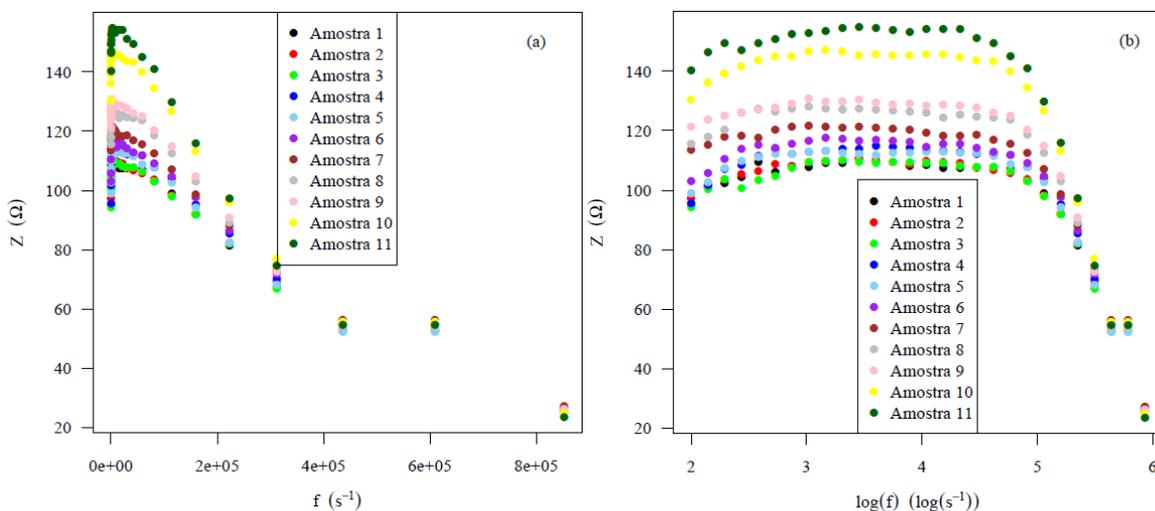
Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho e suas consequências.

### **5.1 ESPECTROS DE IMPEDÂNCIA**

As Figuras 6a e 6b apresentam os resultados obtidos para a impedância em função da frequência em escala normal e em escala logarítmica. Conforme já mencionado foram utilizados os valores da mediana da impedância devido à grande variação nos resultados das três medidas para cada amostra (entre 10% e 20%, principalmente para baixas frequências). Esta variação pode ser causada pela complexidade do leite, tendo em vista que trata-se de uma solução coloidal multicomponente composta por moléculas e íons de diferentes tamanhos (YE et al., 2002).

A análise das Figuras 6a e 6b permite verificar que para altas frequências, os valores experimentais da impedância das diferentes amostras convergem para valores muito próximos de forma que fica praticamente impossível se distinguir os resultados dos tratamentos. No caso da escala logarítmica, é mais fácil se identificar as amostras adulteradas principalmente a partir da amostra 6 (concentração de ureia de 0,0573 g/g).

Figura 6 – Espectros da impedância elétrica em função da frequência em (a) escala normal e (b) escala logarítmica.



FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

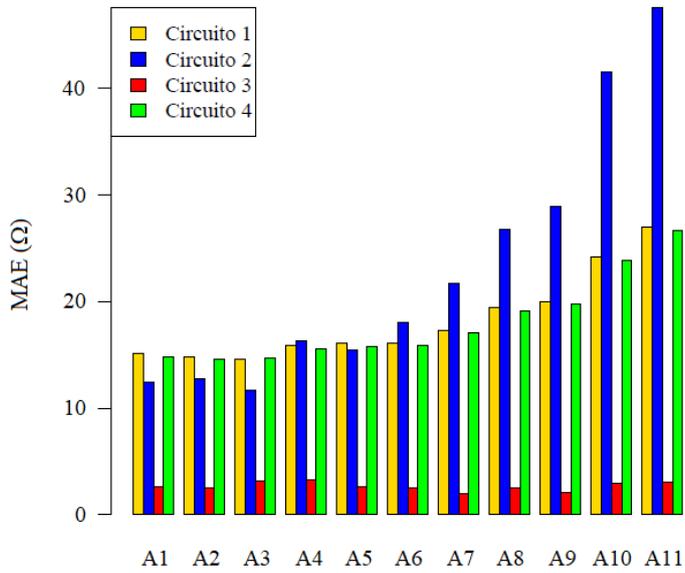
## 5.2 COMPARAÇÃO DOS MODELOS DOS CIRCUITOS EQUIVALENTES

No processo de ajuste dos modelos de circuito equivalente aos dados experimentais, a maior dificuldade foi a obtenção de boas estimativas iniciais para os parâmetros mesmo com a ajuda do pacote nlstools do software R. Não foi possível ajustar o modelo do circuito equivalente com dois capacitores para a camada dupla aos dados experimentais porque a função objetivo (mínimos quadrados) não convergiu. Após algumas tentativas, verificou-se que o ajuste convergia caso valores fixos fossem estabelecidos para o parâmetro  $C_{s01}$  antes da regressão não linear. Verificou-se que os melhores ajustes eram obtidos para valores pequenos

de  $C_{s01}$ . Por essa razão, o modelo foi ajustado para diferentes valores de  $C_{s01}$  com valores variando entre 0 e 1 com passo de 0,1. Os ajustes com melhores índices estatísticos (MAE, RMSE, AIC e BIC) foram gerados para  $C_{s01}$  igual a 0,1. Portanto, esse valor foi fixado e o modelo foi ajustado para que os demais parâmetros do modelo fossem estimados.

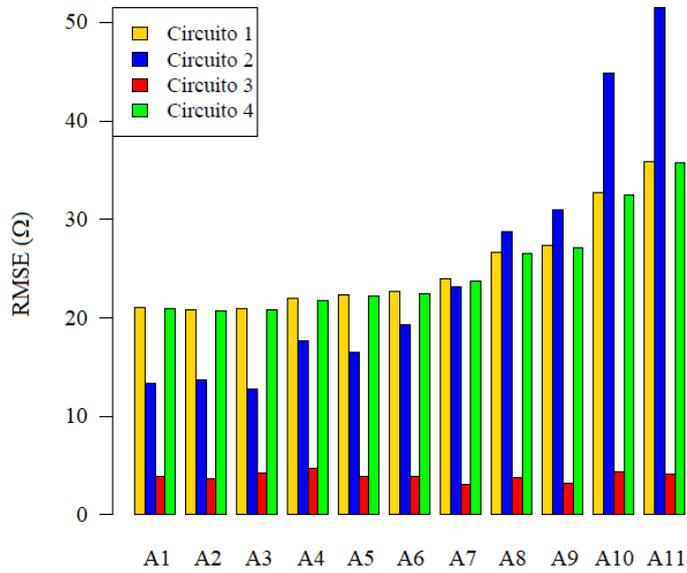
As Figuras de 7 a 10 apresentam diagramas de barra com os resultados dos índices estatísticos obtidos após os ajustes dos modelos dos quatro circuitos equivalentes (Circuito 1: Becchi-Helmholtz; Circuito 2: Elemento de Fase Constante, Circuito 3: Dois Capacitores para Camada Dupla e Circuito 4: Ressonante Paralelo) para todas as amostras (A1 até A11). Os valores individuais estão apresentados na Tabela A1 no Apêndice A. Conforme pode ser observado nas figuras, o circuito equivalente constituído pelos dois capacitores para a camada dupla gerou um ajuste melhor em relação aos demais para todos os índices e amostras considerados o que indica que a inclusão dos dois capacitores pode ser adequada para descrever a camada dupla. O modelo do circuito equivalente com de circuito ressonante em paralelo e o de Becchi-Helmholtz obtiveram um desempenho semelhantes, seguidos pelo circuito de fase constante. Além disso, observou-se que de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, os resíduos provenientes do ajuste do modelo com dois capacitores para a camada dupla podem ser considerados como normalmente distribuídos ( $p > 0,05$ ) o que reforça a hipótese de adequação do modelo para descrever os dados experimentais.

Figura 7 – Resultados obtidos para o erro absoluto médio (MAE) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.



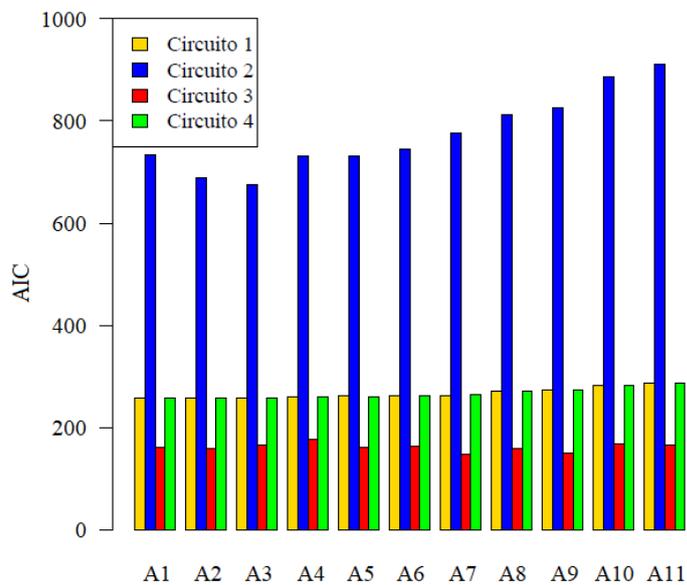
FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

Figura 8 – Resultados obtidos para a raiz do erro quadrático médio (RMSE) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.



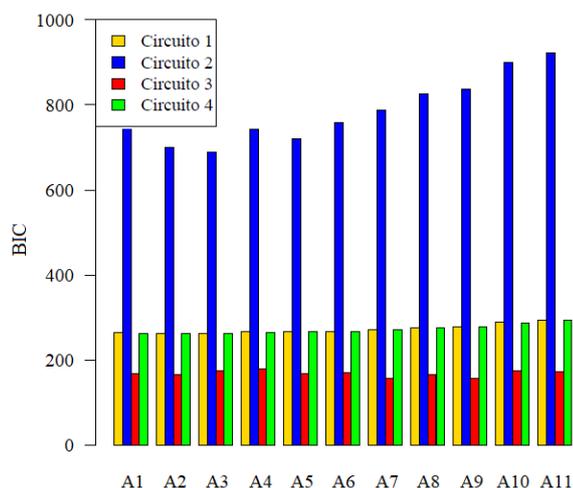
FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

Figura 9 – Resultados obtidos para o critério de informação de Akaike (AIC) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.



FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

Figura 10 – Resultados obtidos para o critério de informação bayesiano (BIC) após o ajuste dos quatro modelos para todas as amostras consideradas.



FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020

A Tabela 3 apresenta os resultados dos parâmetros obtidos após o ajuste do modelo com dois capacitores para a camada dupla para as 11 amostras. Observa-se que todos os parâmetros são estatisticamente significantes, o que confirma que trata-se do modelo mais apropriado para descrever os resultados experimentais.

Tabela 3 – Valores estimados dos parâmetros após ajuste do modelo do circuito composto por dois capacitores para a camada dupla aos dados experimentais.

Amostra	Parâmetro	Estimativa (Erro-padrão)
Amostra 1	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,07 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,63 (0,26)***
Amostra 2	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,08 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,49 (0,25)***
Amostra 3	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,07 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,59 (0,29)***

Amostra 4	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,11 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,35 (0,30)***
Amostra 5	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,11 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,65 (0,26)***
Amostra 6	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,14 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,35 (0,24)***
Amostra 7	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,19 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,40 (0,18)***
Amostra 8	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,25 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,59 (0,22)***
Amostra 9	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,28 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,56 (0,18)***
Amostra 10	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,44 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,50 (0,21)***
Amostra 11	$R_{sol}$ ( $10^2 \Omega$ )	1,52 (0,01)***
	$C_{dl}$ (pF)	5,71 (0,20)***

\*\*\* $p < 0,001$

FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

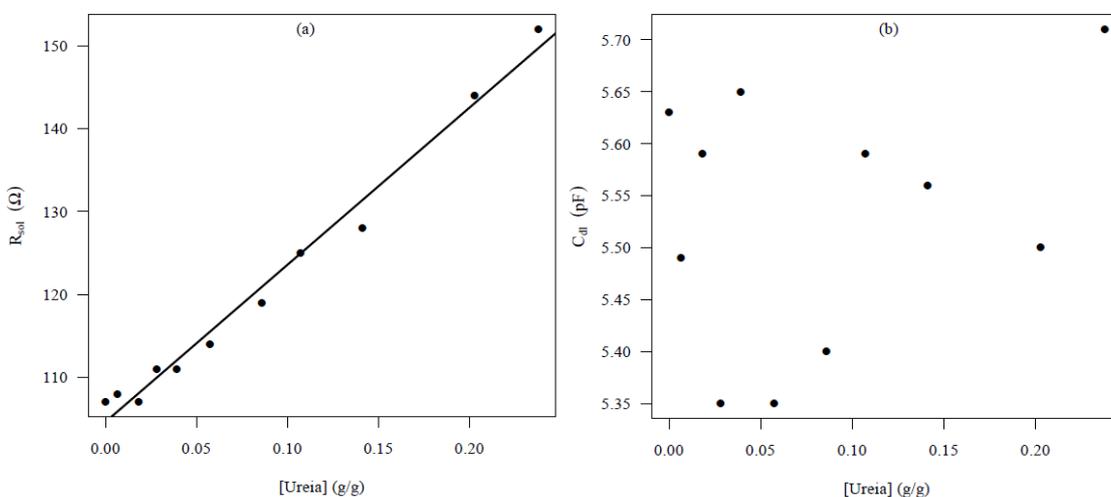
As Figuras 11a e 11b exibem os valores dos parâmetros  $R_{sol}$  e  $C_{dl}$  em função da fração mássica de ureia adicionada ao leite. A partir das Figuras 11a e 11b e da Tabela 3, verifica-se que o parâmetro  $R_{sol}$  aumenta linearmente com a fração mássica de ureia na amostra enquanto que o valor de  $C_{dl}$  não tem correlação aparente com a concentração de ureia. Este resultado para  $C_{dl}$  sugere que o valor numérico deste parâmetro se deve principalmente à aglomeração de íons e moléculas de água naturalmente presentes no leite em torno dos eletrodos e não é afetado pela adição de ureia. Por sua vez, o aumento do parâmetro  $R_{sol}$  implica que a condutividade da solução formada por leite e ureia diminui com a adição de ureia. Uma possível explicação para este comportamento se deve ao fato que mais de 80% do leite cru é constituído por moléculas de água (ZHU et al., 2014). A ureia é altamente solúvel em água e tende a formar grandes agregados moleculares ureia-água e ureia-ureia dependendo da concentração de ureia que é adicionada ao leite (LEE et al., 1995; GRDADOLNIK;

MARÉCHAL, 2002). Estes grandes agregados moleculares afetam a migração de íons na solução leite-ureia, os quais são os maiores responsáveis pela condutividade elétrica do leite (MABROOK; PETTY, 2003a; HENNINGSSON et al., 2005). Deste modo, há uma maior resistência ao movimento das cargas, a qual é caracterizada pelo parâmetro  $R_{sol}$ . A seguinte relação linear foi obtida para expressar a dependência de  $R_{sol}$  com a fração mássica de ureia na solução composta por leite e ureia:

$$R_{sol} = 104,616 + 189,657[\text{Ureia}] \quad (21)$$

A Equação 21, com coeficiente de determinação igual a 0,9844, implica que o valor de  $R_{sol}$  do leite cru (sem a adição extra de ureia) é igual a 104,616  $\Omega$ . Para cada aumento de 1 unidade na fração mássica de ureia na solução, o parâmetro  $R_{sol}$  sofre um aumento de 189,657  $\Omega$ . Portanto, a partir desta equação, verifica-se a possibilidade que este parâmetro poderia ser empregado em um equipamento digital para o cálculo em tempo real da concentração de ureia adicionada intencionalmente a uma amostra de leite cru.

Figura 11 – Gráficos dos parâmetros ajustados (a)  $R_{sol}$  e (b)  $C_{dl}$  em função da concentração de ureia.



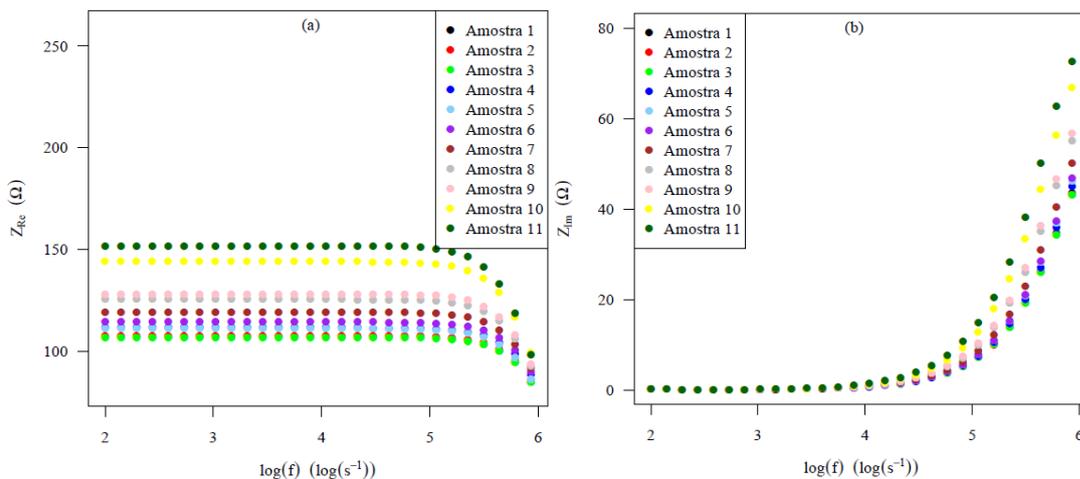
FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

### 5.3 DIAGRAMAS DE BODE E NYQUIST

As Figuras 12a e 12b apresentam os diagramas obtidos para a parte real e a parte imaginária da impedância do circuito equivalente em função do logaritmo da frequência. Conforme pode ser observado na Figura 12a, não é possível distinguir entre as amostras 1 (controle) e as amostras 2 e 3 que correspondem às frações mássicas mais baixas de ureia. Também observa-se que é possível distinguir a amostra controle das demais por simples inspeção visual.

A Figura 13 apresenta o diagrama do ângulo de fase em função do logaritmo da frequência (Diagrama de Bode) enquanto que a Figura 14 apresenta o diagrama da componente imaginária da impedância em função da componente real da impedância (Diagrama de Nyquist).

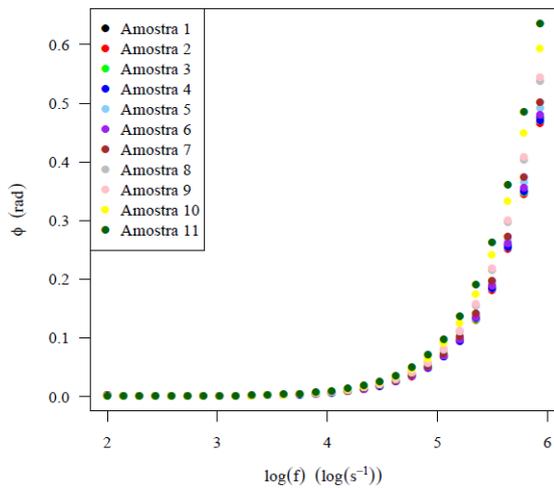
Figura 12 – Diagramas da componente (a) real e (b) imaginária da impedância elétrica em função do logaritmo da frequência para as diferentes amostras estudadas.



FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

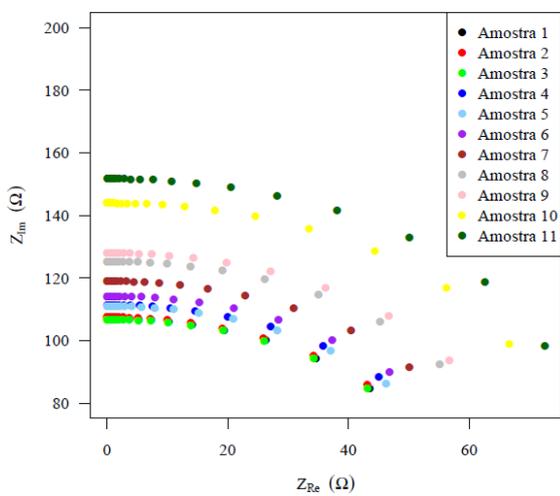
As conclusões obtidas após análise da Figura 14 são semelhantes às obtidas através da Figura 12a, ou seja, é possível se distinguir a adulteração a partir da Amostra 4. Já o Diagrama de Bode não possibilita que se visualize com nitidez a adição de ureia no leite.

Figura 13 – Diagrama de Bode para as diferentes amostras estudadas.



FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

Figura 14 – Diagrama de Nyquist para as diferentes amostras estudadas.



FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve o objetivo de estudar a aplicação da técnica de espectroscopia de impedância elétrica para a identificação da adição intencional de ureia no leite. Foi possível verificar que o modelo do circuito equivalente composto por dois capacitores fornece um bom ajuste aos dados experimentais por ser mais adequado para descrever as interações moleculares que ocorrem na interface entre o eletrodo e o leite. Também foi obtida uma relação linear entre o parâmetro correspondente à resistência elétrica da solução e a concentração da ureia, a qual pode ser útil para se quantificar a concentração de ureia na solução. Através de diagramas contendo as componentes reais e imaginárias da impedância em função do logaritmo da frequência da corrente aplicada e do diagrama de Nyquist, foi possível verificar que a técnica é eficaz para detectar concentrações de ureia a partir de aproximadamente 0,48 mol/kg, ou seja, com 3% de adição de ureia, o que corresponde a amostra 4 de acordo com a terminologia adotada nesta dissertação, um resultado importante sendo capaz identificar até mesmo adulteração com ureia em baixa quantidade.

No entanto, deve-se levar em consideração a variação na composição do leite devido a fatores como a raça leiteira, período de lactação, idade do animal, e fatores extrínsecos, como intervalo de ordenha, processo de ordenha, nível de alimentação, estação do ano. Portanto, os resultados apresentados neste estudo são apenas um método recomendado para pesquisa de medição com EIS, assim para validação do método, como sugestão para próximos estudos considerar esses fatores.

## REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, G.; HIGGS, K. Rapid detection of economic adulterants in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1288, p. 10–20, 2013.
- ALEXANDER, C. K.; SADIKU, M. N. O. Fundamentals of Electric Circuits. 2<sup>nd</sup> Edition. New York: Mc Graw Hill, 1996, 1022p.
- AYVAZ, H.; TEMIZKAN, R. Quick vacuum drying of liquid samples prior to ATR-FTIR spectral collection improves the quantitative prediction: a case study of milk adulteration.

**International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 11, p. 2482–2489, 2018.

AZAD, T.; AHMED, S. Common milk adulteration and their detection techniques. **International Journal of Food Contamination**, v. 3, p. 22, 2016.

BARBANO, D. M.; WOJCIECHOWSKI, K. L.; LYNCH, J. M. Effect of preservatives on the accuracy of mid-infrared milk component testing. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 6000–6011, 2010.

BATY, F.; RITZ, C.; CHARLES, S.; BRUTSCHE, M.; FLANDROIS, J. P.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. A toolbox for nonlinear regression in R: The package nlstools. **Journal of Statistical Software**, v. 66, n. 5, p. 1–21, 2015.

BAUCHOT, A. D.; HARKER, F. R.; ARNOLD, W. M. The use of electrical impedance spectroscopy to assess the physiological condition of kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 18, n. 1, p. 9–18, 2000.

BECCHI, M.; AVENDAÑO, C.; STRIGAZZI, A.; BARBERO, G. Impedance spectroscopy of water solutions: the role of ions at the liquid-electrode interface. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 49, p. 23444–23449, 2005.

BERGANA, M. M.; ADAMS, K. M.; HARNLY, J.; MOORE, J. C.; XIE, Z. Non-targeted detection of milk powder adulteration by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and conformity index analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 78, p. 49–58, 2019.

BILGE, G.; SEZER, B.; ESELLER, K. F.; BERBEROGLU, H.; TOPCU, A.; BOYACI, I. H. Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced breakdown spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 212, p. 183–188, 2016.

BOHINC, K.; BOSSA, G. V.; MAY, S. Incorporation of ion and solvent structure into mean-field modeling of the electric double layer. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 220–233, 2017.

BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31–37, 2015.

BREITENBACH, R.; RODRIGUES, H.; BRANDÃO, J. B. Whose fault is it? Fraud scandal in the milk industry and its impact on product image and consumption – The case of Brazil. **Food Research International**, v. 108, p. 475–481, 2018.

CHAKRABORTY, S.; DAS, C.; BERA, N. K.; CHATTOPADHYAY, D.; KARMAKAR, A.; CHATTOPADHYAY, S. Analytical modelling of electrical impedance based adulterant sensor for aqueous sucrose solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 784, p. 133–139, 2017.

CIUCCI, F. Modeling electrochemical impedance spectroscopy. **Current Opinion in**

**Electrochemistry**, v. 13, p. 132-139, 2019.

COITINHO, T. B.; CASSOLI, L. D.; CERQUEIRA, P. H. R.; SILVA, H. K.; COITINHO, J. B.; MACHADO, P. F. Adulteration identification in raw milk using Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 8, p. 2394–2402, 2017.

DANEZIS, G. P.; TSAGKARIS, A. S.; CAMIN, F.; BRUSIC, V.; GEORGIU, C. A. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 123–132, 2016.

DAS, C.; CHAKRABORTY, S.; ACHARYA, K.; BERA, N. K.; CHATTOPADHYAY, D.; KARMAKAR, A.; CHATTOPADHYAY, S. FT-MIR supported Electrical Impedance Spectroscopy based study of sugar adulterated honeys from different floral origin. **Talanta**, v. 171, p. 327–334, 2017.

DAS, S.; SIVARAMAKRISHNA, M.; BISWAS, K.; GOSWAMI, B. A low cost instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. **ISA Transactions**, v. 56, p. 268–275, 2015.

DE ARAUJO, W. R.; PAIXÃO, T. R. L. C. Use of copper electrode for melamine quantification in milk. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 379–384, 2014.

DE CARVALHO, B. M. A.; DE CARVALHO, L. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; BARCELLOS, E. S.; SILVA JÚNIOR, W. F.; DETMANN, E.; DE CARVALHO, G. G. P. Rapid detection of whey in milk powder samples by spectrophotometric and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 174, p. 1–7, 2015.

DE FREITAS REZENDE, F. B.; CHEIBUB, A. M. S. S.; NETTO, A. D. P.; MARQUES, F. F. C. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 383–389, 2017.

DEVRIES, J. W.; GREENE, G. W.; PAYNE, A.; ZBYLUT, S.; SCHOLL, P. F.; WEHLING, P.; EVERS, J. M.; MOORE, J. C. Non-protein nitrogen determination: A screening tool for nitrogenous compound adulteration of milk powder. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 46–51, 2017.

DU, L.; LU, W.; CAI, Z.; BAO, L.; HARTMANN, C.; GAO, B.; YU, L. Rapid detection of milk adulteration using intact protein flow injection mass spectrometric fingerprints combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 240, p. 573–578, 2018.

DURANTE, G.; BECARI, W.; LIMA, F. A. S.; PERES, H. E. M. Electrical Impedance Sensor for Real-Time Detection of Bovine Milk Adulteration. **IEEE Sensors Journal**, v. 16, n. 4, p. 861–865, 2016.

ELLIS, D. I.; MUHAMADALI, H.; HAUGHEY, S. A.; ELLIOTT, C. T.; GOODACRE, R.

Point-and-shoot: Rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis-moving out of the laboratory and into the food supply chain. **Analytical Methods**, v. 7, n. 22, p. 9401–9414, 2015.

ELZHOV, T.; MÜLLEN, K.; BOLKER, B. minpack.lm: R interface to the Levenberg-Marquardt non-linear least squares algorithm found in Minpack, plus support for bounds, 2016. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/minpack.lm/index.html>

EMBRAPA, 2017. *Sistema Compost Barn: caracterização dos parâmetros de qualidade do leite e mastite, reprodutivos, bem estar animal, do composto e econômicos em condições tropicais*. EMBRAPA GADO DE LEITE. Disponível em <https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-deprojetos/-/projeto/209863/sistema-compost-barn-caracterizacao-dosparametros-de-qualidade-do-leite-e-mastite-reprodutivos-bem-estar-animal-docomposto-e-economicos-em-condicoes-tropicais>.

EVERS, J. M. The milk fat globule membrane – compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 661–674, 2004.

FISTENBERG-EDEN, R. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. **Food Technology**, v. 37, p. 64-70, 1983.

FUENTES, A.; MASOT, R.; FERNANDEZ-SEGOVIA, I.; RUIZ-RICO, M.; ALCANIZ, M.; BARAT, J. M. Differentiation between fresh and frozen-thawed sea bream (*Sparus aurata*) using impedance spectroscopy techniques. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 210–217, 2013.

GAUCHERON, F. Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Composition. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 400S-409S, 2011.

GENTILI, A.; CARETTI, F.; BELLANTE, S.; ROCCA, L. M.; CURINI, R.; VENDITTI, A. Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 5, p. 1375–1388, 2012.

GHASEMI-VARNAMKHAJASTI, M.; GHATREH-SAMANI, N.; NADERI-BOLDAJI, M.; FORINA, M.; BONYADIAN, M. Development of two dielectric sensors coupled with computational techniques for detecting milk adulteration. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 140, p. 266–278, 2017.

GOULDING, D. A.; FOX, P. F.; O'MAHONY, J. A. Milk proteins: An overview. *In: Milk Proteins – From Expression to Food*. 3<sup>rd</sup> Edition, BOLAND, M.; SINGH, H. Academic Press: London, 764 p., 2020.

GRDADOLNIK, J.; MARÉCHAL, Y. Urea and urea-water solutions – an infrared study.

**Journal of Molecular Structure**, v. 615, p. 177-189, 2002.

GROSSI, M.; RICCÒ, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review. **Journal of Sensors and Sensor Systems**, v. 6, n. 2, p. 303–325, 2017.

GUERREIRO, T. M.; OLIVEIRA, D. N.; RODRIGUES MELO, C. F. O.; LIMA, E. O.; RIBEIRO, M. S.; CATHARINO, R. R. Evaluating the effects of the adulterants in milk using direct-infusion high-resolution mass spectrometry. **Food Research International**, v. 108, p. 498–504, 2018.

HENNINGSSON, M.; ÖSTERGREN, K.; DEJMEK, P. The electrical conductivity of milk – The effect of dilution and temperature. **International Journal of Food Properties**, v. 8, n. 1, p. 15-22, 2005.

HOLTO, J.; BERG, G.; LUNDGAARD, L. E. Electrocoalescence of drops in a water-in-oil emulsion. **Annual Report - Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena, CEIDP**, p. 196–199, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2018. Disponível em [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2018\\_v46\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf). Acesso em 06 de agosto de 2020.

JAISWAL, P.; JHA, S. N.; KAUR, J.; BORAH, A. Detection and quantification of anionic detergent (lissapol) in milk using attenuated total reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 221, p. 815–821, 2017.

JAMWAL, R.; KUMARI, S.; BALAN, B.; DHAULANIYA, A. S.; KELLY, S.; CANNAVAN, A.; SINGH, D. K. Attenuated total Reflectance–Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics for rapid detection of argemone oil adulteration in mustard oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 120, p. 108945, 2020.

JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1302–1310, 2006.

JORCIN, J. B.; ORAZEM, M. E.; PÉBÈRE, N.; TRIBOLLET, B. CPR analysis by local electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica acta**, v. 51, n. 8-9, p. 1473-1479, 2006.

KAMAL, M.; KAROUI, R. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 27–48, 2015.

KAPAJ, A.; DECI, E. World milk production and socio-economic factors effecting its consumption *in Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*. WATSON, R.

R.; COLLIER, R. J.; PREEDY, V. R. Academic Press: Cambridge, MA, USA, p. 107–115, 2017.

KARUNATHILAKA, S. R.; YAKES, B. J.; HE, K.; BRÜCKNER, L.; MOSSOBA, M. M. First use of handheld Raman spectroscopic devices and on-board chemometric analysis for the detection of milk powder adulteration. **Food Control**, v. 92, p. 137–146, 2018.

KHAN, K. M.; KRISHNA, H.; MAJUMDER, S. K.; GUPTA, P. K. Detection of urea adulteration in milk using near-infrared Raman spectroscopy. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 93–102, 2015.

LEE, C.; STAHLBERG, E. A.; FITZGERALD, G. Chemical structure of urea in water. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, p. 17737-17741, 1995.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U.; LAVI, Y.; SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 648–654, 2006.

LIMA, L. S.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Bioactive paper platform for detection of hydrogen peroxide in milk. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 227, p. 117774, 2020.

LIMM, W.; KARUNATHILAKA, S. R.; YAKES, B. J.; MOSSOBA, M. M. A portable mid-infrared spectrometer and a non-targeted chemometric approach for the rapid screening of economically motivated adulteration of milk powder. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 177–183, 2018.

LIU, Q.; GUO, W.; ZHU, X. Effect of lactose content on dielectric properties of whole milk and skim milk. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 2037-2044, 2018.

LIZHI, H.; TOYODA, K.; IHARA, L. Dielectric properties of edible oils and fatty acids as a function of frequency, temperature, moisture and composition. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 2, p. 151-159, 2008.

LIZHI, H.; TOYODA, K.; IHARA, L. Discrimination of olive oil adulterated with vegetable oils using dielectric spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 167–171, 2010.

LOPES, A. M.; MACHADO, J. A. T.; RAMALHO, E.; SILVA, V. Milk characterization using electrical impedance spectroscopy and fractional models. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 901-912, 2018.

LU, Y.; XIA, Y.; LIU, G.; PAN, M.; LI, M.; LEE, N. A.; WANG, S. A Review of Methods for Detecting Melamine in Food Samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 51–66, 2017.

- MA, Y.; DONG, W.; BAO, H.; FANG, Y.; FAN, C. Simultaneous determination of urea and melamine in milk powder by nonlinear chemical fingerprint technique. **Food Chemistry**, v. 221, p. 898–906, 2017.
- MABROOK, M. F.; PETTY, M. C. Effect of composition on the electrical conductance of milk. **Journal of Food Engineering**, v. 60, p. 321-325, 2003a.
- MABROOK, M. F.; PETTY, M. C. A novel technique for the detection of added water to full fat milk using single frequency admittance measurement. **Sensors and Actuators B**, v. 96, p. 215-218, 2003b.
- MANTZILA, A. G.; MAIPA, V.; PRODROMIDIS, M. I. Development of a faradic impedimetric immunosensor for the detection of *Salmonella Typhimurium* in milk. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 1169-1175, 2008.
- MARIKKAR, J. M. N.; MIRGHANI, M. E.; JASWIR, I. Application of Chromatographic and Infra-Red Spectroscopic Techniques for Detection of Adulteration in Food Lipids: A Review. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, v. 2, n. 1, p. 32–41, 2016.
- MARQUARDT, D. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. **SIAM Journal of Applied Mathematics**, v. 11, n. 2, p. 431-441.
- MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of Carbon Dioxide on bacterial growth parameters as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1932-1940, 2003.
- MBA, O. I.; DUMONT, M. J.; NGADI, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. **Food Bioscience**, v. 10, p. 26–41, 2015.
- MCDONALD, D. D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 8-9, p. 1376-1388, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução Normativa 68, Oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. 12 dez 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA 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. Instrução Normativa 62, de 29 de dezembro de 2011. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acessado 12 ago. 2020
- MIYANO, K.; YANAGIDA, M.; SHIRAI, Y. Impedance spectroscopy revisited. **Advanced Energy Materials**, v. 13, p. 132–139, 2020.

MONCAYO, S.; MANZOOR, S.; ROSALES, J. D.; ANZANO, J.; CACERES, J. O. Qualitative and quantitative analysis of milk for the detection of adulteration by Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). **Food Chemistry**, v. 232, p. 322–328, 2017.

NAIK, P. P.; MISHRA, G. K.; DANIELSSON, B.; BHAND, S. Android integrated urea biosensor for public health awareness. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 3, p. 12–17, 2015.

NAKONIECZNA, A.; PASZKOWSKI, B.; WILCZEK, A.; SZYPTOWSKA, A.; SKIERUCHA, W. Electrical impedance measurements for detecting artificial chemical additives in liquid food products. **Food Control**, v. 66, p. 116–129, 2016.

NASCIMENTO, C. F.; BRASIL, M. A. S.; COSTA, S. P. F.; PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, M. L. M. F. S.; ROCHA, F. R. P. Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid-liquid microextraction: Spectrophotometric determination of formaldehyde in milk. **Talanta**, v. 144, p. 1189–1194, 2015.

NASCIMENTO, C. F.; SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; ROCHA, F. R. P. Recent advances on determination of milk adulterants. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1232–1244, 2017.

NEUMANN, C. G.; HARRIS, D. M.; ROGERS, L. M. Contribution of animal source foods in improving diet quality and function in children in the developing world. **Nutrition Research**, v. 22, n. 1-2, p. 193–220, 2002.

NIELEN, M.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN DE BROEK, J.; BRAND, A.; DELUYKER, H. A.; MAATJE, K. Relations between on-line electrical conductivity and daily milk production on a low somatic cell count farm. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2589-2596, 1993.

NIEUWOUDT, M. K.; HOLROYD, S. E.; MCGOVERIN, C. M.; SIMPSON, M. C.; WILLIAMS, D. E. Raman spectroscopy as an effective screening method for detecting adulteration of milk with small nitrogen-rich molecules and sucrose. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2520–2536, 2016.

NIKOLAOU, P.; DESKOULIDIS, E.; TOPOGLIDIS, E.; KAKOULIDOU, A. T.; TSOPELAS, F. Application of chemometrics for detection and modeling of adulteration of fresh cow milk with reconstituted skim milk powder using voltammetric fingerprinting on a graphite/SiO<sub>2</sub> hybrid electrode. **Talanta**, v. 206, p. 120223, 2020.

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, F. C. Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 409-415, 2017.

OLIVEIRA MENDES, T.; PORTO, B. L. S.; BELL, M. J. V.; PERRONE, I. T.; OLIVEIRA, M. A. L. Capillary zone electrophoresis for fatty acids with chemometrics for the determination of milk adulteration by whey addition. **Food Chemistry**, v. 213, p. 647–653, 2016.

PARADKAR, M. M.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. An approach to the detection of synthetic milk in dairy milk: 1. Detection of urea. **International Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 3, p. 87–91, 2000.

PEREIRA, P. C. Milk nutrition composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 617–624, 2014.

PHAM, A. C.; PENG, K-Y.; SALIM, M.; RAMIREZ, G.; HAWLEY, A.; CLULOW, A. J.; BOYD, B. J. Correlating digestion-driven self-assembly in milk and infant formulas with changes in lipid composition. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 5, p. 3087–3098, 2020.

POONIA, A.; JHA, A.; SHARMA, R.; SINGH, H. B.; RAI, A. K.; SHARMA, N. Detection of adulteration in milk: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 1, p. 23–42, 2017.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

RAMESH, R.; PUHAZHENDI, P.; KUMAR, J.; GOWTHAMAN, M. K.; D'SOUZA, S. F.; KAMINI, N. R. Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized *Arthrobacter creatinolyticus* urease. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 786–792, 2015.

RANI, A.; SHARMA, V.; ARORA, S.; LAL, D.; KUMAR, A. A rapid reversed-phase thin layer chromatographic protocol for detection of adulteration in ghee (clarified milk fat) with vegetable oils. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2434–2439, 2015.

REANPANG, P.; THEMSIRIMONGKON, S.; SAYPANIA, S.; CHAILAPAKUL, O.; JAKMUNEE, J. Cost-effective flow injection amperometric system with metal nanoparticle loaded carbon nanotube modified screen printed carbon electrode for sensitive determination of hydrogen peroxide. **Talanta**, v. 144, p. 868–874, 2015.

REBECHI, S. R.; VÉLEZ, M. A.; VAIRA, S.; PEROTTI, M. C. Adulteration of Argentinean milk fats with animal fats: Detection by fatty acids analysis and multivariate regression techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1025–1032, 2016.

REHAN, F.; AHEMAD, N.; GUPTA, M. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial – A comprehensive review. **Colloids and Surfaces B – Interfaces**, v. 179, p. 280–292, 2019.

SADAT, A.; MUSTAJAB, P.; KHAN, I. A. Determining the adulteration of natural milk with synthetic milk using ac conductance measurement. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 472–477, 2006.

SINDHUJA, M.; SARAVANA KUMAR, N.; SUDHA, V.; HARINIPRIYA, S. Equivalent circuit modeling of microbial fuel cells using impedance spectroscopy. **Journal of Energy Storage**, v. 7, p. 136–146, 2016.

SINGH, H. The milk fat globule membrane – A biophysical system for food applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 1–2, p. 154–163, 2006.

SMOCZYNSKI, M.; STANIEWSKI, B.; KIELCZEWSKA, K. Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane – some nutritional and technological implications. **Food Reviews International**, v. 28, n. 2, p. 188–202, 2012.

SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; CELEGHINI, R. M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 692–695, jan. 2011.

STUPIN, D. D.; KUZINA, E. A.; ABELIT, A. A.; KONIAKHIN, S. V.; EMELYANOV, A. E.; NIKOLAEV, D. M.; RYAZANTSEV, M. N.; DUBINA, M. V. Bio-Impedance Spectroscopy: Basics and Applications. **arXiv:2005.03275 [physics.bio-ph]**, 2020, 35p.

TAMIME, A. Y. **Milk Processing and Quality Management**. John Wiley & Sons: Chichester, England. 2009, 324p.

TEIXEIRA, J. L. P.; CARAMÊS, E. T. S.; BAPTISTA, D. P.; GIGANTE, M. L.; PALLONE, J. A. L. Vibrational spectroscopy and chemometrics tools for authenticity and improvement the safety control in goat milk. **Food Control**, v. 112, p. 107105, 2020.

TERUYA, M. Y. Espectroscopia de impedância em soluções iônicas e mistura de etanol/água. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências**, 2008.

TIBOLA, C. S.; SILVA, S. A.; DOSSA, A. A.; PATRÍCIO, D. A. Economically motivated food fraud and adulteration in Brazil: Incidents and alternatives to minimize occurrence. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 8, p. 2028–2038, 2018.

TOHIDI, M.; GHASEMI-VARNAMKHAJASTI, M.; GHAFARINIA, V.; BONYADIAN, M.; MOHTASEBI, S. S. Development of a metal oxide semiconductor-based artificial nose as a fast, reliable and non-expensive analytical technique for aroma profiling of milk adulteration. **International Dairy Journal**, v. 77, p. 38–46, 2018.

TRIVEDI, U. B.; LAKSHMINARAYANA, D.; KHOTARI, I. L.; PATEL, N. G.; KAPSE, H. N.; MAKHIJA, K. K.; PATEL, P. B.; PANCHAL, P. J. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 140, n. 1, p. 260–266, 2009.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 4ª Edição. Editora UFSM: Santa Maria, Brasil. 2010, 210p.

UPADHYAY, N.; KUNAR, A.; RATHOD, G.; GOYAL, A.; LAL, D. Development of a method employing reversed-phase thin-layer chromatography for establishing milk fat purity with respect to adulteration with vegetable oils. **International Journal of Dairy Technology**,

v. 68, n. 2, p. 207–217, 2015.

WAHED, P.; RAZAAQ, M. A.; DHARMAPURI, S.; CORRALES, M. Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method. **Food Chemistry**, v. 202, p. 476–483, 2016.

WU, Y.; ZHANG, Y. Analytical chemistry, toxicology, epidemiology and health impact assessment of melamine in infant formula: Recent progress and developments. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 325–335, 2013.

XINHUA DAI, X. F.; FUHAI, S.; YANG, M.; LI, H.; ZHOU, J.; XU, R. Accurate analysis of urea in milk and milk powder by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 19, p. 1634-1638, 2010.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W.; ANEMA, S. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p. 393-402, 2002.

ZHAO, K.; LIU, Y.; ZHANG, Q. Dielectric behavior of adulterated milk with urea and water. **Journal of Molecular Liquids**, v. 273, p. 37–44, 2019.

ZHU, X.; GUO, W.; JIA, Y.; KANG, F. Dielectric properties of raw milk as functions of protein content and temperature. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 3, p. 670-680, 2014.

Tabela A1 – Índices estatísticos obtidos após o ajuste dos modelos de circuitos equivalentes.

Concentração de Ureia	Índices estatísticos					
	Circuitos Equivalentes	R <sup>2</sup>	RMSE	MAE	AIC	BIC
0 (mol/kg)	Becchi-Helmholtz	5,07E-08	2,10E+01	1,51E+01	2,58E+02	2,63E+02
	Com elemento de fase constante	8,14E-01	1,34E+01	1,24E+01	7,33E+02	7,45E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	8,99E-01	7,44E+00	5,73E+00	5,84E+02	5,93E+02
	Ressonante em Paralelo	1,58E-02	2,09E+01	1,48E+01	2,58E+02	2,63E+02
0,110 (mol/kg)	Becchi-Helmholtz	6,17E-08	2,08E+01	1,48E+01	2,58E+02	2,63E+02
	Com elemento de fase constante	8,17E-01	1,37E+01	1,27E+01	6,88E+02	7,01E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,67E-01	3,78E+00	2,56E+00	4,70E+02	4,80E+02
	Ressonante em Paralelo	1,79E-02	2,06E+01	1,45E+01	2,57E+02	2,62E+02
0,309 (mol/kg)	Becchi-Helmholtz	3,99E-08	2,10E+01	1,46E+01	2,58E+02	2,63E+02
	Com elemento de fase constante	8,00E-01	1,28E+01	1,16E+01	6,76E+02	6,88E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,43E-01	5,04E+00	4,02E+00	5,18E+02	5,28E+02
	Ressonante em Paralelo	1,86E-02	2,08E+01	1,47E+01	2,57E+02	2,63E+02
0,482 (mol/kg)	Becchi-Helmholtz	4,27E-09	2,20E+01	1,59E+01	2,60E+02	2,66E+02
	Com elemento de fase	7,89E-01	1,76E+01	1,63E+01	7,31E+02	7,43E+02

	constante					
	Com dois capacitores para dupla camada	9,54E-01	4,73E+00	3,31E+00	5,07E+02	5,17E+02
	Ressonante em Paralelo	1,56E-02	2,18E+01	1,56E+01	2,60E+02	2,65E+02
	Becchi-Helmholtz	5,00E-08	2,23E+01	1,61E+01	2,61E+02	2,67E+02
0,678 (mol/kg)	Com elemento de fase constante	7,87E-01	1,65E+01	1,54E+01	7,32E+02	7,20E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,70E-01	3,85E+00	2,64E+00	4,73E+02	4,83E+02
	Ressonante em Paralelo	1,40E-02	2,22E+01	1,58E+01	2,61E+02	2,66E+02
	Becchi-Helmholtz	5,81E-08	2,26E+01	1,61E+01	2,62E+02	2,67E+02
1,013 (mol/kg)	Com elemento de fase constante	7,82E-01	1,93E+01	1,80E+01	7,45E+02	7,58E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,70E-01	3,94E+00	2,53E+00	4,77E+02	4,87E+02
	Ressonante em Paralelo	1,67E-02	2,24E+01	1,58E+01	2,62E+02	2,67E+02
	Becchi-Helmholtz	1,34E-07	2,39E+01	1,73E+01	2,65E+02	2,71E+02
1,565 (mol/kg)	Com elemento de fase constante	7,58E-01	2,32E+01	2,17E+01	7,77E+02	7,89E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,84E-01	3,07E+00	2,02E+00	4,35E+02	4,44E+02
	Ressonante em Paralelo	1,43E-02	2,38E+01	1,71E+01	2,65E+02	2,70E+02
	Becchi-Helmholtz	7,80E-08	2,67E+01	1,94E+01	2,71E+02	2,77E+02
1,997 (mol/kg)	Com elemento de fase	7,03E-01	2,87E+01	2,67E+01	8,12E+02	8,25E+02

	constante					
	Com dois capacitores para dupla camada	9,80E-01	3,74E+00	2,48E+00	4,68E+02	4,78E+02
	Ressonante em Paralelo	1,39E-02	2,65E+01	1,91E+01	2,71E+02	2,76E+02
	Becchi-Helmholtz	1,02E-07	2,73E+01	2,00E+01	2,73E+02	2,78E+02
2,736 (mol/kg)	Com elemento de fase constante	6,92E-01	3,10E+01	2,89E+01	8,25E+02	8,37E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,87E-01	3,14E+00	2,10E+00	4,38E+02	4,48E+02
	Ressonante em Paralelo	1,21E-02	2,71E+01	1,97E+01	2,72E+02	2,78E+02
	Becchi-Helmholtz	4,96E-07	3,27E+01	2,41E+01	2,83E+02	2,88E+02
4,234 (mol/kg)	Com elemento de fase constante	6,02E-01	4,49E+01	4,15E+01	8,87E+02	9,00E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,82E-01	4,37E+00	2,99E+00	4,94E+02	5,04E+02
	Ressonante em Paralelo	1,09E-02	3,25E+01	2,38E+01	2,82E+02	2,88E+02
	Becchi-Helmholtz	5,75E-07	3,59E+01	2,70E+01	2,88E+02	2,93E+02
5,194 (mol/kg)	Com elemento de fase constante	5,57E-01	5,14E+01	4,75E+01	9,10E+02	9,23E+02
	Com dois capacitores para dupla camada	9,87E-01	4,13E+00	3,02E+00	4,85E+02	4,94E+02
	Ressonante em Paralelo	6,90E-03	3,58E+01	2,67E+01	2,88E+02	2,93E+02

FONTE: Elaborada pela própria autora, 2020.