

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

FILOMENA KARLA DE CASTRO MONTEIRO

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ADIÇÃO DE SORO EM LEITE

Juiz de Fora
2015

FILOMENA KARLA DE CASTRO MONTEIRO

**UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ADIÇÃO DE SORO EM LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Qualidade do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria José Valenzuela Bell

**Juiz de Fora
2015**

Monteiro, Filomena Karla de Castro.

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ADIÇÃO DE SORO EM LEITE / Filomena Karla de
Castro Monteiro. -- 2015.

85 p. : il.

Orientador: Maria José Valenzuela Bell
Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal
de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados,
2015.

1. espectroscopia NIR. 2. quimiometria. 3. leite cru. 4.
soro. I. Bell, Maria José Valenzuela , orient. II. Título.

FILOMENA KARLA DE CASTRO MONTEIRO

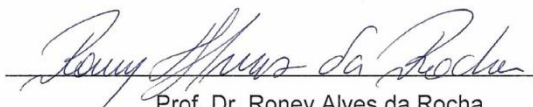
UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE ADIÇÃO DE SORO EM LEITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Qualidade do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

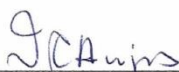
Dissertação aprovada em 03/08/2015



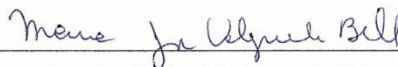
Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone
Universidade Federal de Viçosa



Prof. Dr. Roney Alves da Rocha
Universidade Federal de Lavras



Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria José Valenzuela Bell
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho a toda minha família que, com, muito carinho e apoio, sempre me incentivaram para a realização dos meus ideais, encorajando-me a enfrentar todos os momentos difíceis da vida, em especial a minha filha Érica pela contribuição para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que eu vivi e que me possibilitou chegar até aqui, que me fez ser quem eu sou.

Aos meus pais Manoel Monteiro e Maria de Lourdes, meus irmãos Carlos Manoel, Carlos Daniel e Danuza, as minhas cunhadas Luciane e Carla, ao meu esposo Santos Eurico, minhas filhas Érica e Mariana, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Durante estes dois últimos anos muitas pessoas participaram da minha vida e seria difícil não mencioná-las.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), EMBRAPA Gado de Leite e ao Instituto de Laticínio Cândido Tostes (ILCT/ EPAMIG), pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao professor Lúcio Guedes Barra (in memorian) pelo exemplo de vida.

Ao Professor Virgílio pela utilização do laboratório LEM – Laboratório de espectroscopia de materiais e também a todos os colegas do laboratório.

Aos Professores Roney e Thiago pela orientação e paciência na realização dos trabalhos.

À Professora Maria José pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Aos Professores Dr. Marco Antônio Moreira Furtado e Dr. Júnio César Jacinto de Paula, pelo apoio e pela atenção sempre que precisei.

Aos Professores das disciplinas cursadas, pela dedicação e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do mestrado, pela troca de experiências profissionais durante o período cursado das disciplinas.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meus agradecimentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Uma das adulterações que ocorre em leite é a adição de soro que é atualmente no Brasil 90% mais barato. É um problema particularmente complexo, porque as análises não podem ser realizadas rapidamente. O soro de leite é muitas vezes descartado pela indústria de laticínio durante a fabricação de queijo, o que é proibido por questões ambientais. O soro tem sido utilizado para adulteração de leite fluido e em pó. A adição de soro pode ser detectada pela análise de CMP por HPLC ou eletroforese, que são técnicas trabalhosas e demoradas para serem executadas. Este trabalho apresenta um método para quantificar adição de soro ao leite cru por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier associada ao método PLS e redes neurais artificiais, comparando os resultados com os obtidos pela determinação de CMP por HPLC. O soro foi obtido através da adição de quimosina ao leite cru, após a formação do coágulo, foi então separado, filtrado, aquecido à temperatura de 80° C e resfriado. Foram adicionados soro ao leite nas concentrações 0% (sem adição de soro); 1%; 4,25%; 7,5%; 10,75%; 14%; 17,25%; 20,5% realizadas em triplicata e nas concentrações de 2,5%; 6%; 9%; 19%; 22% para validação. As análises estatísticas empregadas: PLS apresentaram coeficiente de determinação R^2 de 0,9885 para o conjunto de calibração e R^2 de 0,9543 para o conjunto de validação, e redes neurais apresentaram R^2 de 0,9999 para o conjunto de treinamento e R^2 de 0,99996 para o conjunto de validação mostrando que as medições de NIR associado ao PLS e redes neurais pode ser utilizada para quantificar a adição de soro em leite cru.

Palavras chaves: Espectrometria NIR, quimiometria, leite cru, soro.

ABSTRAT

A common doctoring concerning milk is the addition which is currently, in Brazil, 90% cheaper. It is a particularly complex problem because the analysis can't be made quickly. The whey is, in many times, discarded by the dairy industry during the making of the cheese, which is forbidden for environmental reasons. The whey has been used for the doctoring of liquid and powder milk. The addition of whey can be detected by CMP analysis by HPLC analysis or electrophoresis which are laborious and lengthy techniques to be executed. This paper presents a method to quantify the addition of whey to the raw milk by spectroscopy on the infrared with Fourier transform associated with the PLS method, and artificial neural networks comparing the results to the ones obtained by the determination of CMP by HPLC. The whey obtained through the addition of chymosin to the raw milk, after the formation of the clot, it was, then, separated, filtered, heated to the temperature of 80°C and cooled. Whey was added to the milk in the concentrations of 0% (no addition of whey); 1%; 4,25%; 7,5%; 10,75%; 14%; 17,25%; 20,5% made in triplicate and in the concentrations of 2,5%; 6%; 9%; 19%; 22% for validation. The statistical analysis employed: PLS presented a coefficient of determination R^2 of 0,98885 for the calibration set and R^2 of 0,9543 for the validation set, and neural networks presented R^2 of 0,9999 for the training set and R^2 of 0,99996 for the validation set showing that the measures of NIR associated to the PLS and neural networks can be used to quantify the addition of whey to raw milk.

Keywords: NIR spectroscopy, chemometrics, raw milk, whey.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Gráfico da produção mundial de leite em mil toneladas, entre os anos de 2010 a 2014	21
Figura 2:	Gráfico da produção de queijo no Brasil em mil toneladas, no período de 1993 a 2020.....	26
Figura3:	Micela de caseína (A: submicela, B: cadeias proteicas, C: fosfato de cálcio, D: κ -caseína, E: grupo fosfato).....	32
Figura 4:	Local da ação da quimosina na κ -caseína.....	33
Figura 5:	CLAE.....	38
Figura6:	Decomposição da radiação solar.....	40
Figura 7:	O espectro eletromagnético.....	41
Figura 8:	Tipos de vibrações moleculares.....	45
Figura 9:	Transição fundamental e transições harmônicas.....	47
Figura 10:	Perfil da energia potencial: A: Modelo harmônico e B: (1) harmônico e (2) anarmônico.....	48
Figura 11:	Diagrama esquemático de um espectrômetro de FT-NIR.....	50
Figura 12	Rede neural de três camadas.....	56
Figura 13:	Esquema do experimento de quantificação de fraude de leite com soro de leite por CLAE e espectroscopia do infravermelho.....	61
Figura 14:	Espectrômetro da marca Bruker modelo MPA – R.....	62
Figura 15	Esquema geral do processo de calibração (PLS).....	63
Figura 16:	A: Análise de acidez; B: Crioscópio; C: Lactoscopio.....	65
Figura 17:	Representação do cromatograma referente 147,40 mg/L CMP e ao tempo retenção 6,496.....	67
Figura 18:	Representação do cromatograma referente 331,61mg/L CMP e ao tempo retenção 6,495.....	67

Figura 19:	Concentração de CMP e porcentagem de soro referente às amostras de calibração.....	68
Figura 20:	Concentração de CMP e porcentagem de soro referente às amostras de validação.....	69
Figura 21:	Gráfico de reflectância x número de ondas (cm^{-1}) construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1}	70
Figura 22:	Gráfico de reflectância x número de onda (cm^{-1}) referente amostras 0% (sem soro), 20,5% de soro e soro de leite, construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1}	71
Figura 23:	Gráfico de reflectância x número de onda (cm^{-1}) referente amostras 0% (sem soro), 1%, 4,25%, 14%, 20,5%, construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1}	71
Figura 24:	Gráfico de reflectância x número de onda (cm^{-1}) referente amostras 2,5%, 7,5%, 10,75%, 14%, 20,5%, construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1}	72
Figura25:	Observado x predito. Eixo-horizontal valores verdadeiros de CMP quantificados pelo método HPLC, eixo-vertical valores de CMP obtidos pelo método de infravermelho-próximo (\blacktriangle) conjunto de calibração, (\bullet) conjunto de validação.....	73
Figura 26	Gráfico da correlação dos valores reais e previsto do CMP referente amostras de treinamento.....	75
Figura 27	Gráfico da correlação dos valores reais e previsto do CMP referente amostras de validação.....	75
Figura 28	Gráfico referente às representações dos valores de CMP previstos e CMP residual referente as amostras de treinamento.....	76
Figura 29	Gráfico referente às representações dos valores de CMP previstos e CMP residual referente às amostras de validação...	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de leite no Brasil entre os anos 2002 e 2013.....	22
Tabela 2	Produção de leite no Brasil e nas regiões brasileiras em milhões de litros nos anos de 2012 e 2013.....	23
Tabela 3	Composição média do leite e dos soros doce e ácido.....	24
Tabela 4	Composição do leite e do soro em termos de minerais	24
Tabela 5	Composição de vitaminas do leite e do soro, em mg/L.....	25
Tabela 6	Proteínas importantes do leite.....	28
Tabela 7	Diferenças entre caseínas e soroproteínas.....	29
Tabela 8	Fração proteica das caseínas.....	30
Tabela 9	Valor teórico de aminoácido do CMP conforme a estrutura primária.....	34
Tabela 10	Atribuições das regiões espectrais às possíveis transições espectrais.....	43
Tabela 11	Composição média do leite utilizado no estudo.....	64
Tabela 12	Análises físico-químicas do leite utilizado no estudo.....	64
Tabela 13	Concentrações de CMP obtidas por CLAE em amostras adicionadas de soro de leite.....	66
Tabela 14	Parâmetros obtidos para o modelo PLS para predição CMP.....	74
Tabela 15	Parâmetros de avaliação obtidos para o modelo RNA para predição CMP.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
°C	Grau Celsius (unidade de temperatura)
Ca ²⁺	Cálcio
CCS	Contagem de células somáticas
CDP	peptídeo derivado da caseína
CGMP	Caseinoglicomacropéptido
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FG	cromatografia líquida de alta eficiência por filtração gélica
CLAE-FR	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
cm ⁻¹	unidade de energia
CMP	Caseinomacropéptido
CTB	Contagem total de bactérias
Da	Daltons (unidade de medida de massa)
DDA	Departamento de Defesa Agropecuária
EV/UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
ESD	extrato seco desengordurado
E ₀	energia associada com o nível quântico ν
FIR	<i>far infrared</i> - infravermelho distante
FT-IR	infravermelho com transformada de Fourier
FT-NIR	infravermelho próximo com transformada de Fourier
GAL	Galactose
IR	<i>infrared</i> - infravermelha
GMP	Glicomacropéptido
GaTNAc	N-acetilgalactosamina
IBGE	Instituto Brasileiro Geografia e Estatística
Ig	Imunoglobulinas
IN	Instrução Normativa
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LEM	Laboratório de Espectroscopia de Materiais
L	Litro (unidade de medida de volume)

-Log	probabilidade logarítmica
Likelihood	
MAD	<i>mean absolute deviation</i> – desvio médio absoluto
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MET	Metionina
mg	miligrama (unidade de medida de massa)
MIR	<i>middle infrared</i> - infravermelho médio
MLR	<i>multiple linear regression</i> - regressão linear múltipla
MP	Ministério Público
MSC	<i>multiplicative scatter correction</i> – correção de espalhamento multiplicativo
NeuAc	Ácido acetilneuramínico
NIR	<i>near infrared</i> - infravermelho próximo
nm	nanômetro (unidade de medida de comprimento)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	<i>principal component analysis</i> - análise de componentes principais
PCR	<i>principal component regression</i> - regressão em componentes principais
PLS	<i>partial least squares</i> - mínimos quadrados parciais
PHE	Fenilalanina
pH	potencial de hidrogênio
R	coeficiente de correlação
R ²	coeficiente de determinação
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal
RMSEE	raiz quadrada do erro médio
RMSEE	<i>root mean square error of estimation</i> – raiz quadrada do erro de estimativa média
RMSEP	<i>root mean square error of prediction</i> – raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão
SIMCA	<i>soft independent modeling of class analogy</i> – modelagem independente para analogia de classes

SIPOA	Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal
SFA-SC	Superintendência Federal de Agricultura de Santa Catarina
Sum Freq	soma frequência
SSE	<i>sum of squared error</i> – soma dos erros quadráticos
UV	Ultravioleta
UHT	<i>ultra high temperature</i> – ultra alta temperatura
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USDA	United States Department of Agriculture - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
α -la	α -lactoalbumina
α_s	α_s -caseína
β -lg	β -lactoglobulinas
κ	κ -caseína
ν	número quântico vibracional
ν	frequência vibracional fundamental

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	LEITE.....	19
2.1.1	O leite no Brasil e no mundo.....	21
2.2	SORO.....	23
2.3	PROTEÍNAS DO LEITE.....	27
2.3.1	Caseínas.....	29
2.3.2	Soroproteínas.....	32
2.4	CASEINOMACROPEPTIDEO.....	33
2.5	FRAUDES EM LEITE NO BRASIL.....	35
2.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	37
2.7	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	40
2.7.1	Princípios da espectroscopia no infravermelho.....	44
2.7.2	NIR com transformada de Fourier (FT-NIR).....	49
2.8	QUIMIOMETRIA – TRATAMENTO DE DADOS.....	50
2.8.1	Calibração multivariada.....	51
2.8.2	Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	52
2.8.3	Correção Multiplicativa de Sinais (MSC).....	53
2.8.4	Validação.....	54
2.9	REDES NEURAIS ARTIFICIAIS (RNA).....	55
2.10	UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	56
3.0	OBJETIVOS.....	59
3.1	OBJETIVO GERAL.....	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
4.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1	COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	60
4.2	PREPARAÇÃO DO SORO DO LEITE.....	60

4.3	ADIÇÃO DE SORO AO LEITE.....	61
4.4	CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	62
4.5	AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NO NIR.....	62
4.6	PLS E RNA.....	63
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1	COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE UTILIZADO NO ESTUDO.....	64
5.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU SEM ADIÇÃO DE SORO.....	64
5.3	ANÁLISES DE REFERÊNCIA – CLAE.....	65
5.4	ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	69
5.5	CORREÇÃO DO ESPALHAMENTO DA LUZ.....	69
5.6	REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS.....	72
5.7	RDES NEURAIAS ARTIFICIAIS (RNA).....	74
6.0	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados contêm nutrientes como carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais, exercendo um papel fundamental na alimentação humana. Representam também um importante segmento da economia de nosso país. O setor tem demonstrado nos últimos anos um considerável crescimento e a necessidade da elevação de qualidade destes produtos.

A necessidade do alinhamento à regulamentação internacional tem forçado um aprimoramento da legislação brasileira no sentido da consolidação dos reais indicadores de qualidade do leite e derivados. Entre os parâmetros importantes para a caracterização do leite está a composição centesimal de seus principais constituintes, como gordura, lactose e proteínas.

Em setembro de 2002 foi publicada a Instrução Normativa 51, através da qual o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), definiu os parâmetros de qualidade e estabeleceu novos parâmetros de avaliação para o leite cru refrigerado, sendo que em 2011 a Instrução Normativa 62 substituiu a Instrução Normativa 51 estabelecendo novas metas. Esses padrões são os seguintes: gordura, proteínas, sólidos totais e sólidos não gordurosos, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total, crioscopia e resíduos de antibióticos ou outros inibidores do crescimento microbiano (BRASIL, 2011).

A fraude no leite com a adição de soro, que é atualmente no Brasil 90% mais barato (FERRÃO et al., 2007), seu reduzido aproveitamento em derivados e seu alto custo de tratamento para descarte é um problema que vem preocupando autoridades nacionais e internacionais. A detecção destas fraudes cada vez mais elaboradas tem sido um desafio para a comunidade científica (FURTADO e VILELA, 1996).

As metodologias de análises de referência são trabalhosas e demoradas para serem executadas. Como alternativa para facilitar a avaliação da qualidade tem sido utilizados equipamentos eletrônicos com resultados rápidos, como a espectroscopia de infravermelho, associados às técnicas estatísticas.

O objetivo deste trabalho foi comparar o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com o método de espectroscopia de infravermelho próximo, já que

este se apresenta como uma alternativa promissora, com respostas rápidas, ausência de preparação de amostra, e tempo de análise reduzido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEITE

O leite é secretado pelas fêmeas de mamíferos com o objetivo de servir de alimento para o crescimento e saúde do recém-nascido e por sua riqueza em nutrientes como proteínas, lipídeos, açúcares, vitaminas e minerais, há milênios é utilizado na alimentação humana (FOX, 2003). É considerado sob o aspecto nutricional um dos alimentos mais completos, sendo um dos alimentos mais caracterizado quimicamente (RENHE et al., 2011).

O leite e seus derivados além de exercerem um papel fundamental na alimentação humana, representam também um importante segmento da economia de nosso país. O setor tem demonstrado nos últimos anos um considerável crescimento.

O Brasil apresenta consumo de leite chegando a 170 litros/habitantes/ano, seja na forma líquida ou na de produtos lácteos, sendo que o recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 210 litros/habitantes/ano (MAPA, 2014). Ações dos governos de incentivo ao consumo e a oferta crescente de novos produtos tais como os alimentos funcionais à base de leite, o leite com teores reduzidos de lactose, as linhas de produtos específicas para gestantes, recém-nascidos e adolescentes, entre outras, trabalham a favor do aumento do consumo e do mercado internacional de leite e derivados (LEITE, 2009).

A procura nacional por grandes volumes de leite de boa qualidade faz com que a pecuária leiteira seja competitiva, sendo necessário quantificar e conhecer os parâmetros que podem interferir nos resultados obtidos na análise da qualidade do leite, a fim de gerar ganhos efetivos na atividade. Devem-se diagnosticar os pontos que devem ser corrigidos. Os consumidores estão mais exigentes o que tem levado o setor leiteiro a passar por uma crescente demanda de produtos lácteos de alta qualidade, forçando a progressiva adaptação deste importante segmento. Em vários países, já existe o pagamento diferenciado para produtores que forneçam leite com teores mais elevados de constituintes, dentre estes podemos citar a gordura e a proteína, além de outros parâmetros de qualidade considerados essenciais (OLIVEIRA, 2011).

A produção de leite varia quanto ao volume e sua composição e depende dos seguintes fatores: espécie animal, raça, individualidade animal, intervalo de ordenhas, variação durante a ordenha, diferenças entre os quartos, período de lactação, influência das estações, alimentação, temperatura, doenças, idade do animal e condições climáticas (ROMA JÚNIOR, 2008).

A composição média varia apresentando 87,3% de água, 3,3% de proteínas, 3,8% de gordura, 4,9% de lactose e 0,72% de minerais (SGARBIERI, 2004). É um líquido aparentemente homogêneo, em que os lipídeos encontram-se, em emulsão. A gordura é variável entre espécies, e mesmo dentro da mesma espécie, também varia com estação do ano e tipo de alimentação do gado. A gordura apresenta-se como glóbulos que possuem um núcleo constituído principalmente de triacilgliceróis rodeado por uma membrana lipoproteica (COSTA et al., 2009).

A estrutura, propriedades funcionais e o processamento dependem da distribuição e interação de sua composição. Os glóbulos de gordura e as caseínas são responsáveis pela maioria das características físicas, como estrutura e cor encontradas nos produtos lácteos (Brito et al., 2009).

O regulamento de Inspeção Industrial foi publicado no Brasil em 1952, e estabeleceu os parâmetros de qualidade para os produtos de origem animal. Em 2002 por meio da Instrução Normativa 37 instituiu-se a Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite (RBQL), com o objetivo de realizar análises laboratoriais.

Em setembro de 2002, por meio da publicação da Instrução Normativa nº51 (IN 51) (BRASIL, 2002), o MAPA definiu novos parâmetros de qualidade e estabeleceu critérios de avaliação. Esta foi substituída em dezembro de 2011 pela Instrução Normativa 62/2011 (IN 62/2011) que preconiza alguns testes para estabelecer os padrões de qualidade: Contagem de células somáticas (CCS), Contagem total de bactérias (CTB), composição química e caracterização física do leite, como a estabilidade térmica. Estabelece também que o leite cru refrigerado deve conter no mínimo 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4% de extrato seco desengordurado (ESD), estabelecendo prazos para atingir CCS e CTB (BRASIL, 2011).

2.1.1 O leite no Brasil e no mundo

A produção de leite no mundo desde 2010 está crescendo. A figura 1 mostra o gráfico do crescimento da produção mundial de leite nos últimos anos segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA).

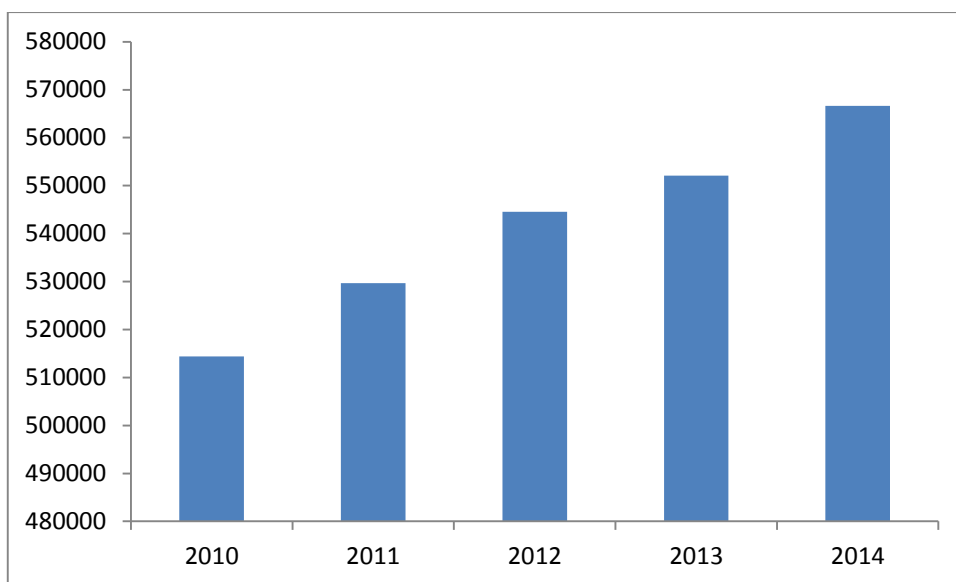


Figura 1: Gráfico da produção mundial de leite em mil toneladas, entre os anos de 2010 a 2014.

Fonte: USDA, 2014.

Segundo o USDA a produção brasileira de leite, em 2013, foi a quinta maior no mundo, ficando atrás somente da União Europeia, Estados Unidos, Índia e China. O Brasil melhorou sua posição em relação a 2012, quando ocupava a sexta posição, e a Rússia, o quinto lugar (IBGE, 2013).

Nos últimos anos no Brasil a cadeia produtiva do leite, a mais complexa dentro do Agronegócio, vem sofrendo mudanças rápidas e significativas. Apresentando um dos maiores rebanhos do mundo com grande potencial para abastecimento de leite no mercado interno e externo, representando também um papel relevante no suprimento

de alimentos e na geração de empregos e renda para a população. Essas mudanças vêm acontecendo no perfil das indústrias laticinistas, na geografia da produção primária, e no destino dos produtos lácteos (IBGE, 2013).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de leite no Brasil no ano de 2012 foi 49,2% superior ao ano de 2002, conforme tabela 1.

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

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

Fonte: IBGE, 2013.

As regiões que se destacam na produção leiteira são o Sudeste e o Sul do Brasil, conforme tabela 2. Nas últimas décadas a produção do Sul do Brasil teve um crescimento tanto em volume quanto em importância, diminuindo a diferença em relação à região Sudeste que era de 27,8% para apenas 2,7%, ocupando nas últimas décadas uma posição importante no cenário nacional do leite (IBGE, 2012). Entre os estados, Minas Gerais, no ano de 2012 manteve o primeiro lugar do *ranking* da produção leiteira, seguido do Rio Grande Sul, Paraná e Goiás (IBGE, 2012).

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

	Produção	Participação na produção (%)	
		2012	2013
Brasil	32.304.421	-	-
Norte	1.658.315	5,1	5,4
Nordeste	3.501.316	10,8	10,5
Sudeste	11.591.140	35,9	35,1
Sul	10.735.645	33,2	34,4
Centro Oeste	4.818.006	14,9	14,6

Fonte: IBGE, 2013.

2.2 SORO

O soro de leite pode ser definido como a porção aquosa que é separada da caseína durante a fabricação de queijo, correspondendo a 90% em volume de leite, dependendo do queijo processado (FURTADO e LOURENÇO NETO, 1994; TEIXEIRA e FONSECA, 2008).

Na indústria ou no laboratório o soro pode ser obtido através de três processos: coagulação enzimática ou por ação da quimosina, este tipo de coagulação, resulta na formação do coágulo de caseína; por precipitação ácida, resultando na caseína isoelétrica e por microfiltração através da separação das micelas de caseínas (SGARBIERI, 2004).

Tipos de soro lácteo: no soro ácido a precipitação das caseínas é realizada em pH 4,6, obtido da fabricação de ricotas, mas quando a coagulação ocorre enzimaticamente, entre pH 5,9 e 6,3 o soro produzido é chamado de doce, provém da fabricação de muçarelas, minas, cheddar, dentre outros queijos, tendo uma ampla aplicação na área de alimentos (TULLIO, 2007).

No Brasil a produção de soro é representada quase que totalmente de soro doce, sendo a produção de soro ácido insignificante (CARVALHO, 2007). Os principais

componentes, vitaminas e minerais do soro encontram-se nas tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3: Composição média do leite e dos soros doce e ácido

	Leite	Soro doce %	Soro ácido %
Sólidos totais	13,0	6,4	6,2
Proteínas	3,6	0,8	0,75
Gordura	3,9	0,5	0,04
Lactose	4,6	4,6	4,2
Cinza	0,8	0,5	0,8
Ácido láctico	-	0,05	0,4

Fonte: Antunes, 2003.

Tabela 4: Composição do leite e do soro, em termos de minerais

Minerais	Leite mg/L	Soro de leite mg/L
Cálcio	1170	430
Sódio	680	500
Magnésio	110	88
Potássio	1430	1600
Fósforo	950	400

Fonte: Adaptado MELLO, 1989, FOX 1997, WALSTRA et al., 1999.

Tabela 5: Composição vitaminas do leite e do soro, em mg/L

Vitaminas	Leite	Soro de leite
B1	0,44	0,38
B2	1,70	1,20
B3	1,30	0,85
B5	3,50	3,40
B6	0,50	0,42
B12	0,004	0,00003
C	15	2,2

Fonte: Adaptado MELLO, 1989, FOX 1997, WALSTRA et al., 1999.

A composição do soro é de aproximadamente 93% de água, 5% de lactose, 0,9-0,7% de proteínas, 0,5-0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequena quantidade de vitaminas, podendo variar dependendo da unidade industrial que o produziu, do tipo de queijo e o respectivo método de fabricação, das características do leite usado como matéria-prima, das condições ambientais e do gado que produziu o leite usado na fabricação. Segundo SMITHERS (2008), em uma simples comparação entre a composição média aproximada do leite bovino e o soro de leite pode-se observar que aproximadamente 50% dos sólidos do leite permanecem no soro, incluindo quase toda lactose e cerca de 20% das proteínas.

No Brasil o consumo de lácteos vem elevando-se consideravelmente. O aumento da produção de queijos, junto com os seus benefícios, traz também um grave problema ambiental e econômico com o aumento do volume de soro, coproduto decorrente de sua fabricação.

Em 2013 a produção de queijo no país foi de aproximadamente 1032,0 mil toneladas, conforme figura 2 (ABIQ, 2013), e estima-se que a produção de soro neste ano foi de 9.288.000 toneladas. Partindo da estimativa que de cada quilograma de queijo são produzidos 9 litros de soro, um laticínio com uma produção média diária de 10.000 litros de soro polui o equivalente a uma cidade com população de 5.000 habitantes (SANTOS et al., 2001). A maioria das indústrias de queijo no país é de pequeno e médio porte, não dispendo de pessoal qualificado para o aproveitamento e

tratamento deste coproduto (Mendes et al., 2006). A preocupação mundial com a ecologia, com uma legislação que torna obrigatório o tratamento de efluentes pelas indústrias, estimula a busca por alternativas para a utilização do soro, devido às propriedades nutricionais do mesmo (PAULA, 2005).

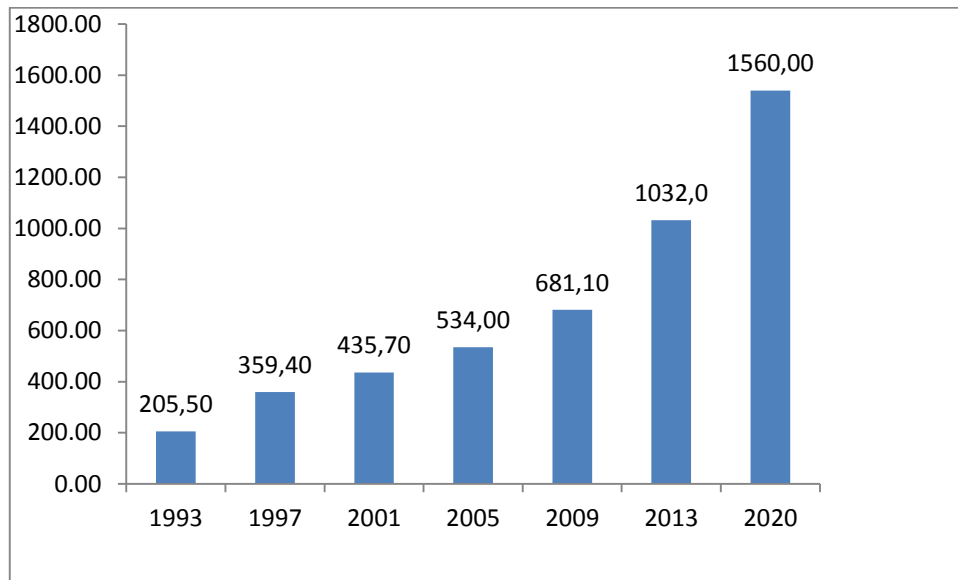


Figura 2: Gráfico de produção de queijo no Brasil, em mil toneladas, no período de 1993 a 2020.

*2020 – é uma projeção.

Fonte: ABIQ, 2013.

O soro do leite foi descartado por muitos anos, mas a partir da década de 70 iniciaram-se pesquisas a fim de estudar suas propriedades (AIRES, 2010).

São várias as alternativas para o seu uso, dependendo da tecnologia aplicada podem ser transformados em produtos de interesse para a indústria alimentícia animal e humana, química, farmacêutica e cosmética (PAULA, 2005).

No Brasil uma das principais formas de reaproveitamento do soro é a produção de bebida láctea (GUEDES, 2012), entretanto, a maior parte do mesmo não é reaproveitada. Muitas vezes ocorre sua utilização adicionada ao leite a ser comercializado. Esta incorporação constitui fraude, tendo como finalidade diminuir

custos através do aumento do volume do leite e lesando o consumidor (AQUINO, 2013).

Essa alta produção associada ao emprego de metodologias analíticas demoradas e trabalhosas para identificação da adição do soro ao leite leva à prática de fraudes em um grande número de indústrias. Atualmente a comunidade científica impulsionada pelos órgãos governamentais vem estudando o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos aplicados à detecção deste tipo de fraude (AQUINO, 2013).

2.3 PROTEÍNAS DO LEITE

As proteínas do leite fornecem micronutrientes essenciais (exemplo: cálcio e fósforo), aminoácidos e componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina), da mãe para o recém-nascido (LIVNEY, 2010). São classificadas em caseínas, soroproteínas, proteínas associadas à membrana do glóbulo de gordura, lactoferrina e enzimas. Constituem ingredientes valorizados pelas suas propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais (SGARBIERI, 2005), no soro líquido, a concentração está reduzida, tornando-se necessárias algumas etapas de concentração do soro, para que sejam destacadas suas propriedades funcionais como solubilidade, emulsificação e formação de espuma (AIRES, 2010).

Encontram-se na tabela 6 as principais proteínas do leite:

Tabela 6: Proteínas importantes do leite

Proteínas	Concentração no leite (g/L)
Caseínas	24-28
α s ₁	12-15
α s ₂	3-4
β	9-11
κ	3-4
Soroproteínas	5-7
β -lactoglobulinas (β -lg)	1-1,5
α -lactoalbumina (α -la)	0,6-0,1
Albumina sérica bovina	0,1-0,4
Imunoglobulinas (Ig)	~ 0,1
Proteínas da membrana do glóbulo de gordura	~ 0,4
Proteína total do leite	30-35

Fonte: Adaptado de LIVNEY, 2010.

O leite contém 30-35 g/L de proteína total, na qual dois grandes grupos destacam-se: caseínas e soroproteínas, do ponto de vista nutritivo e industrial, são as proteínas de maior aplicação e valor econômico (SGARBIERI, 2005).

A diferenciação entre elas está representada na tabela 7, segundo FOX (2003):

Tabela 7: Diferenças entre caseínas e soroproteínas

Características	Caseínas	Proteínas do soro
Solubilidade em pH 4,6	não (insolúveis)	sim
Coagulação proteolítica (quimosina)	sim	não
Estabilidade térmica (Termorresistência)	sim	não
Presença de fósforo	sim	não
Percentual de enxofre	0,8%	1,7%
Origem	glândula mamária	glândula mamária e plasma
Estado	coloidal	em dissolução

Fonte: FOX, 2003.

2.3.1 Caseínas

As caseínas no leite fluido representam 80% das proteínas totais do leite, são proteínas específicas, fosforiladas e insolúveis em pH 4,6, enquanto que as soroproteínas são solúveis sob as condições iônicas do leite neste pH. É de grande importância industrial a precipitação isoelétrica das caseínas no leite, pois permite à produção de caseínas e caseinatos, produtos lácteos fermentados e queijos produzidos sob coagulação ácida (FOX, 2003).

Em relação ao tratamento térmico as caseínas são estáveis, o que contribui para estabilidade elevada ao calor nos tratamentos de alta temperatura que é submetido o leite (FOX, 2003).

As caseínas são classificadas em subgrupos, são eles: α , β , κ e γ . As caseínas α apresentam uma família com características diferentes (α_{s0} e α_{s5}). As variantes genéticas de cada grupo de caseínas são mostradas na tabela 8 (SGARBIERI, 2005).

Tabela 8: Fração proteica das caseínas

Fração Proteica	Porcentagem no leite desnatado	Massa molecular (*)	Variantes genéticas
Caseína α_1 (α_0 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5)	45-55	23.613	A, B, C, D
Caseína β	25-35	24.000	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B, C, D
Caseína κ	8-15	19.000	A, B
Caseína γ	3-7	21.000	
γ_1		20.500	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B
γ_2		11.800	A ₁ ou A ₂ , A ₃ , B
γ_3		11.500	A ₁ ou A ₂ ou A ₃ , B

Fonte: Adaptado SGARBIERI, 2005.

(*) Massa molecular em Dalton.

As caseínas possuem altos níveis de prolina, presentes nas frações α e β , contêm 0,8% de fósforo, sendo que o grau de fosforilação varia nas caseínas individualmente. São sintetizadas nas glândulas mamárias para satisfazer provavelmente as necessidades do recém-nascido.

A caseína apresenta uma estrutura interna formada de α_1 - α_2 - β -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio, enquanto que a κ -caseína está localizada preferencialmente na superfície (DALGLEISH, 2011).

A κ -caseína tem como base uma cadeia simples com 169 aminoácidos (aa). No leite encontra-se agregada em polímeros de massa molecular entre 60.000 a 150.000 Da (SGARBIERI, 2004). Contêm dois resíduos de cisteína e um de fosfoserina, este resíduo provavelmente não participa da formação de fosfato de cálcio em função da sua localização na porção C-terminal da cadeia polipeptídica.

A κ -caseína é a fração das caseínas heterogêneas, insensível ao Cálcio (Ca^{2+}), desempenhando importante papel na estabilidade da caseína em condições normais e

impedindo a precipitação das caseínas α_s e β em presença de íons. Esta propriedade estabilizadora é perdida durante a precipitação pela quimosina (CARVALHO, 2007).

A κ -caseína apresenta duas variantes genéticas A e B. A variante A apresenta mais carga elétrica do que a variante B, isto pode ser explicado pela substituição de isoleucina aminoácido (aa 136) e da alanina (aa 148) da variante A, por treonina e asparagina respectivamente (CARVALHO, 2007).

A cisteína somente é encontrada nas caseínas α_2 e κ . Este resíduo forma pontes dissulfeto intermoleculares. Nas caseínas α_1 e β não encontramos cisteína ou cistina o que permite uma maior flexibilidade nessas moléculas. Devido principalmente aos teores de prolina, distribuída em toda a cadeia polipeptídica, as caseínas, em especial a β -caseína, são proteínas de estruturas abertas e com predominância de estruturas primárias (DICKINSON, 1999).

Muitas das propriedades tecnológicas do leite, por exemplo, a sua cor branca, a estabilidade ao calor ou etanol e a coagulação por coalho, são devidas às propriedades das micelas de caseína. Devido ao valor econômico e tecnológico, há um incentivo para caracterizar as suas propriedades e elucidação da sua estrutura (FOX, 2008).

A comunidade científica tem apresentado vários modelos para explicar a estrutura da caseína, não encontrando unanimidade. Entre eles podemos destacar o modelo de revestimento interno/núcleo em que proteínas do interior das micelas são diferentes daquelas da parte exterior; outro modelo composto por submicelas, o modelo em que a micela é uma rede porosa de proteínas e o fosfato de cálcio que são responsáveis pelas ligações cruzadas entre as proteínas contribuindo para a manutenção de toda a rede unida (RENHE et al., 2011). Todos os modelos apresentam em comum a carboxi-terminal da κ -caseína predominantemente presente como filamentos flexíveis, orientados para o meio externo. A κ -caseína possui regiões de grande hidrofília em sua molécula, se orientando para o lado de fora da micela, enquanto que as demais se orientam para o seu interior. Isto ocasiona um impedimento estérico e eletrostático à aglomeração da micela. A estrutura da caseína é estabilizada por interações hidrofóbicas e iônicas (SOUZA, 2013).

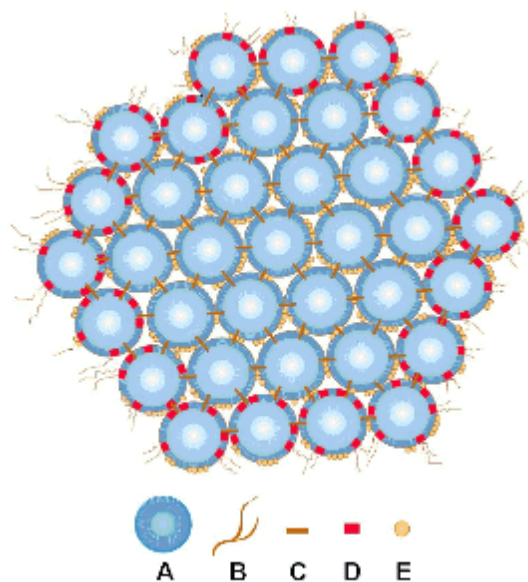


Figura 3: Micela de caseína (A: submicela, B: cadeias proteicas, C: fosfato de cálcio, D: κ -caseína, E: grupo fosfato).

Fonte: www.food-info.net/images/caseinmicelle.jpg

A estabilidade das micelas de caseína e o equilíbrio de minerais podem ser alterados quando aplicados tratamentos tecnológicos (SILVA, 2010).

2.3.2 Soroproteínas

As soroproteínas permanecem no soro após a precipitação da caseína, a quantidade de proteínas varia de 0,7% a 1,2% da sua composição média e equivale cerca de 20% a 25% do total de proteínas encontradas no leite. Estas proteínas apresentam um excelente perfil de aminoácidos, caracterizando-as como proteínas de alto valor biológico (AIRES, 2012).

São globulares, com elevada hidrofobicidade. A estabilidade térmica destas proteínas é típica das proteínas globulares. Os dois principais componentes α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (FOX, 2003) são produzidos comercialmente como frações de proteínas isoladas de pureza alta. Os produtos deste tipo são utilizados como ingredientes alimentícios, consumido por atletas ou pessoas que precisam de dieta especial.

A β -lactoglobulina presente em maior quantidade representa 50% das proteínas do soro. É tipicamente globular, sendo a principal proteína. Contém 162 aminoácidos, com uma média massa molecular (em torno 18 kDa), o que lhe confere resistência a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presente no estômago, sendo absorvida no intestino delgado (ANTUNES, 2003).

A α -lactoalbumina apresenta o segundo maior teor no soro do leite, caracteristicamente capaz de ligar-se ao cálcio. Possui massa molecular de 14 kDa. Apresenta alto teor de triptofano, aminoácido essencial, e contém quatro ligações dissulfídicas não apresentando grupo fosfato. Modifica a atividade da enzima galactosiltransferase (ANTUNES, 2003).

2.4 CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP)

O caseinomacropeptídeo (CMP) é um peptídeo que apresenta 64 aminoácidos, formado devido à ação da quimosina durante a fabricação do queijo (TULIO, 2007). Ocorre a clivagem da proteína κ -caseína na ligação fenilalanina (PHE) aa 105 e metionina (MET) aa 106, resultando em dois peptídeos, o caseinomacropeptídeo, que contém a porção C-terminal (106 a 169), este é solúvel em ácido tricloroacético 8%, apresentando em sua estrutura diferentes concentrações de fosfato e carboidratos, e outro peptídeo de baixa solubilidade, o para- κ -caseinato constituído pela porção N-terminal (1 a 105). A figura 4 representa o local da ação da quimosina na κ -caseína (MAGALHÃES, 2008).

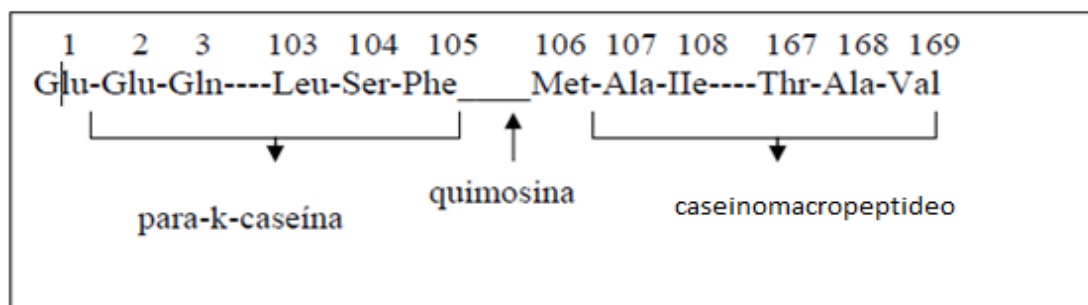


Figura 4: Local da ação da quimosina na κ -caseína.

Fonte: Magalhães, 2008.

O CMP possui valor teórico elevado dos aminoácidos isoleucina e valina e menor dos aminoácidos como fenilalanina, triptofano e tirosina (ALCANTARA, 2009). A composição teórica dos aminoácidos do CMP está relacionada na tabela 9, logo abaixo:

Tabela 9: Valor teórico de aminoácido do CMP conforme a estrutura primária

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA	VALOR TEÓRICO*(%)
Ácido aspártico	Asp	8,5
Treonina	Thr	18,2
Serina	Ser	7,8
Ácido glutâmico	Glu	19,2
Glicina	Gly	0,9
Alanina	Ala	5,3
Valina	Val	8,9
Metionina	Met	2,0
Isoleucina	Ile	10,1
Leucina	Leu	1,7
Tirosina	Tyr	0
Fenilalanina	Phe	0
Histidina	His	0
Lisina	Lys	5,7
Arginina	Arg	0
Prolina	Pro	11,6

Fonte: Chu, Macleod, Ozimek, 1996.

*Valor teórico calculado conforme a estrutura primária do CMP.

O termo caseinomacropéptido (CMP) é também conhecido como glicomacropéptido (GMP), caseinoglicomacropéptido (CGMP) ou péptido derivado da caseína (CDP). Denomina-se GMP a forma glicosilada devido ao seu elevado conteúdo de carboidrato e de CMP a forma não glicosilada do péptido (TULLIO, 2007).

O CMP pode apresentar quatro variações genéticas A, B, C e E, sendo as variantes A e B as formas mais comuns da κ -caseína, que podem estar na forma

glicosilada ou não glicosilada. A forma glicosilada representa 50 a 60% do CMP total e apresenta em sua composição GAL (galactose), GaTNAc (N-acetilgalactosamina) e NeuAc (ácido acetilneuramínico). A concentração do CMP liberada não varia com a proporção entre as variantes A e B (MAGALHÃES, 2008).

As enzimas produzidas por bactérias psicrófilas podem ocasionar proteólise da k-caseína, produzindo pseudo CMP por um único aminoácido (metionina terminal no CMP, resíduo 106 – alanina terminal no pseudo-CMP, resíduo 107). O pseudo CMP possui um resíduo a menos que o CMP, sendo que *Pseudomonas fluorescens* podem produzir certa quantidade de CMP e são menos específicas que a quimosina (MAGALHÃES, 2008).

2.5 FRAUDES EM LEITE NO BRASIL

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

A autenticidade dos alimentos é um problema mundial. A detecção de produtos fraudados e de baixa qualidade torna-se cada vez mais importante, tanto por razões econômicas, como de saúde pública. A adulteração de um produto visa lucro ilícito, seja por adição de um componente qualquer ou pela subtração de seus elementos (BEHMER, 1999).

O leite pode ser adulterado de várias maneiras, pela adição de elementos de baixo valor, como a de água e soro, com a finalidade de aumentar o volume fornecido com custo reduzido. O soro de leite, coproduto do processamento, possui uma composição semelhante a do leite, o que torna difícil sua detecção (ZADOW, 1997).

É permitida a adição de soro ao leite, desde que comercializado como bebida láctea, que é o produto lácteo resultante da mistura de leite e soro de leite fermentado pela ação de microrganismos específicos ou adicionado de leite fermentado e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após fermentação (BRASIL, 2005).

A legislação brasileira é clara e objetiva em relação à adulteração do leite, define que leite fluido e em pó são aqueles produtos que não sofreram a adição de produtos não permitidos. A adição de quaisquer produtos tais como o soro é considerado fraude, o baixo custo e o grande volume tornam atrativa sua adição (OLIVEIRA, 2011).

Os direitos dos consumidores são estabelecidos na Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990, Código de Proteção e Defesa dos consumidores. Determina como direito básico a proteção da sua saúde e segurança. Portanto, deve atender aos parâmetros de qualidade e segurança definido pelos órgãos fiscalizadores competentes, não podendo acarretar riscos à saúde. O direito à informação adequada e clara, com especificação correta de quantidade, características, composição e qualidade, significando que as informações constantes do rótulo devem corresponder ao seu conteúdo, sob pena de violação a legislação (CQUALI, 2008). Dispõe que são impróprios ao uso os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos a vida ou a saúde, perigosos ou, ainda, aqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação (BRASIL, 1990).

A Instrução Normativa nº 69, no seu artigo 1º oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para análises dos lácteos e derivados, determinando que sejam usados nos laboratórios nacionais agropecuários.

No final de 2012, com as notificações de detecção de fraudes ocorridas no estado do Rio Grande do Sul, o Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPOA) de Santa Catarina intensificou as ações de fiscalização e verificação oficial por meio de análises do leite cru refrigerado. Em março de 2013, foram analisadas 104 amostras, sendo apresentados apenas dois resultados de não conformidade. Procedeu-se ainda o rastreamento de fabricação destes produtos, o que resultou na coleta de amostras de leite UHT e envio destas para análise no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Rio Grande do Sul, tendo apresentado resultado dentro do “padrão” esperado (MAPA, 2014).

Em agosto de 2014 foi deflagrada a chamada Operação Leite Adulterado I e II, uma ação conjunta da Superintendência Federal de Agricultura de Santa Catarina (SFA/SC) e do Ministério Público (MP) de Santa Catarina, com base nas denúncias

recebidas, nos históricos das empresas e nos resultados das análises, foram investigadas empresas localizadas no município de Mondai e Ponte Serrada, municípios localizados no estado de Santa Catarina (MAPA, 2014).

O MAPA por meio do Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPOA), do Departamento de Defesa Agropecuária (DDA), da SFA/SC determinou a interdição de estabelecimentos em Santa Catarina, com base nas investigações realizadas durante a Operação Leite Adulterado III, em parceria com o MP de Santa Catarina (MAPA, 2014).

Ainda em 2014, a Operação Leite Compensado 6 ultrapassou as fronteiras do Rio Grande do Sul. Além de postos de resfriamento e cooperativas gaúchas, foi descoberto no Paraná a adição de água e elementos químicos para mascarar o leite que já estava impróprio para consumo. A operação mais recente, a Leite Compensado 7, no Rio Grande do Sul encontrou produto adicionado de água e sal (MAPA, 2014).

2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O russo botânico Mikhael Tswett em 1906, utilizou em trabalhos o termo cromatografia para descrever a separação de extrato vegetal, utilizando colunas de vidro cheias com partículas sólidas, e arrastou os componentes com éter de petróleo. Cromatografia tem origem nos termos gregos chrom (cor) e graphe (escrever), embora o processo não dependa da cor. No ano de 1930 foi iniciada a época moderna da cromatografia, quando Kuhn e Lederer desenvolveram as experiências de Tswett, separando e identificando as xantófitas da gema do ovo usando coluna com carbonato de cálcio pulverizado como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel (COLLINS, 2006).

A cromatografia inclui métodos que permitem a separação, identificação e determinação de componentes muito semelhantes de misturas complexas. A amostra é transportada por uma fase móvel que pode ser gás, líquido ou fluido supercrítico, que é então forçada a passar através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada em coluna ou superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra distribuam-se entre as fases móveis e estacionárias em graus

variados. Os componentes que são retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel e vice-versa. São separadas em bandas ou zonas discretas sendo analisadas qualitativamente e quantitativamente (HOOLER, 2010).

Os critérios para classificação de cromatografia variam. De acordo com o sistema cromatográfico é classificado em coluna ou planar. Em relação ao estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia gasosa, na qual a fase móvel é um gás; a cromatografia líquida, na qual a fase móvel é líquida e a cromatografia supercrítica, que usa como fase móvel um vapor pressurizado, em temperatura e pressão acima de seu ponto crítico. De acordo com a fase estacionária pode ser líquida, sólida ou fase ligada (COLLINS, 2006).

A cromatografia líquida em coluna divide-se em dois grupos: a cromatografia líquida clássica, que utiliza colunas de vidro, empacotadas com fases estacionárias finamente divididas, pelas quais passam as fases móveis sob ação da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que utiliza geralmente colunas metálicas contendo partículas especialmente preparadas que proporcionam separações muito eficientes, são utilizadas altas pressões para forçar a passagem do solvente e assim diminuir o tempo da análise (COLLINS, 2006).



Figura 5: CLAE.

Fonte: www.fem.unicamp.br/~lee/hplc.htm

A CLAE é usada para separar e quantificar os componentes numa mistura líquida. Constitui um método físico-químico de separação, baseado na migração

diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes graus de interação entre as duas fases imiscíveis, uma móvel e a outra fixa.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência por filtração géllica (CLAE-FG) foi desenvolvido por HOOYDONK e OLIEMAN em 1982 com o objetivo de determinar a ação da renina. Posteriormente a este trabalho, OLIEMAN e BEDEM em 1983 utilizaram o mesmo método para quantificar a adição de soro de leite sólido ao leite em pó.

OLIEMAN e RIEL (1989) empregaram CLAE em coluna reversa (CLAE-FR) para estudar o comportamento da proteólise no leite, causada por bactérias psicotróficas.

ALVIN (1999) realizou um estudo da influência da qualidade do leite nos resultados do método de CLAE-FG, quando utilizado para detectar soro de leite adicionado neste produto, e concluiu que os resultados positivos, quanto à presença de CMP, podem ser interpretados como adição de soro ao leite, ou como proveniente da detecção de produtos de degradação proteica do leite provenientes de proteólise causada por bactérias *Pseudomonas* presentes no leite.

A detecção e quantificação de CMP, proveniente da ação proteolítica de enzimas por meio de CLAE, com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV), é uma das metodologias oficiais estabelecidas pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006).

LASMAR (2007) avaliou a viabilidade do uso de leite cru conservado com bromopol na pesquisa de soro de leite por CLAE.

MAGALHÃES (2008) desenvolveu um método laboratorial CLAE-FR e detecção por Espectrometria de massa para determinar a adulteração de leite com soro de leite através da detecção de CMP ou pseudo-CMP produzido por enzimas termorresistentes de bactérias psicotróficas.

OLIVEIRA (2009) utilizou CLAE-FG e detecção por ultravioleta para quantificação de CMP proveniente da ação proteolítica de enzimas.

VILLANOEVA et al. (2014) avaliou a influência da temperatura de armazenamento de amostras de leite UHT, em relação ao índice de CMP por CLAE e a precisão do método de detecção.

FUKUDA em 2003 sugere que CLAE deve ser empregado para os casos duvidosos e/ou em contestação, independente de ser aplicada como metodologia de rotina.

A metodologia CLAE, porém, apresenta alto custo de instrumentação e reagentes, além de necessidade de experiência no seu manuseio.

2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia pode ser definida como a interação de qualquer tipo de radiação magnética com a matéria, ou seja, tudo que nossos olhos percebem, é um tipo de espectroscopia que está acontecendo (OLIVEIRA, 2001).

Entender os efeitos que a radiação eletromagnética exerce sobre a matéria provém de longo tempo, mas foi Isaac Newton que iniciou o estudo sobre a luz e descobriu que a luz branca do sol era um somatório de outras. Fenômeno semelhante pode ser observado em um prisma. A colorida, vista no prisma e no arco-íris, corresponde a uma pequena fração de um amplo espectro chamado espectro eletromagnético (OLIVEIRA, 2001). Sir Frederick William Herschel, em 1800, utilizando o mesmo princípio, realizou uma experiência com a ajuda de um termômetro, registrou a quantidade de calor associado a cada cor que constitui a luz solar, e acima da região vermelha foi observado um aumento significativo da temperatura e este aquecimento era causado por radiação não visível, descobrindo a região do infravermelho próximo (ALMEIDA, 2009).



Figura 6: Decomposição da radiação solar.

Fonte: www.inpe.br/unidades/cep/atividadescep/educasere/apostila.htm

Sabemos que a luz tem um comportamento duplo, ora apresenta-se como partículas ou fótons, ora como onda. Do ponto de vista ondulatório apresenta duas propriedades: seu comprimento de onda, ou seja, a distância entre dois máximos de onda gerada, e sua frequência, número de vezes que essas ondas são geradas por uma fonte (OLIVEIRA, 2001).

O espectro de radiação eletromagnética abrange as ondas de rádio, micro-ondas, o infravermelho, o visível, os raios ultravioletas, os raios x e os raios gama (VIANA, 2008). A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho está situada na faixa de radiação com número de ondas entre 12800 e 10 cm^{-1} , entre as faixas gamas do visível e micro-ondas. Divide-se em três regiões: infravermelho próximo (*near infrared*, NIR), infravermelho médio (*middle infrared*, MIR) e infravermelho distante (*far infrared*, FIR) (HOOLER, 2009). Os espectros de rotação das moléculas e os espectros de vibração molecular são estudados no infravermelho distante e médio, os harmônicos das vibrações moleculares são estudados no infravermelho próximo. A figura 7 apresenta as regiões espectrais do infravermelho.

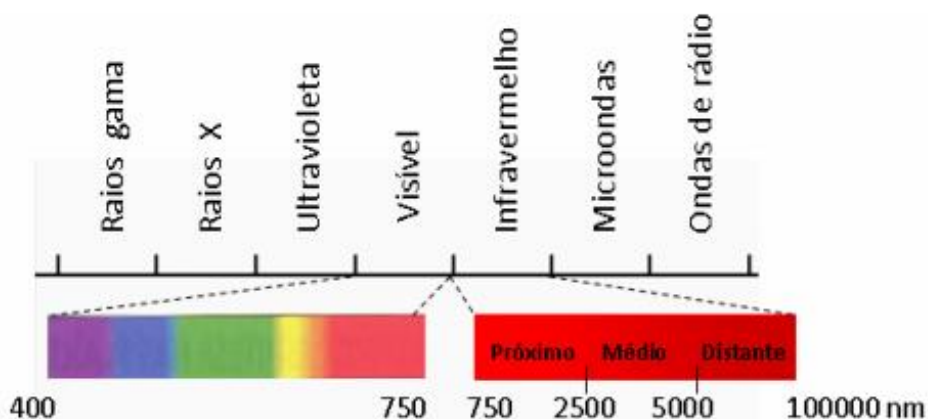


Figura 7: O espectro eletromagnético.
Fonte: VIANA, 2008.

A espectroscopia estuda a interação de radiações eletromagnéticas com as moléculas, tendo como objetivo a determinação dos níveis de energia de átomos. As diferenças de energia entre os níveis são determinadas pelo espectro, e a partir destas medidas determinam-se as posições relativas dos níveis energéticos. A ligação entre dois átomos envolve diferentes tipos de energia, como a energia translacional,

vibracional e a eletrônica. As transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas (SALA, 2008).

Em uma molécula para que ocorra absorção é fundamental que a radiação incidente na molécula promova excitação dos modos vibracionais, de modo que a sua energia corresponda à diferença de dois níveis energéticos vibracionais. Desse modo as absorções ocorrem a um determinado comprimento de onda, que corresponde à energia que permite a transição (ALMEIDA, 2009).

Uma molécula para absorver a radiação infravermelha (*infrared*, IR) deve sofrer uma variação no momento dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. O momento dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e pela distância entre dois centros de carga (HOLLER, 2009).

As moléculas quando absorvem radiação no infravermelho são excitadas para atingir um estado de maior energia, sendo um processo quantizado. No processo de absorção são absorvidas as frequências de radiação no infravermelho que equivalem às frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações na maioria das moléculas mais covalentes (PAVIA et al., 2010).

Inicialmente, a espectroscopia NIR foi ignorada pelos pesquisadores. Existia dificuldade de obter as informações, uma vez que as bandas de absorção na região NIR são produto de sobretons (bandas que possuem valores de frequência que correspondem a múltiplos inteiros dos valores das vibrações fundamentais) e bandas de combinação (são combinações lineares das frequências ou números inteiros destas) fundamentais de vibração (PASQUIM, 2003).

A região chamada de infravermelho próximo, recentemente, tem recebido muita atenção, em particular com relação às análises quantitativas de amostras com matrizes complexas (BARBOSA, 2007). Nesta região as bandas de absorção são sobretons ou combinações de vibrações fundamentais de estiramento que ocorrem na região 3000 a 1700 cm^{-1} , geralmente ligações C-H, N-H e O-H, cujas absorvidades molares são baixas tendo como limites de detecção da ordem de 0,1% (HOLLER, 2009). Devido às absorções não serem muito intensas, muitas vezes sobrepõem-se, tornando largas as bandas e com baixa sensibilidade. Os espectros NIR em vista dos fatores citados

anteriormente não são facilmente interpretáveis, havendo a necessidade, para extrair a informação contida neles, da aplicação de métodos de calibração multivariada (ALMEIDA, 2009).

Tabela 10: Atribuições das regiões espectrais às possíveis transições espectrais

Região Espectral (nm)	Natureza da transição vibracional
2200-2450	Estiramento da combinação C-H
2000-2200	Estiramento da combinação N-H, O-H
1650-1800	Primeiro sobreton do estiramento C-H
1400-1500	Primeiro sobreton do estiramento N-H, O-H
1100-1225	Segundo sobretons do estiramento C-H
950-1100	Segundo sobretons do estiramento N-H, O-H
850-950	Terceiro sobretons do estiramento C-H
775-850	Terceiro sobretons do estiramento N-H, O-H

Fonte: FILHO, 2003.

GOULDEN em 1957 obteve pela primeira vez espectro no NIR de caseína, gordura e lactose de amostras de leite em pó usando comprimentos de ondas para determinação da composição das amostras (RODRIGUEZ-OTERO et al., 1997).

As bandas de absorção no NIR são de 10 a 100 vezes mais fracas que suas correspondentes no infravermelho médio no estado fundamental. Não se constitui em grande desvantagem a diminuição da sensibilidade devido às transições fracas observadas, tendo disponíveis fontes de radiação intensa e detectores de alta eficiência para uso nesta região espectral. O uso da técnica em amostras nas quais um alto teor de água se encontra presente, é permitido devido ao fato das ocorrências não apresentarem alta intensidade. Uma vantagem analítica está relacionada ao baixo coeficiente de absorção que possibilita uma alta profundidade de penetração na amostra, uma vez que permite a análise direta da absorção e do espalhamento da amostra, por exemplo, em líquidos ou sólidos turvos em transmitância ou absorbância sem pré-tratamentos adicionais (TERRA, 2013).

O NIR gera grande quantidade de dados, alta sobreposição espectral e baixa intensidade de sinais, necessitando para ser implantada com eficácia a utilização de métodos quimiométricos (ALMEIDA, 2009).

Entre as vantagens do método NIR estão: o curto período de tempo para obtenção do espectro, a não geração de resíduos químicos, o fato de ser uma técnica não invasiva e não necessitar de preparação das amostras, motivando, assim, o desenvolvimento de técnicas analíticas utilizando esta metodologia (SALA, 2008).

2.7.1 Princípios da espectroscopia no infravermelho

A natureza das ligações moleculares é definida pelas ligações entre átomos dentro de moléculas e está relacionada à base física de absorção da luz. Essas ligações não são estáticas, vibram o tempo todo, originando estiramento e compressão das moléculas, resultando em um movimento de ondas dos átomos com frequência específica dependente dos elementos envolvidos (VIANA, 2008).

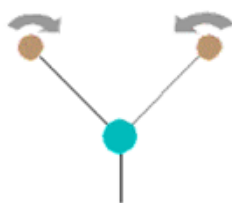
A espectroscopia do infravermelho vibracional é regida pelas leis de Hooke, utiliza o modelo mecânico clássico para explicar os movimentos dos corpos. A lei de Hooke não é aplicada para região do infravermelho próximo devido ao fato de que essa região é composta por bandas de combinação e sobretons. Aplica-se então o princípio de Franck Condon, o qual considera a anarmonicidade do sistema (SALA, 2008).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos: estiramento e deformação, e podem ser simétricas e assimétricas. As vibrações de estiramento são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, e as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano de referência (HOOLER, 2009).

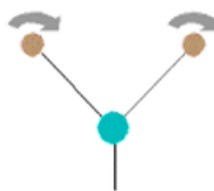
Deformações Axiais



Deformações angulares



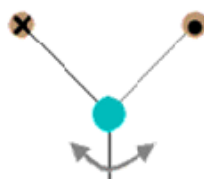
Simétrica



Assimétrica



Simétrica fora do plano



Assimétrica fora do plano

Figura 8: Tipos de vibrações moleculares

Fonte: www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir_arquivos/image004.gif

Podem existir acoplamentos e interações que envolvem vibrações de alongamento e deformação que, caso a intensidade seja reduzida quando comparada com a dos grupos principais, se verificarem a formação de sobretons e bandas de combinação (LEITÃO, 2012).

A formação de sobretons e bandas de combinação são verificadas quando da existência de acoplamentos e interações envolvendo vibrações de alongamento e deformação, na medida em que a intensidade seja reduzida quando comparada com a dos grupos principais (LEITÃO, 2012).

As bandas de combinação aparecem quando uma molécula poliatômica possui dois ou mais modos vibracionais que podem interagir entre si. A soma de cada frequência dos módulos vibracionais na interação possui valor igual à frequência da banda de combinação resultante (LEITÃO, 2012).

Vários modelos existem para explicar o comportamento vibracional das moléculas diatômicas. O modelo oscilador harmônico linear está entre outros reconhecidos, em que a energia (E) é descrita pela lei de Hooke, representado pela equação (1) (ALMEIDA, 2009):

$$E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

Em que k é a constante de ligação, h a constante de Plank, π é um valor irracional equivalente 3,14 e μ a massa reduzida.

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2)$$

e onde m_1 e m_2 são as massas dos átomos envolvidos.

A equação (3) fornece a energia potencial, (V) como função dos deslocamentos dos átomos x :

$$V(x) = \frac{1}{2} k x^2 \quad (3)$$

Este modelo apresenta restrições quando aplicado na prática apesar de dar uma visão do que acontece com as vibrações moleculares.

A mecânica quântica define alguns níveis de energia pela equação (4):

$$E_v = (v + \frac{1}{2}) h\nu \quad (4)$$

v é o número quântico vibracional, E_v é a energia associada com o nível quântico v e ν é a frequência vibracional fundamental.

A frequência (ν) no modelo clássico é dado pela seguinte equação:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (5)$$

Conforme mostrado na figura 9 (modelo harmônico) a distância entre cada nível é sempre a mesma entre os níveis vibracionais, e na figura 10B (2) (modelo anarmônico) essa distância vai diminuindo, ou seja, diminui para energias mais altas.

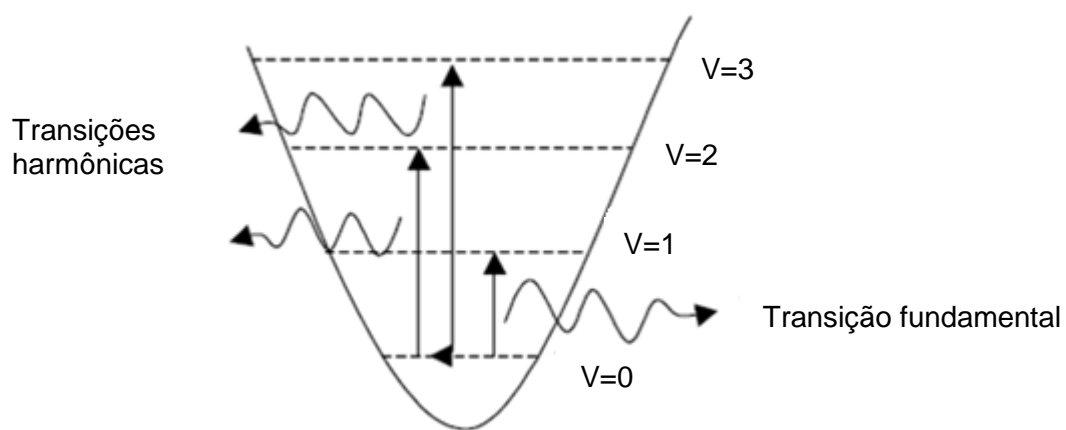


Figura 9: Transição fundamental e transições harmônicas

Fonte: Adaptada TAKAMAYA, 2009.

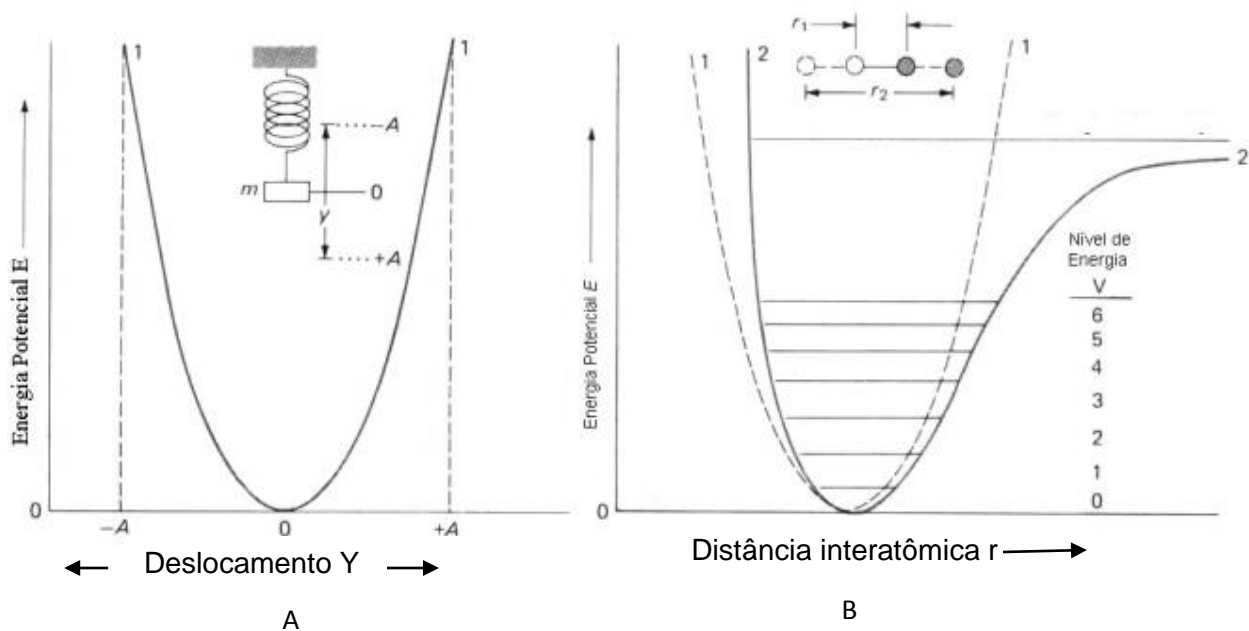


Figura 10: Perfil da energia potencial: A: Modelo harmônico e B: (1) harmônico e (2) anarmônico.

Fonte: ALMEIDA, 2009.

As figuras demonstram que para elevadas distâncias nucleares entre os dois átomos presentes na ligação, o modelo do oscilador anarmônico prevê dissociação, enquanto o modelo do oscilador harmônico não tem este fator em conta (ALMEIDA, 2009).

O modelo do oscilador anarmônico representa melhor o comportamento das moléculas em se tratando de moléculas reais. Prevê também a presença de sobretons, que são as transições observadas no NIR e bandas de combinação, conforme na figura 10B (2), suas frequências são a soma dos múltiplos de cada frequência de interação (ALMEIDA, 2009).

O espectro NIR está associado à anarmonicidade das ligações envolvendo átomos de hidrogênio, que devido à sua pequena massa atômica e grande momento dipolo quando ligados a átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio, conseguem vibrar com maior amplitude (COSTA FILHO, 2003).

2.7.2 NIR com transformada de Fourier (FT-NIR)

O espectro é constituído por uma fonte de infravermelho, um conjunto de lentes, local para colocar as amostras e um detector. Os instrumentos FT-NIR têm como resultados do processo de análise um interferograma que contém informações sobre todas as frequências do espectro IR, são baseados em sua grande maioria no interferômetro de Michelson (LEITÃO, 2012).

Com o desenvolvimento de *softwares* apareceram os espectrômetros de FT-NIR, que é uma operação matemática que irá separar as frequências das absorções individuais contidas no interferograma, produzindo um espectro virtualmente idêntico ao obtido com um espectrômetro dispersivo. A operação matemática infravermelho transformada de Fourier (FT-IR) é aplicada, quer por um microprocessador acoplado ao espectrofotômetro, quer por um computador associado externamente ao aparelho, distribuindo assim a energia absorvida pela amostra por cada componente de onda, apresentando assim os valores de cada frequência, resultando numa compreensão e leitura dos resultados (ALMEIDA, 2009).

A vantagem do FT-NIR é que apresenta maior velocidade e sensibilidade em relação a um instrumento dispersivo. A figura 11 mostra o diagrama esquemático do equipamento baseado na transformada de Fourier, que pode atuar nas diferentes regiões do infravermelho, dependendo da luz, detector e varredura dos espelhos utilizados (ARAUJO, 2007).

A utilização simultânea de toda a faixa do espectro nos equipamentos NIR com transformada de Fourier explica a ótima relação sinal/ruído nestes equipamentos, avaliando todos os comprimentos de onda ao mesmo tempo e não somente uma faixa. A utilização de múltiplas aquisições de dados com passagem contínua da radiação vinda da fonte luminosa melhora também essa relação (ARAUJO, 2007).

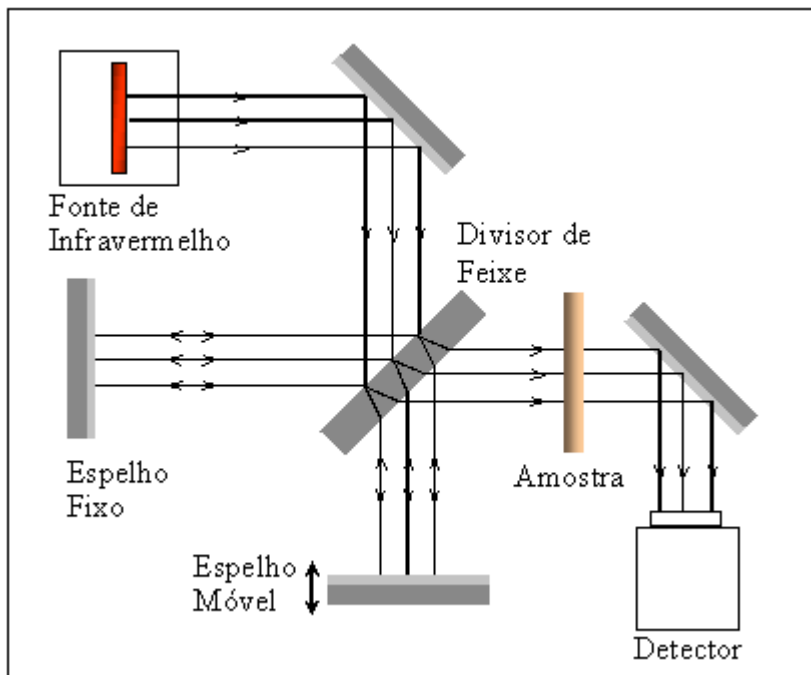


Figura 11: Diagrama esquemático de um espectrômetro de FT-NIR.

Fonte: www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir_arquivos/image006.gif

2.8 QUIMIOMETRIA – TRATAMENTO DE DADOS

A evolução dos instrumentos para análises químicas possibilita gerarem uma única amostra e em um pequeno espaço de tempo um número considerável de dados. Em um único espectro pode ser registrado a intensidade de mil ou mais comprimentos de onda, sendo necessário para que uma informação útil seja obtida deste volume de dados a utilização de técnicas adequadas, originando a quimiometria, um dos campos de estudo destinado à análise de dados químicos de natureza multivariada, uma ferramenta de automação laboratorial (ROCHA, 2009).

O termo quimiometria surgiu no final dos anos 70 para descrever as técnicas associadas ao tratamento matemático e à interpretação de dados químicos. Os instrumentos analíticos modernos utilizados pelos pesquisadores surgiram pela necessidade do desenvolvimento de novos métodos matemáticos e estatísticos para lidar com a vasta quantidade de dados. Como resultados surgiram vários métodos de análise multivariada, que viabilizaram o tratamento rápido de extensos conjuntos de

dados de um sistema qualquer. Utilizando métodos de regressão é possível detectar e quantificar os teores de vários compostos usando dados de espectroscopia (COVA, 2011).

Os métodos de análise multivariada mudaram o quadro de análise química, passou-se a investir no desenvolvimento de técnicas matemáticas capazes de transformar sinais procedentes de misturas de componentes, em informação útil sobre uma ou várias propriedades de interesse (ROCHA, 2009).

2.8.1 Calibração multivariada

Hoje, as técnicas instrumentais estão sendo cada vez mais utilizadas como: espectroscopia no infravermelho, espectroscopia no visível/ultravioleta, espectroscopia de massa, cromatografia, ressonância magnética nuclear, polarografia, análise por injeção em fluxo, etc. Estas técnicas não produzem respostas das propriedades físicas das amostras, apenas registram espectros, sendo necessário algum procedimento para encontrar um algoritmo matemático que analise estas propriedades a partir dos resultados registrados pelo instrumento (CARVALHO, 2007).

O objetivo é que o modelo construído seja empregado para prever as propriedades relevantes em amostras desconhecidas, usando como base resposta instrumental das mesmas (ROCHA, 2009).

A calibração dependendo do número de variáveis pode ser classificada em univariada, quando é estipulada uma relação matemática entre uma única variável dependente e uma única variável independente, e a calibração multivariada, quando há relação entre mais de uma variável. Podendo ser lineares e não lineares. A regressão linear múltipla é dada pela equação 6:

$$Y_{(Np)} = X_{(nj)} B_{(jp)} + E_{(Np)} \quad (6)$$

Onde X contém absorvância ao longo dos comprimentos de "J", "B" é uma matriz que contém os coeficientes do modelo, e "E" é o resíduo não explicado pelo modelo.

Existe uma variedade de técnicas disponíveis para os dados espectrais, dentre as mais conhecidas temos: regressão linear múltipla (*multiple linear regression*, MLR), análise por componentes principais (*principal components analysis*, PCA) e mínimos quadrados parciais (*partial least squares*, PLS) possibilitando um avanço na quimiometria (VIANA, 2008).

2.8.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O princípio fundamental do PLS é a construção de uma nova base ortogonal para o espaço gerado pelas amostras. É um modelo matemático baseado em variáveis latentes (fatores), onde cada fator é definido como uma combinação linear das variáveis originais das matrizes X (variáveis independentes) ou Y (variáveis dependentes) (FERREIRA et al.,1999). Nessa nova base as coordenadas das amostras são chamadas de *scores* e os cossenos dos ângulos são os *loadings* (CARVALHO, 2007).

O método é dividido em três etapas: a primeira consiste em montar as matrizes de dados X a partir dos dados espectrais, e Y a partir das propriedades de interesse. A segunda consiste em eliminar as informações que não são relevantes ao sistema, e a terceira etapa consiste em obter-se a relação entre as matrizes X e Y (ZENI, 2005).

O PLS é repetido até o número de variáveis latentes desejadas ou definido. No caso de ter uma reta Y, ou seja, $X_1 = X$ e $Y_1 = Y$, a primeira variável latente $t_1 = X_1 W_1$. O vetor W_1 é definido

$$W = \frac{Xy}{xy} \quad (7)$$

Para gerar a primeira estimativa dos vetores dos *loadings* de x e y:

$$q = \frac{t_a y}{t_a^T t_a} \quad (8)$$

$$p = \frac{t_a x}{t_a^T t_a} \quad (9)$$

Os valores X_1 e Y_1 são atualizados para próxima interação

$$X_2 = X_1 - t_1 p_1 \quad (10)$$

$$Y_2 = Y_1 - t_1 q_1 \quad (11)$$

O coeficiente regressão b é encontrado através de:

$$b = W(P^T W)^{-1} Q^T \quad (12)$$

W , P e Q são obtidos da concatenação dos vetores determinados pelo algoritmo: w_1 , p_1 e q_1 .

No PLS a calibração multivariada é realizada utilizando a informação do espectro inteiro para construir um modelo de regressão, relacionado à propriedade de interesse, por esta razão é chamado de método "*full spectrum*".

Alguns parâmetros adotados como critério de seleção são: coeficiente de correlação (R^2), os valores de RMSEE e RMSEP (ZENI, 2005).

2.8.3 Correção Multiplicativa de Sinais (MSC)

O uso de ferramentas matemáticas antes da modelagem multivariada faz-se necessário para corrigir interferências espectrais devido ao espalhamento da luz, variações ópticas de caminho óptico e ruído que se originam devido à variação física das amostras ou efeitos instrumentais. Algumas técnicas de pré-processamento utilizadas são MSC, Variação Padrão Normal (*Standard Normal Variate*, SNV) e 2ª derivada de Savitzky-Golay (TERRA, 2013).

A Correção Multiplicativa de Sinais (MSC) é o processo matemático utilizado para normalizar os dados ou compensar problemas, como o fenômeno conhecido como espalhamento da luz, que geralmente é provocado pela falta de homogeneidade óptica das amostras que é comum em medidas de reflectância na região do infravermelho. Os sinais analíticos, obtidos por técnicas instrumentais, podem ser acompanhados por ruídos de diversas origens, estes podem dificultar a interpretação, bem como a modelagem das propriedades associadas aos sinais espectrais. Estas operações matemáticas possuem o objetivo de reduzir, eliminar, ou padronizar os impactos sobre os espectros (NETO, 2012).

Esse método matemático minimiza a interferência através da linha base dos espectros, de modo que todos os espectros apresentem o espalhamento médio do conjunto de calibração (ALMEIDA, 2009).

2.8.4 Validação

As amostras do conjunto de validação não são empregadas para ajustar o modelo, apenas para verificar o desempenho. As amostras do conjunto calibração devem apresentar valores que estejam entre o intervalo do conjunto de calibração e apresentem desempenho muito semelhante em todos os parâmetros de avaliação do modelo de calibração. A validação pode ser realizada pelo método de validação externa também chamada independente ou validação cruzada (CARVALHO, 2007).

Validação externa:

No caso da validação externa, separa-se um grupo de amostras de propriedade conhecida, chamado conjunto de validação e o restante das amostras irá formar o conjunto de calibração. As amostras da validação externa também são analisadas pelo método de referência (CARVALHO, 2007).

O modelo é construído utilizando as amostras de calibração e validado pelo conjunto de validação. São comparadas as propriedades previstas com as propriedades obtidas experimentalmente, e calculado o erro de previsão. A dimensão do erro irá determinar a eficiência do modelo (CARVALHO, 2007).

$$\text{Erro} = (\hat{Y}_i - y_i) \quad (13)$$

No qual \hat{Y}_i é o valor estimado para amostra i utilizando o modelo e y_i é o valor medido para amostra.

Validação cruzada:

No método de validação cruzada uma ou mais amostras são retiradas do conjunto de calibração, constrói-se um modelo com as amostras restantes e faz-se a previsão para estas amostras, em seguida são incluídas novamente no conjunto e outras amostras são retiradas. A operação é repetida até que todas as amostras do conjunto de calibração sejam testadas (CARVALHO, 2007).

A validação permite testar se o modelo é capaz de prever as propriedades (variáveis dependentes) descritas pelas variáveis independentes, de forma confiável, podendo ser utilizado para fazer a previsão de propriedades em amostras desconhecidas (CARVALHO, 2007).

2.9 REDES NEURAIIS ARTIFICIAIS (RNA)

As pesquisas sobre as redes neurais iniciaram quando Warren Mc Culloch e Walter Pitts, em 1943, estabeleceram as bases da neurocomputação e geraram procedimentos matemáticos análogos ao funcionamento dos neurônios biológicos (PANTOJA, 2006).

Nos anos 80 com os avanços na área de tecnologia de computadores e processamento paralelo, o interesse pelas redes neurais retornou, surgindo novos modelos neurais (PANTOJA, 2006).

As RNA possuem regras de treinamentos na maioria dos modelos, onde os pesos de suas conexões são ajustados de acordo com os padrões apresentados, ou seja, aprendem através de exemplos. Distinguem-se pelo grande número de parâmetros envolvidos (pesos) devido à alta conectividade entre os neurônios. Os dados normalmente são divididos em dois conjuntos, um usado para o treinamento e o outro para testar a capacidade de previsão. A rede é treinada para determinar o conjunto de pesos ótimos (SOTELLO, 2006).

A rede mais utilizada é a de três camadas, consistindo de uma camada de entrada, é onde os dados são apresentados à rede; uma oculta ou intermediária, onde

é feita a maior parte do processamento e outra de saída, onde o resultado final é concluído (SOTELLO, 2006).

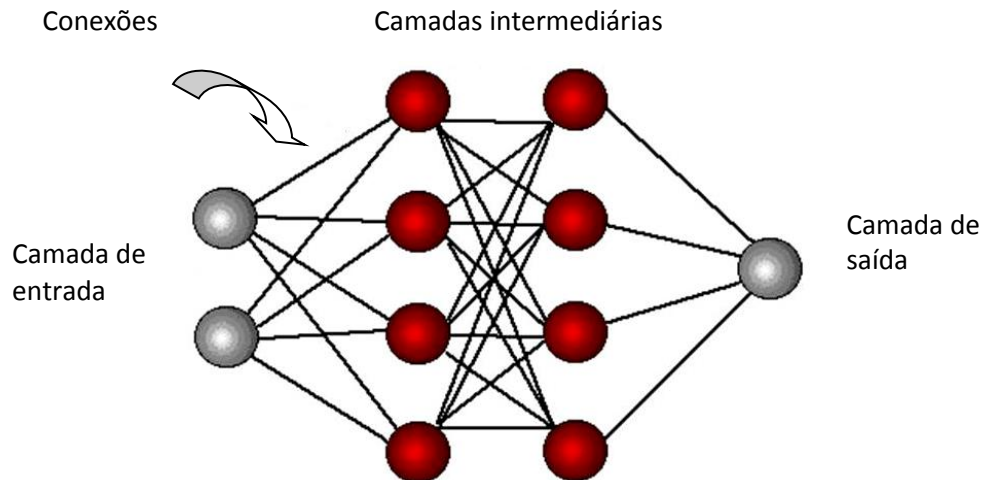


Figura 12: Rede neural de três camadas.

Fonte: <http://www.din.uem.br/ia/neurais/camadas.gif>

2.10 UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

KASEMSUMRAN et al. (2007) concluiu em seus estudos que os resultados obtidos demonstraram que a espectroscopia NIR associado ao PLS é altamente viável para detectar adulterantes como água e soro de leite em leite natural.

FERRÃO et al. (2007) concluiu em seus estudos que os resultados obtidos demonstraram que modelos de regressão para detectar adulterantes como amido, soro de leite e sacarose em leite em pó são bastante promissores para serem empregados na avaliação da qualidade de produtos alimentícios através de medidas indiretas de análise, como por exemplo, espectros de reflexão no infravermelho próximo - NIR.

ALMEIDA (2009) concluiu que NIR associado às técnicas quimiométricas, foram capazes de quantificar as propriedades físico-químicas das farinhas de alimentação.

OLIVEIRA (2010) desenvolveu em seu trabalho um método para determinação de CMP em leite ultra-alta temperatura (UAT), através da aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo, para isso utilizou oito marcas diferentes de leite UAT, todas oriundas de laticínios sob Inspeção Federal. Em cada marca de leite foram obtidos oito

tratamentos, com base na adição de soro em pó reconstituído nas concentrações de 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 8% e 10%.

O método de referência utilizado foi o CLAE. Os resultados encontrados estavam acima da concentração permitida ao consumo (até 30 mg/L).

O modelo de calibração mais adequado para a determinação de CMP em leite UHT foi desenvolvido com a utilização das seguintes ferramentas quimiométricas: método de seleção de espectros máxima distância, pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada, e o método de regressão por mínimos quadrados parciais.

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,8946 leva a conclusão que a espectroscopia de infravermelho próximo pode ser uma alternativa para determinação de CMP em leite UHT, utilizando cinco fatores (OLIVEIRA, 2010).

INACIO (2010) conclui em suas pesquisas que os experimentos propostos permitiram a classificação e a quantificação de amostras de leite em pó através das técnicas da espectroscopia de infravermelho próximo com reflectância difusa, PLS, PCA, regressão em componentes principais (*principal component regression*, PCR) e modelagem independente para analogia de classes (*soft independent modeling of class analogy*, SIMCA) comparadas com o método de referência Kjeldhal.

CASSOLI (2010) utilizou a metodologia de infravermelho com transformada de Fourier na identificação e adulteração em leite cru. As amostras foram adulteradas com bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro de leite. Foram desenvolvidas calibrações para identificação de adulteração através da comparação de leite adulterado com um espectro de referência para leite cru.

BALALIN & SMIRNOV (2011) em seu trabalho constataram que a espectroscopia infravermelha é uma ferramenta eficaz para detectar melamina em produtos lácteos, fórmulas infantis, leite em pó e líquido, alcançando em seu trabalho $0,76 \pm 0,11$ ppm (parte por milhão). Concluíram que a espectroscopia de infravermelho pode ser considerada como um método rápido, sensível e de baixo custo para análises de produtos lácteos.

ZHANG (2014) em seu trabalho utilizou mais de 800 amostras de leite representativas, que consistia de 287 amostras de leite de vaca cru de diferentes pastagens ao redor de Xangai, na China, e 526 amostras de leite adulterado contendo

diferentes pseudo-proteínas e espessantes, que foram coletadas e concebidas para demonstrar um método para rapidamente discriminar leites adulterados com base nos espectros do infravermelho próximo. Os resultados demonstraram a utilidade de espectros NIR combinado com métodos de reconhecimento de padrões não-lineares como um método objetivo e rápido para a identificação dos padrões dos leites cru oriundos de vaca.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar o soro de leite adicionado ao leite cru utilizando espectroscopia do infravermelho próximo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a eficiência do método de espectroscopia do infravermelho próximo na quantificação de soro de leite no leite cru.

Comparar o método de espectroscopia do infravermelho próximo na determinação de soro de leite no leite cru em relação ao método de referência CLAE.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As quatro amostras de leite cru foram coletadas em quatro fazendas localizadas na Zona da Mata Mineira e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) onde foram analisadas e preparadas.

Foram fracionadas, congeladas e transportadas em caixas isotérmicas contendo solução criogênica (álcool, gelo reciclável e sal) até o laboratório de Análise de Qualidade de Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG). A EV/UFMG processou as análises CLAE das amostras em questão.

As análises de composição química do leite e as análises das amostras de espectroscopia foram realizadas no LEM do Departamento de Física da UFJF.

As características físico-químicas estudadas compreenderam a determinação da acidez titulável, foi realizada a titulação com a solução Dornic. O volume de solução Dornic gasto foi anotado, para que se realizasse correlação com a acidez da amostra: 0,1 mL de solução Dornic gastos na titulação correspondem a 1^oD. Na determinação da densidade foi utilizado termolactodensímetro, o índice crioscópico foi realizado no crioscópio digital. O aparelho mostrou o resultado da temperatura de congelamento do leite em graus Hortvet e o teor de água presente em %. Para dosagem de gordura, proteína e lactose, foi utilizado o equipamento lactoscopio.

4.2 PREPARAÇÃO DO SORO DO LEITE

2000 ml de leite integral não homogeneizado foi aquecido à temperatura de 32°C e adicionado de 2 ml de quimosina. Após agitação, o leite com o coalho foi mantido a esta temperatura por aproximadamente 40 minutos até a formação do coágulo. A massa coagulada foi cortada em cubos e agitada lentamente por 30 segundos. Após esse tempo foi deixada em repouso por mais 2 a 3 minutos. A massa foi novamente

agitada lentamente, até que o soro estivesse límpido sem a presença de matéria leitosa. O soro foi então separado, filtrado em lactofiltro inox e aquecido à temperatura de 80° C para inativação da enzima do coalho e resfriado.

4.3 ADIÇÃO DE SORO AO LEITE

Ao final têm-se duas soluções estoque, uma da mistura das amostras de leite cru e outra de soro.

Ao leite cru foram adicionados soro de leite nas concentrações 0% (sem adição de soro); 1%; 4,25%; 7,5%; 10,75%; 14%; 17,25%; 20,5% realizadas em triplicata e nas concentrações de 2,5%; 6%; 9%; 19%; 22% para validação. Em seguida foram retiradas alíquotas de 1 ml de amostras para análise por espectroscopia do infravermelho NIR por reflexão, o restante das amostras foram congeladas para serem enviadas para o laboratório da Qualidade de Leite da EV/UFMG para análise por CLAE sendo verificada e comparada a eficiência da análise por espectroscopia do infravermelho.

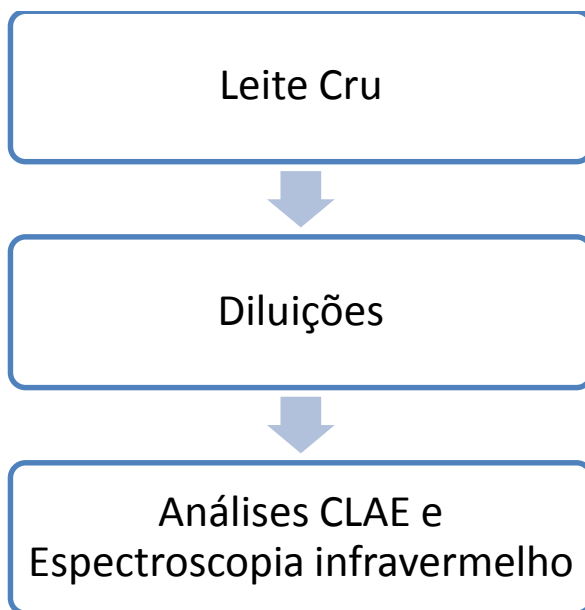


Figura 13– Esquema do experimento de quantificação de fraude de leite com soro de leite por CLAE e espectroscopia do infravermelho.

4.4 CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O equipamento utilizado para quantificação de soro de leite foi o equipamento SHIMADZAU modelo SPD – 10AV. A coluna utilizada foi a Zorbax GF-250 da Agilent, fase reversa. Com vazão de 1,5 ml/min.

Uma quantidade de 5 ml de ácido tricloroacético (24%) foi adicionada gota a gota a 10 ml das amostras, deixada em repouso durante 60 minutos à temperatura ambiente, seguido por filtração em papel qualitativo, rejeitando as primeiras gotas.

O injetor utilizado foi seringa. O tempo de retenção foi entre 6,49 e 6,51 minutos. As análises foram realizadas no laboratório da qualidade de leite da EV/UFMG.

4.5 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NO NIR

O equipamento utilizado para coleta dos espectros foi um espectrômetro da marca Bruker modelo MPA – R (Figura 14), com o apoio do programa computacional OPUS versão 6.5, pertencente ao LEM do Departamento de Física da UFJF.

Este equipamento utiliza a transformada de Fourier e possui uma esfera de integração. A aquisição dos espectros foi realizada na faixa 13500 a 3700 cm^{-1} em modo de reflexão difusa, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 *scans* por leitura (cada espectro é uma média de 32 varreduras).



Figura 14: Espectrômetro da marca Bruker modelo MPA– R

4.6 PLS E RNA

A partir da aquisição do NIR e das quantificações pelo método de referência HPLC foi utilizado o PLS e RNA para classificação das amostras. O PLS utiliza informações dos conjuntos de dados da matriz espectral (X) para correlacioná-los com as informações presentes do conjunto de dados de referência (Y).

A figura 15 apresenta um esquema do processo de calibração, sendo que o modelo de calibração é uma relação entre X (espectros NIR) e Y (método de referência) e os diversos métodos de regressão irão correlacionar ambos as informações de formas diferentes.

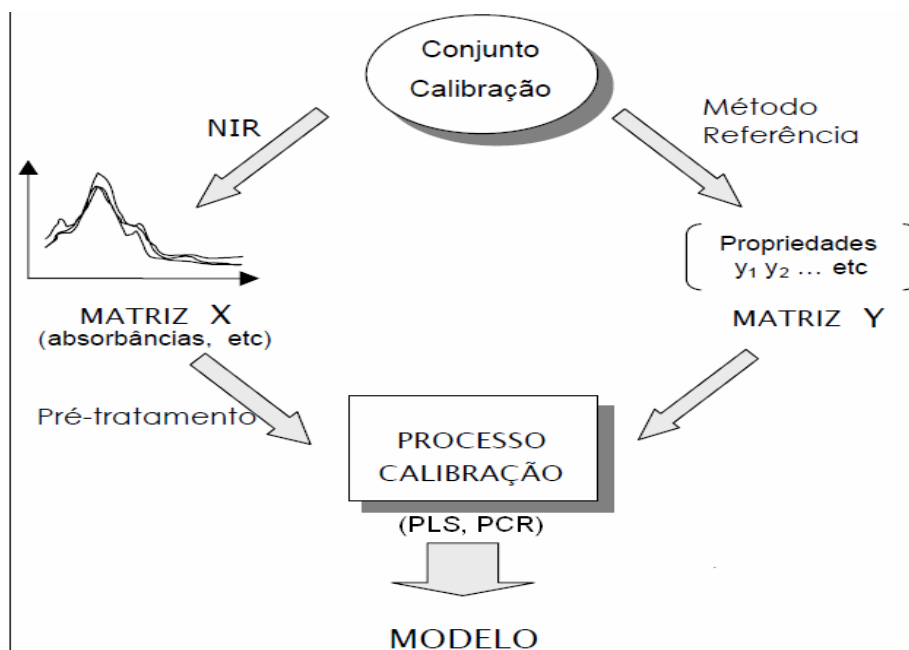


Figura 15: Esquema geral do processo de calibração (PLS)

Fonte: Sotelo, 2006

Na quantificação pelo RNA as amostras foram divididas em conjunto de treinamento e validação. A arquitetura utilizada na rede foi do tipo Random K-folde.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE UTILIZADO NO ESTUDO

Tabela 11: Composição média do leite utilizado no estudo

Componente	%	Desvio Padrão
Proteína	3,38	0,078
Gordura	3,60	0,121
Lactose	4,53	0,138

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU SEM ADIÇÃO DE SORO

As análises físico-químicas do leite cru sem adição de soro coletado em propriedades rurais, no mesmo dia da sua produção e imediatamente refrigerado encontram-se na tabela 12.

Tabela 12: Análises físico-químicas do leite utilizado no estudo

Parâmetros de qualidade	Valor
Gordura	3,60%
Densidade	1.032,8 g/L
Acidez	15,22°D
Índice crioscópico	-0,548 °H - % H ₂ O = 0%
Alizarol	Normal
Ph	6,67
ESD(%m/m)	9,18%

Os resultados obtidos estavam dentro dos padrões fixados pela Instrução Normativa (IN) 62 (BRASIL, 2011).

Na figura 16 estão representados os equipamentos utilizados nas análises realizadas nas amostras de leite cru.

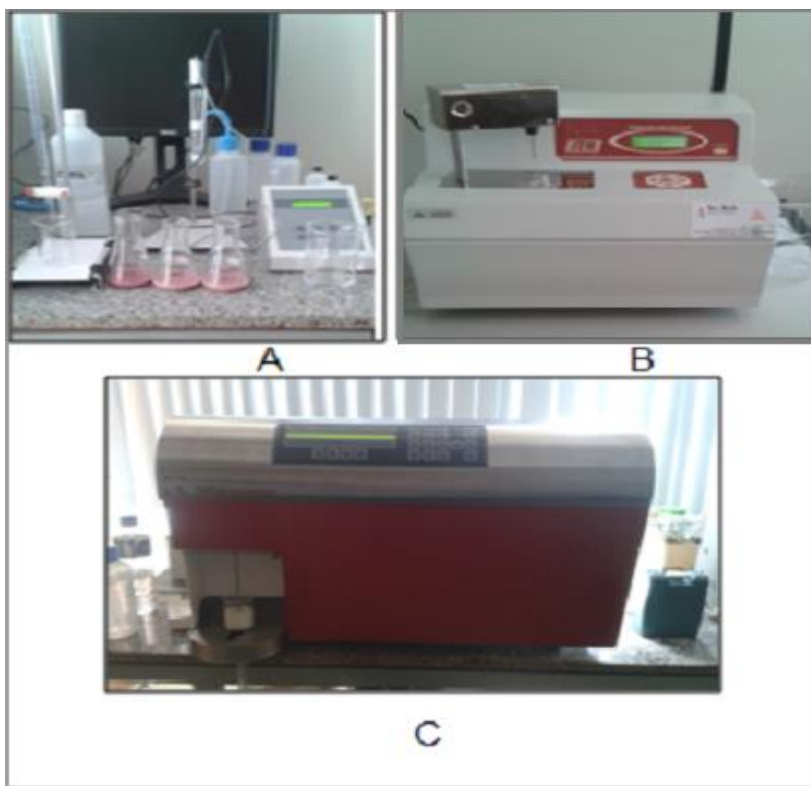


Figura 16: A: Análise de acidez; B: Crioscópio; C: Lactoscópio

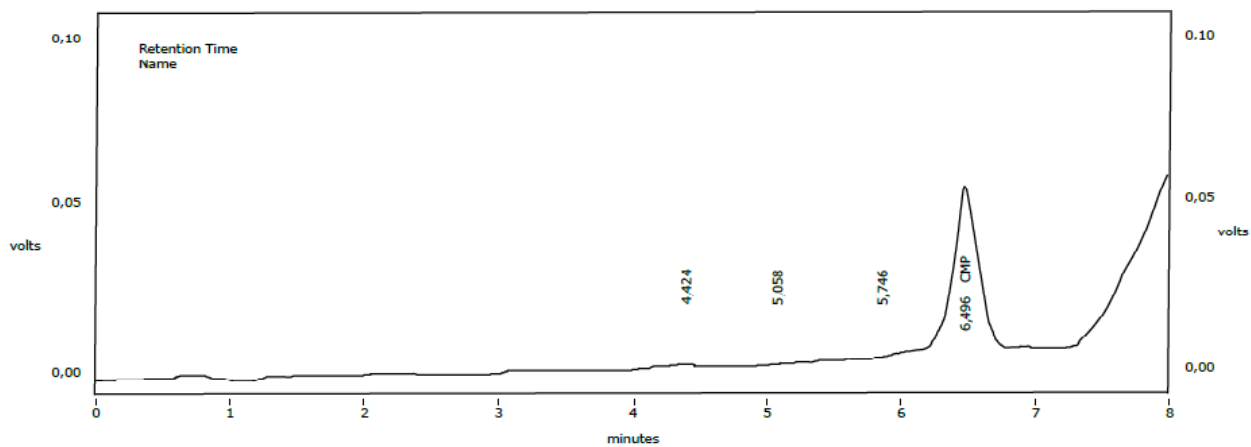
5.3 ANÁLISES DE REFERÊNCIA – CLAE

Os valores de cada amostra analisada pelo método CLAE em função da quantidade de CMP estão demonstrados na tabela 13.

Tabela13: Concentrações de CMP obtidas por CLAE em amostras adicionadas de soro de leite

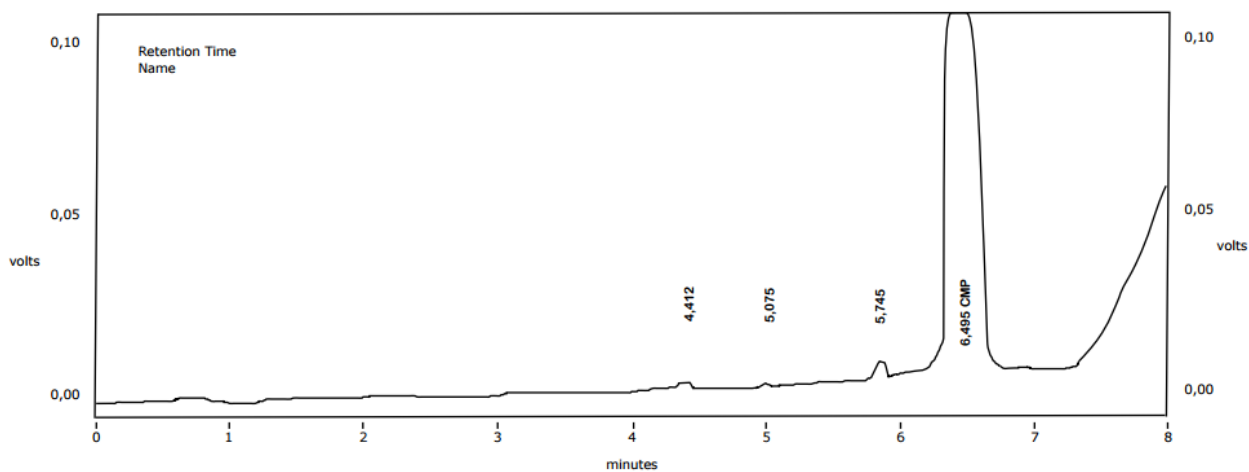
Amostra	Concentração		CLAE CMP mg/L	Amostra	Concentração		CLAE CMP mg/L
	% soro	% leite			% soro	% leite	
01	0	100	0,951	16	20,5	79,5	438,46
02	1	99	24,61	17	0	100	0,487
03	4,25	95,75	73,05	18	1	99	25,98
04	7,5	92,5	147,74	19	4,25	95,75	88,35
05	10,75	89,25	192,22	20	7,5	92,5	158,55
06	14	86	276,63	21	10,75	89,25	225,94
07	17,25	82,75	309,61	22	14,0	86	246,96
08	20,5	79,5	392,45	23	17,25	82,75	310,87
09	0	100	0,664	24	20,5	79,5	424,65
10	1	99	23,27	25	2,5	97,5	52,44
11	4,25	95,75	81,55	26	6,0	94	113,36
12	7,5	92,5	152,17	27	9,0	91	187,51
13	10,75	89,25	205,63	28	19,0	81	419,28
14	14,0	86	276,49	29	22,0	78	379,83
15	17,25	82,75	331,61				

Nas figuras 17 e 18 temos representados os tempos de retenção de CMP em torno de “6,496” e “6,495” minutos referentes às concentrações de 147,74 e 331,610 mg/L de CMP, respectivamente.



UV-VIS(205nm) Pk# name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
4 CMP	6,496		147,74	mg/L

Figura17: Representação do cromatograma referente 147,74 mg/L CMP e ao tempo retenção 6,496.



UV-VIS(205nm) Pk# name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
4CMP	6,495	2024774	331,610	mg/L

Figura18: Representação do cromatograma referente 331,610 mg/L CMP e ao tempo retenção 6,495.

A figura 19 representa a concentração de CMP em relação à porcentagem adicionada de soro de leite para o conjunto de validação. Os coeficientes de correlação encontrados para o conjunto de calibração foram $R = 0,9978$ e coeficiente de determinação de $R^2 = 0,9957$ para 1º lote de repetições, $R = 0,9958$ e $R^2 = 0,9912$ para 2º lote e $R = 0,9969$ e $R^2 = 0,9939$ para 3º lote. O R^2 é uma medida descritiva da qualidade do ajuste obtido. Estes resultados demonstram que houve uma linearidade entre a porcentagem de soro e a concentração de CMP.

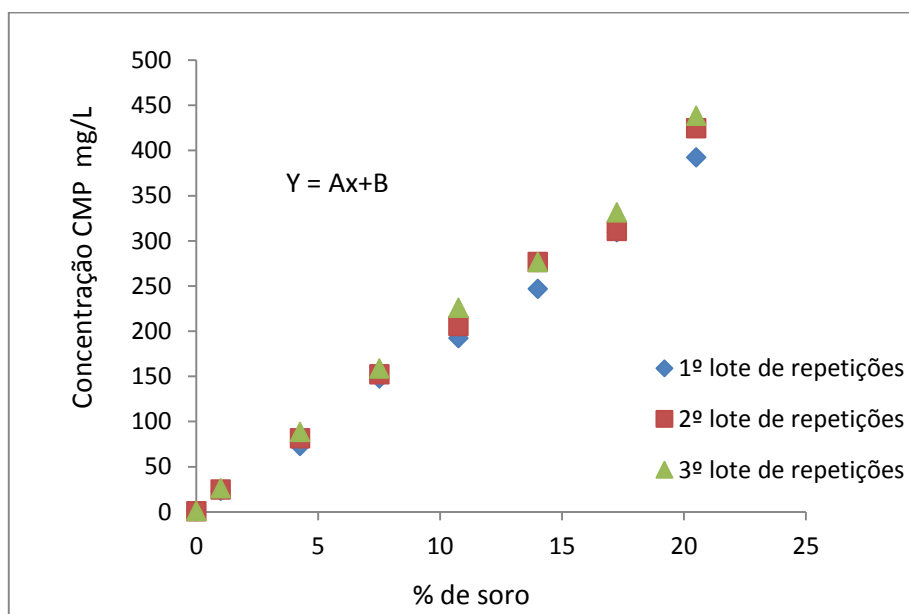


Figura 19: Concentração de CMP e porcentagem de soro referente às amostras de calibração.

A figura 20 representa a concentração de CMP em relação à porcentagem adicionada de soro de leite para o conjunto de validação.

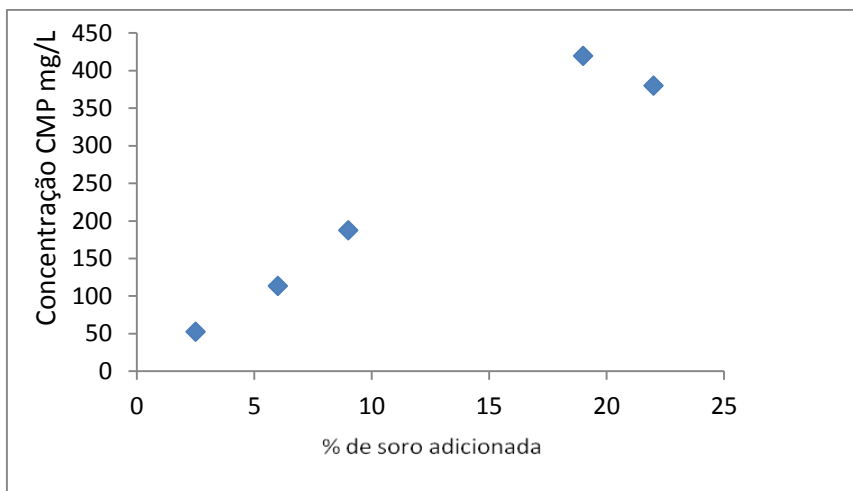


Figura 20: Concentração de CMP e porcentagem de soro referente às amostras de validação.

5.4 ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Das 29 amostras analisadas por espectroscopia NIR, 8 análises utilizaram amostras com níveis de adição de soro de 0% (amostra sem soro); 1%; 4,25%; 7,5%; 10,75%; 14%; 17,25%; e 20,5% analisadas em triplicatas, totalizando 24 amostras. Outras 5 amostras com percentual de soro de 2,5%; 6%; 9%; 19% e 22% foram utilizadas como conjunto de validação.

5.5 CORREÇÃO DO ESPALHAMENTO DA LUZ

Depois de obtidos os espectros no NIR das amostras de leite adulteradas com soro, utilizou-se o filtro de MSC para normalizar cada observação em relação ao espectro médio, e as variáveis foram centradas.

Os espectros representados na figura 21 foram obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1} e construído o gráfico de reflectância x número de ondas (cm^{-1}). Foi utilizada para desenvolvimento PLS toda a região do espectro, *full spectros*.

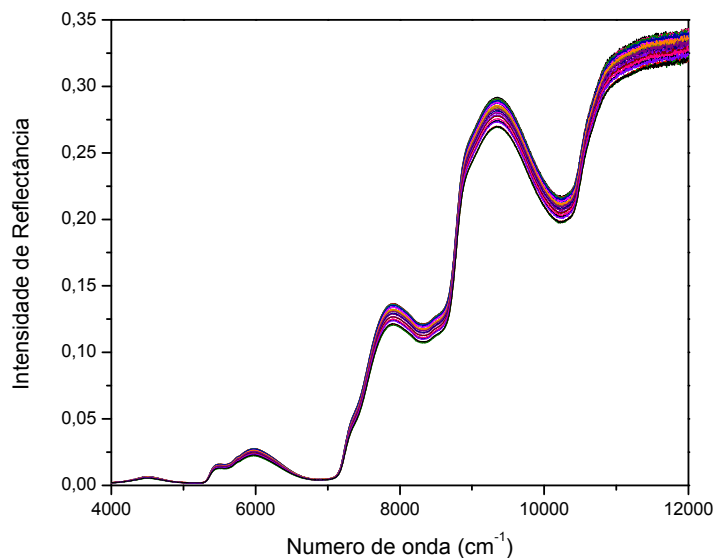


Figura 21: Gráfico de Reflectância x número de ondas (cm^{-1}) construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo de 4000 a 12000 cm^{-1} .

A figura 22 mostra os espectros NIR de 4000 cm^{-1} a 12000 cm^{-1} de leite cru sem adulteração, adulterado com 20,5% de soro de leite e soro de leite puro. As figuras 23 e 24 também ilustram a semelhança entre os espectros de leite cru e leite cru adulterado com soro. Os espectros do leite e leite adulterado são semelhantes, e não é fácil quantificá-los, necessitando de métodos quimiométricos como PLS para quantificação das amostras.

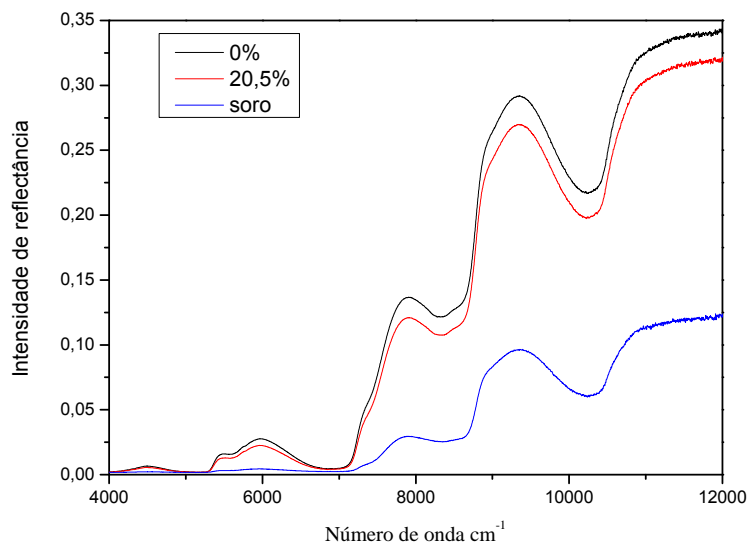


Figura 22: Gráfico de Reflectância x número de onda (cm^{-1}) referente amostras 0% (sem soro), 20,5% de soro e soro de leite, construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1} .

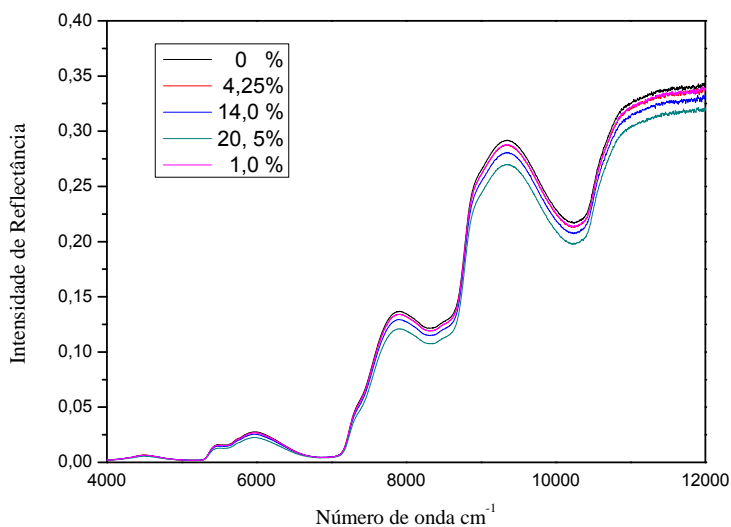


Figura 23: Gráfico de Reflectância x número de onda (cm^{-1}) referente amostras 0% (sem soro), 1%, 4,25%, 14%, 20,5%, construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1} .

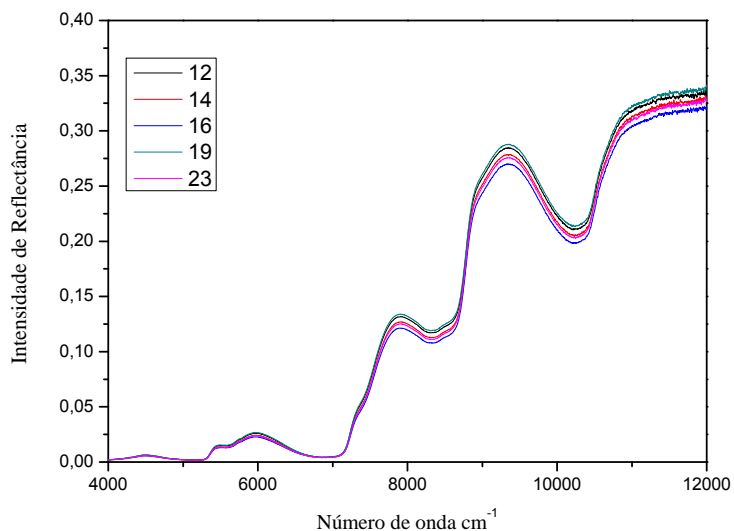


Figura 24: Gráfico de reflectância x número de onda (cm^{-1}) referente amostras 2,5%, 7,5%, 10,75%, 14%, 20,5%, construído a partir dos espectros obtidos em toda região do infravermelho próximo 4000 a 12000 cm^{-1} .

5.6 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

A partir das aquisições NIR e das quantificações obtidas pelo método HPLC foi elaborado um modelo de regressão por PLS utilizando o *software* OPUS 6.5. O modelo PLS foi ajustado utilizando 2 variáveis latentes, R^2_x igual 0,877 (relacionado ao espectros de infravermelho-próximo) e R^2_y igual 0,998 (relacionado as concentrações fornecidas pelo método HPLC).

O modelo de calibração para adulteração com soro de leite apresentou RMSEE igual 6,68 mg/L e RMSEP igual 39,36 mg/L por um modelo de PLS ajustado utilizando 2 fatores. Este modelo foi construído utilizando o MSC como pré-tratamento.

Os valores de RMSEE igual a 6,68 mg/L e RMSEP igual a 39,36 mg/L correspondem em percentual de soro adicionado ao RMSEE igual 0,23% e RMSEP igual a 1,91% respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a espectroscopia NIR em combinação com PLS tem um potencial viável para quantificar soro em amostras de leite cru.

A figura 25 apresenta o gráfico de correlação entre as quantificações obtidas pela técnica NIR (eixo Y) e a técnica HPLC (eixo X).

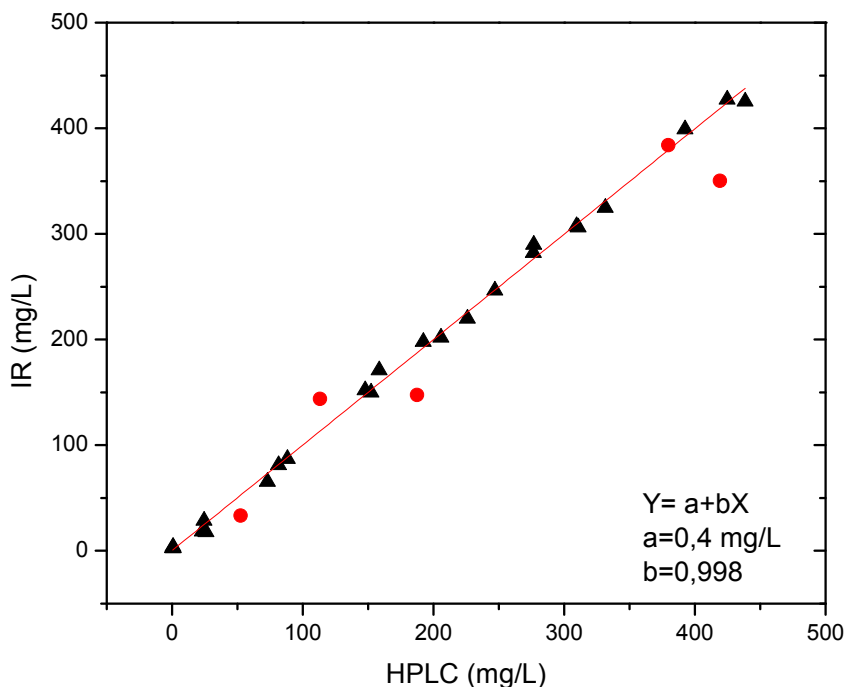


Figura 25: Observado x predito. Eixo-horizantal valores verdadeiros de CMP quantificados pelo método HPLC, eixo-vertical valores de CMP obtidos pelo método de infravermelho-próximo (▲) conjunto de calibração, (•) conjunto de validação.

Fazendo um ajuste linear entre os valores quantificados pelo método HPLC e pela regressão PLS com os espectros de infravermelho próximo, foi obtido um coeficiente de determinação R^2 de 0,9885 para o conjunto de calibração e R^2 de 0,9543 para o conjunto de validação sugerindo que as medições de NIR podem ser utilizadas para quantificar a adição de soro de leite em leite cru.

O estudo mostra que o PLS é um modelo excelente para predição de soro de leite em leite cru.

Tabela 14: Parâmetros obtidos para o modelo PLS para predição CMP

Parâmetros	Soro	% adição de soro
R ²	0,9885	
RMSEE	6,68 mg/L	0,23%
RMSEP	39,37mg/L	1,91%

5. 7 REDES NEURAIIS ARTIFICIAIS (RNA)

Para a aplicação das redes neurais, as amostras foram divididas em conjunto de treinamento e validação. A arquitetura utilizada na rede foi do tipo Random K-folde os parâmetros de avaliação encontram-se na tabela 15.

Tabela 15: Parâmetros de avaliação obtidos para o modelo RNA para predição CMP

Parâmetros	Treinamento	Validação
RSquare ou coeficiente de determinação	0,99999	0,99996
RMSE (raiz quadrada do erro médio)	0,03002	1,06304
MAD(desvio médio absoluto)	0,0228586	0,9296278
-LogLikelihood (Probabilidade logarítmica)	-52,1772	5,9203046
SSE (Soma dos erros quadráticos)	0,0225239	4,5202603
Sum Freq (Soma frequência)	25	4

O coeficiente de determinação R² igual 0,99999 e RMSE de 0,03002 no conjunto utilizado no treinamento, R² igual 0,99996 e RMSE 1,06304 para o conjunto de validação. O modelo de calibração multivariada por rede neural forneceu um modelo capaz de quantificar a concentração de soro. O processo de treinamento foi satisfatório. Isto pode ser verificado no processo de previsão, quando foi utilizado o modelo obtido

para identificar as amostras que não entraram no conjunto de treinamento e pelos resultados obtidos dos parâmetros de avaliação constantes da tabela 15.

Como pode ser verificada nos gráficos das figuras 26 e 27 a correlação dos valores reais e previsto do CMP apresentam uma linearidade, com valores de coeficiente de determinação extremamente próximo de 1.

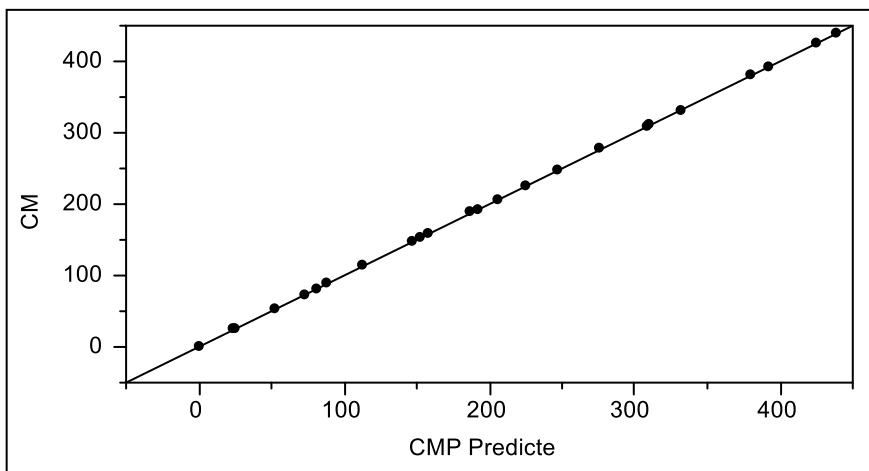


Figura 26: Gráfico da correlação dos valores reais e previsto do CMP referente amostras de treinamento.

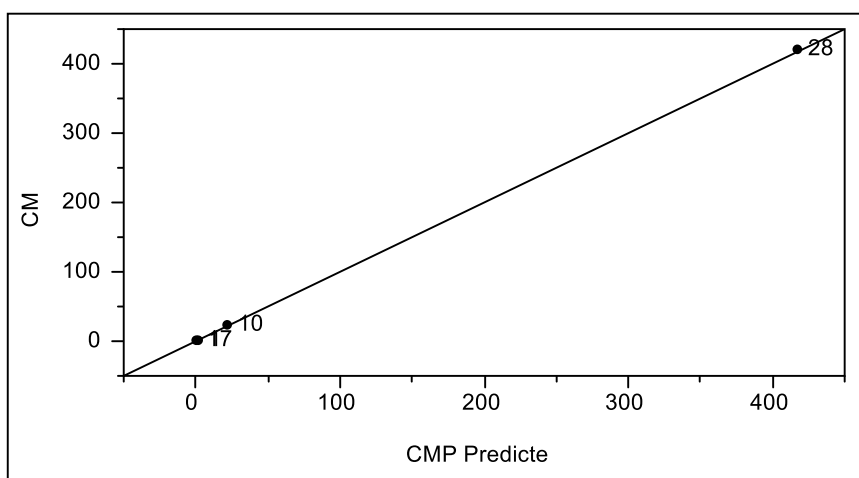


Figura 27: Gráfico da correlação dos valores reais e previsto do CMP referente amostras de validação.

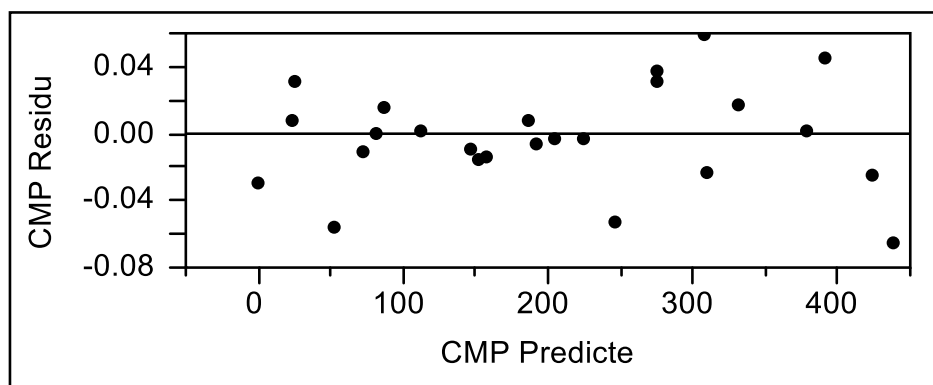


Figura 28: Gráfico referente às representações dos valores de CMP previstos e CMP residual referente às amostras de treinamento.

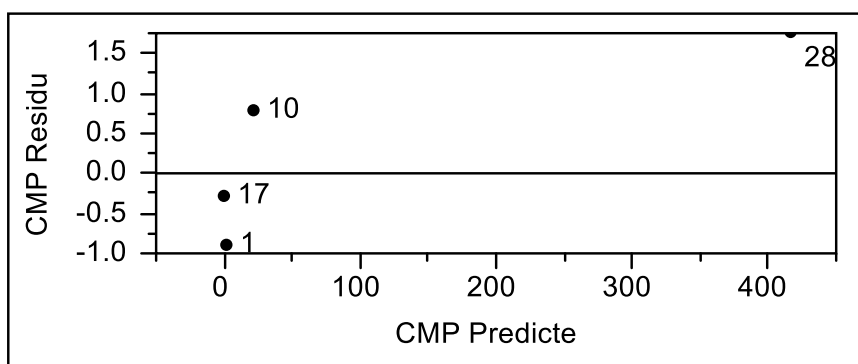


Figura 29: Gráfico referente às representações dos valores de CMP previstos e CMP residual referente às amostras de validação.

6.0 CONCLUSÃO

Baseando-se nos estudos pode-se concluir que a combinação entre a espectroscopia NIR e o PLS é uma maneira apropriada para análises de determinação de soro de leite obtido por ação enzimática no leite cru. Nos soro ácido e soro obtido por microfiltração não existe CMP.

A utilização de RNA permite a quantificação de fraude por adição de soro de leite ao leite, demonstrando grande potencial de sua aplicação para seleção das possíveis amostras adulteradas.

Mostrando uma boa correlação entre a metodologia aqui apresentada, o NIR juntamente com a abordagem PLS e, ou redes neurais apresentam em relação à metodologia oficial por HPLC como vantagens: rapidez, ausência de preparação de amostra, ausência do consumo de reagente e análise não destrutiva.

Sugerimos pesquisas que possam cobrir maior variação de constituintes do leite para aplicações práticas na indústria laticinista.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. **Produção de queijos no Brasil**. São Paulo, 2013.

AIRES, A. G. **O soro de leite como suplemento proteico para atletas**. 2010. Trabalho de conclusão do curso (Graduação de Engenharia de Alimentos)-Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

ALCANTARA, L. A. P. **Otimização do fracionamento das proteínas do soro de leite por extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos**. 2009. Dissertação – (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ALMEIDA, F. **Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica)-Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

ALVIN, T. C. **Efeito da qualidade do leite na detecção do soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho filtração gélica (GF-HPLC)**. 1992. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite bovino**. 1. Ed. Barueri: Manole, 2003. 26-30 e 137p.

AQUINO, L. F. M. C. et al. Identifying cheese whey an adulterant in milk: Limited contribution of a sensometric approach. **Food Research International**, v. 62, p. 233-237, 2014.

ARAUJO, A. M. Monitoramento de processos em tempo real via espectrofotometria no infravermelho próximo. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)– Universidade Tiradentes, Sergipe, 2007.

BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2007.189p.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**: queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 13. ed. São Paulo: Nobel, 1999. 320p.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 12 de setembro de 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n.30.691, de 29 de maio 1952 e alterado pela última vez pelo Decreto n.2.244 de 4 de junho de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 jun. 1997. Seção 1, p.11555.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 ago. 2005. Seção 1, p. 7.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25/06/1962, nº 1.236 de 02/09/1994, nº 1.812 de 08/02/1996, nº 2.244 de 04/06/1997 e nº 6385 de 27/02/2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 27 fev. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p. 6

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE C.; SILVA M.; SOUZA G.
Composição do Leite. Agência de informação EMBRAPA Agronegócio do Leite.
EMBRAPA. Disponível em:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html > . Acesso em 5 de dezembro de 2014.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO L. M.; ALCANTARA L. P. A.; BONOMO R. C. F.
Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **REDEVET. Revista electrónica de Veterinaria**, v. 8, n. 6, p. 1-7, 2007. Disponível em:
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060704.pdf>. Acesso em 20 de agosto 2014.

CASSOLI, L. D; SARTORI, B; ZAMPAR, A; MACHADO, P. F. An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 4, p. 480-485, nov. 2011.

COLLINS, C. H. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 452p.

COSTA FILHO, P. A. **Estudo comparativo de técnicas de inteligência artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo,** 2003. 201f. Tese (Doutorado em Ciências – Química analítica)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

COSTA, M. R.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 507-514, 2009.

COVA, T. F. G. G. **Aplicações em quimiometria:** do diagnóstico médico à quimiometria. 2011. Dissertação (Mestrado química)-Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

CQUALI. Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos. **Direitos do Consumidor.** São Paulo. 2008. Disponível em:<<http://www.cquali.gov.br/data/Pages/MJ1A9DD1F0ITEMID02EAB682C855462B9B CAAFC04D3A1933PTBRNN.htm> > Acesso em 12 de agosto de 2014.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2011.

DICKINSON, E. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 15, n. 2, p. 161-176, 1999.

FERRÃO, M. F.; MELLO, C.; BORIN, A.; MARETTO, D. A.; POPPI, R. J. LSSVM: uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. **Química Nova**, v.30, n.4, p.852-859, 2007.

FERREIRA NETO, F. **Determinação do teor de diclofenaco sódico em comprimidos por espectroscopia no infravermelho próximo NIR com calibração multivariada PLS**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química)–Universidade Federal Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2012.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P. L. H. *Advanced Dairy Chemistry*. 3.ed. New York, Kluwer: Academic/Plenum Publisher, 2003. v.1.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677-684, 2008.

FUKUDA, S. P. **Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite**. 2003. 149f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)–Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FURTADO, M. M. e LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, p. 76-77, 1994.

FURTADO, M. A. M. e VILELA, M. A. P. Fraudes em leite de consumo: Limites de detecção. **Revista Leite e Derivados**, n. 29. Julho/Agosto, 1996.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. de. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-88, 2006.

HOMEM, G. R.; **Avaliação técnico-econômica e análise locacional de uma unidade processadora de soro de queijo em Minas Gerais**. 2004. 230f. Tese (Doutorado Ciências e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**, Tradução para o português: CÉLIO PASQUINI et al. [Coord.] 6. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 40, p 1- 71, 2012. Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf> acessado em 10 de março 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v 41, p 1-108, 2013. Disponível em:<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf> acessado em 15 de março 2015.

INÁCIO, M. R. C. **Ferramentas quimiométricas aplicadas à classificação de amostras de leite em pó e quantificação de proteínas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal Rio Grande do Norte, 2010.

KASEMSUMRAN, S.; THANAPASE, W.; KIATSOONTHON, A. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. **Analytical Sciences**, v. 23, n. 7, p. 907-910, 2007.

LEITÃO, T. M. D. **Aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo em Ciências Farmacêuticas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

LEITE, J. L. B et al. **Comércio Internacional de Lácteos**. 2. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, Israel, v. 15, p. 73–83, 2010.

MAGALHÃES, M. A. **Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratados por lípases. **Brazilian journal of Food Technology**, v.9, n.2, p.143-149, 2006.

MILAGRES, F. R. **Avaliação da madeira de híbridos de Eucalyptus globulus com E. grandis e E. urophylla, para produção de celulose, utilizando espectroscopia NIR.** 2009. Dissertação (Mestrado Ciência Florestal)-Universidade Federal Viçosa, Viçosa, 2009.

MOTTA, E. do C. M. **Caracterização do leite bovino e humano através da técnica Raman dispersiva no infravermelho próximo e análise semi quantitativas dos teores macro nutricionais.** 2012. Dissertação (Mestrado Engenharia Biomédica)-Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, 2012.

OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia molecular. **Cadernos temáticos de química nova na escola**, v. 4, p. 24-30, 2001.

OLIVEIRA, G. B. **Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas.** 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

OLIVEIRA, R. R de **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo para a determinação do caseinomacropéptideo em leite UHT.** 2010 – Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

OLIVEIRA, M. C. P. P. de - **Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): validação da análise do teor de uréia e de outros parâmetros de qualidade do leite -** 2011 – Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PANTOJA, P. A. Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização da carga de petróleo para o processo de destilação atmosférica – 2006 – Dissertação (Mestrado em Engenharia química)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PASQUINI, C. Nearinfraredspectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PAULA, J.C.J. de. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite.** 2005. 70p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia.** Trad. Pedro Barros. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

RENHE, I. R. T.; PERRONE, I. T.; SILVA, P. H. F. **Leite Condensado. Identidade, qualidade e tecnologia**, Juiz de Fora: Templo, 2011, p 45-47.

RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: A review. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2815-2819, 1997.

ROMA JÚNIOR, L. C. **Características quantitativas e qualitativas da proteína do leite produzido na região Sudeste**. 2008. 150 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

TULLIO, L. T. **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SALA, O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho. 2.ed.- São Paulo: Editora UNESP, 2008.

SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F.; Alternativa para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.3, p. 44-50, 2001.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **RevNutr**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005

SILVA, N. F. N. **Desfosforilação de caseínas por via enzimática e química**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

SMITHERS, G. Review Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, 18, 695– 704, 2008.

SOTELO, F. F. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização de petróleo: simulação de uma unidade de uma unidade de destilação atmosférica**. 2006. 154 p (Doutorado em Engenharia química)-Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOUZA, A. B. Avaliação da influência tecnológica da relação soro-proteína/caseínas durante condições simuladas de processamento térmico. 2013 - Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e Minas padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TERRA, L. A. **Avaliação de transformação polimórfica em comprimidos do fármaco carbamazepina por espectroscopia de imagem no infravermelho próximo e ferramentas quimiométricas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

VIANA, L. C. **Uso da espectroscopia no infravermelho próximo para predição de propriedades tecnológicas da madeira de eucalyptus**. 2008 - Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VILLANOEVA, C. N. B. C. et al. Caseinomacropeptide index in UHT whole milk stored under different conditions of temperature and time. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 289-296, 2014.

ZADOW, J. G. **Modern Dairy Technology: Advances in Milk Processing**. London: Elsevier, 1997. v.2.

ZENI, D. **Determinação de Cloridrato de Propranolol em Medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS)**. 2005 - Dissertação (Mestrado em química)-Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria, 2005.

ZHANG, Li-Guo; Zhang, X.; Ni, L. J.; Xue, Z. B.; Gu, X., & Huang, S. X. Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. **Food chemistry**, v. 145, p. 342-348, 2014.