

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO
PRÓXIMO PARA A DETERMINAÇÃO DO
CASEINOMACROPEPTÍDEO EM LEITE UAT**

Raphael Rocha de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

GOIÂNIA
2010

RAPHAEL ROCHA DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO
PRÓXIMO PARA A DETERMINAÇÃO DO
CASEINOMACROPEPTÍDEO EM LEITE UAT**

Dissertação apresentada para obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Cristiano Sales Prado

Prof. Dr. Antônio Nonato de Oliveira

GOIÂNIA
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

O482a Oliveira, Raphael Rocha.
Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo para a
determinação do caseinomacropeptídeo em leite UAT
[manuscrito] / Raphael Rocha de Oliveira. - 2010.
63 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Evandro Lage.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária, 2010.

Bibliografia.

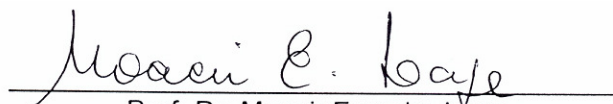
Inclui lista de figuras, tabelas e abreviaturas.

1. Calibração multivariada 2. NIRS 3. PLS 4. Pré-tratamentos
5. Proteólise 6. Soro de queijo. I. Título.

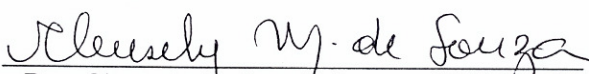
CDU: 637.344

RAPHAEL ROCHA DE OLIVEIRA

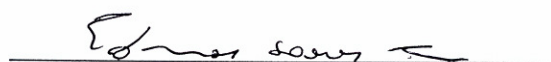
Dissertação defendida e aprovada em **26/02/2010**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Moacir Evandro Lage
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Cleusely Matias de Souza - UFG/Jataí-Goiás



Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

Dedico

À minha avó Maria Bandeira Neres Rocha, que nos deixou em 09 de novembro de 2009.

Não é fácil lidar com a perda de um ente querido, mas na minha lembrança, ao invés de tristeza, ficarão os seus sábios ensinamentos, as suas atitudes de extrema generosidade, o exemplo de uma pessoa caridosa, justa, que não fazia acepção de pessoas e que sempre conduziu a todos da família a trilharem o bom caminho.

“Vovó Mariquinha”, obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, física e psíquica, disposição, paciência e as condições necessárias para o cumprimento desta importante etapa.

A toda minha família, que deu o suporte material e emocional, força, e o apoio necessário para a realização do Mestrado, especialmente aos meus pais, Gilton Pereira de Oliveira e Maria do Socorro Bandeira Rocha de Oliveira; à minha irmã, Gracielle Rocha de Oliveira, seu esposo, Hyohanne Alaim Araújo Borges e meu sobrinho, Yan Alaim de Oliveira Araújo; ao meu irmão, Gilton Pereira de Oliveira Júnior e ao meu avô, Adauto Rocha Nogueira.

À minha namorada Michelle Costa de Sales, que sempre me encorajou e me deu um novo ânimo para continuar em frente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moacir Evandro Lage, que desde a graduação, vem contribuindo para o meu desenvolvimento acadêmico, com sugestões valiosas e conhecimentos técnicos.

Aos professores do Centro de Pesquisa em Alimentos, Prof. Dr. Cristiano Sales Prado e Prof. Dr. Antônio Nonato de Oliveira, por participarem do comitê de orientação; e ao Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau, por contribuir, sempre que solicitado, para a execução deste trabalho.

Aos meus grandes amigos, Fabrício de Oliveira Pereira, Osvaldo José da Silveira Neto e Valter Mário Canedo Filho, companheiros, nos momentos bons e ruins, desde o início da graduação.

Às bolsistas de Iniciação Científica, Candice Henriques Silva e Maria Izabel Amaral Souza, pela amizade e contribuição importante na parte experimental.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Alimentos, especialmente Rodrigo Almeida de Oliveira e Wilson Cosme Ricardo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade concedida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O leite	3
2.2 Qualidade do leite	5
2.3 Fraude em leite por adição de soro de queijo	6
2.4 Caseinomacropéptido	8
2.5 Métodos para a determinação de CMP em leite	11
2.6 Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS).....	12
2.6.1 Princípios da espectroscopia de infravermelho próximo	14
2.7 Quimiometria e calibração multivariada	16
2.7.1 Métodos para seleção de espectros.....	17
2.7.2 Pré-tratamento dos dados	18
2.7.3 Construção do modelo de calibração	19
2.7.4 Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo de calibração	22
2.7.5 Validação.....	24
2.8 Regiões do infravermelho próximo associadas aos movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos	25
2.9 Aplicação do NIRS em análises com leite fluido.. ..	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Local do experimento	30
4.2 Preparo das amostras para a construção dos modelos de calibração	30
4.3 Célula utilizada para as análises por NIRS	31
4.4 Critérios para a seleção dos modelos	33
4.5 Definição do método de seleção de espectros e pré-tratamento (s) matemático (s).....	33
4.6 Definição das melhores regiões espectrais	34
4.7 Validação externa.....	36

4.8 Metodologia para a quantificação de CMP em leite UAT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Índices de CMP encontrados nas amostras do conjunto de calibração.....	39
5.2 Definição do método de seleção de espectros.....	41
5.3 Definição do (s) pré-tratamento (s).....	43
5.4 Seleção das regiões do infravermelho mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos presentes no CMP.....	46
5.4.1 Regiões em que foram visualizadas diferenças espectrais bem definidas.....	50
5.5 Validação externa.....	52
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da micela de caseína.....	8
Figura 2 - Local da ação da quimosina na κ -caseína	9
Figura 3 - O espectro eletromagnético	13
Figura 4 - Tipos de vibrações moleculares.....	15
Figura 5 - Esquema geral do processo de calibração	20
Figura 6 - Processo de compressão de dados.....	21
Figura 7 - Estrutura dos aminoácidos encontrados em maior quantidade na estrutura do CMP.....	26
Figura 8 - Célula projetada para análise de amostras líquidas.....	32
Figura 9 - Curva padrão para determinação do soro de queijo em leite fluido	37
Figura 10 - Distribuição de frequência dos resultados de CMP dos 64 tratamentos do conjunto de calibração.....	40
Figura 11 - Espectros de leites UAT sem a utilização de pré-tratamentos.....	43
Figura 12 - Espectros de leites UAT em 1ª derivada.....	44
Figura 13 - Espectros de leites UAT em 2ª derivada.....	45
Figura 14 - Relação entre os valores determinados pelo NIRS e valores de referência obtidos por CLAE	49
Figura 15 - Diferenças espectrais nos intervalos A: 1124-1136 e B: 1143- 1162.....	50
Figura 16 - Diferenças espectrais no intervalo 1792-1824	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição teórica dos aminoácidos presentes no CMP	25
Tabela 2 - Regiões e faixas espectrais associadas aos movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos.	27
Tabela 3 - Modelos de calibração com distância de Mahalanobis e máxima distância, utilizando o método de PLS e toda a faixa de 1100 a 2500 nm.	41
Tabela 4 - Pré-tratamentos utilizados com a máxima distância e método de regressão PLS, utilizando toda a faixa de 1100 a 2500 nm... ..	45
Tabela 5 - Modelos com faixas de 50 nm de intervalo, utilizando máxima distância, 2ª derivada e variável normal padronizada, e método de regressão PLS	47
Tabela 6 - Classificação das regiões espectrais mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos do CMP	48
Tabela 7 - Resultados dos agrupamentos realizados conforme a classificação das melhores regiões espectrais, mostrada na Tabela 6	48

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMP	Caseinomacropéptido
CPA	Centro de Pesquisa em Alimentos
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
EV	Escola de Veterinária
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NIRS	Espectroscopia de infravermelho próximo
NM	Nanômetros
PCR	Regressão por Componentes Principais
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
PRESS	Quadrado dos erros de previsão
R^2	Coeficiente de determinação
SEC	Erro padrão de calibração
SEV	Erro padrão de validação
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SNV	Variável Normal Padronizada
TCA	Ácido Tricloroacético
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFG	Universidade Federal de Goiás

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um método para a determinação de CMP em leite UAT através da aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo. Leites UAT de oito marcas diferentes foram utilizados para a construção dos modelos de calibração. Em cada uma dessas marcas foram obtidos oito tratamentos, com base na adição de soro em pó reconstituído ao leite, em 0 (amostra sem adição de soro), 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% e 10%, formando um total de 64 tratamentos. Os espectros foram obtidos por NIRS em três replicatas, formando um total de 192 espectros. Os resultados da CLAE mostraram um índice de CMP nas amostras obtidas no mercado, variando entre 33,64 e 398,78 mg/L. Esses resultados indicam fraude por adição de soro de queijo ou baixa qualidade do leite cru utilizado como matéria-prima. Ao todo, 48 modelos foram obtidos, mostrando que para o desenvolvimento de um modelo de calibração adequado para a determinação de CMP em leite UAT deve-se utilizar juntamente com o método de regressão PLS, o método de seleção de espectros máxima distância e os pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada. As regiões do infravermelho próximo mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos presentes no CMP foram: 1100-1310; 1400-1430; 1490-1550; 1640-1680; 1780-1970; 2020-2100 e 2310-2350 nm. Quando foram agrupadas essas regiões, utilizando as ferramentas quimiométricas selecionadas, foram encontrados os melhores resultados de R^2 (0,8946) e de PRESS (1323569,25), utilizando seis fatores e eliminando apenas 1,56% dos espectros (outliers). Os resultados das amostras utilizadas na etapa de validação, indicam que a adição de soro de queijo, ou a utilização de matérias-primas de baixa qualidade inicial para a fabricação de leite UAT, pode ser rotineira. Os resultados também mostraram que o modelo de calibração foi bem ajustado, já que a razão SEC/SEV apresentou-se dentro do intervalo de similaridade (0,74). Além disso, o modelo de calibração apresentou capacidade de distinção, pois reconheceu os 48 espectros da validação, mas não reconheceu espectros de quatro marcas de leite UAT desnatado. A espectroscopia de infravermelho próximo pode ser uma alternativa para a determinação de CMP em leite UAT, desde que haja um conjunto de calibração com amostras representativas da população a ser predita no futuro.

Palavras-chave: Calibração multivariada, NIRS, PLS, pré-tratamentos, proteólise, soro de queijo

ABSTRACT

This work was carried out to develop a method for the determination of CMP in UHT milk using near-infrared spectroscopy. UHT milk from eight different brands were used for the construction of calibration models. In each of these brands were obtained eight treatments based on the addition of reconstituted whey powder to milk, to 0 (sample with no added whey), 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% and 10%, giving a total of 64 treatments. The spectra were obtained by NIRS in three replicates, giving a total of 192 spectra. The HPLC results showed a rate of CMP in the samples obtained in the market, ranging between 33.64 and 398.78 mg/L. These results indicate fraud by the addition of whey or low quality of raw milk used. Altogether, 48 models were obtained, showing that the development of a calibration model suitable for the detection of CMP in UHT milk should be used with the PLS method, the method of selecting maximum distance and the pre-treatment 2nd derivative and standard normal variate. The near-infrared regions most closely correlated with the vibrational motion of the amino acids present in the CMP were: 1100-1310, 1400-1430, 1490-1550, 1640-1680, 1780-1970, 2020-2100 and 2310-2350 nm. When these regions were grouped with the selected chemometric tools, have been found the best results from R^2 (0,8946) and PRESS (1323569,25), using 6 factors, and eliminating only 1.56% of the spectra (outliers). The results of the samples used for validation, indicates that the addition of whey, or the use of materials of poor quality for the production of UHT milk can be a routine. The results also showed that the calibration model was fine adjusted, as the ratio SEC/SEV was within the range of similarity (0.74). Moreover, the calibration model showed the ability to distinguish, because it recognized the 48 spectra of validation, but did not recognized spectra of four brands of skim milk UHT. However, there is a need for a calibration set wider so that be representative of the entire population.

Keywords: Multivariate calibration, NIRS, PLS, pre-treatments, proteolysis, whey

1 INTRODUÇÃO

Além de sua importância econômica, o leite é considerado um alimento quase completo para o homem, pois apresenta composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e minerais, principalmente o cálcio, sendo indicado para todas as idades (SOUZA, 2006).

Com o aumento da exigência do consumidor por segurança alimentar, a demanda global para uma produção de leite de alta qualidade vem crescendo nas últimas décadas. Dentre os vários parâmetros utilizados para se avaliar a qualidade do leite, pode-se considerar: a ausência de proteólise causada por proteases de bactérias psicotróficas, que provoca reflexos negativos no produto final e diminuição da vida de prateleira (FUKUDA, 2003); e a ausência de fraudes, as quais visam aumentar o tempo de vida de prateleira do produto, aumentar o ganho com o litro do alimento vendido, e/ou alterar as características e os componentes do leite (VIOTTO & CUNHA, 2006).

Entre as fraudes praticadas no Brasil, a mais comum é a adição do soro de queijo, que é 90% mais barato que o leite (FERRÃO et al., 2007). Esta fraude tem merecido a atenção dos órgãos de fiscalização pelo fato de que para o consumidor, a diferença entre o leite puro e o fraudado é imperceptível quando o grau de adição de soro não ultrapassa 20% (BRANDÃO, 2000).

Embora o valor nutricional da proteína do soro seja alto, a substituição do leite por soro precisa ser especificada com clareza, pois, caso contrário, é considerado fraude (VELOSO et al., 2002). A adição de soro de queijo ao leite pode ser detectada e quantificada pela determinação do caseinomacropeptídeo (CMP), em que se tolera um índice de CMP de até 30 mg/L para o leite a ser destinado ao abastecimento direto (BRASIL, 2006b).

Contudo, a presença de CMP em leite UAT não pode ser considerada indicação exclusiva de fraude com soro, pois a proteólise por proteases bacterianas também pode levar ao aparecimento de CMP (RECIO et al., 1996).

A determinação do CMP em leite requer a utilização de análises demoradas, caras e difíceis de serem executadas (FERRÃO et al., 2007). Como a indústria necessita de respostas rápidas, foi objeto de estudos nos últimos anos técnicas que exijam menor manipulação, preparo e tempo de análise reduzidos,

além de bom grau de precisão. Neste sentido, a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) apresenta-se como uma alternativa promissora (CEN & HE, 2007).

O espectro obtido a partir do NIRS é o resultado da reflexão da luz por moléculas orgânicas. Todas as bandas de absorção/reflexão são resultantes de vibrações ou combinações de vibrações (SKOOG et al., 2002). A determinação analítica por infravermelho próximo é baseada na análise do espectro da matéria-prima ou produto analisado. Na prática, a análise quantitativa fundamenta-se na determinação de uma relação matemática entre o conjunto de espectros gerados e valores obtidos a partir de análises laboratoriais de referência. A aplicação qualitativa baseia-se na pesquisa da relação com determinados padrões de comportamento (inflexões, mudanças de bandas de reflexão, etc) dos espectros, em decorrência de algum tipo de alteração física ou química do produto pesquisado (SIMAS, 2005).

Uma vez criada e validada a biblioteca de espectros, sua facilidade de uso impressiona quando comparado aos métodos de análises convencionais. No entanto, o método NIRS não apresenta só vantagens. Como se trata de um método indireto, necessita do desenvolvimento de calibração, precisando, além dos cuidados preliminares com o método de referência, de uma seleção de amostras que tenha variabilidade capaz de representar toda a faixa de trabalho, além das concentrações dos constituintes refletindo sempre nas mesmas frequências (CAMPESTRINI, 2005).

A espectroscopia no infravermelho já foi aplicada em leite para determinação da proteína, caseína total, gordura, lactose, umidade, classificação de leite e em casos de adulteração com gordura (RODRIGUEZ-OTERO et al., 1997). Em relação à determinação de CMP em leite fluido, não foram encontrados estudos utilizando o método NIRS.

Considerando os aspectos mencionados, este estudo foi proposto com o objetivo de desenvolver um método para a determinação do caseinomacropéptido em leite UAT através da aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O leite

Desde a domesticação do gado, há cerca de 6.000 anos, documentos indianos atestam o fato de que o leite já era considerado um importante constituinte alimentar. Este hábito de consumir leite prevalece até os dias de hoje, e adquiriu o perfil da civilização moderna, que o beneficiou e criou um grande número de produtos lácteos (ROMA JÚNIOR, 2008).

Por definição, o leite é um produto obtido da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas leiteiras sadias, bem alimentadas e em repouso. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie da qual procede (BRASIL, 2008).

A produção de leite no Brasil obteve na última década um crescimento de 45%, passando de 18,604 bilhões de litros em 1998 para um total estimado de 27,083 bilhões em 2008 (EMBRAPA, 2008a), gerando um valor bruto da produção de aproximadamente R\$ 15 bilhões (CNA, 2008). No último ranking elaborado pela EMBRAPA (2008b), com dados da produção de 2007, o Brasil apareceu como o sexto maior produtor de leite do mundo. Em relação ao ranking dos Estados, Minas Gerais apareceu em 1º lugar, com uma produção de 7,275 bilhões de litros, seguido de Rio Grande do Sul (2,944 bilhões de litros) e Paraná (2,701 bilhões de litros). Goiás apareceu em 4º lugar, com uma produção de 2,639 bilhões de litros (EMBRAPA, 2008c).

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

Os principais componentes do leite bovino são: água (87,30%), lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%) e minerais (0,72%). As partículas suspensas na fase líquida do leite são gotículas de gordura e micelas de caseína (SGARBIERI, 2004).

Contudo, o leite produzido pelo animal varia quanto ao volume e quanto à relação entre os seus diversos componentes, que podem ser estratificados em mais de 50 compostos químicos de importância variada. As variações quanto à composição do leite dependem dos fatores: espécie animal, raça, individualidade animal, intervalo entre 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).

É em razão desta complexa composição, que o leite constitui matéria prima de extrema versatilidade tecnológica, cujos constituintes, isoladamente ou em conjunto, proporcionam a obtenção de imensa gama de derivados (FUKUDA, 2003).

Atualmente, o leite fluido formal mais comercializado no Brasil é o leite UAT. Entende-se por leite UAT (Ultra Alta Temperatura), o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 e 150 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, e imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C, e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 2008).

A produção brasileira de leite UAT em escala comercial iniciou-se em 1972, no Rio de Janeiro, com um volume de um milhão de litros. Mas foi na década de 90 que houve um intenso crescimento da participação relativa do leite UAT no mercado nacional de leite fluido, passando de uma produção de 184 milhões de litros em 1990, para 2,450 bilhões de litros em 1997, o que corresponde a um incremento de 1.231,5% ao longo do período (MARTINS et al, 2004).

Nos últimos anos, o leite UAT tem sido o vetor de crescimento do leite de consumo no Brasil. Suas vendas, em 2008, somaram 5,3 bilhões de litros, representando 75% do total de leite fluido formal consumido no país. Em 2009, foi previsto que a indústria de leite UAT fechasse o ano com um faturamento de R\$ 9 bilhões (ABLV, 2009).

Dentre os vários fatores que podem explicar este crescimento do leite UAT, pode-se citar os menores custos logísticos, tais como distribuição e comercialização do produto final; e a maior facilidade de estocagem na indústria e

no comércio, em função do seu formato em caixa de material semi-rígido. Além disso, é bastante aceito pelos consumidores devido às facilidades de estocagem à temperatura ambiente, e à maior vida de prateleira, podendo ser armazenado por quatro meses ou mais enquanto fechado. Isso possibilita a inclusão do leite na compra mensal do consumidor, não necessitando adquiri-lo diariamente, como o leite pasteurizado (MAGALHÃES, 2008).

Em função destes e outros fatores, a crescente produção e consumo do leite UAT no Brasil tem despertado cada vez mais o interesse por pesquisas relacionadas à qualidade deste produto.

2.2 Qualidade do leite

A qualidade do leite consumido no país é uma constante preocupação de técnicos e autoridades ligadas à área de saúde e laticínios. A determinação de um leite de qualidade pode ser definida em termos de sua integridade, ou seja, livre da adição de substâncias e/ou remoção de componentes; de sua composição química e características sensoriais, como odor, sabor e aspecto; da ausência de patógenos e de deterioração microbiológica, como a que ocorre por proteólise causada por microrganismos psicotróficos (DÜRR, 2004).

A proteólise do leite UAT é um dos fatores mais importantes para a limitação de sua vida de prateleira, pois provoca mudanças indesejáveis no sabor, no odor e na textura, como o aumento da viscosidade, levando, em alguns casos, à formação de gelificação (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

A ausência de fraudes é também um importante parâmetro para a determinação da qualidade de um leite (SÁ, 2004). Por definição, fraude é a adição ou subtração parcial ou total de qualquer substância na composição original do produto. A fraude pode ser caracterizada tanto pela adição de uma matéria qualquer que não exista no produto, como pela subtração de um dos seus elementos, em condições tais que o produto perca suas características normais (BRASIL, 2008).

Inicialmente, as fraudes almejavam obter aumento de volume do leite, mas, atualmente, visam também alterar as características e os componentes, em

específico o teor de proteínas, com o intuito de receber bonificações (lucro ilícito) em sistemas de pagamento por qualidade (VIOTTO & CUNHA, 2006), criando assim, competição desleal e impacto negativo na economia local ou mesmo internacional (GUAN et al., 2005).

No Brasil, a fraude mais comum em leite é a adição com soro de queijo. Este é um problema que vem preocupando os órgãos de fiscalização e de controle de qualidade nacionais e internacionais, uma vez que a adição de soro de queijo ao leite compromete a sua qualidade, prejudica diretamente o consumidor e aos concorrentes que obedecem à legislação, além de incorrer em diversos crimes previstos na legislação (CARVALHO et al., 2007).

2.3 Fraude em leite por adição de soro de queijo

O soro pode ser definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos, correspondendo a cerca de 80 a 90% do volume do leite, dependendo do tipo de queijo processado e das técnicas de fabricação empregadas. Segundo ZINSKY et al. (2001), o soro pode ser obtido em laboratório ou na indústria por três processos principais:

- a) processo de coagulação enzimática (enzima quimosina ou renina), resultando no coágulo de caseínas, que é a matéria-prima para a produção de queijos; e obtenção de soro doce;
- b) precipitação ácida, resultando no soro ácido;
- c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico.

No Brasil a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, pois provêm da fabricação de queijos por coagulação enzimática, que são os mais comercializados no país (CAYOT & LORIENT, 1997).

O soro é considerado produto nobre pelo seu teor de proteínas de alto valor nutritivo, ricas em aminoácidos essenciais; pela presença de vitaminas do grupo B e por conter quase a totalidade dos sais minerais e a lactose presente no leite que o originou (NEVES, 1993). Embora o valor nutricional da proteína do

soro seja alto, a substituição do leite por soro precisa ser especificada com clareza, pois, caso contrário, é considerado fraude (VELOSO et al., 2002).

O soro de queijo é um produto interessante para quem visa o lucro ilícito, pois pode ser utilizado tanto para aumentar o volume do leite, como para aumentar as proteínas detectáveis. Além disso, é economicamente atrativa sua adição ao leite fluido pelo fato de apresentar um custo reduzido ou nulo, já que é um subproduto quase sempre disponível pela alta quantidade gerada da fabricação de queijos, e pelo fato de ter baixo aproveitamento em derivados e subprodutos lácteos, além do custo do tratamento para o seu descarte em natureza ser alto (CARVALHO et al., 2007).

A legislação brasileira e de todos os países desenvolvidos proíbem a adição de soro de queijo ao leite de consumo (DRACZ, 1996). Contudo, a sua fiscalização é um problema para os órgãos, pois para o consumidor a diferença entre o leite puro e o fraudado é imperceptível quando o grau de adição de soro não ultrapassa 20% (BRANDÃO, 2000).

Exemplos de fraudes em leites por adição de soro de queijo foram mostrados por LASMAR (2007). Segundo a autora, no Estado de Minas Gerais, foi encontrada a fraude em 21 amostras de 38 analisadas, sendo que em uma delas, o teor de adição de soro ao leite chegou a 60%. A autora afirmou que em uma blitz realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), detectou-se a adição de soro de queijo em 32 de 74 indústrias analisadas em 13 Estados brasileiros.

MAFUD et al. (2007), afirmam que para coibir a adição de soro de queijo ao leite, deveria ocorrer a intensificação da fiscalização e o aprimoramento dos sistemas de fiscalização. Algumas medidas seriam úteis para este propósito, como: levantamento e treinamento do número ideal de técnicos para suprir a demanda prevista pelo governo; contratação de mais funcionários e aumento do orçamento para os órgãos de fiscalização; aumento do valor da multa punitiva; aumento da rotação dos fiscais que atuam em cada empresa, evitando que o mesmo atue sempre nas mesmas; dentre outros. Porém, deve ser feita em longo prazo, a conscientização de consumidores e empresas em relação à qualidade do leite, para que as ações corretivas sejam suficientes.

2.4 Caseinomacropeptídeo

As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grandes grupos, as caseínas e as proteínas do soro. A caseína pode ser definida como a fração da proteína do leite que sofre precipitação em pH = 4,6 a 20°C; enquanto que o restante das proteínas do leite que não sofrem precipitação é chamado coletivamente de proteínas do soro (FARRELL et al., 2004).

A caseína é constituída de cinco principais variantes genéticas: α s1, α s2, β , γ e κ -caseína, sendo que a α -caseína (incluindo a α s1 e α s2-caseína) representa aproximadamente 50% das caseínas, a β -caseína 30%, a κ -caseína 15% e a γ -caseína 5% (FARRELL et al., 2004). A estrutura da caseína é ilustrada na Figura 1.

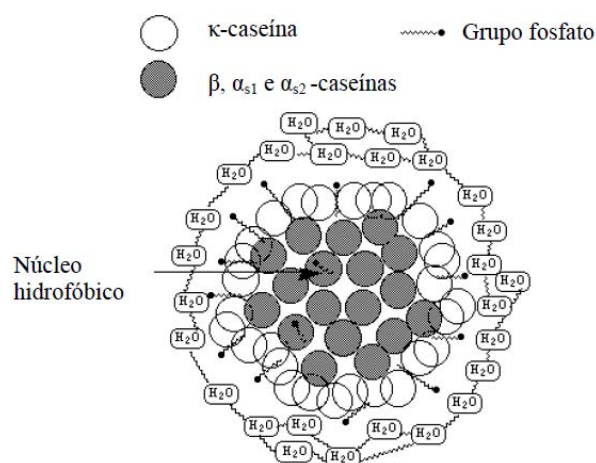


FIGURA 1 - Desenho esquemático da micela de caseína (Lasmar, 2007)

A κ -caseína é constituída por um polipeptídeo de 169 aminoácidos e atua como agente estabilizador da micela de caseína. Contudo, esta propriedade de estabilizar a micela de caseína é perdida durante a coagulação enzimática pela quimosina, que hidrolisa a κ -caseína entre os aminoácidos 105 (fenilalanina-phe) e 106 (metionina-met) (FUKUDA, 2003).

Dois fragmentos ou peptídeos são produzidos desta hidrólise: um N-terminal, denominado para- κ -caseína, composto pelos resíduos de aminoácidos 1 a 105, que permanece nas micelas de caseína na massa do queijo formada; e um polipeptídeo hidrofílico de 64 resíduos de aminoácidos (106-169), derivado da

parte C-terminal da κ -caseína, denominado de caseinomacropeptídeo (MOLLÉ & LÉONIL, 1995). A Figura 2 representa o local da ação da quimosina na κ -caseína.

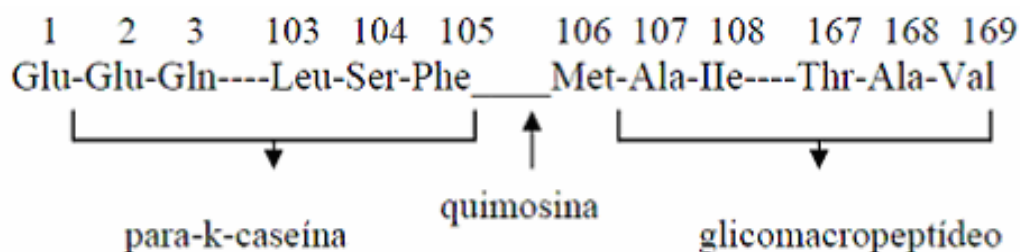


FIGURA 2 - Local da ação da quimosina na κ -caseína (Fennema, 2000)

O caseinomacropeptídeo é um dos inúmeros nomes para os peptídeos resultantes da quebra da κ -caseína. O peptídeo é também conhecido como glicomacropeptídeo (GMP), devido ao seu elevado conteúdo de carboidratos; caseinoglicomacropeptídeo (CGMP); ou peptídeo derivado da caseína (CDP) (TULLIO, 2007).

A detecção de CMP no leite UAT é indicativa de adição de soro de queijo pelo fato do CMP ser hidrofílico, permanecendo, então, solúvel no soro obtido (VELOSO et al., 2002). Contudo, a presença de CMP em leite UAT não pode ser considerada indicação exclusiva de fraude com soro, pois a proteólise, por enzimas de bactérias psicotróficas, pode levar ao aparecimento de CMP (RECIO et al., 1996).

Atualmente, os microorganismos psicotróficos passaram a ter maior importância no leite, já que a Instrução Normativa (IN) 51 (BRASIL, 2002), determinou o resfriamento do leite cru após a ordenha a uma temperatura de 4 °C a 7 °C na propriedade e 10 °C na indústria, em um período máximo de 3h, sendo que o armazenamento no tanque de expansão na propriedade não deve ultrapassar 48h.

Contudo, vários laticínios começaram a fazer a coleta do leite cru, nas propriedades rurais, em intervalos maiores, já que esse produto pode ser mantido em baixas temperaturas por períodos mais longos. Como os microorganismos psicotróficos são capazes de se multiplicarem em temperaturas menores que 7 °C, leites crus estocados por um tempo maior favoreceram o crescimento de grande quantidade de bactérias psicotróficas (SANVIDO, 2007).

Essas bactérias produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas capazes de resistirem aos tratamentos térmicos comerciais. Embora não tenham especificidade, essas enzimas podem hidrolisar a κ -caseína na ligação 105-106, levando a formação do CMP. Além disso, podem provocar ruptura entre os aminoácidos metionina (resíduo 106) e alanina (resíduo 107) formando a estrutura conhecida como pseudo-CMP, que difere do CMP por ter apenas um aminoácido a menos (MAGALHÃES, 2008).

De acordo com a mesma autora, toda análise baseada na identificação do CMP pode resultar na classificação errônea das amostras, ou seja, resultados falso-positivos quanto à adição de soro ao leite, pois não tem como diferenciar o CMP que foi produzido por enzimas proteolíticas e lipolíticas, do que foi obtido com a adição de soro.

Entretanto, as enzimas proteolíticas e lipolíticas só são produzidas quando a contagem de bactérias excede 10^6 UFC/mL (VIDAL-MARTINS et al., 2005). Segundo MAGALHÃES (2008), se for respeitado a temperatura de armazenamento e o tempo de estocagem determinado pela IN 51 (BRASIL, 2002), não haverá a formação de uma quantidade de bactérias suficientes para produzir as enzimas proteolíticas e lipolíticas, e assim, não ocorrerá proteólise no leite UAT.

De acordo com a legislação brasileira, o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto quando forem encontradas concentrações de até 30 mg de CMP por litro de leite. Quando o índice de CMP estiver entre 30 e 75 mg/L, o produto deverá ser destinado apenas à produção de derivados lácteos, e quando houver índice de CMP acima de 75 mg/L, o produto deverá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, caso a caso, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) (BRASIL, 2006b).

Amostras de leite que apresentarem concentração de CMP acima de 30 mg/L não podem ser destinadas ao consumo direto, pois, ou apresenta adição de soro de queijo, ou indica intensa atividade proteolítica, ou seja, é indício de um leite fraudado ou de má qualidade (MAGALHÃES, 2008).

2.5 Métodos para a determinação de CMP em leite

O MAPA, através da Portaria nº 124, de 23 de setembro de 1991 (BRASIL, 1991), estabeleceu dois métodos oficiais para a determinação do CMP, sendo um qualitativo (reativo de Ehrlich para a determinação do ácido siálico), e o outro quantitativo (detecção e quantificação do CMP por meio da cromatografia líquida de alta eficiência). Contudo, essa Portaria foi revogada pela Portaria nº 144, de 8 de junho de 2007 (BRASIL, 2007).

Atualmente, a legislação vigente é a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006a), que estabeleceu dois métodos para a determinação de CMP no leite. Um dos métodos é baseado na determinação do CMP por CLAE, como já estabelecido em 1991. De acordo com FUKUDA (2003), a CLAE é a técnica aceita internacionalmente para identificar e quantificar o CMP. Contudo, essa mesma autora afirma que a utilização do método CLAE se torna muitas vezes inviável em virtude do alto custo dos equipamentos, reagentes e da necessidade de mão-de-obra altamente especializada.

A IN 68 (BRASIL, 2006a), também estabeleceu como oficial o método da ninidrina ácida, que é baseado na determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico ligado ao caseinomacropéptido que é liberado da κ -caseína, na região do visível do espectro, a 470 nanômetros (nm). Em 2003, FUKUDA mostrou que esta técnica apresentou correlação positiva ($r=0.981$) com o método CLAE, e concluiu que o método da ninidrina ácida deveria ser utilizado nas análises de rotina, por não envolver materiais e equipamentos sofisticados, ou mão de obra qualificada, além de reduzir o tempo de execução das análises e que a CLAE deveria ser utilizada só em casos duvidosos ou em contra-provas laboratoriais.

No entanto, FUKUDA (2003), mostrou que os métodos da ninidrina ácida e da cromatografia líquida de alta eficiência não foram capazes de diferenciar o CMP produzido da proteólise bacteriana, do proveniente do soro de queijo.

Estudos com vários outros métodos foram obtidos com o intuito de simplificar a marcha analítica e aumentar a sensibilidade dos métodos existentes.

Dentre os vários estudos e métodos propostos para a determinação do CMP em leite, pode-se citar:

- Cromatografia de troca iônica (LÉONIL & MOLLÉ, 1991);
- Cromatografia de exclusão molecular (VAN HOOYDONK & OLIEMAN, 1982);
- Eletroforese em gel de poliacrilamida (VILELA, 1987);
- Ensaio imunoenzimático (ELISA) (PICARD et al., 1994);
- Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (OLIEMAN & VAN RIEL, 1989);
- Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e Espectrometria de Massa, combinados (MOLLÉ & LÉONIL, 1995; MAGALHÃES, 2008);
- Eletroforese capilar (RECIO et al., 1996);
- Eletroforese capilar de zona com uma coluna hidrofílica de sílica fundida (VAN RIEL & OLIEMAN, 1995);
- CLAE e a espectrometria de massa de ionização por electrospray (NONI & RESMINI, 2005);
- Dentre outros.

Apesar dos vários estudos feitos para a determinação de CMP em leite, ainda se faz necessário o desenvolvimento de um método analítico que seja rápido, preciso, barato, que não necessite de mão de obra especializada, e que utilize equipamentos automatizados (ROMA JÚNIOR, 2008). Neste sentido, a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) apresenta-se como uma alternativa promissora.

2.6 Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS)

NIRS é a sigla de uma técnica denominada near infrared reflectance spectroscopy (espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo). O infravermelho próximo recebe este nome devido à sua proximidade do espectro visível. A parte do espectro eletromagnético visível ao olho humano se estende de 400 a 780 nm, enquanto que o espectro eletromagnético do infravermelho vai de 2.500 a 1.000.000 nm. A região intermediária entre o infravermelho e o espectro

visível, situada entre 780 a 2.500 nm é denominada de infravermelho próximo (SOTELO, 2006), como pode ser vista na Figura 3.

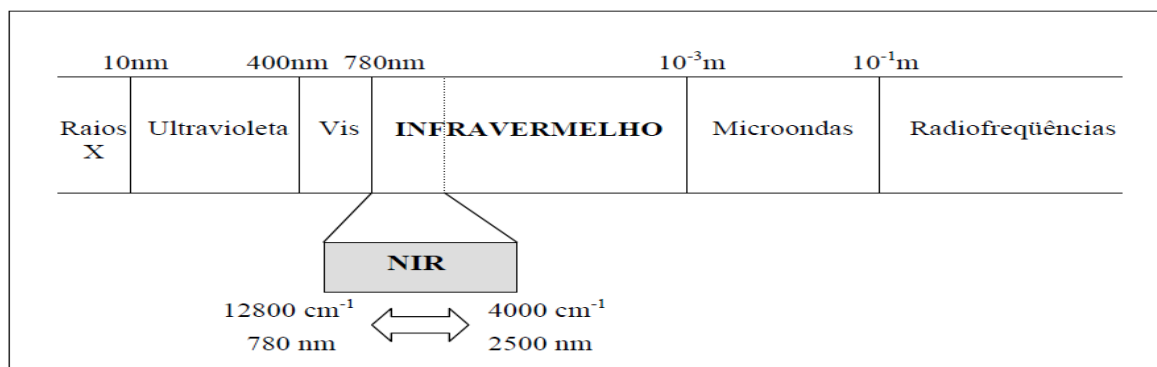


FIGURA 3 - O espectro eletromagnético (Sotelo, 2006)

Existem diferenças básicas no comportamento da emissão de luz nas diferentes regiões do infravermelho. Enquanto que o infravermelho próximo caracteriza-se por uma combinação de harmônicas (ondas curtas com 700 a 1.400 nm) e bandas de vibração (1.400 a 2.500 nm), o infravermelho médio se caracteriza por uma propagação de luz como vibrações fundamentais (2.500 a 50.000 nm), e o infravermelho longínquo apresenta ondas muito longas (50.000 a 1.000.000 nm) propagando-se como rotações (GIVENS et al., 1997).

A espectroscopia no infravermelho próximo é consagrada desde o início da década de 60 (BORIN, 2003). Entretanto, pelo fato das bandas serem harmônicas e de combinação, a absorção na região do infravermelho próximo é 10 a 100 vezes menos intensa que no infravermelho médio. Além disso, existem combinações e forte sobreposição das bandas, fazendo com que os espectros de infravermelho próximo sejam de difícil interpretação, o que deixou a técnica NIRS no esquecimento por algum tempo (WORKMAN et al., 1996).

Só no início dos anos 80, com a popularização dos microcomputadores e o surgimento de uma nova área na química, a quimiometria, é que o infravermelho próximo voltou a ser objeto de estudos em química analítica (NATALINO, 2006).

Os contínuos avanços da informática em termos de hardware e software, possibilitaram a aquisição de um grande número de dados de uma mesma amostra, tornando possíveis análises complexas de soluções e

substâncias, fazendo com que a técnica NIRS fosse utilizada em um número cada vez maior de aplicações (SKOOG et al., 2002).

Como vantagens do NIRS sobre os métodos convencionais pode-se citar: medidas freqüentes e rápidas, entre 15 e 90 segundos por análise; pequena quantidade de amostra utilizada; preparação rápida e simples das amostras; determinação simultânea de diferentes atributos; além de possuir alta seletividade (CAMPESTRINI, 2005; CEN & HE, 2007).

Este método analítico também tem ganhado avanços e terreno nas aplicações industriais em virtude de ser limpo, pois não há emprego de reagentes agressivos e nem a geração de resíduos danosos ao ambiente. Além disso, o baixo custo devido à rapidez das análises justifica a compra do equipamento (HELFER et al., 2006).

2.6.1 Princípios da espectroscopia de infravermelho próximo

Basicamente, o termo espectroscopia tem sido utilizado para designar métodos analíticos em que se estuda a interação de radiações eletromagnéticas com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos, o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas (PANTOJA, 2006). De uma maneira generalizada, a técnica é uma integração da espectroscopia, estatística e computação de dados (VAN KEMPEN & JACKSON, 1996).

Os alimentos são compostos principalmente de matéria orgânica e uma menor fração inorgânica. Todas as ligações orgânicas têm bandas de absorção na região do infravermelho próximo, enquanto que os minerais só são detectados quando em complexos orgânicos ou quelatos (VAN KEMPEN & JACKSON, 1996).

Por causa da baixa massa atômica do hidrogênio, as harmônicas e combinações de banda do hidrogênio tornam os grupos funcionais C-H, O-H e N-H dominantes no espectro do infravermelho próximo em alimentos, possuindo comprimentos de onda de absorção característicos (SKOOG et al., 2002).

A base física de absorção de luz é relacionada à natureza das ligações moleculares que, por sua vez, são definidas pelos vínculos entre átomos dentro

de molécula (VAN KEMPEM & JACKSON, 1996). Dependendo da massa e das ligações químicas em torno de um átomo, têm-se efeitos vibracionais distintos na molécula. Devido a este caráter vibracional, as moléculas, quando submetidas à ação de radiações, estão sujeitas ao desenvolvimento de uma série de efeitos inerentes às ondas eletromagnéticas, tais como absorção, refração, reflexão e espalhamento. Tais efeitos são específicos dos átomos presentes na molécula, bem como da região do espectro envolvida, permitindo a identificação de compostos (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Vários modelos são propostos para explicar o comportamento vibracional das moléculas, porém, nenhum deles é tão eficiente quanto o da esfera-mola. De acordo com este modelo, os átomos são representados por esferas de tamanho variável, ao passo que as ligações são descritas como molas com elasticidades diferentes. Uma molécula só estaria na posição estática a 0°K (-273,15 °C). Em qualquer temperatura diferente, existe o movimento vibracional, representado por vários estágios de estiramento da “mola”, entre os limites de estiramentos máximo e mínimo. Estas vibrações e seus respectivos estados de estiramento dependem fundamentalmente dos tipos de átomos envolvidos (“tamanho das esferas”) e da força de ligação (“força da mola”). Dependendo dos fatores citados, cada vibração apresenta uma energia característica, denominada energia vibracional (PASQUINI, 2003).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformação axial (ou estiramento) e deformação angular, e podem ser simétricas ou assimétricas. As vibrações angulares podem ainda ser classificadas como no plano ou fora do plano (DURRANT, 2009). Os diferentes tipos de vibração são mostrados na Figura 4.

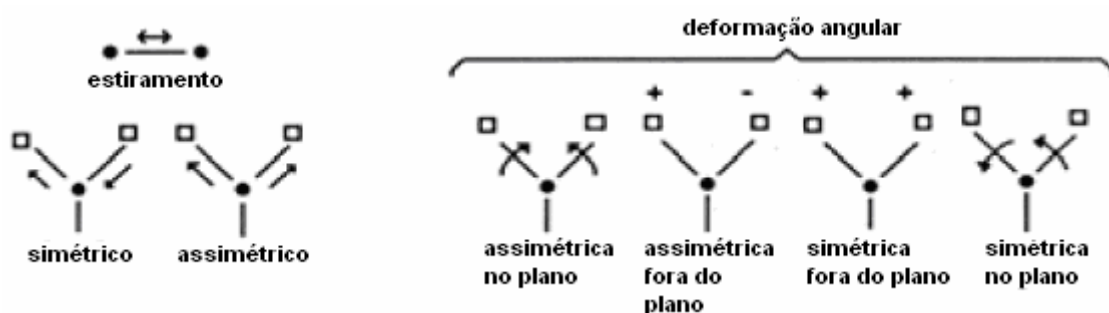


FIGURA 4 - Tipos de vibrações moleculares (Adaptado de Durrant, 2009)

Como a intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que causou esta banda, a quantidade de um composto presente em uma amostra pode ser determinada através de uma curva de calibração (intensidade da banda versus concentração) construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Contudo, é importante salientar que seria fácil lidar com o NIRS se o espectro se apresentasse claro e distinto para os vários componentes da amostra, mas não é assim que ocorre. Segundo VAN KEMPEN & JACKSON (1996), os alimentos apresentam grande número de ligações moleculares que caracterizam diversos compostos orgânicos, mas que absorvem luz de um mesmo comprimento de onda, gerando um espectro com muitas bandas de vibração e harmônicas sobrepostas, dificultando a interpretação e a extração da informação contida neles. Essa sobreposição vai depender das substâncias presentes em cada alimento, e às vezes podem ser variáveis dentro de um mesmo alimento, quando há a comparação de amostras distintas.

Assim, para predição de um composto orgânico, de uma amostra contendo uma distribuição heterogênea de substâncias químicas, o NIRS utiliza o artifício de comparar resultados obtidos por laboratório com os espectros obtidos por ele, através da calibração multivariada (BRAGA & POPPI, 2004).

2.7 Quimiometria e calibração multivariada

A quimiometria foi proposta no final dos anos 70, e pode ser definida como uma disciplina da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e lógica formal, a fim de selecionar os melhores procedimentos experimentais para a obtenção de informações químicas de natureza multivariada (HOPKE, 2003). A quimiometria, em conjunto com técnicas espectroscópicas, permite a extração de informações dos espectros completos e/ou de faixas espectrais (PANTOJA, 2006).

Na quimiometria, uma área muito aplicada atualmente é a calibração multivariada, que é aquela que permite determinar um componente de interesse em matrizes complexas, ou analisar, simultaneamente, vários componentes em sistemas mais simples (MALUF, 2008).

A primeira etapa da construção do modelo de calibração multivariada trata da aquisição de respostas instrumentais para uma série de padrões (amostras de calibração), em que o valor da propriedade de interesse é conhecido (BRAGA & POPPI, 2004). A base da calibração multivariada é, portanto, um sistema de determinação indireta. Torna-se imprescindível a utilização de um grupo de amostras cuja propriedade de interesse seja determinada inicialmente por um método de referência, no qual o software encontra uma correlação entre uma propriedade de interesse (concentração, por exemplo) com o respectivo espectro, que servirão para a construção do modelo matemático (NATALINO, 2006).

A calibração multivariada também é empregada de forma efetiva para análise de espectros de matrizes complexas, pois no espectro dessas amostras podem ocorrer sobreposições de sinais devido aos seguintes fatores: presença de compostos com bandas espectrais semelhantes, ocorrência de diversos estiramentos e deformações vibracionais em cada molécula, e grande interferência da água, que pode mascarar outros compostos. Além disso, a calibração multivariada é de suma importância para corrigir erros e efeitos não lineares no espectro NIRS, causados por perdas de energia da amostra por absorbância, refração interna, difusão interna e reflexão especular (QUEJI, 2008).

2.7.1 Métodos para seleção de espectros

No desenvolvimento dos modelos, uma das primeiras fases é detectar amostras anômalas ou outliers. Esta etapa, juntamente com a escolha do número de fatores (ou variáveis latentes) suficientes para explicar toda a informação analítica necessária, constituem as principais etapas de análise para a correta obtenção de modelos que serão utilizados para determinar as concentrações de

novas amostras, através de seus respectivos dados espectrais (NAGATA et al., 2001).

Amostras anômalas são aquelas cujas características se diferenciam muito do valor global (H), calculado para cada tratamento (SIMAS, 2005). A distância de Mahalanobis e a máxima distância são métodos muito utilizados para a seleção de espectros, pois identificam e eliminam os espectros anômalos, melhorando a eficiência do modelo de calibração (FERREIRA et al., 1999).

2.7.2 Pré-tratamento dos dados

Interferências de parâmetros espectrais, como espalhamento de luz, profundidade de penetração da luz, entre outros, são fatores que podem variar de um espectro a outro, mesmo que seja da mesma amostra, originando modelos não lineares. Para reduzir, eliminar ou padronizar os impactos sobre os espectros, são utilizados pré-tratamentos matemáticos. A utilização de pré-tratamentos também facilita a interpretação dos espectros, pois ajudam na obtenção de dados importantes e na exclusão de dados desnecessários, melhorando a qualidade de previsão dos modelos de calibração (ZENI, 2005). Algumas técnicas de pré-tratamento são mostradas a seguir.

Segundo PEDRO (2004), a inclinação e desvios da linha de base podem ser removidos pela aplicação de derivadas. As linhas de base da curva que apresentam tais características podem ser aproximadas por um modelo linear do tipo:

$$A = a\lambda + b$$

em que a absorvância A é influenciada por uma inclinação a e por um termo constante b, que representa o desvio da linha base.

A primeira derivada da expressão acima fornece:

$$\frac{dA}{d\lambda} = a$$

e, deste modo, o termo constante b é removido.

Já com a aplicação da segunda derivada, obtém-se também a exclusão do termo a, que representa a inclinação da linha de base, como pode ser

observado na próxima equação. Com isso, uma completa regularização da linha de base é obtida:

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = 0$$

Porém, deve-se ter cuidado com a qualidade dos espectros aos quais deseja-se aplicar o cálculo das derivadas, uma vez que não só os sinais espectrais, como também os ruídos, tornam-se acentuados (BRAGA & POPPI, 2004).

Os pré-tratamentos correção da linha de base e eliminação de tendências podem ser utilizados para reduzir o deslocamento da linha de base e curvilinearidades. Já a utilização da variável normal padronizada (SNV) tem por objetivo remover as interferências multiplicativas de dispersão, tamanho de partículas, variação de luz e distância nas análises por NIRS (MALUF, 2008).

2.7.3 Construção do modelo de calibração

Uma vez feito o pré-tratamento dos dados, a etapa seguinte é a construção do modelo de calibração, considerando que após o pré-tratamento e a seleção de espectros, a complexidade do modelo deverá ser menor, melhorando, portanto, o método de regressão utilizado. De maneira geral, o modelo deve extrair a informação relevante contida nos espectros de infravermelho próximo, a qual está relacionada diretamente com a informação que se deseja conhecer no futuro, aplicando o modelo conhecido (SOTELO, 2006).

Há a coleta de espectros de amostras de calibração em um equipamento NIRS, e a análise dessas amostras através de um método de referência, para obter os valores de referência correspondentes. O desenvolvimento do modelo envolve a determinação das relações entre os espectros e os valores de referência dos parâmetros analisados. O esquema geral do processo de calibração é ilustrado na Figura 5.

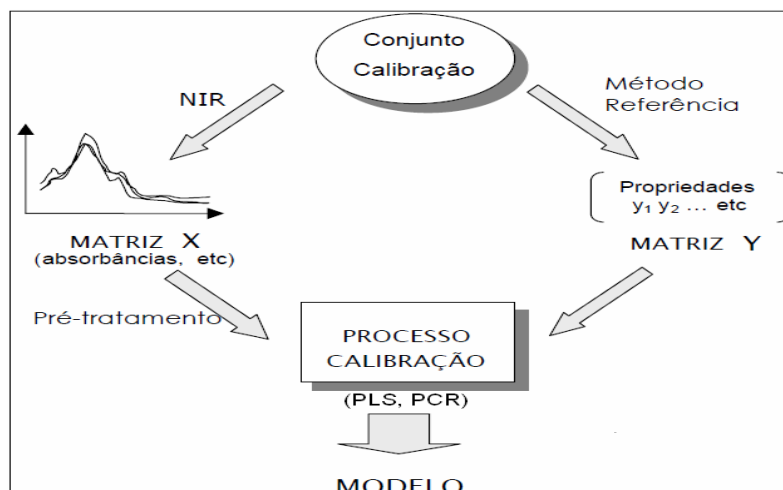


FIGURA 5 - Esquema geral do processo de calibração (Sotelo, 2006)

Entende-se da figura acima que a matriz Y representa a informação que se deseja que o modelo represente, reproduza e seja capaz de estimar quando amostras desconhecidas sejam analisadas. O modelo de calibração é simplesmente uma relação entre X (espectros NIRS) e Y (propriedades a modelar) e os vários métodos de regressão existentes são diferentes na forma como elas relacionam ambas as informações.

É usual que as variáveis X (variáveis espectrais) sejam capazes de conter diversos tipos de informações ao mesmo tempo, em proporções diferentes. Como consequência, tem-se uma redundância de dados, sendo a compressão dessa informação a melhor forma de contornar este problema. Segundo SOTELO (2006), essa redução ainda é mais necessária quando o comportamento do sistema não é conhecido, sendo dois métodos de regressão os mais utilizados para a compressão, o PCR (Regressão por Componentes Principais) e o PLS (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais). Somente o método PLS vai ser estudado por estar disponível no software utilizado no experimento.

O objetivo do PLS é representar a vasta informação contida nos espectros em um outro sistema de variáveis, reduzido, sem perder informação relevante, onde as novas variáveis são chamadas de fatores (t_s) ou variáveis latentes. Os fatores são combinações lineares das variáveis originais, superando assim os problemas de seletividade (não eliminando nenhuma variável) e colinearidade (muitas variáveis contêm tipos de informações similares). O processo de compressão de dados é mostrado na Figura 6.

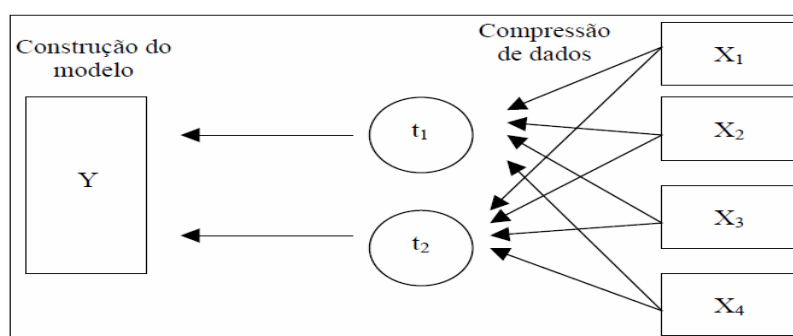


FIGURA 6 - Processo de compressão de dados (Sotelo, 2006)

O método PLS reduz a matriz dos dados considerando tanto a informação em X , como a informação em Y , de forma a maximizar a sua relação com os fatores calculados. Com isto, são obtidos componentes que melhor se relacionam com Y e, ao mesmo tempo, explicam da melhor maneira possível a variabilidade em X (GELADI & KOWALSKI, 1986).

O método baseia-se na projeção da matriz X em um espaço de dimensão menor, que consiste na decomposição dos espectros de modo a diferenciar a relação entre as amostras e a relação entre as variáveis espectrais.

Nesta etapa, a matriz de espectros é decomposta em duas matrizes de variações: loadings (pesos) e scores (escores). Os escores são as coordenadas dos espectros no sistema agora definido pelos componentes principais, indicando a relação entre as amostras, e os pesos, representam a relação das variáveis espectrais entre o sistema original e o sistema definido pelos fatores. A interação entre os escores e os pesos define os componentes principais, sendo que cada um define a dimensão que as variáveis estão medindo em comum, o que pode ser interpretado como uma interação relevante entre as variáveis envolvidas (CHAMINADE et al., 1998).

No PLS, a calibração multivariada pode ser realizada utilizando a informação de toda a faixa espectral. No entanto, considerando o grande número de variáveis fornecidas por toda a faixa espectral, algumas destas variáveis podem interferir na modelagem, além de tornar o tratamento dos dados mais lento. Além disso, podem ser consideradas informações não relevantes, como por exemplo, bandas que não contenham nenhuma informação das propriedades a serem analisadas e a amplitude da razão sinal-ruído (NORGAARD et al., 2000).

Para melhorar o desempenho de técnicas de calibração multivariada, tem sido utilizados procedimentos apropriados para a seleção das regiões espectrais associadas aos compostos estudados. Dentre estes procedimentos, normalmente a escolha da região espectral a ser modelada depende da experiência do analista (das regiões habitualmente excluídas) e do seu conhecimento do sistema sob investigação (BORGES NETO, 2005).

Recentemente, alguns algoritmos foram desenvolvidos com o propósito de pesquisar e selecionar as regiões espectrais, localizando o conjunto de variáveis que podem resultar nos melhores modelos. Um exemplo de algoritmo utilizado para esta finalidade é o método dos mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS), que é uma extensão do PLS. A técnica de seleção de variáveis elimina automaticamente informações não relevantes, obtendo melhores modelos de calibração (PARISOTTO et al., 2009).

2.7.4 Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo de calibração

Como já mostrado, a eliminação de espectros anômalos e a escolha do número de fatores melhoram a eficiência do modelo de calibração. Alguns parâmetros, calculados com os resultados obtidos pelos modelos, servem para a escolha e seleção de modelos mais adequados para a predição dos parâmetros desejados. Segundo SALIBA et al. (2003), estes parâmetros são: coeficiente de determinação (R^2), PRESS, erro-padrão de calibração (SEC) e erro-padrão de validação (SEV).

O coeficiente de determinação deve ser interpretado como a proporção de variação total da variável dependente que é explicada pela variação da variável independente. A análise do valor de R^2 nos mostra a correlação dos pontos da curva de calibração, quanto mais próximo a 1,00 este valor, mais correlacionado estão os valores com a reta obtida (ZENI, 2005).

De acordo com FERRÃO et al. (2004), o número apropriado de fatores na calibração PLS pode ser determinado pelo PRESS (predicted residual error sum of squares), que é a soma dos desvios quadrados para os valores estimados em relação aos valores reais, como mostrado na equação a seguir:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Nesta equação, y_i é o valor de referência para a i ésima amostra, e $\hat{y}_i$ é a previsão para o valor desta amostra. Um decréscimo no PRESS indica um modelo robusto, ou seja, com habilidade de previsão. Por exemplo, se a capacidade de predição é boa, ou seja, se o valor obtido pelo modelo de calibração for próximo do valor obtido pelo método de referência, a diferença entre esses valores será pequena. Assim, o somatório dessas pequenas diferenças resultará em um valor de PRESS também pequeno, significando que o modelo tem habilidade de previsão, já que os valores obtidos por ele são próximos dos valores obtidos pelo método de referência.

Quanto maior o número de fatores, menor o desvio da reta de calibração, porém, se for utilizado um número de fatores maior que o recomendado, poderá ocorrer aumento do ruído, erros de modelagem, e armazenamento de informação desnecessária ou não correlacionada com a propriedade medida, levando à obtenção de modelos com menor qualidade de previsão, denominados de modelos sobre-ajustados (FERRÃO & DAVANZO, 2005). Por outro lado, a inclusão de um número muito baixo de fatores pode deixar de modelar muitas informações importantes, ocasionando o efeito denominado de ajustamento inferior (CARNEIRO, 2008).

Outra medida que é empregada para avaliar a habilidade de previsão de um modelo é o SEC, onde os valores são preditos após a construção do modelo com todas as amostras, ou seja, o modelo faz a predição para todas as amostras de calibração de uma única vez. O SEC é calculado pela equação a seguir, onde “n” representa o número de amostras utilizadas (FERRÃO et al., 2004).

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

2.7.5 Validação

Depois de calibrado, o equipamento ainda não está pronto para ser utilizado, já que a calibração deve ser testada em um processo denominado de validação. Segundo PASQUINI (2003), uma validação pode se parecer muito com uma calibração. A diferença fundamental é que as amostras de validação não são empregadas para se ajustar o modelo, somente para verificar o desempenho do modelo com novos dados.

A validação do modelo é indispensável após a calibração de uma propriedade qualquer por espectroscopia. A validação pode ser realizada por dois métodos, a validação externa e a validação cruzada (MILAGRES, 2009).

De acordo com a mesma autora, na validação externa, para se verificar a eficácia da predição dos constituintes, é utilizado um conjunto de teste separado e diferente do conjunto de calibração. Com o conjunto de calibração, obtêm-se equações de regressão que serão usadas para prever o valor das amostras do conjunto de validação, a partir dos seus espectros de infravermelho próximo. Dessa forma, é possível comparar os valores estimados com os valores determinados pelo método de referência.

O uso de um conjunto separado constitui a abordagem de validação mais direta. Recomenda-se utilizar a validação externa sempre que possível, pois os modelos obtidos usualmente fornecem melhores resultados (PASQUINI, 2003).

Na validação cruzada uma ou mais amostras são removidas das amostras do modelo de calibração e utilizadas como um conjunto de predição. As amostras da predição retornam ao conjunto de calibração e novas amostras são removidas como amostras de predição. Este processo é repetido até que todas as amostras do conjunto de calibração tenham passado pelo conjunto de predição (SIMAS, 2005).

Sugere-se que a validação cruzada seja usada apenas quando o número de amostras for limitado, em casos que o custo das análises de laboratório é elevado (PASQUINI, 2003).

A mesma equação mostrada para SEC pode ser utilizada para obter o erro padrão de validação, onde se substitui os valores y_s para as amostras deste conjunto, denominando agora de SEV (FERRÃO et al., 2004).

Os valores de SEC e de SEV podem ser utilizados para determinar o ajuste de um modelo. De acordo com FERRÃO et al. (2004), valores de SEV muito maior que o de SEC indicam modelos sobre-ajustados, isto é, a regressão encontrada considera dados que não estão realmente correlacionados, como por exemplo, ruídos, erros sistemáticos, etc. Assim, o modelo pode ser considerado bem ajustado quando a relação SEC/SEV fica no intervalo entre 0,5 e 1, sendo que valores mais próximos de 1, indicam modelos mais bem ajustados.

2.8 Regiões do infravermelho próximo associadas aos movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos

Estruturalmente, os aminoácidos são formados por um grupamento carboxila (COOH), um grupamento amina (NH₂) e um radical que determina cada um dos vinte aminoácidos (CAMPBELL, 2001).

O CMP é rico em aminoácidos de cadeia ramificada como a valina e isoleucina, e livre de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e dos aminoácidos sulfurados cistina e cisteína. Observa-se na Tabela 1 a composição teórica dos aminoácidos presentes no CMP.

TABELA 1 - Composição teórica dos aminoácidos presentes no CMP (Chu et al., 1996)

Aminoácido/Abreviatura	Valor teórico (%)
Ácido Aspartico/Asp	8,5
Ácido glutâmico/Glu	19,2
Alanina/Ala	5,3
Arginina/Arg	0*
Glicina/Gly	0,9
Histidina/His	0*
Isoleucina/Ile	10,1
Leucina/Leu	1,7
Lisina/Lys	5,7
Metionina/Met	2,0
Prolina/Pro	11,6
Serina/Ser	7,8
Treonina/Thr	18,2
Valina/Val	8,9

*Em quantidades traço.

As estruturas dos quatro aminoácidos encontrados em maior quantidade no CMP (Tabela 1), que juntos representam 59,1% do total de aminoácidos, são mostradas na Figura 7.

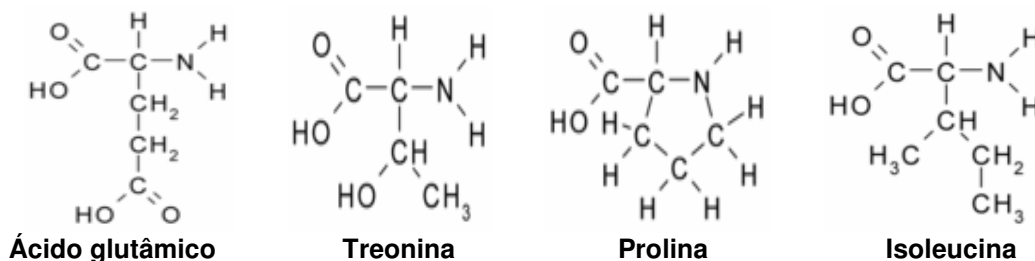


FIGURA 7 - Estrutura dos aminoácidos encontrados em maior quantidade na estrutura do CMP (Campbell, 2001)

MURRAY & WILLIAMS (1990), mostraram em seu estudo, as regiões do infravermelho próximo em que ocorrem movimentos associados às vibrações dos principais compostos orgânicos, N-H, C-N, C-O, O-H e C-H. Como o CMP é formado por 64 resíduos de aminoácidos e o método NIRS é baseado nos efeitos vibracionais do enlace molecular que se deseja determinar, é importante mostrar as regiões do infravermelho próximo que são associadas aos movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos do CMP (Tabela 2), pois estas regiões serão úteis para que os objetivos deste trabalho sejam alcançados.

TABELA 2 – Regiões e faixas espectrais associadas aos movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos (Murray & Williams, 1990)

Região	Faixa espectral (nm)	Movimento vibracional associado
1	1100-1310	2ª sobretons: Absorção desconhecida de vários aminoácidos; 3ª sobretons: estiramento N-H de todos os aminoácidos; estiramento COO ⁻ ou combinação de bandas de vários aminoácidos;
2	1400-1430	3ª sobretons: estiramento O-H de grupos COOH
3	1490-1610	1ª sobretons: estiramento N-H; extensão C-N de aminas; 2ª sobretons: estiramento COO ⁻ ou combinação de bandas de aminoácidos ionizados; estiramento COO ⁻ ou combinação de bandas de vários aminoácidos; 3ª sobretons: deformação N-H, aminas primárias e secundárias; deformação NH ₃ de aminoácidos; estiramento C-O do grupo COOH de aminoácidos
4	1590-1650	1ª sobretons: estiramento N-H de todos os aminoácidos
5	1640-1680	3ª sobretons: deformação NH ₃ +NH de aminoácidos
6	1780-1970	1ª sobretons: absorção desconhecida de vários aminoácidos
7	2020-2150	2ª sobretons: deformação N-H de aminas primárias e secundárias; 2ª sobretons: deformação NH ₃ de aminoácidos; 2ª sobretons: estiramento C-O do grupo COOH de aminoácidos
8	2200-2250	2ª sobretons: deformação NH ₃ + NH de aminoácidos
9	2310-2420	1ª sobretons: estiramento COO ⁻ ou combinação de bandas de aminoácidos ionizados; estiramento COO ⁻ ou combinação de bandas de vários aminoácidos; 3ª sobretons: estiramento C-N de aminas primárias; estiramento C-N de aminas primárias

2.9 Aplicação do NIRS em análises com leite fluido

RODRIGUEZ-OTERO et al. (1997), fizeram uma ampla revisão da utilização do infravermelho próximo em produtos lácteos. Esses autores mostraram vários experimentos utilizando a técnica NIRS na determinação da proteína, caseína total, gordura, lactose, umidade, classificação de leite e em casos de adulteração com gordura. Nestas determinações, os autores apresentam trabalhos utilizando vários comprimentos de onda, pré-tratamentos e métodos de regressão.

Ainda hoje, a maior parte dos estudos aplicam o NIRS nas mesmas determinações mostradas por RODRIGUEZ-OTERO et al. (1997), mas a cada ano novas ferramentas quimiométricas, como métodos de regressão, pré-tratamentos, seleção de variáveis, etc, são lançadas no mercado, permitindo aos trabalhos recentes a obtenção de melhores modelos de calibração.

Em relação à determinação do CMP em leite fluido, seja cru, pasteurizado ou ultra pasteurizado, não foram encontrados estudos realizados com o método NIRS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver um método para a determinação do caseinomacropéptido em leite UAT através da aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS).

3.2 Objetivos específicos

- Definir o método de seleção de espectros e o (s) pré-tratamento (s) mais adequados para o desenvolvimento de um modelo por NIRS, para a determinação do CMP em leite UAT;
- Definir as regiões do infravermelho próximo que apresentam maior correlação com os movimentos vibracionais específicos dos aminoácidos do CMP;
- Selecionar o modelo de calibração mais adequado para a determinação do CMP em leite UAT, através da utilização do método de seleção de espectros, do (s) pré-tratamento (s) selecionados, e das regiões do infravermelho próximo mais correlacionadas com os movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos do CMP;
- Avaliar a eficácia do modelo de calibração através da validação externa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Espectrofotometria e Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

4.2 Preparo das amostras para a construção dos modelos de calibração

Foram utilizados leites UAT de oito marcas diferentes, todos oriundos de laticínios sob Inspeção Federal (SIF), sendo sete localizados no Estado de Goiás e um em Minas Gerais. As amostras das marcas de leites UAT foram adquiridas e mantidas a temperatura ambiente. No momento das análises, apresentaram período de fabricação inferior a um mês

Amostras supostamente sem adição de soro de queijo, de cada uma das marcas, foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em triplicata, para que fosse determinado o índice de CMP em cada leite UAT utilizado na construção dos modelos de calibração. Este procedimento foi denominado de tratamento 0, pois não houve adição de soro, as amostras foram analisadas como obtidas do mercado.

Além do tratamento 0, em cada marca foram obtidos outros sete tratamentos, com base na adição de soro de queijo reconstituído ao leite em 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% e 10%. Para que haja melhor compreensão, os tratamentos foram denominados conforme a adição do soro de queijo ao leite, ou seja, de tratamentos 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10, respectivamente, totalizando oito tratamentos em cada marca utilizada, e 64 tratamentos no total.

O soro utilizado foi obtido através da reconstituição de soro doce em pó, de uma marca comercial, para evitar possíveis interferências da utilização do soro obtido da produção de queijo. Como o soro doce contém entre 6 e 7% de

sólidos totais (CARVALHO et al., 2007), para a preparação do soro foram utilizados 70g de soro em pó para cada litro de água destilada.

O teor de umidade do soro em pó utilizado não foi mostrado nas informações contidas na embalagem. Assim sendo, foram feitas análises, em triplicata, do teor de umidade desse produto. O resultado médio encontrado foi de 2,36%. Assim, o soro reconstituído utilizado neste experimento apresentou 6,83% de sólidos totais, representando bem as características de um soro obtido da coagulação enzimática.

O soro reconstituído foi analisado por CLAE, para que fosse determinada a quantidade de caseinomacropeptídeo presente nele. A partir do valor encontrado, em mg/L, foram feitos cálculos para determinar o teor de CMP nas adições realizadas, ou seja, a quantidade de CMP presente em 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% e 10% do soro reconstituído. Assim, os valores dos tratamentos 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10, de cada marca, foram obtidos através do valor de CMP encontrado na adição feita, somado ao valor obtido por CLAE no tratamento 0 da marca em questão. Esta foi a maneira mais viável para a execução do experimento, já que as análises de CMP por CLAE dos 64 tratamentos, em triplicata, foram impossibilitadas em virtude do alto gasto com reagentes, materiais e equipamentos; além da demora nas análises ($\pm$ oito análises por dia de trabalho), o que inviabilizou as determinações de todas as amostras por CLAE, devido ao fato do equipamento CLAE ser bastante utilizado para análises de rotina.

4.3 Célula utilizada para as análises por NIRS

O CPA só dispunha de células para análises de amostras sólidas. Havia no mercado um número reduzido de empresas comercializando células líquidas compatíveis com o equipamento utilizado neste trabalho, e que ofereciam o produto a um custo elevado. Não havia recursos para a compra de uma célula própria para análises de amostras líquidas.

A solução encontrada foi projetar uma célula para análise de amostras líquidas a partir das dimensões de uma célula para sólidos, para que a peça

fabricada fosse compatível com as dimensões do equipamento, e que fosse permitido a utilização do vidro de quartzo de uma célula sólida.

A peça foi fabricada em uma torneadora, em material de alumínio, pintada com uma tinta preta fosca, para que nas análises por NIRS houvesse reflexões associadas apenas às amostras de leite UAT. A peça foi formada por um suporte e por uma tampa contendo o vidro de quartzo. O vidro foi fixado à tampa através da utilização de cola de silicone. Foram colocadas borrachas entre o suporte e a tampa, para proteger o vidro, e permitir a vedação da peça através do ajuste suporte/tampa por quatro parafusos localizados nas extremidades da célula projetada. Foi feita uma abertura na parte superior da peça, para facilitar o uso e o descarte das amostras de leites UAT.

Observa-se na Figura 8 a célula projetada para análise de amostras líquidas.

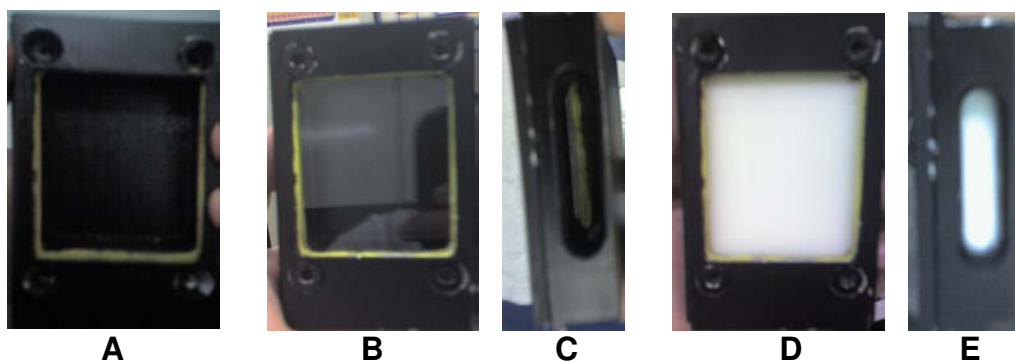


FIGURA 8 - Célula projetada para análise de amostras líquidas. A-suporte; B-célula fechada vazia; C-abertura da célula vazia; D-célula fechada com leite UAT; E-abertura da célula contendo leite UAT

Na célula projetada foram necessários apenas 45 mL de cada amostra. O custo desta célula foi em torno de 10% do valor de uma célula ofertada por empresas especializadas.

As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho próximo (NIRS) da Perstorp Analytical Company, modelo 6500 equipado com detector de reflectância, na faixa de 1100 a 2500 nm, em intervalos de 2 nm. Para eliminar ruídos aleatórios, como por exemplo ruídos da rede elétrica, as medidas no aparelho foram realizadas 32 vezes para cada amostra, sendo obtido o espectro médio. Para garantir que variações extremas de temperatura não

interferissem na coleta dos espectros, o equipamento foi mantido em uma sala com temperatura controlada de aproximadamente 25°C.

Os espectros armazenados foram posteriormente submetidos aos tratamentos estatísticos disponíveis no software Vision®. Em cada um dos tratamentos foram obtidos espectros em três replicatas, obtendo nos oito tratamentos de cada marca, 24 espectros, e 192 no total. Cada espectro foi obtido em apenas 23 segundos.

4.4 Critérios para a seleção dos modelos

Foram desenvolvidos vários modelos para determinar o método de seleção de espectros, o (s) pré-tratamento (s) matemático (s) e as regiões do infravermelho próximo que deveriam ser utilizados para a obtenção do modelo de calibração mais adequado para a determinação de CMP em leite UAT.

Na seleção desses parâmetros foi considerado como critério inicial os modelos que apresentaram maiores coeficientes de determinação (R^2). Nos casos em que os coeficientes de determinação mostraram-se próximos, utilizou-se o menor valor de PRESS e o menor número de fatores.

4.5 Definição do método de seleção de espectros e pré-tratamento (s) matemático (s)

Inicialmente, os testes foram realizados para definir o método de seleção de espectros mais adequado para a obtenção de um bom modelo de calibração. Nesta etapa, foram obtidos dois modelos, um com cada método de seleção de espectros observados no Quadro 1. Para o desenvolvimento desses modelos, além de um dos métodos de seleção, foram utilizados o método de regressão PLS, e a informação contida na faixa de 1100 a 2500 nm.

Foram feitas as avaliações entre os métodos de seleção do Quadro 1, porque é descrito na literatura que tanto um método como o outro pode ser

adequado a um grupo de amostras, dependendo das características da mesma. Essa avaliação só é possível após uma simulação com os métodos.

QUADRO 1 - Métodos de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos disponíveis no software Vision®

Métodos de seleção de espectros	Pré-tratamentos matemáticos
Distância de Mahalanobis Máxima Distância	1ª Derivada 2ª Derivada Correção da linha de base Eliminação de tendências Variável Normal Padronizada

Assim, o método de seleção mais adequado e o método PLS, utilizando a faixa de 1100 a 2500 nm, foram utilizados para obtenção de modelos utilizando os pré-tratamentos mostrados no Quadro 1. Primeiramente, os modelos foram desenvolvidos com os pré-tratamentos 1ª e 2ª derivadas, para determinar qual delas proporcionaria um melhor modelo.

A derivada selecionada foi, então, testada com os outros pré-tratamentos do Quadro 1, para analisar se a utilização de mais de um pré-tratamento promovia melhoria nos modelos de calibração. A melhor combinação entre o método de seleção de espectros escolhido e o (s) pré-tratamento (s), foi selecionada para ser utilizada nos testes, visando obter um modelo de calibração adequado para a determinação de CMP em leite UAT.

4.6 Definição das melhores regiões espectrais

Como o software utilizado neste experimento não possuía um algoritmo que permitisse a seleção das faixas espectrais mais adequadas, e não foram encontrados estudos com a técnica NIRS para a determinação de CMP em leite UAT, para o desenvolvimento do modelo de calibração mais adequado, poderiam ser utilizadas as regiões do infravermelho próximo associadas aos movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos presentes no CMP (Tabela 2).

Contudo, o estudo de MURRAY & WILLIAMS (1990) foi realizado com compostos puros. Em função do leite ser uma matriz altamente complexa, pode

ser que algum composto orgânico apresente nas regiões observadas na Tabela 2 uma resposta maior que a dos aminoácidos, já que vários componentes podem absorver luz em um mesmo comprimento de onda. Além disso, podem apresentar nessas regiões distorções espectrais por oscilações do próprio equipamento, que interferem na obtenção das informações relacionadas com a propriedade de interesse, gerando assim, modelos de calibração ruins.

Então, para definir as regiões mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos presentes no CMP, foram desenvolvidos modelos utilizando faixas de 50 nm de intervalo, desde a faixa 1100-1150 nm até 2450-2500 nm, usando o método PLS, juntamente com o método de seleção de espectros e o (s) pré-tratamento (s) definidos nas etapas anteriores.

Os resultados desses modelos desenvolvidos com intervalos de 50 nm foram associados às regiões observadas na Tabela 2. Para mostrar como as associações foram feitas e quais foram os critérios utilizados para a seleção de cada faixa espectral, pode-se utilizar a região quatro da Tabela 2 (1590-1650 nm) como exemplo. Fazem parte dessa região duas faixas de 50 nm testadas, as faixas 1550-1600 e 1600-1650. Dependendo do resultado de R^2 encontrado nessas faixas, a região quatro pode ter tido um dos três destinos:

1. Se foram encontrados bons valores de R^2 nessas duas faixas de 50 nm, então a região quatro foi selecionada para os testes, visando obter o modelo de calibração mais adequado para a determinação de CMP em leite UAT. Assim, as regiões visualizadas na Tabela 2 que apresentaram bons resultados de R^2 nos intervalos de 50 nm associados a elas, foram selecionadas para os testes.
2. Se foram encontrados baixos resultados de R^2 nessas duas faixas de intervalo de 50 nm, então a região quatro foi eliminada dos testes. Assim, todas as regiões observadas na Tabela 2 que apresentaram baixos resultados de R^2 nos intervalos de 50 nm associados a elas, foram eliminadas dos testes.
3. Se a faixa 1550-1600 nm apresentou baixo valor de R^2 e a faixa 1600-1650 apresentou bom valor de R^2 , poderia se pensar em utilizar apenas a faixa 1600-1650 e eliminar os 10 últimos nanômetros da faixa 1550-1600, pois pertencem a uma faixa com baixo valor de R^2 . Contudo, pode ser que a informação de interesse tenha começado nesses 10 nanômetros eliminados, havendo com

isso, a perda de informação correlacionada com o que se busca. Então, nos casos em que parte de uma região apresentou bom valor de R^2 e parte apresentou baixo valor de R^2 nas faixas com 50 nm, foram feitos testes para determinar qual o intervalo apresentava-se mais correlacionado com as informações do analito.

Após a seleção das regiões foram desenvolvidos modelos utilizando cada uma delas. Com base no valor de R^2 encontrado foram classificadas e depois agrupadas com o intuito de aumentar as informações moleculares relacionadas com os compostos de interesse, e assim, obter melhores modelos de calibração. Primeiramente, foram desenvolvidos modelos utilizando apenas as duas melhores regiões, depois as três melhores, e assim por diante, até o agrupamento de todas as faixas espectrais. Este procedimento visou determinar se todas as regiões associadas aos compostos de interesse são úteis para a melhoria dos modelos de calibração, ou se alguma (s) delas deveriam ser retirada (s) por interferir negativamente nos resultados do modelo.

As regiões do modelo considerado mais adequado, foram ainda analisadas com o intuito de detectar diferenças visuais bem definidas em cada uma delas.

4.7 Validação externa

Das oito marcas utilizadas na etapa de calibração, duas marcas, uma produzida no Estado de Goiás e a outra produzida em Minas Gerais foram utilizadas para a validação externa. Contudo, estas marcas são de lotes fabricados com mais de um mês de diferença dos lotes das respectivas marcas utilizados para a calibração.

As marcas utilizadas na etapa de validação externa foram submetidas às mesmas manipulações realizadas nas amostras do conjunto de calibração. Assim, 48 espectros formaram o conjunto de validação. As amostras foram determinadas por CLAE, seguindo os procedimentos realizados na calibração, e pelo método NIRS, utilizando o modelo de calibração considerado mais adequado

para a determinação do CMP em leite UAT, por espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS).

A capacidade qualitativa do modelo de calibração também foi avaliada. Para isto, foram utilizadas quatro marcas de leite UAT desnatado. De cada uma das quatro marcas foram obtidos dois espectros, totalizando oito espectros.

4.8 Metodologia para a quantificação de CMP em leite UAT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a determinação em mg/L do teor de CMP por CLAE em leite UAT foi feita uma curva de calibração (Figura 9), preparada utilizando-se leite genuíno, de procedência conhecida. Para o seu preparo foi utilizado um padrão de CMP com grau de pureza de no mínimo 90% (Dinâmica®). O padrão foi diluído em leite em 0, 15, 30, 50, 75 e 100 mg/L, de acordo com recomendado pela metodologia oficial (BRASIL, 2006a).

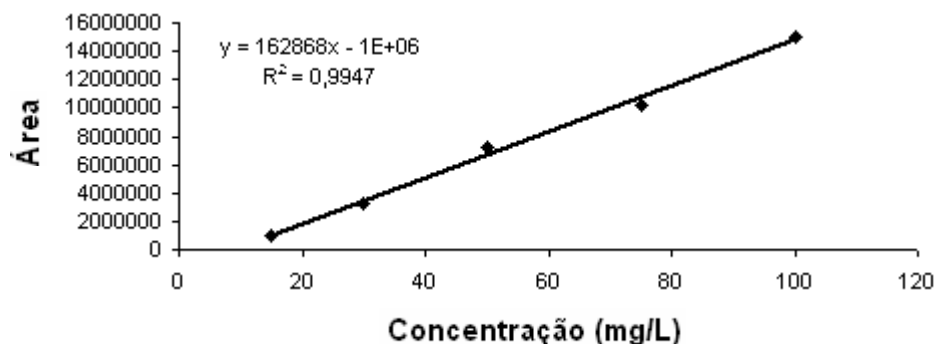


FIGURA 9 - Curva de calibração para a determinação de CMP em leite fluido

Para o preparo da amostra para análise, 20mL de leite foram tratados com 10 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 24%, deixando em repouso por 60min. Após este período realizaram-se duas filtrações, a primeira em papel de filtro qualitativo, descartando-se as cinco primeiras gotas do filtrado, e a segunda em filtro MILLIPORE de 0,45 μ m.

A determinação cromatográfica foi realizada com a injeção de 20 μ L do filtrado no cromatógrafo, GILSON 118, utilizando detector UV/VIS, operando em

vazão de 1mL/min, e a detecção na faixa do UV em comprimento de onda de 205nm, com a linha de base já devidamente estabilizada.

A corrida cromatográfica foi realizada em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência, com sistema isocrático (GILSON 306), com injetor automático ASTED – XL da marca GILSON e looping de 20µL e coluna Zorbax GF-250 Bioséries da Agilent de 9mm de diâmetro interno por 250mm de comprimento. A fase estacionária da coluna era composta por partículas esféricas de sílica, modificadas na superfície por zircônio estabilizado, enquanto que a fase ligada era composta por monocamada molecular hidrofílica com diâmetro de poro de 150Å. A solução da fase móvel usada foi um tampão fosfato com pH6 (1,74g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a., 12,37g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a. e 21,41g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) dissolvido em 1000mL de água milli-Q ultra purificada.

Foi construído um gráfico de concentração de CMP em mg/L versus absorvância em UV a 205 nm, calculando-se a equação da reta de regressão, sendo aceitos valores de $r \geq 0.95$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Índices de CMP encontrados nas amostras do conjunto de calibração

Os resultados por CLAE, em triplicata, mostraram um índice de CMP acima do permitido para a destinação ao consumo direto (BRASIL, 2006b) nas amostras sem adição de soro de queijo das oito marcas de leites UAT utilizadas na etapa de calibração. Os resultados encontrados variaram de 33,64 a 398,78 mg/L, apresentando uma variação de 1.085,43% entre o maior e o menor valor. As oito marcas utilizadas apresentaram resultados de 1,12 a 13,30 vezes acima do permitido ao consumo direto.

De acordo com BRASIL (2006b), dos oito resultados encontrados, os lotes de três marcas deveriam ter sido destinados à produção de derivados lácteos, pois apresentaram índices de CMP de 33,64; 39,52 e 65,58 mg/L. As outras cinco marcas apresentaram: 105,08; 152,22; 182,62; 202,38 e 398,78 mg de CMP por litro de leite. Assim, os lotes dessas marcas deveriam ser destinados à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino permitido pelo DIPOA, mas de modo algum à alimentação humana, como ocorreu.

Levando-se em consideração os altos índices de CMP encontrados nos leites UAT analisados, é mais provável que tenha ocorrido adição de soro de queijo, e não proteólise bacteriana.

Para ocorrer proteólise no leite UAT que libere uma grande quantidade de CMP livre, é necessário que a carga de psicrótrófos no leite cru seja elevada. Contudo, altas contagens de bactérias psicrótróficas provocam queda no pH durante a estocagem do leite cru, desestabilizando a micela de caseína, deixando o leite susceptível à coagulação, principalmente, quando submetido ao tratamento térmico (CARDOSO, 2006). Assim, a indústria não receberá um leite cru com possibilidade de coagular durante a fabricação do leite UAT.

Além disso, o laticínio não correria o risco de utilizar uma matéria-prima que possibilitasse intensa proteólise no leite UAT, pois o consumidor, insatisfeito com os reflexos negativos no produto final, passaria a adquirir uma outra marca.

Contudo, mesmo diante das evidências, não é possível afirmar que o CMP encontrado não seja relacionado com a proteólise, e sim com a adição de soro de queijo, já que o método CLAE não é capaz de determinar a origem do CMP detectado no leite.

De qualquer forma, os leites analisados estão em desacordo com a legislação vigente (BRASIL, 2002; BRASIL, 2006b), já que resultados de CMP acima de 30 mg/L indicam leite fraudado por adição de soro de queijo ou de má qualidade da matéria-prima.

O soro reconstituído apresentou uma concentração média de 2.540 mg por litro. Assim, os valores de CMP em 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10% do soro reconstituído foram, respectivamente: 25,4; 50,8; 76,2; 101,6; 152,4; 203,2; 254 mg/L. Após a adição desses valores aos resultados do tratamento zero de cada marca, foram encontrados valores de CMP entre 33,64 e 652,78 mg/L, nos 64 tratamentos que formaram o conjunto de calibração.

A distribuição dos resultados das amostras do conjunto de calibração é observada na Figura 10.

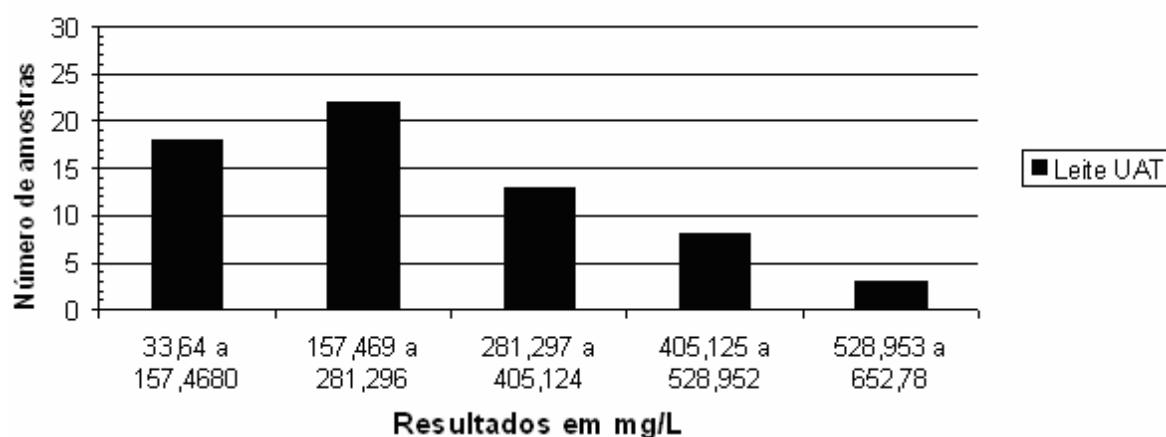


FIGURA 10 - Distribuição de freqüência dos resultados de CMP dos 64 tratamentos do conjunto de calibração

Observa-se na Figura 10, que o conjunto de calibração foi composto por classes com número diferente de amostras, pois as oito marcas apresentaram grande variação nos resultados do tratamento zero. Esperava-se, que fossem obtidos nos tratamentos zero das amostras do conjunto de calibração, índices de

CMP iguais ou próximos de zero, já que supostamente, as amostras comerciais seriam isentas de CMP.

Assim, com as adições de soro de queijo de 1 a 10%, seria obtido um conjunto de amostras com valores de CMP aproximados entre 0,0 e 254,0 mg/L, ou seja, haveria um grupo de amostras englobando as concentrações de CMP consideradas na legislação vigente (BRASIL, 2006b) para as três destinações cabíveis, e a distribuição de frequência apresentaria classes com número aproximados de amostras.

5.2 Definição do método de seleção de espectros

Os resultados com os métodos distância de Mahalanobis e máxima distância são visualizados na Tabela 3.

TABELA 3 - Modelos de calibração com distância de Mahalanobis e máxima distância, utilizando o método PLS e toda a faixa de 1100 a 2500 nm

Modelo	Método	R ²	PRESS	Fatores
1	Distância de Mahalanobis	0,6165	1510068,250	5
2	Máxima distância	0,6073	1549479	5

O modelo 1, que utilizou a distância de Mahalanobis, apresentou maior valor de R² e menor valor de PRESS que o modelo 2, que utilizou a máxima distância. Maior valor de R² significa maior correlação com os valores da reta obtida, e o menor valor de PRESS significa maior robustez. Assim, o método escolhido deveria ser a distância de Mahalanobis.

Contudo, quando foi utilizado o método de Mahalanobis em testes utilizando regiões espectrais menores, o software apresentou uma mensagem de erro, alertando que pelo número de amostras, deveria ser selecionada uma região com um intervalo maior. A utilização da distância de Mahalanobis só foi permitida quando foram colocadas regiões individuais com pelo menos 500 nm de intervalo. Já a máxima distância aceitou em seus testes regiões de apenas 2 nm de intervalo.

Como um dos objetivos foi definir regiões associadas com os movimentos vibracionais dos compostos presentes no CMP, optou-se por utilizar a máxima distância como método de seleção de amostras. Este método se mostrou viável por tornar possível a utilização de faixas com intervalos menores, e por apresentar valor de R^2 pouco menor (1,51%), e valor de PRESS pouco maior (2,79%) que os obtidos com a distância de Mahalanobis, mostrando que modelos desenvolvidos por máxima distância podem ter eficiência semelhante aos obtidos por distância de Mahalanobis.

Em relação ao número de fatores, nos dois modelos foram considerados como adequados a utilização de cinco fatores, pois foram associados aos mais baixos valores de PRESS. Se fosse utilizado um número de fatores maior que o recomendado, poderia ocorrer a obtenção de modelos sobreajustados (FERRÃO & DAVANZO, 2005) e se fosse utilizado um menor número de fatores, poderia ocorrer o efeito denominado de ajustamento inferior (CARNEIRO, 2008).

Como não foram encontrados estudos para a determinação de CMP em leite fluido pela técnica NIRS, serão mostradas a seguir pesquisas recentes utilizando esta técnica com o método PLS, em outras áreas, para que se tenha uma idéia do número de fatores considerados adequados.

MORGANO et al. (2007), concluíram que o uso de seis fatores foi o mais apropriado na construção do modelo para determinar o teor de açúcar em amostras de café cru.

QUEIJI (2008) estudando a determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maçã, encontrou como adequada a utilização de seis fatores.

SAUER-LEAL et al. (2008), estudando a caracterização físico-química de queijo prato, observaram que o menor erro foi conseguido com um grande número de fatores, normalmente 10 a 15. Entretanto, houve capacidade de previsão com incremento pouco significativo a partir do oitavo fator. Por este motivo, visando evitar a criação de modelos sobreajustados, que normalmente apresentam pouca robustez, decidiram desenvolver modelos utilizando até oito fatores.

O software Vision® foi configurado para utilizar até oito fatores nos modelos de calibração obtidos neste experimento, para evitar a utilização de um número grande de fatores, e assim, a obtenção de modelos sobre-ajustados.

O modelo dois, desenvolvido sem a utilização de pré-tratamentos, foi considerado um modelo com baixa capacidade de previsão, já que de acordo com MONCADA (2006) equações de calibração possuem boa capacidade preditiva quando o coeficiente de determinação é superior a 0,69. Assim, torna-se imprescindível o uso de pré-tratamentos de dados, para que os modelos desenvolvidos apresentem maior habilidade de previsão.

5.3 Definição do (s) pré-tratamento(s)

A Figura 11 mostra os 192 espectros de leites UAT do conjunto de calibração, sem a utilização de pré-tratamentos.

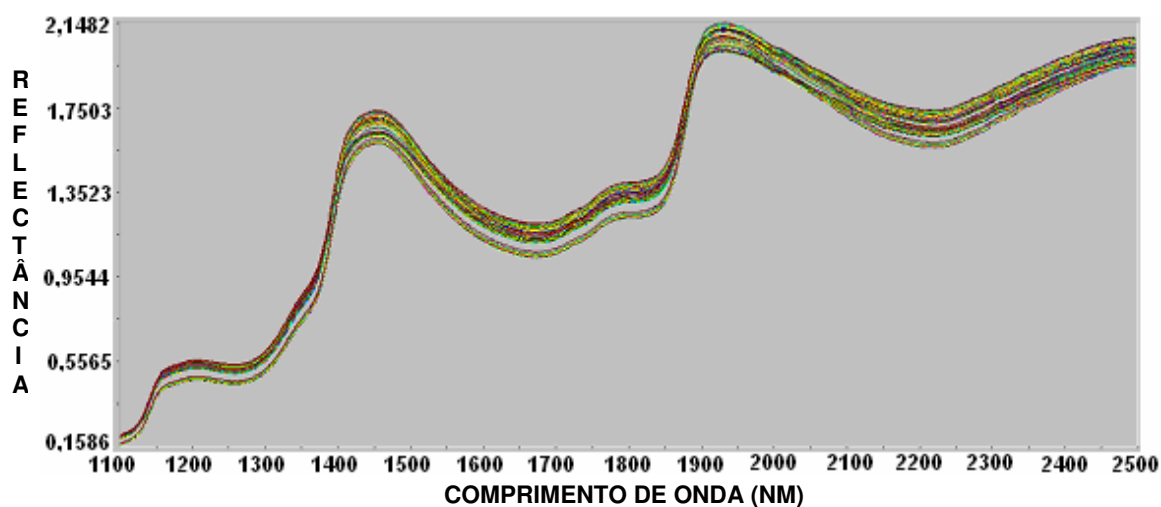


FIGURA 11 - Espectros de leites UAT sem a utilização de pré-tratamentos

Na Figura 11, os espectros sofrem influência da inclinação e desvios da linha de base. Devido a isso, a visualização e interpretação das modificações espectrais, devido a presença do analito de interesse, são prejudicadas. É esperado, portanto, que os modelos de calibração provenientes da utilização

desses espectros apresentem coeficientes de determinação de menor valor do que espectros com derivadas.

Observa-se na Figura 12 que nos espectros do conjunto de calibração com a aplicação da 1ª derivada, permanece a inclinação da linha de base, apesar do desvio da linha de base ter sido eliminado. Assim, as condições de interpretação e visualização dos espectros são melhorados significativamente em relação ao espectro bruto, mas ainda sofre interferências.

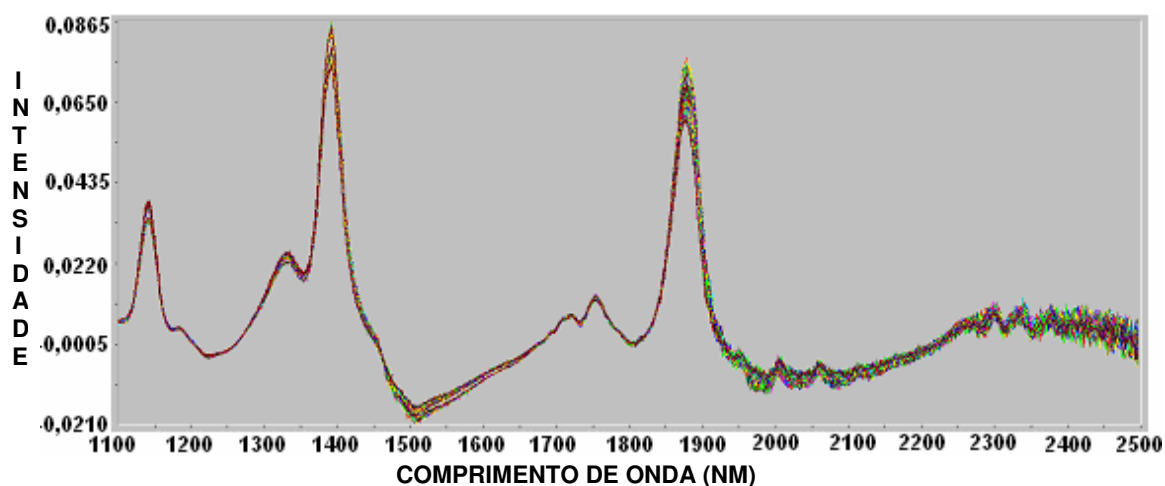


FIGURA 12 - Espectros de leites UAT em 1ª derivada

Os espectros da Figura 13, em 2ª derivada, sofrem tanto eliminação do desvio da linha de base, como também da inclinação, obtendo espectros que permitem a visualização e interpretação de suas características com maior eficiência. Assim, teoricamente, esses espectros permitem o desenvolvimento de um modelo de calibração mais adequado que os anteriores, mas deve-se ter prudência, já que os ruídos podem ser potencializados.

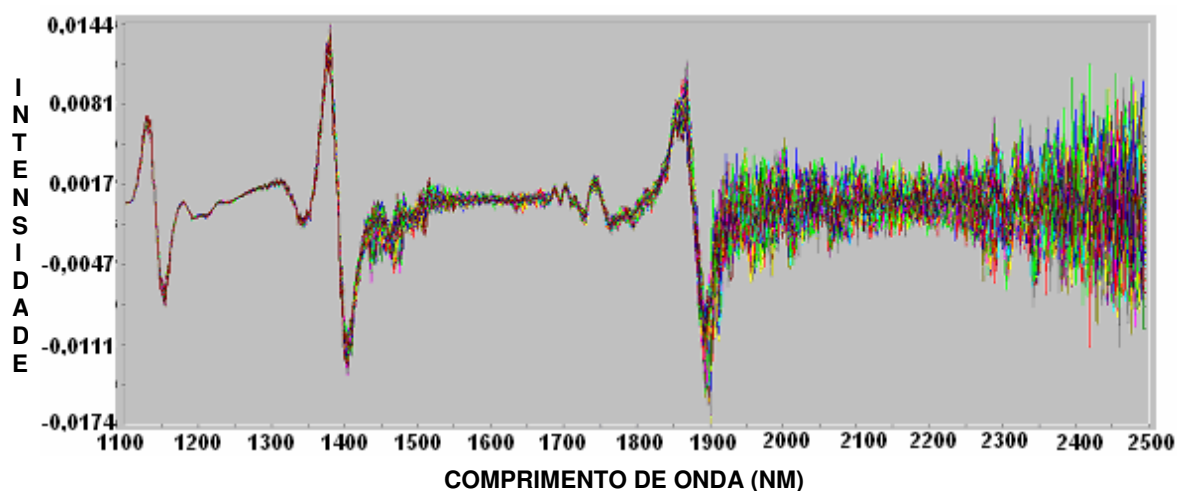


FIGURA 13 - Espectros de leites UAT em 2ª derivada

Os resultados dos modelos desenvolvidos para definir quais pré-tratamentos fornecem melhores modelos de calibração para a determinação de CMP em leite UAT, são observados na Tabela 4.

TABELA 4 - Pré-tratamentos utilizados com a máxima distância e método de regressão PLS, utilizando toda a faixa de 1100 a 2500 nm

Modelo	Pré-tratamento	R ²	PRESS	Fatores	Outliers nº (%)
3	1ª derivada	0,5703	2062621	3	0
4	2ª derivada	0,7945	2012293,5	3	7 (3,64)
5	2ª derivada com variável normal padronizada	0,8173	1978950	3	8 (4,16)
6	2ª derivada com correção da linha de base	0,7637	2269413,5	3	2 (1,04)
7	2ª derivada com eliminação de tendências	0,7951	2009452,625	3	7 (3,64)

A 2ª derivada foi escolhida por apresentar um valor de R² superior 39,31% ao da 1ª derivada, mostrando que a 2ª derivada permite a obtenção de melhores modelos de calibração. A 2ª derivada foi, então, testada com os pré-tratamentos variável normal padronizada, correção da linha de base e eliminação de tendências.

A Tabela 4 mostra que o modelo cinco, com 2ª derivada e variável normal padronizada, apresentou valor de R^2 superior, e valor de PRESS inferior aos dos outros modelos com 2ª derivada, mostrando que a combinação dos pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada, foi a mais adequada para a obtenção de bons modelos de calibração.

Contribui também para a escolha do modelo cinco, o fato de que o R^2 obtido foi maior que o considerado pela literatura para boa capacidade preditiva (MONCADA, 2006) e por ter utilizado apenas três fatores. Além disso, foram reconhecidos como outliers e eliminados apenas 4,16% dos espectros do conjunto de calibração.

Segundo PASQUINI (2003), a exclusão de algumas amostras é freqüente e, geralmente, contribui para uma melhoria da qualidade da calibração. Os resultados mostrados na Tabela 4 corroboram esta afirmativa, já que o modelo com a 2ª derivada e variável normal padronizada apresentou maior quantidade de outliers, e melhores resultados que os demais modelos que utilizaram a 2ª derivada.

No entanto, PASQUINI (2003) explica ainda que é necessário ser prudente, pois a supressão de uma grande quantidade de amostras outliers resulta na diminuição da representatividade. FONTANELI et al. (2002), mencionam que na rotina e calibração do NIRS, a população-alvo está bem representada quando são eliminadas menos de 10% de outliers, mostrando que o número de outliers eliminadas pelo modelo cinco foi adequado.

5.4 Seleção das regiões do infravermelho próximo mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos presentes no CMP

Analisando os resultados da Tabela 5, pode-se observar que faixas espectrais da ordem de 50 nm não fornecem bons modelos de calibração, já que todos os valores de R^2 foram inferiores a 0,69. A média de R^2 encontrada foi de apenas 0,33. O valor de PRESS também nos mostra que modelos com intervalos de 50 nm possuem baixa capacidade de previsão, pois a maioria dos modelos da

Tabela 5 apresentou valor de PRESS maior que o obtido com o modelo cinco (Tabela 4), que utilizou a informação de toda a faixa de 1100 a 2500 nm.

TABELA 5 - Modelos com faixas de 50 nm de intervalo, utilizando máxima distância, 2ª derivada e variável normal padronizada, e método de regressão PLS

Modelo	Faixa espectral	R ²	PRESS	Fatores
8	1100-1150	0,6061	1685377,125	4
9	1150-1200	0,5354	1905676,375	3
10	1200-1250	0,4905	2327253,25	5
11	1250-1300	0,4631	2504410,75	6
12	1300-1350	0,5144	1951239,875	4
13	1350-1400	0,4097	2239908	3
14	1400-1450	0,4141	2701997,25	6
15	1450-1500	0,2927	3102543,75	3
16	1500-1550	0,422	2971597,25	5
17	1550-1600	0,2696	3469525,75	6
18	1600-1650	0,1019	3490163,75	1
19	1650-1700	0,3977	2858971,75	6
20	1700-1750	0,28	3102543,75	6
21	1750-1800	0,3274	3151170,75	4
22	1800-1850	0,378	2751492,75	4
23	1850-1900	0,5574	1830194,375	4
24	1900-1950	0,3598	3098328,25	5
25	1950-2000	0,4021	2656292,75	4
26	2000-2050	0,3383	3078423,25	6
27	2050-2100	0,3374	2992234,25	6
28	2100-2150	0,0742	3976009,75	1
29	2150-2200	0,1088	4055214,5	1
30	2200-2250	0,0931	3684292,25	1
31	2250-2300	0,076	3765374,75	1
32	2300-2350	0,461	2661341	6
33	2350-2400	0,23	3434361,5	6
34	2400-2450	0,0706	4207574	1
35	2450-2500	0,2303	3625222,25	6

Segundo BULLÉ (2009), faixas pequenas não oferecem bons modelos, pois é necessário um número mínimo de informações moleculares, por isso os resultados nos intervalos de 50 nm foram ruins. Contudo, alguns intervalos de 50 nm (Tabela 5) mostraram-se mais adequados para a obtenção de modelos de previsão, apresentando R² acima da média (0,33), indicando que a associação dessas faixas espectrais com os movimentos vibracionais específicos da estrutura

dos aminoácidos presentes no CMP, de acordo com a Tabela 2, poderia melhorar a qualidade dos modelos de calibração.

Da associação dos movimentos vibracionais dos aminoácidos (Tabela 2) com os resultados da Tabela 5, utilizando os critérios descritos em material e métodos, foram selecionadas as seguintes regiões do infravermelho próximo: 1100-1310; 1400-1430; 1490-1550; 1640-1680; 1780-1970; 2020-2100 e 2310-2350 nm. De acordo com os resultados apresentados pelos modelos de cada uma, foram classificadas em regiões espectrais mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos do CMP, como mostra a Tabela 6.

TABELA 6 - Classificação das regiões espectrais mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos do CMP

Modelo	Classificação	Região espectral	R ²	PRESS	Fatores
36	1 ^a	1100-1310	0,6516	1739980,25	5
37	2 ^a	1780-1970	0,6237	2125471,75	6
38	3 ^a	1490-1550	0,4671	2794317,5	6
39	4 ^a	2310-2350	0,4222	2658279,75	6
40	5 ^a	2020-2100	0,3824	3479440,5	4
41	6 ^a	1400-1430	0,2177	3174990,5	2
42	7 ^a	1640-1680	0,12	3266338	1

Como não foram obtidos valores de R² muito próximos, não houve dificuldades para estabelecer as melhores regiões, não sendo necessária a análise dos valores de PRESS. Conforme a classificação obtida, essas regiões espectrais foram agrupadas, apresentando modelos com os resultados mostrados na Tabela 7.

TABELA 7 - Resultados dos agrupamentos realizados conforme a classificação das melhores regiões espectrais, mostrada na Tabela 6

Modelo	Número de regiões agrupadas	R ²	PRESS	Fatores	Outliers (nº/%)
43	Duas	0,707	1857104,125	6	1 (0,52)
44	Três	0,7416	1760862,875	6	2 (1,04)
45	Quatro	0,8381	1631780,25	6	2 (1,04)
46	Cinco	0,8417	1631219	5	2 (1,04)
47	Seis	0,8876	1559730,875	6	2 (1,04)
48	Sete	0,8946	1323569,25	6	3 (1,56)

Os resultados da Tabela 7 mostram que houve melhoria nos modelos à medida que foi sendo agrupado um número maior de regiões, mostrando que toda a informação correlacionada com os movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos é determinante para a obtenção do modelo com maior capacidade de previsão.

Assim, o modelo 48, desenvolvido com o método de seleção máxima distância, com os pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada, com o método de regressão PLS, utilizando as regiões espectrais 1100-1310; 1400-1430; 1490-1550; 1640-1680; 1780-1970; 2020-2100 e 2310-1350 nm, foi considerado o mais adequado para a determinação de CMP em leite UAT, pois dentre todos os modelos desenvolvidos, foi o que apresentou o maior valor de R^2 e o menor valor de PRESS.

A relação entre os valores determinados por este modelo, e os valores obtidos pela análise de referência (CLAE) é mostrada na Figura 14. Estes resultados mostram o ajuste dos dados obtidos pelo método de calibração, com os dados do método de referencia, sendo o ajuste equivalente ao R^2 de 0,8946; o maior valor alcançado nos modelos testados.

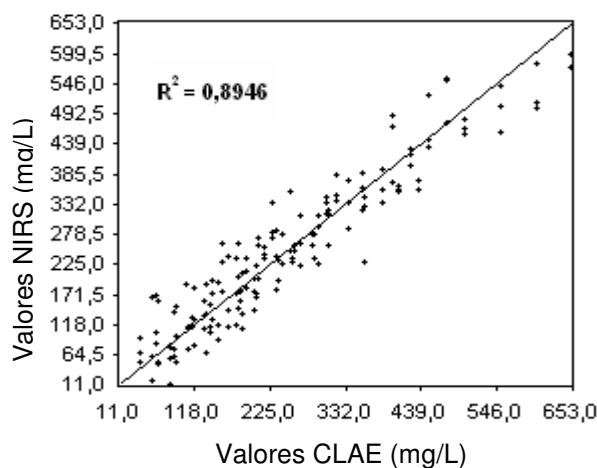


FIGURA 14 - Relação entre os valores determinados pelo NIRS e os valores de referência obtidos por CLAE

5.4.1 Regiões em que foram visualizadas diferenças espectrais bem definidas

Foram detectadas diferenças visuais bem definidas, nos espectros da maioria das marcas do conjunto de calibração, em dois pontos pertencentes às regiões do modelo 48 (Tabela 7). Não foram encontradas diferenças em outros pontos do infravermelho próximo, mostrando que as diferenças encontradas são correlacionadas com o movimento dos aminoácidos. Os espectros mostrados nas Figuras 15 e 16 pertencem a uma das marcas do conjunto de calibração, em que as diferenças foram mais visíveis.

A) Região 1: 1116 a 1204 nm

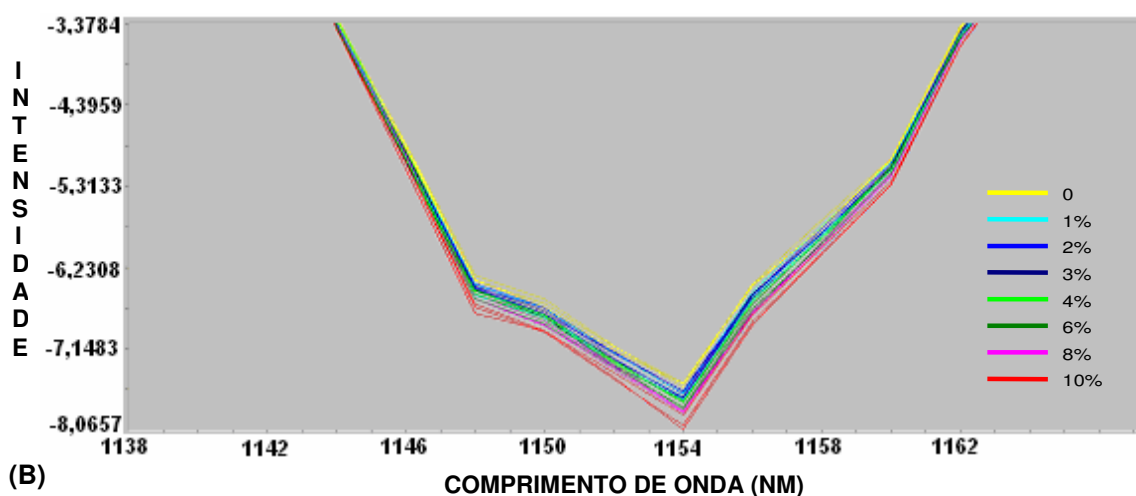
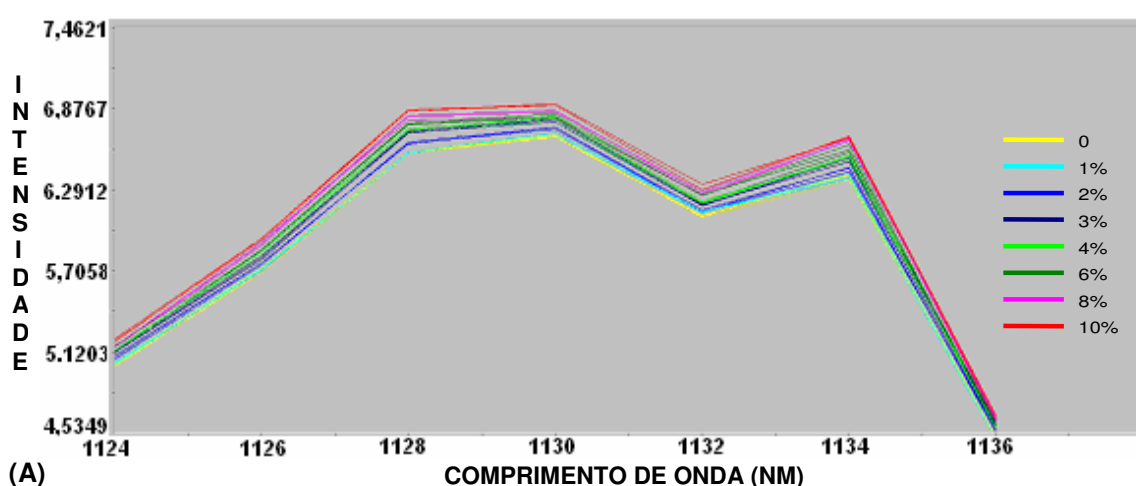


FIGURA 15 - Diferenças espectrais nos intervalos A: 1124-1136 e B: 1143-1162

A Figura 15 mostra as diferenças visuais entre 1124 e 1136 nm, e entre 1143 e 1162 nm, mas quando a imagem foi aproximada no software Vision®, percebeu-se diferenças em toda a faixa de 1116 a 1204 nm.

O intervalo A mostra uma inflexão positiva (reflexão), com as intensidades máximas, obtidas no software Vision®, variando de 6,6555 na amostra sem adição de soro e 6,9110 na amostra com 10 % de soro. O intervalo B mostra uma inflexão negativa (absorção), com as intensidades variando de -7,3274 na amostra 0 e -8,0685 na amostra 10%. Houve um aumento de intensidade de reflexão e de absorção conforme foi aumentando a percentagem de soro de queijo utilizado

Acredita-se que este comportamento seja devido à maior quantidade de CMP presente no tratamento 10, ocorrendo, portanto, maior movimento vibracional das ligações moleculares da estrutura dos aminoácidos, aumentando a intensidade de reflexão e de absorção.

B) Região 2: 1792 a 1824 nm

A Figura 16 mostra deslocamento da banda para menores comprimentos de onda, iniciando com os espectros sem adição de soro (0) até os espectros com 10% de soro.

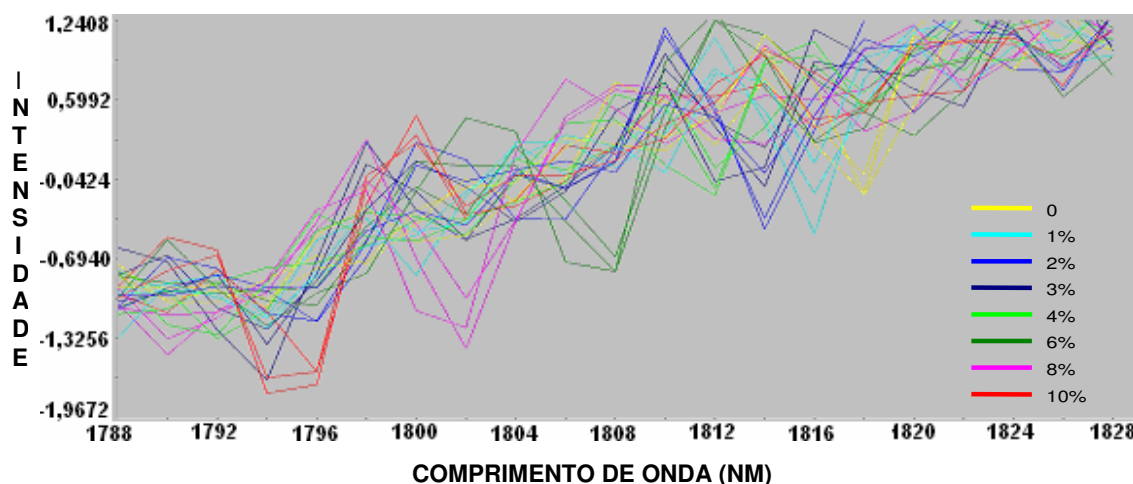


FIGURA 16 – Diferenças espectrais no intervalo 1792-1824

Os espectros de amostras contendo maior quantidade de CMP apresentaram deslocamento para regiões de mais alta energia. Provavelmente,

isso deve ter ocorrido pelo fato de maiores concentrações apresentarem um maior número de compostos, e assim maior número de interações interatômicas, que produzirão maior quantidade de energia, havendo, então, o deslocamento para regiões de maiores frequências.

Mesmo não sendo observadas diferenças visuais bem definidas nas outras regiões do modelo 48, há nelas movimentos vibracionais associados à estrutura dos aminoácidos. Assim, a correta seleção de ferramentas quimiométricas é essencial para extrair as informações contidas nos espectros, proporcionando a obtenção de melhores modelos de calibração.

5.5 Validação externa

As amostras utilizadas na etapa de validação, também apresentaram um índice de CMP acima do permitido para a destinação ao abastecimento direto (BRASIL, 2006b), uma com 178,28 mg/L e outra com 237,45 mg/L. Quando foram comparados estes resultados, com os resultados obtidos por essas mesmas marcas na etapa de calibração, encontrou-se variação de 2,46% e 17,33%, respectivamente.

São necessários estudos mais abrangentes, mas a menor variação entre as amostras de lotes diferentes de uma mesma marca, utilizadas nas etapas de formação e validação, se comparadas à grande diferença (1.085,43%) existente entre as oito marcas utilizadas na etapa de calibração, pode ser um indício de que, ou é rotineira a adição de soro de queijo ao leite, ou é rotineira a utilização de leites de baixa qualidade, já que os índices de CMP apresentaram-se próximos nos lotes de uma mesma marca, produzidos com mais de um mês de diferença.

Os 48 espectros do conjunto de validação foram reconhecidos pelo NIRS. O valor do erro padrão de calibração (SEC) do modelo utilizado (modelo 48) foi de 98,3677. O erro padrão de validação (SEV) foi de 132,472. Assim, a razão SEC/SEV foi de 0,74; mostrando que o modelo de calibração foi bem ajustado.

Nenhum dos espectros das marcas de leite UAT desnatado, utilizados para avaliar a capacidade qualitativa do modelo de calibração, foi reconhecido pelo modelo NIRS, mostrando que o modelo apresentou boa capacidade de distinção.

Então, provavelmente, o banco de dados de leites UAT não servirá para a determinação de CMP em outro tipo de leite fluido, já que a composição desses leites é influenciada por especificidades do processamento.

Mesmo em leite UAT, há necessidade de obter um conjunto de calibração mais amplo, com amostras representativas de toda a população. Mesmo que haja variação entre as oito marcas utilizadas para a calibração, só foram utilizadas amostras de um único lote, e de um mesmo período de produção. Como ocorrem diferenças na composição do leite, por influência das estações, temperatura, condições climáticas, alimentação, etc; é possível que seja necessária a utilização de grande quantidade de amostras, de diferentes épocas do ano, para obter variabilidade suficiente para representar toda a faixa de trabalho.

Laboratórios ou indústrias que utilizam na rotina o método CLAE para a determinação de CMP em leite, podem utilizar as amostras recebidas para a formação do conjunto de calibração por NIRS. Geralmente, estes laboratórios processam grande quantidade de amostras, com variação suficiente para representar toda a população de estudo. Além disso, a utilização do método de referência em todas as amostras vai garantir resultados mais exatos e precisos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste experimento mostraram que a detecção de caseinomacropeptídeo em leite UAT é uma ocorrência comum, indicando fraude por adição de soro de queijo ou má qualidade da matéria-prima utilizada para a fabricação. Sete marcas produzidas em Goiás apresentaram por CLAE índices de CMP acima de 0,30 mg/L, que é o limite estabelecido para a destinação ao abastecimento direto, segundo a legislação vigente. Foi analisada apenas uma marca produzida em Minas Gerais, que também apresentou índices de CMP inadequados para a destinação ao consumo direto.

O método de seleção de espectros máxima distância e os pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada, juntamente com o método de regressão PLS, são ferramentas quimiométricas eficientes para a obtenção de bons modelos de calibração para a determinação de CMP em leite UAT.

Nem todas as regiões do infravermelho próximo apresentaram-se adequadas, sendo necessária a seleção das regiões espectrais mais correlacionadas com os movimentos vibracionais específicos da estrutura dos aminoácidos do CMP, em leite UAT.

A espectroscopia de infravermelho próximo pode ser uma alternativa para a determinação de CMP em leite UAT, desde que haja um conjunto de calibração com amostras representativas da população a ser predita no futuro.

REFERÊNCIAS

1. ABLV - Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida. **Indústria de leite longa vida prevê crescer 4% este ano**. Disponível em <http://www.ablv.org.br/21-Releases-Industria-de-leite-longa-vida-preve-crescer-4-este-ano.aspx>. Acesso em: 18 de nov. de 2009.
2. BORGES NETO, W. **Parâmetros de qualidade de lubrificantes e óleo de oliva através de espectroscopia vibracional, calibração multivariada e seleção de variáveis**. 2005. 130 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
3. BORIN, A. **A aplicação de quimiometria e espectroscopia no infravermelho próximo no controle de qualidade de lubrificantes**. 2003. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
4. BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v.27, n.6, p.1004-1011, 2004.
5. BRANDÃO, S.C.C. O futuro da qualidade do leite brasileiro. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.5, n.28, p.68-71, 2000.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 124 de 23 set. 1991. Aprova métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 nov. 1991, p.26245-26246.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51 de 18 set. 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos aplicados aos leites cru e pasteurizado. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, n.183, 46p.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, 12 dez. 2006a. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?>. Acesso em: 03 set. 2009.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, 13 dez. 2006b. Institui critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “Índice CMP”. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?>. Acesso em: 03 set. 2009.

10. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 114, 8 jun. 2007. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17814>. Acesso em: 12 out. 2009.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos Origem Animal - RIISPOA. Decreto nº 30.691, 29 mar. 1952. Alterado pelos Decretos nº 1236 de 02/09/1994, nº 1812 de 08/02/1996, nº 2244 de 04/06/1997, nº 6385 de 27/02/2008. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>. Acesso em: 04 fev. 2009.
12. BULLÉ, D.J. **Tecnologias limpas na síntese e avaliação toxicológica de 1,2,4-oxadiazóis em *Aspergillus niger***. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul.
13. CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 752 p.
14. CAMPESTRINI, E. Utilização de Equipamento NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) nos Estudos de Valores Nutricionais (Composição Química e Digestibilidade) de Alimentos Para não Ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.5, p.240-251, 2005. Disponível em: http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/025V2N5P240_251_SE T2005.pdf. Acesso em: 16 ago. 2009.
15. CARDOSO, R.R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57 f. Tese (Doutorado em microbiologia agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
16. CARNEIRO, M.E. **Classificação de lâminas de madeira de *pinus spp* por espectroscopia óptica**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
17. CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; ALCÂNTRA, L.A.P.; BONOMO, R.C.F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista eletrônica de Veterinária**, v.8, n.6, 7p., 2007. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060704.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2009.
18. CAYOT, P.; LORIENT, D. Structure-function relationships of whey proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.225-255.
19. CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food qualityTrends. **Food Science and Technology**, v.18, p.72-83, 2007.

20. CHAMINADE, P.; BAILLET, A.; FERRIER, D. Data treatment in near infrared spectroscopy. **Analusis**, v.26, n.4, p.33-38, 1998.
21. CHU, L.; MACLEOD, A.; OZIMEK, L. Isolation of glycomacropeptide from sodium caseinate hydrolysate solution by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**, v.51, n.6, p.303-306, 1996.
22. CNA. 2008. Perspectivas e desafios para o agronegócio em 2008. Disponível em: www.cna.org.br. Acesso em: 18 nov. 2009.
23. DRACZ, S. **Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite**. 1996. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
24. DÜRR, J.W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do leite: uma oportunidade única. In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Editora Passo Fundo, 2004. p. 38-55.
25. DURRANT, S.F. material didático. **Espectroscopia no Infravermelho**. Disponível em: <http://www.sorocaba.unesp.br/professor/steve/POSMAT%20S%202009/Espetroscopia%20IR/Infravermelho%20l.pdf>. Acesso em: 22. jun. 2009.
26. EMBRAPA. 2008a. **Produção de Leite, Vacas Ordenhadas e Produtividade Animal no Brasil – 1980/2008**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php>. Acesso em: 18 nov. 2009.
27. EMBRAPA. 2008b. **Classificação mundial dos principais países produtores de leite de vaca – 2007**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>. Acesso em: 18 nov. 2009.
28. EMBRAPA. 2008c. **Ranking da Produção Anual Leite por Estado no Brasil, 2007**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0240.php>. Acesso em: 18 nov. 2009.
29. FARRELL, H.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E.; CREAMER, L.K.; HICKS, C.L.; HOLLAR, C.M.; NG-KWAI-HANG, K.F.; SWAISGOOD, H.E. Nomenclature of the proteins of cows-milk-sixth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.1641-1674, 2004.
30. FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Espanha: Editora Acribia S.A., 2000, 1280p.

31. FERRÃO, M.F.; CARVALHO, C.W.; MÜLLER, E.I.; DAVANZO, C.U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.333-340, 2004.
32. FERRÃO, M.F.; DAVANZO, C.U. Horizontal attenuated total reflection applied to simultaneous determination of ash and protein contents in commercial wheat flour. **Analytica Chimica Acta**, v.440, n.2, p.411-415, 2005.
33. FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; BORIN, A.; MARETTO, D.A.; POPPI, R.J. LS-SVM: 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.
34. FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, v.22, p.724-731, 1999.
35. FONTANELI, R.S.; DURR, J.W.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; HAUBERT, F.; BORTOLINI, F. Validação do método da reflectância no infravermelho proximal para análise de silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.594-598, 2002.
36. FUKUDA, S. P. **Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropeptídeo e caseinomacropeptídeo em leite**. 2003. 149 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
37. GELADI, P.E.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v.185, p.1-17, 1986.
38. GIVENS, D.I.; DE BOEVER, J.L.; DEAVILLE, E.R. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v.10, p.83-114, 1997.
39. GUAN, R.; LIU, D.; YE, X.; YANG, K. Use of fluometry for determination of skim milk powder adulteration in fresh milk. **Journal of Zhejiang University**, v.6, n.11, p.1101-1106, 2005.
40. HELFER, G.A.; FERRÃO, M.F.; FERREIRA, C.V.; HERMES, N. Publicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, 2006.
41. HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v.500, n.1-2, p.365-377, 2003.

42. LASMAR, M.M. **Deteccção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de leite cru conservadas em bronopol**. 2007. 38 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
43. LÉONIL, J.; MOLLÉ, D. A method for determination of macropeptide by cation-exchange fast protein liquid chromatography and its use for following the action of chymosin in milk. **Journal of Dairy Research**, v.58, n.3, p.321-328, 1991.
44. MAFUD, M.D.; ROSSI, R.M.; CAMPOS, E.M.; NEVES, M.F.; SCARE, R.F. Não-conformidade na cadeia produtiva do leite: problemas institucionais. In: XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Londrina, 2007. **Anais eletrônicos...** [online]. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/6/844.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2010.
45. 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.
46. MALUF, D.F. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de sibutramina em forma farmacêutica e estudo de dissolução *in vitro***. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
47. MARTINS, R.S.; SANTOS, C.V.; TEIXEIRA, S.R. **Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil**. 2004. Disponível em: http://www.madainoticias.com.br/ma_atualidades20.htm. Acesso em: 14 set. 2009.
48. 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. 142 f. Dissertação (*Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
49. MOLLÉ, D.; LÉONIL, J. Heterogeneity of the bovine k-casein caseinomacropeptide, resolved by Liquid Chromatography on line with Electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.708, p.223-230, 1995.
50. MONCADA, G.V.H. **Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (nirs) en el análisis cuantitativo y cualitativo de carne de cordero**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Austral de Chile, Valdivia.

51. MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO. M.F.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.346-350, 2007.
52. MURRAY, I.; WILLIAMS, P.C. Chemical Principles of Near-Infrared Technology. In: WILLIAMS, P.C; NORRIS, K.H. **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. 2 ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1990, p.17-34.
53. NAGATA, N.; BUENO, M.I.M.S.; PERALTA-ZAMORA, P. Métodos matemáticos para a correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raio-x. **Química Nova**, v.24, n.4, p.531-539, 2001.
54. NATALINO, R. **Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise das componentes principais a dados espectrométricos**. 2006. 52 f. Tese ("Magister Scientiae") – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
55. NEVES, B.S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. Artigo Técnico. **Revista Leite e Derivados**, v.10, p. 50-54, 1993.
56. NONI, I.D.; RESMINI, P. Identification of rennet-whey solids in "traditional butter" by means of HPLC/ESI-MS of non-glycosylated caseinomacropetide A. **Food Chemistry**, v.93, n.1, p.65-72, 2005.
57. NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN J.P.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S.B. Interval Partial Least Square Regression (iPLS): A comparative Chemometric Study with an Example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.54, p.413-419, 2000.
58. OLIEMAN, C.; VAN RIEL, J.A.M. Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPEC. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.43, p.171-184, 1989.
59. PANTOJA, P.A. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na caracterização da carga de petróleo para o processo de destilação atmosférica**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Universidade de São Paulo, São Paulo.
60. PARISOTTO, G.; MARQUES, M.; HERMES, A.L.; FLORES, E.M.M.; FERRÃO, M.C. Desenvolvimento de metodologias no infravermelho aplicadas para a quantificação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas. **Orbital**, v.1, n.1, p.38-48, 2009.
61. PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals practical aspects and analytical applications. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.14, n.2, p.198-219, 2003.

62. PEDRO, A.M.K. **Determinação simultânea e não-destrutiva de sólidos totais e solúveis, licopeno e beta-caroteno em produtos de tomate por espectroscopia no infravermelho próximo utilizando calibração multivariada.** 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
63. PICARD, C.; PLARD, I.; RONGDAUX-GAIDA, D.; COLLIN, J.C. Detection of proteolysis milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. **Journal of Dairy Research**, v.61, n.3, p.395-404, 1994.
64. QUEJI, M.D. **Determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maçã por espectroscopia no infravermelho e método de calibração multivariada.** 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
65. RECIO, I.; FRUTOS, M.; OLANO, A.; RAMOS, M. Protein Changes in Stored Ultra-High-Temperature-Treated Milks Studied by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.44, n.12, p.3955–3959, 1996.
66. RODRIGUEZ-OTERO, J.L.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. Analysis of Dairy Products by Near-Infrared Spectroscopy: A Review. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.45, n.8, p.2815-2819, 1997.
67. 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.
68. SÁ, E. Análises para detectar fraudes em leite. **Leite & Derivados**, n.78, 2004.
69. SALIBA, E.O.S.; GOTIJO NETO, M.M; RODRIGUEZ, N.M.; MIRANDA, L.F.; Predição da composição química do sorgo pela técnica de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, p.357-360, 2003.
70. SAUER-LEAL, E.; OKADA, F.M.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1621-1625, 2008.
71. SANVIDO, G.B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira.** 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

72. SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, 2004.
73. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, p.67-78.
74. SIMAS, R. C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia de infravermelho próximo**. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
75. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Ed. Editora Oficial da Sociedade Brasileira de Química, 2002.
76. SOTELO, F.F. **Aplicação da espectroscopia de Infravermelho Próximo na caracterização de petróleo. Simulação de uma unidade de destilação atmosférica**. 2006. 77 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
77. SOUZA, R.C. **Resíduos de antibiótico no leite**. 2006. 44 f. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ.
78. TULLIO, L.T. **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
79. VAN HOOYDONK, A. C. M.; OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.36, n.2, p.152-158, 1982.
80. VAN KEMPEN, T.A.T.G.; JACKSON, D. NIRS may provide rapid evaluation of amino acids. **Feedstuffs**, v.68, p.12-15, 1996.
81. VAN RIEL, J.; OLIEMAN, C. Determination of caseinomacropéptide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk end buttermilk powder. **Electrophoresis**, v.16, p.529-533, 1995.
82. VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.V.L.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v.25, n.4, p.1-13, 2002.
83. VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; ROSSI JUNIOR, O.D.; PENNA, A.L.B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

84. VILELA, S.C. **Detection de suero de queseria agragado a leche pasteurizada y leche em polvo, por determinacion del glicomacropeptídeo por eletroforesis.** 1987. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidad Austral de Chile, Valdivia.
85. VIOTTO, W.H.; CUNHA, C.R. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. **Anais...** Goiânia:Talento, 2006, p.241-258.
86. WORKMAN, J.J.; MOBLEY, P.R.; KOWALSKY, B.R.; BRO, R. Interpretive spectroscopy for near infrared. **Applied Spectroscopy Reviews.** v.31, p.251-320, 1996.
87. ZENI, D. **Determinação de cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS).** 2005. 64 f. Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
88. ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; PEREIRA DIAS, N.F.G.; JACOBUCCHI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal Food Technology**, v.4, p.1-8, 2001.