

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**

**Núcio Flávio da Silva**

**Otimização das análises de leite para detecção de soro por espectroscopia de  
infravermelho**

**Juiz de Fora  
2024**

**Núcio Flávio da Silva**

**Otimização das análises de leite para detecção de soro por espectroscopia de  
infravermelho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientadora: Dra. Maria José Valenzuela Bell

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Flávio da Silva, Núcio .

Otimização das análises de leite para detecção de soro por espectroscopia de infravermelho / Núcio Flávio da Silva. -- 2024.  
97 p. : il.

Orientador: Maria José Valenzuela Bell

Coorientador: Mirian Pereira Rodarte

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2024.

1. Espectroscopia. 2. Caseinomacropéptido. 3. Leite. 4. Fraudes. 5. Soro. I. José Valenzuela Bell, Maria , orient. II. Pereira Rodarte, Mirian , coorient. III. Título.

**Núcio Flávio da Silva**

**Otimização das análises de leite para detecção de soro por espectroscopia de infravermelho**

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
graduação em  
Ciência e Tecnologia  
do Leite e Derivados  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre  
em Ciência e  
Tecnologia do Leite e  
Derivados. Área de  
concentração: Ciência  
e Tecnologia do Leite  
e Derivados.

Aprovada em 05 de junho de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

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

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

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

Juiz de Fora, 22/05/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Valenzuela Bell, Professor(a)**, em 19/06/2024, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virgilio de Carvalho dos Anjos, Professor(a)**, em 30/06/2024, às 22:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roney Alves da Rocha, Usuário Externo**, em 23/07/2024, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1812147** e o código CRC **B55E6E37**.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabalho aos meus pais por sempre me apoiarem nos momentos difíceis da vida e por sempre me incentivarem a buscar meus objetivos. À minha esposa Adriana por estar sempre presente nos momentos em que me ausentei para dedicar a este estudo e por cuidar tão bem de nosso filhos. Aos meus filhos Artur e Beatriz para demonstrar que nunca é tarde para aprender e que o conhecimento é algo que nos faz trilhar e buscar a cada dia novas expectativas.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me guiar e iluminar meus caminhos com sabedoria e saúde. À minha orientadora Maria José pela paciência na orientação e incentivo no qual tornou este trabalho possível. À time Nestlé por me confiar este desafio e principalmente a equipe do NQAC (Nestlé Quality Assurance Center) por me dar esta oportunidade e tornar este sonho possível.

## RESUMO

A cadeia produtiva do leite e derivados é de grande importância econômica e social para o Brasil, com o país sendo o terceiro maior produtor mundial de leite. A adição de soro de queijo ao leite é uma das fraudes mais comuns, prejudicando a qualidade e o valor nutritivo do alimento. A detecção de fraudes tem sido realizada por meio de métodos analíticos tradicionais, mas também estão sendo utilizadas outras áreas de estudo, como a espectroscopia de infravermelho, para facilitar a avaliação da qualidade do leite. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo preditivo ou classificatório para detectar a adição de soro de leite em quantidades que permitam classificar o leite de acordo com a Instrução Normativa N°68. Avaliando a eficiência do método de espectroscopia do infravermelho médio na quantificação/detecção de soro de leite no leite cru e comparando-o com o método utilizado em rotina, o Kit c-Gmp. No estudo, foram coletadas amostras de leite cru na rotina da recepção de leite da fábrica Nestlé em Montes Claros, Minas Gerais. As amostras foram divididas em dois grupos: amostras em branco, que não tinham adulteração com soro, e amostras adulteradas, que tinham adição intencional de soro. Foram coletadas um total de 886 amostras das rotas recebidas na unidade entre janeiro de 2022 e agosto de 2023. Para realizar a checagem das contaminações intencionais realizadas durante o estudo, foram realizadas análises do índice de CMP de 5 níveis das concentrações utilizadas (0 – Isentos de adição, 30 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L). As checagens foram realizadas pelo método HPLC bem com pelo kit c-GMP. O método mostrou uma boa correlação em relação à metodologia HPLC. No entanto, ao comparar o método com o kit c-GMP, observou-se que o equipamento não foi capaz de quantificar satisfatoriamente em níveis entre 30 mg/L e 75 mg/L. No entanto, o equipamento demonstrou que, ao realizar leituras com níveis superiores a 75 mg/L, ele também quantifica em níveis mais baixos (entre 30 mg/L e 75 mg/L), o que pode ser útil na quantificação de níveis acima de 75 mg/L. Para reduzir o erro encontrado no modelo preditivo de detecção, será necessário realizar um estudo mais aprofundado e desenvolver o uso de outras ferramentas, como as Redes Neurais Artificiais (RNA).

Palavras chaves: Espectrometria, soro, leite cru.

## ABSTRAT

The dairy production chain is of great economic and social importance to Brazil, with the country being the third largest producer of milk in the world. The addition of whey to the milk is one of the most common frauds, jeopardizing the quality and nutritional value of the food. Fraud detection has been carried out using traditional analytical methods, but electronic equipment, such as infrared spectroscopy, is also being used to facilitate the evaluation of milk quality. The aim of this study was to develop a predictive and/or classifying model to detect the addition of whey in quantities that would allow the milk to be classified according to Normative Instruction N°68. Evaluating the efficiency of the near-infrared spectroscopy method in the quantification/detection of whey in raw milk and comparing it with the method used in routine use, the c-Gmp Kit. In the study, samples of raw milk were collected during the milk reception routine at the Nestlé factory in Montes Claros, Minas Gerais. The samples were divided into two groups: blank samples, which had no adulteration with serum, and adulterated samples, which had intentional addition of serum. A total of 886 samples of the routes received at the unit between January 2022 and August 2023 were collected. To check for intentional contamination during the study, analyzes of the CMP index of 5 levels of the concentrations used (0 - free of addition, 30 mg/L, 50 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 100 mg/L and 150 mg/L) were performed. The checks were performed by the HPLC method as well as by the c-GMP kit. The method showed a good correlation with the HPLC methodology. However, when comparing the method with the c-GMP kit, it was observed that the equipment was not able to quantify satisfactorily at levels between 30 mg/L and 75 mg/L. However, the equipment demonstrated that when taking readings at levels above 75 mg/L, it also quantifies at lower levels (between 30 mg/L and 75 mg/L), which may be useful in quantifying levels above 75 mg/L. To reduce the error found in the detection method, it will be necessary to carry out a more in-depth study and to develop the use of other tools, such as Artificial Neural Networks (RNA).

Keywords: Spectrometry, whey, raw milk.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Consumo de lácteos (Kg/Hab) Versus Renda <i>Per Capta</i> (USS/HAB) 2001 .....	22
Figura 2	- Micela de caseína (A: submicela, B: cadeias proteicas, C: fosfato de cálcio, D: k-caseína, E: grupo fosfato) .....	28
Figura 3	- Local de ação da quimosina na $\kappa$ -caseína .....	29
Figura 4	- Regiões espectrais de importância analítica .....	35
Figura 5	- Figura 5 - Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares (a) Estiramento, (b) Dobramento, (c) Vibração de estiramento simétrico, (d) Vibração de estiramento assimétrico, (e) Vibração de deformação tipo tesoura, (f) Vibração de deformação tipo oscilação, rotação, (g) Vibração de deformação tipo balanço, (h) Vibração de deformação tipo torção ...	37
Figura 6	- Diagrama esquemático espectrofotômetro com transformada de Fourier. ....	39
Figura 7	- Representação da Análise de Componentes Principais, por meio dos sistemas decoordenadas .....	45
Figura 8	- Representação esquemática das matrizes X e Y no desenvolvimento do método PLS .....	46
Figura 9	- Figura 9 - Milkoscan FT2 .....	52
Figura 10	- Figura 10 - Fluxo interno FT2 .....	52
Figura 11	- Interpretação dos resultados de c-GMP pelo kit Operon .....	53
Figura 12	- Esquema de utilização Software FTiR Calibrator .....	53
Figura 13	- Imagem do software exemplificando remoção de Outliers .....	55
Figura 14	- Caixa para seleção de canais do software (Full Spectra) .....	56
Figura 15	- Exemplo área de seleção completa dos espectros do software .....	56
Figura 16	- Conjunto de Scores de amostras rotina presentes na biblioteca do espectrômetro Infravermelho .....	58
Figura 17	- Conjunto de Espectros das amostras de rotina presentes na biblioteca do espectrômetro Infravermelho .....	58
Figura 18	- Conjunto de Residual x Comprimento de Ondas amostras rotina FT2.	59
Figura 19	- Resultados de CMP pelo kit Operon das amostras adulteradas .....	62
Figura 20	- Resultados equipamento x resultados referência .....	63

Figura 21	- Distribuição resultados equipamento Milkoscan FT2 x resultados referência após exclusão de Outliers .....	64
Figura 22	- Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 30 mg/L de CMP .....	65
Figura 23	- Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 75 mg/L de CMP .....	66
Figura 24	- Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 100 mg/L de CMP .....	67
Figura 25	- Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 150 mg/L de CMP .....	68
Figura 26	- Visualização do melhor fator do teste demonstrado no Software FT2 Calibrator .....	69
Figura 27	- Visualização do melhor fator obtido através do Teste 2 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 2 .....	70
Figura 28	- Visualização do melhor fator obtido através do Teste 3 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 3 .....	71
Figura 29	- Distribuição dos resultados e números de fatores, teste seleção de área – PLS 1 .....	73
Figura 30	- Distribuição dos resultados e números de fatores, teste seleção de área – PLS 2 .....	74
Figura 31	- Distribuição dos resultados e números de fatores, teste seleção de área – PLS 3 .....	75
Figura 32	- Linearidade gráfica dos resultados .....	76
Figura 33	- Linearidade gráfica dos resultados após exclusão os resultados com possíveis erros .....	77
Figura 34	- Demonstração da linearidade do melhor modelo .....	79
Figura 35	- Demonstração da escolha do fator 9 pela PLS .....	80
Figura 36	- Resultados Teste 1 Confirmatório – FT2 x HPLC .....	81
Figura 37	- Resultados obtidos pelo Kit c-GMP Teste Confirmatório 1 em mg/L ....	82
Figura 38	- Resultados Teste 2 Confirmatório – FT2 x HPLC .....	83
Figura 39	- Resultados Kit c-GMP Teste Confirmatório 2 em mg/L .....	84
Figura 40	- Regressão linear – Coeficiente de Determinação $R^2 = 0,912$ .....	85

Figura 41 - Resultados Milkoscan FT2 e HPLC x Faixa Detecção do imunocromatográfico Kit c-GMP ..... 86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Concentração e distribuição média dos componentes do leite .....	20
Tabela 2	- Composição média do leite e dos soros doce e ácido .....	24
Tabela 3	- Composição do leite e do soro, em termos de minerais .....	24
Tabela 4	- Composição vitaminas do leite e do soro, em mg/L .....	24
Tabela 5	- Valor teórico de aminoácido do CMP conforme a estrutura primária .	30
Tabela 6	- Regiões espectrais do infravermelho .....	35
Tabela 7	- Regiões espectrais do infravermelho e suas principais aplicações ..	36
Tabela 8	- Atribuições das regiões espectrais às possíveis transições espectrais .....	38
Tabela 9	- Relação de massa utilizada da solução padrão .....	51
Tabela 10	- Quantidade de amostras por concentração de soro adicionado .....	60
Tabela 11	- Composição média do leite utilizado no estudo .....	61
Tabela 12	- Nível de adulteração x resultado HPLC .....	61
Tabela 13	- Nível de adulteração x resultado kit c-GMP .....	62
Tabela 14	- Resultados obtido pelo Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 1 .....	69
Tabela 15	- Resultados Obtidos pelo Teste 2 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 2 .....	70
Tabela 16	- Resultados Obtidos pelo Teste 3 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 3 .....	71
Tabela 17	- Resultados teste seleção de área PLS 1 .....	72
Tabela 18	- Resultados do Teste1A seleção de área PLS 2 .....	74
Tabela 19	- Resultados do Teste 1A seleção de área PLS 3 .....	75
Tabela 20	- Resultados obtidos Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa PLS 1, 2 e 3 – Suavização 1 .....	78
Tabela 21	- Resultados obtidos Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa PLS 1, 2 e 3 – Suavização 2 .....	78
Tabela 22	- Resultados obtidos Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa PLS 1, 2 e 3 – Suavização 3 .....	79
Tabela 23	- Concentrações realizadas Teste 1 e Teste 2 .....	80
Tabela 24	- Resultados Teste 1 método: Milkoscan FT2, HPLC e Kit c-GMP .....	81

Tabela 25 - Resultados Teste 2 métodos: Milkoscan FT2, HPLC e Kit c-GMP ..... 83

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASM	Módulo de Espectro Normal
c-GMP	Caseína Glicomaclopeptídeo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMP	Caseínomaclopeptídeo
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIL	Federação Internacional de Laticínios
FT-IR	Infravermelho Transformada de Fourier
HPLC	Hight-peformance Liquid Chromatography
ISO	International Organization Standardization
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MLR	Multiple Linear Regression
MIR	Mid-infrared
NIR	Near-infrared
PCA	Análises por Componentes Principais
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinação
RE	Erro Relativo
RMSE	Erro Quadrático Médio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1	LEITE .....	20
2.2	CONSUMO DE LEITE NO BRASIL E NO MUNDO .....	21
2.3	SORO .....	23
2.3.1	Proteínas do Leite .....	25
2.3.2	Caseínas .....	26
2.3.3	Soroproteínas .....	28
2.4	CASEÍNOMACROPEPTIDEO (CMP) .....	29
2.5	FRAUDES EM LEITE NO BRASIL .....	31
2.6	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	32
2.7	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	34
2.7.1	NIR com transformada de Fourier (FT-NIR) .....	39
2.7.2	Espectroscopia o infravermelho em análises de alimentos .....	40
2.8	ANÁLISE DOS DADOS (QUIMIOMETRIA) .....	42
2.8.1	Calibração Multivariada .....	43
2.8.2	Análise Componentes Principais (PCA) .....	44
2.8.3	Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	45
2.9	VALIDAÇÃO CRUZADA .....	47
2.10	COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ ) .....	47
2.11	PRECISÃO ABSOLUTA E RELATIVA .....	47
2.11.1	Exatidão .....	47
2.11.2	Precisão .....	48
2.12	REPETIBILIDADE .....	48
2.12.1	Repetibilidade Absoluta/Relativa .....	48
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>50</b>
4.1	AMOSTRAGEM .....	50
4.2	SORO .....	50

4.3	ADULTERAÇÃO DO LEITE .....	51
4.4	COLETA DOS ESPECTROS NO MIR .....	51
4.5	MÉTODO IMUNOCROMATOGRAFICO PARA ANÁLISE DE CMP .....	52
4.6	SOFTWARE PARA TRABALHO DOS DADOS DE PCA E PLS .....	53
4.6.1	Número de Fatores .....	53
4.6.2	Limite Amostras Normais e Anormais (Treshold) .....	54
4.6.3	Valores Atípicos (Outliers) .....	54
4.6.4	Suavização do comprimento de onda (Smooth) .....	55
4.6.5	Calibragem Completa do Espectro (Full Spectra Calibrations) .....	55
4.6.6	Filtro de Referência (Reference Filter) .....	56
4.6.7	Validação Cruzada (Crossvaler) .....	57
4.6.8	Seletor de Canal (Channel Selector) .....	57
4.7	CONSTRUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL .....	57
4.7.1	Criação do ASM (Módulo de Espectro Anormal) .....	59
4.8	CONSTRUÇÃO DO MODELO IDEAL .....	59
4.8.1	Construção de Sample Set .....	59
4.9	CHECAGEM DA CURVA MODELO IDEAL .....	60
4.10	CRITERIOS ESTABELECIDOS .....	60
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
5.1	COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE UTILIZADO NO ESTUDO .....	61
5.2	AVALIAÇÃO CONCENTRAÇÃO DE CMP DAS AMOSTRAS .....	61
5.3	DISTRIBUIÇÃO VISUAL DOS RESULTADOS .....	62
5.4	AVALIAÇÃO ESPECTRAL DO MODELO IDEAL.....	64
5.5	RESULTADOS PLS .....	69
5.5.1	Teste 1 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 1 .....	69
5.5.2	Teste 2 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 2 .....	70
5.5.3	Teste 3 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 3 .....	71
5.6	TESTES SELEÇÃO DE ÁREA .....	72
5.6.1	Teste 1A - Seleção de área – PLS 1 .....	72
5.6.2	Teste 1A - Seleção de área – PLS 2 .....	73
5.6.3	Teste 1A - Seleção de área – PLS 3 .....	75
5.6.4	Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa .....	76
5.7	TESTES CONFIRMATÓRIOS .....	80

5.7.1	Teste 1 Confirmatório Milkoscan Ft2 x método HPLC .....	80
5.7.2	Teste 2 Confirmatório Milkoscan Ft2 x método HPLC .....	82
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do leite e derivados é um setor de grande importância econômica e social para o Brasil, recebendo dedicação especial do MAPA. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite, com mais de 34 bilhões de litros por ano, com produção em 98% dos municípios brasileiros, tendo a predominância de pequenas e médias propriedades, empregando cerca de 4 milhões de pessoas. O país conta com mais de 1 milhão de propriedades produtoras de leite segundo dados da Secretaria de Política Agrícola (MAPA, 2023).

É notório observar que a sociedade tem se desenvolvido de forma expressiva em diversas áreas do conhecimento, porém sempre se fez necessário para o desenvolvimento populacional a busca por alimentos de diversas fontes e de boa qualidade. O consumidor é cada vez mais presente no mercado de lácteos, demandando diversidade de produtos e derivados do leite. O consumidor diante das gôndolas do mercado lácteo, de forma oculta ele está sinalizando aos produtores e indústrias o que mais gosta, para que os fabricantes e vendedores fiquem mais atentos para atender às demandas cada vez mais específicas e exigentes de seus consumidores (RENTERO,2019).

O hábito de consumo de derivados diversos e de leite *in natura* de animais, foram aprimorados de acordo com os padrões e os critérios de aceitabilidade. Conforme o desenvolvimento de tecnologia nas indústrias de produtos de origem animal, aprimorou aos produtos derivados do leite, processos específicos resultando em produtos diversificados com elevada aceitação em vários nichos de mercado (RENTERO,2019).

O leite é um dos produtos mais importantes da agropecuária brasileira. De acordo com Brasil (2017), é definido pelo decreto Nº 9.013 como o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. É, também, um alimento rico em nutrientes, sendo fonte de proteínas e cálcio e seu consumo pode trazer diversos benefícios para a saúde. Porém, assim como outros produtos alimentícios, está suscetível a ações fraudulentas e criminosas ao longo de sua cadeia produtiva (PINTO, 2022).

As fraudes em leite são um assunto bastante recorrente na sociedade e, de tempos em tempos, somos expostos a novos escândalos envolvendo este tema. Dessa forma, são diversas as consequências que a indústria leiteira enfrenta e, muitas delas, estão relacionadas com a visão negativa que se cria sobre os produtos lácteos,

podendo gerar significativo impacto sobre consumidores, produtores e empresários (PINTO, 2022).

Originalmente, as fraudes em leite visavam aumentar o volume, principalmente pela adição de água. Porém com o passar do tempo e com o refinamento de técnicas, surgiram novos tipos de adulteração, como adição de soro de leite, conservantes, substâncias neutralizantes e reconstituintes de densidade e crioscopia (SALES et al., 2020). A modernização destas práticas faz da detecção das fraudes um desafio crescente, e o fato de que podem ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva do leite dificulta ainda mais sua detecção (FAGNANI, 2016).

Segundo Fagnani (2016), as fraudes podem ocorrer na propriedade rural e estão associadas à obtenção de lucro através da entrega de maiores volumes de leite à indústria e/ou transportador do que o que foi de fato produzido. A etapa de transporte também se torna suscetível a adulterações, onde a responsabilidade é atribuída aos donos das empresas ou ao próprio caminhoneiro. As fraudes, muitas vezes, podem estar conectadas às indústrias, ocorrendo dentro do próprio laticínio, ou ao comércio, nos produtos expostos ao consumidor como através da alteração de prazos de validade, por exemplo.

A necessidade do alinhamento à regulamentação internacional tem forçado um aprimoramento da legislação brasileira no sentido da consolidação dos reais indicadores de qualidade do leite e derivados. Entre os parâmetros importantes para a caracterização do leite está a composição centesimal de seus principais constituintes, como gordura, lactose e proteínas (MONTEIRO, 2015).

A legislação brasileira, e também a de todos os países desenvolvidos, proíbe a adição de soro de leite ao leite de consumo. Caso a adição seja feita, o produto final deverá chamar-se “bebida láctea” e não poderia ser considerado leite (tipo A, B, C, esterilizado, etc.) (DRACZ, 1996).

A legislação brasileira considera fraude a adição de soro de leite ao leite pasteurizado, esterilizado ou em pó. Entretanto, por estar quase sempre disponível, uma vez que é um subproduto da fabricação de queijos, de custo reduzido ou nulo, torna-se economicamente atrativa a adição de soro de leite ao leite, prejudicando diretamente o consumidor e os concorrentes que obedecem à legislação, além de incorrer em crimes previstos na legislação. Uma vez que a adição de soro de leite ao leite compromete a sua qualidade, torna-se imprescindível o controle deste importante

alimento distribuído aos consumidores, para sua utilização como se fosse leite puro (CARVALHO, 2007).

Esta adição, assim como qualquer outra, é proibida pela legislação brasileira por reduzir o valor nutritivo do alimento diluindo os teores de proteínas e gorduras. Caracteriza, ainda, prática abusiva que lesa os direitos do consumidor e que pode, em casos de consumo prolongado, gerar desnutrição, principalmente em lactentes. No entanto, para uma grande diversidade de outros produtos como leites fermentados, achocolatados, confeitos, panificações e as denominadas bebidas lácteas, o soro de leite é um ingrediente de uso comum (OLIVEIRA, 2011).

As metodologias de análises de referência são trabalhosas, demoradas e possuem um custo elevado para serem executadas. Como uma alternativa para facilitar a avaliação da qualidade tem sido utilizados outros ramos de estudos com, como a espectroscopia de infravermelho, associados às técnicas estatísticas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LEITE

O leite é uma combinação de diversos elementos em água. Os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87%. Os principais elementos sólidos do leite são lipídios (gordura), carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Esses elementos, suas distribuições e interações são determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento (BRITO, 2021). A concentração e distribuição média dos componentes do leite pode ser observada na Tabela 01.

Tabela 1 - Concentração e distribuição média dos componentes do leite.

Componente	Leite (g/L)
Água	87,1
Sólidos Totais	12,9
Caseínas	2,6
Proteínas do soro	0,7
Gordura	4,0
Lactose	4,6
Minerais	0,7
Outros	0,32

Fonte: Baldasso (2008).

A porcentagem de lactose no leite é de aproximadamente 5% (4,7% a 5,2%). É um dos elementos mais estáveis do leite, isto é, menos sujeito a variações. As proteínas representam entre 3% e 4% dos sólidos encontrados no leite. A porcentagem de proteína varia, dentre outros fatores, e é proporcional à quantidade de gordura presente no leite. Isso significa que quanto maior a percentagem de gordura no leite, maior será a de proteína. Existem vários tipos de proteína no leite. A principal delas é a caseína, que apresenta alta qualidade nutricional e é muito importante na fabricação dos queijos. A caseína é produzida pelas células secretoras da glândula mamária e encontra-se organizada na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína junto com cálcio, fósforo e outros sais.

Cerca de 95% da caseína total do leite está nessa forma. As micelas de caseína junto com os glóbulos de gordura são responsáveis por grande parte das propriedades relativas à consistência e à cor dos produtos lácteos (BRITO, 2021).

A concentração de gordura no leite varia geralmente entre 3,5 e 5,3%, em razão de diferenças entre raças, estágio da lactação e de acordo com a alimentação dos animais. A gordura do leite está presente na forma de pequenos glóbulos, suspensos na fase aquosa. Cada glóbulo é envolvido por uma camada formada por um componente da gordura denominado fosfolipídio. Essa camada forma uma membrana que impede a união de todos os glóbulos. Desse modo, a gordura do leite é mantida na forma de suspensão (BRITO, 2021).

O leite é uma fonte excelente da maioria dos sais minerais necessários para o desenvolvimento dos indivíduos. O cálcio e o fósforo do leite apresentam alta disponibilidade, em parte porque se encontram associados à caseína. Por isso, o leite é uma das melhores fontes de cálcio para o crescimento do esqueleto dos indivíduos e para a manutenção da integridade dos ossos dos adultos. O conteúdo de ferro é baixo (BRITO, 2021).

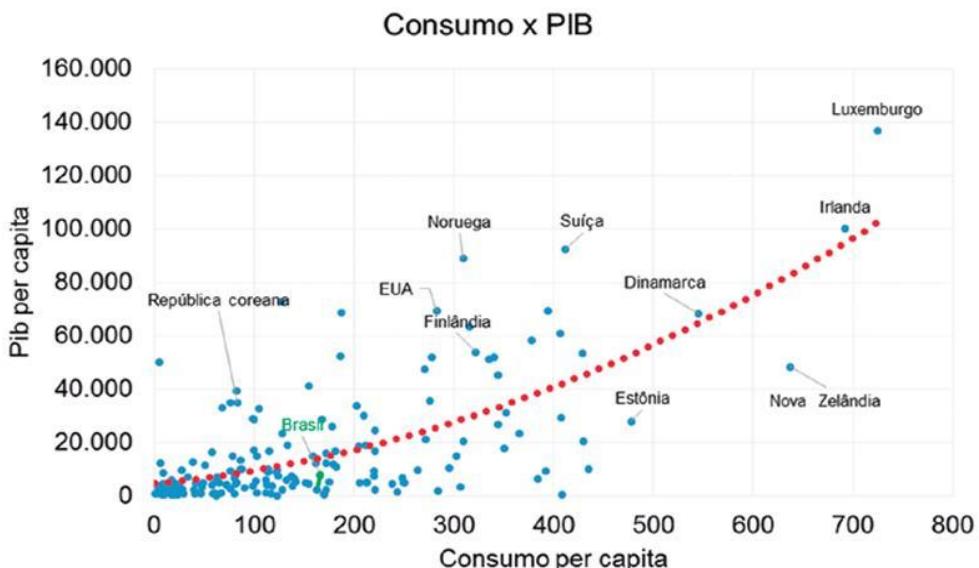
## 2.2 CONSUMO DE LEITE NO BRASIL E NO MUNDO

O consumo de produtos lácteos industrializados cresce com o nível de renda. Sua evolução segue o conceito econômico de elasticidade-renda. Obviamente que existe o efeito de saciedade e o consumo deixa de expandir a partir de determinado nível. No entanto, considerando o padrão de renda global pode-se afirmar que há amplo espaço para o crescimento do consumo, sempre considerando que o fator renda será decisivo nesse contexto. Em países de com população de baixa renda, a população se alimenta relativamente mais de raízes e tubérculos e à medida que a renda cresce ocorre migração para proteínas animais, como o caso do leite e seus derivados (CARVALHO, 2023).

O consumo a partir de 2000, destacando pontualmente alguns países, vale ilustrar o comportamento positivo do consumo com o padrão de renda *per capita* (Figura 1) e a densidade de países com renda baixa e baixo consumo. De amostra de 188 países, apenas 100 deles possui consumo superior a 100 kg de leite equivalente por ano. Somente 54 países têm consumo superior a 200 kg por habitante por ano. Isso ilustra o potencial de expansão do consumo, a depender do crescimento de

renda. Em países da América do Sul, observa-se que Uruguai, Argentina e Chile possuem consumo *per capita* ligeiramente superior ao do Brasil e bem acima do Paraguai. Mas tanto Uruguai quanto Argentina têm apresentado desempenho fraco de demanda. A Argentina chegou a ter consumo *per capita* de 215 kg/habitante em 2000, recuando para 182 kg em 2021 (CARVALHO, 2023).

Figura 1 – Consumo de lácteos (Kg/Hab) Versus Renda *Per Capita* (USS/HAB) 2001.



Fonte: Embrapa/IFCN (2003).

O Brasil, por outro lado, passou de 129 kg para 170 kg/habitante no mesmo período, apesar da desaceleração após 2014. O destaque de crescimento do consumo no citado período foi o Paraguai, que apesar de ter consumo médio relativamente baixo registrou expansão de 60% no período, passando de 88 kg para 141 kg/habitante (CARVALHO, 2023).

Segundo (Carvalho, 2023) em 21 anos, o consumo de lácteos na China saltou de 8 para 39 Kg/habitante. Na Europa, o consumo de lácteos já é bastante elevado, com volume médio de 312 kg/habitante. França e Alemanha possuem o consumo mais alto, com 344 kg e 334 kg por habitante, respectivamente. Mas no caso da França o consumo vem desacelerando, inclusive de queijos, enquanto na Alemanha a tendência é de elevação.

Na Ásia, o principal destaque no consumo de lácteos é a Índia, com consumo *per capita* parecido com o brasileiro, no patamar de 172 kg/habitante. Além de volume relativamente mais alto que o dos demais países do continente, o consumo indiano

praticamente dobrou em 21 anos. China e Vietnã também tiveram desempenho interessante. O consumo chinês passou de 8 kg/habitante em 2000 para quase 39 kg/habitante em 2021. Vietnã seguiu o mesmo caminho, com elevação de 7 kg/habitante para 25 kg/habitante. Esses números ainda baixos mostram que há espaço para forte expansão do consumo na região, que tem sua base em leite fluido e alguns refrigerados. Completando, na América do Norte, o consumo no Canadá e nos Estados Unidos são parecidos, próximo de 280 kg/habitante (CARVALHO, 2023).

Apesar de serem mercados de consumo mais consolidados, ainda dão sinais de crescimento de demanda, sobretudo nos queijos. Portanto, analisando o consumo global, observa-se que algumas regiões continuam com volume relativamente baixo, devido ao menor poder de compra da população. Em alguns países da América do Sul, como o caso brasileiro, o baixo crescimento da economia tem dificultado a expansão do consumo. O mesmo vem ocorrendo na Argentina. Já na Ásia, existe espaço enorme de crescimento do consumo de produtos ainda classificados como commodities, como leite fluido. O mesmo não tende a ocorrer em países com renda superior, em que o consumo de leite fluido perde espaço para produtos como queijos, iogurtes e outros refrigerados (CARVALHO, 2023).

### 2.3 SORO

O soro de leite é um coproduto da fabricação de queijos, obtido após a remoção da coalhada de caseína do leite. De acordo com a técnica utilizada para a coagulação do leite, obtém-se o soro de leite doce ou ácido (Tavares, 2020, Tsermoula, et al., 2021). O soro ácido é produzido pela coagulação ácida do leite, por meio da adição de ácido ou de culturas de bactérias láticas. Já o soro doce é produzido através da coagulação enzimática do leite pela adição de coalho, tipicamente composto por renina e pepsina, isto é, proteases (enzimas) com função de coagular a caseína (Schuck, et al., 2004). As principais diferenças entre os soros ácido e doce consistem nos valores de pH, no perfil mineral, na quantidade de lactose e ácido láctico e no teor de proteínas. O soro ácido é caracterizado por valores mais baixos de pH (pH~4,6-4,7) em comparação ao soro doce (pH~5,9-6,4) e contém maior quantidade de íons cálcio, ânions fosfato e ácido láctico (Pires, et al., 2021, Merkel et al., 2021, Zhao et al., 2022).

No Brasil a produção de soro é representada quase que totalmente de soro doce, sendo a produção de soro ácido insignificante (WIOTTO, 1993). Os principais componentes, vitaminas e minerais do soro encontram-se nas tabelas 02, 03 e 04 respectivamente.

Tabela 2 - Composição média do leite e dos soros doce e ácido.

	Leite %	Soro doce %	Soro ácido %
Sólidos Totais	13,0	6,4	6,20
Proteínas	3,6	0,8	0,75
Gordura	3,9	0,5	0,04
Lactose	4,6	4,6	4,20
Cinza	0,8	0,5	0,80
Ácido Lático		0,05	0,40

Fonte: Antunes (2023).

Tabela 3 - Composição do leite e do soro, em termos de minerais.

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

Fonte: FOX (1997).

Tabela 4 - Composição vitaminas do leite e do soro, em mg/L.

Vitaminas	Leite	Soro de leite
B <sub>1</sub>	0,44	0,38
B <sub>2</sub>	1,70	1,20
B <sub>3</sub>	1,30	0,85
B <sub>5</sub>	3,50	3,40
B <sub>6</sub>	0,50	0,42
C	15	2,2

Fonte: Adaptado FOX (1997), WALSTRA et al. (1999).

Em uma composição aproximada, o soro de leite apresenta 93 a 94% de água e 6% a 7% de sólidos totais, sendo que dentre os principais constituintes dos sólidos totais, a lactose (4,5 a 5%) e as proteínas (0,7 a 0,9%) se destacam, junto com os minerais e a gordura, por serem compostos valiosos para a indústria. As proteínas do soro de leite, além de fornecerem aminoácidos com benefícios relacionados a aspectos nutricionais, contêm algumas propriedades funcionais (gelificação, emulsificação e formação de espuma). Tais fatores fizeram com que o soro de leite ganhasse atenção de vários setores industriais, tendo em vista suas potencialidades energéticas, farmacêuticas e nutricionais (DUARTE, et al., 2020, SETIOWATI, et al., 2020, PIRES, et al., 2021, ZHANG, et al., 2021).

A indústria de laticínios considerou o soro, por muitos anos, como um subproduto de baixo valor, despejando-o em rios e lagos ou irrigando o solo (Vieira, 1999). Com o início da fabricação de queijos em larga escala, a disposição desse resíduo tornou-se um grande problema, uma vez que era descartado sem que fossem consideradas as consequências ambientais. Aos poucos, esse produto passou a ser utilizado para produção de lactose e na alimentação de animais. O soro é reconhecido pelo seu alto valor nutricional, o que faz com que sua utilização tenha grande importância econômica (MAGANHA, 2008).

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

### 2.3.1 Proteínas do Leite

As proteínas representam entre 3% e 4% dos sólidos encontrados no leite. A porcentagem de proteína varia, dentre outros fatores, com a raça e é proporcional à quantidade de gordura presente no leite. Isso significa que quanto maior a percentagem de gordura no leite, maior será a de proteína (BRITO, 2021).

Existem vários tipos de proteína no leite. A principal delas é a caseína, que apresenta alta qualidade nutricional e é muito importante na fabricação dos queijos. A caseína é produzida pelas células secretórias da glândula mamária e encontra-se organizada na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de

caseína junto com cálcio, fósforo e outros sais. Cerca de 95% da caseína total do leite está nessa forma. As micelas de caseína junto com os glóbulos de gordura são responsáveis por grande parte das propriedades relativas à consistência e à cor dos produtos lácteos (BRITO, 2021).

A caseína não é facilmente alterada pelo calor, permanecendo bastante estável quando o leite é pasteurizado. Entretanto, quando ocorrem mudanças na acidez do leite, há rompimento da estrutura das micelas, o que faz a caseína precipitar e formar coágulos. A gordura e a caseína têm importância fundamental para a manufatura de vários derivados lácteos, sendo que representam a maior concentração de elementos sólidos dos queijos (BRITO, 2021).

As proteínas do soro de leite são comumente concentradas e desidratadas para produzir concentrados ou isolados proteicos, os quais são amplamente usados na fabricação de outros alimentos (WHERRY et al., 2019).

### 2.3.2 Caseínas

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

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

As caseínas são classificadas em subgrupos, são eles:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ . As caseínas  $\alpha$  apresentam uma família com características diferentes ( $\alpha s1$  e  $\alpha s2$ ).

A caseína apresenta uma estrutura interna formada de  $\alpha s1$ - $\alpha s2$ - $\beta$ -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio, enquanto que a  $\kappa$ -caseína está localizada preferencialmente na superfície (DALGLEISH, 2011).

A  $\kappa$ -caseína tem como base uma cadeia simples com 169 aminoácidos. No leite encontra-se agregada em polímeros de massa molecular entre 60.000 a 150.000 Da (SGARBIERI, 2004). Contém dois resíduos de cisteína e um de fosfoserina, esse

resíduo provavelmente não participa da formação de fosfato de cálcio em função da sua localização na porção C-terminal da cadeia polipeptídica.

A  $\kappa$ -caseína é a fração das caseínas heterogêneas, insensível ao Cálcio (Ca2+), desempenhando importante papel na estabilidade da caseína em condições normais e impedindo a precipitação das caseínas  $\alpha$ s e  $\beta$  em presença de íons. Esta propriedade estabilizadora é perdida durante a precipitação pela quimosina (CARVALHO, 2007).

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

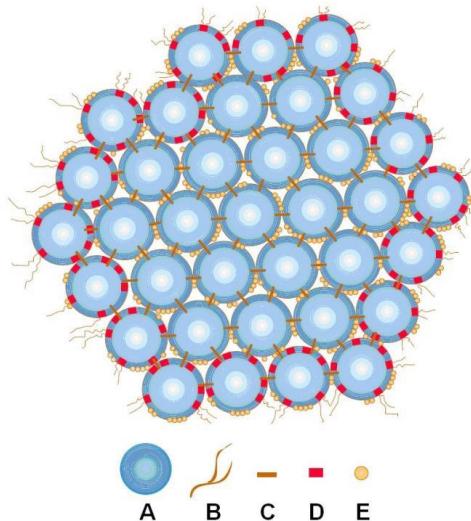
A cisteína somente é encontrada nas caseínas  $\alpha$ s2 e  $\kappa$ . Este resíduo forma ligações dissulfeto intermoleculares. Nas caseínas  $\alpha$ s1 e  $\beta$  não encontramos cisteína ou cistina o que permite uma maior flexibilidade nessas moléculas. Devido principalmente aos teores de prolina, distribuída em toda a cadeia polipeptídica, as caseínas, em especial a  $\beta$ -caseína, são proteínas de estruturas abertas e com predominância de estruturas primárias (DICKINSON, 1999).

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

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

impedimento estérico e eletrostático à aglomeração da micela. A estrutura da caseína é estabilizada por interações hidrofóbicas e iônicas (SOUZA, 2013).

Figura 2 – Micela de caseína (A: submicela, B: cadeias proteicas, C: fosfato de cálcio, D: k-caseína, E: grupo fosfato).



Fonte: Food-Info, (2003).

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

### 2.3.3 Soroproteínas

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

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

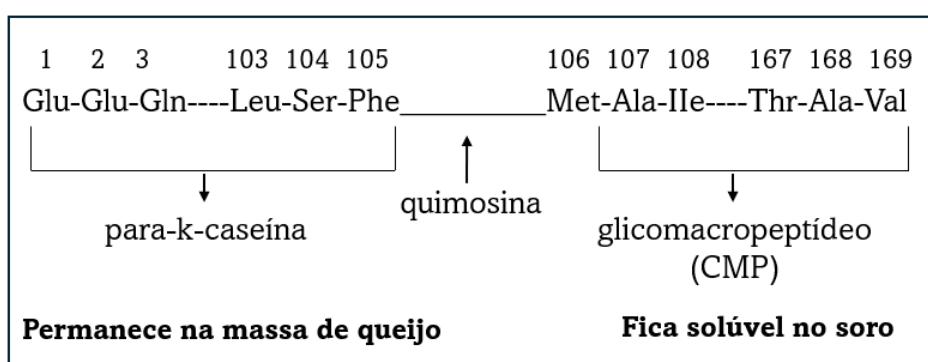
A  $\beta$ -lactoglobulina presente em maior quantidade representa 50% das proteínas do soro. É tipicamente globular, sendo a principal proteína. Contém 162 aminoácidos, com uma média massa molecular (em torno de 18 kDa), o que lhe confere resistência a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presente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

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

#### 2.4 CASEÍNOMACROPEPTIDEO (CMP)

O caseinomacropéptideo (CMP) é um peptídeo que apresenta 64 aminoácidos, formado devido à ação da quimosina durante a fabricação do queijo (TULIO, 2007). Ocorre a clivagem da proteína  $\kappa$ -caseína na ligação fenilalanina (PHE) aa 105 e metionina (MET) aa 106, resultando em dois peptídeos, o caseinomacropéptideo, que contém a porção C-terminal (106 a 169), este é solúvel em ácido tricloroacético 8%, apresentando em sua estrutura diferentes concentrações de fosfato e carboidratos, e outro peptídeo de baixa solubilidade, o para  $\kappa$ -caseinato constituído pela porção N-terminal (1 a 105). A Figura 3 representa o local da ação da quimosina na  $\kappa$ -caseína (MAGALHÃES, 2008).

Figura 3 - Local de ação da quimosina na  $\kappa$ -caseína.



Fonte: Adaptado Magalhães (2008).

O CMP possui valor teórico elevado dos aminoácidos isoleucina e valina e menor dos aminoácidos como fenilalanina, triptofano e tirosina (ALCANTARA, 2009). A composição teórica dos aminoácidos do CMP está relacionada na tabela 05, logo abaixo:

Tabela 5 - Valor teórico de aminoácido do CMP conforme a estrutura primária.

AMINOÁCIDO	ABREVIATRURA	VALOR TEÓRICO* (%)
Ácido aspártico	Asp	8,5
Ácido glutâmico	Glu	19,2
Alanina	Ala	5,3
Arginina	Arg	0
Fenilalanina	Phe	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
Tirosina	Tyr	0
Treonina	Thr	18,2
Valina	Val	8,9

Fonte: Chu, Macleod, Ozimek, 1996.

\*Valor teórico de aminoácido calculado conforme a estrutura primária do CMP.

O CMP pode apresentar quatro variações genéticas A, B, C e E, sendo as variantes A e B as formas mais comuns da  $\kappa$ -caseína, que podem estar na forma glicosilada ou não glicosilada. A forma glicosilada representa 50 a 60% do CMP total e apresenta em sua composição GAL (galactose), GaTNAc (N-acetilgalactosamina) e NeuAc (ácido acetilneuramínico). A concentração do CMP liberada não varia com a proporção entre as variantes A e B (MAGALHÃES, 2008).

As enzimas produzidas por bactérias psicrotróficas podem ocasionar proteólise da  $\kappa$ -caseína, produzindo pseudo CMP por um único aminoácido (metionina terminal

no CMP, resíduo 106 – alanina terminal no pseudo-CMP, resíduo 107). O pseudo CMP possui um resíduo a menos que o CMP, sendo que *Pseudomonas fluorescens* podem indicar aumento de CMP e são menos específicas que a quimosina (MAGALHÃES, 2008).

## 2.5 FRAUDES EM LEITE NO BRASIL

A adição fraudulenta de soro ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do glicomacropeptídeo (GMP), que resulta da quebra da ligação peptídica da k-caseína entre os aminoácidos 105-106 Phe-Met. Desta cisão forma-se a para-kcaseína (1-105) que permanece nas micelas de caseína e o glicomacropeptídeo (106-169) que fica no soro (CARVALHO, 2007). No entanto, proteases termoestáveis produzidas por micro-organismos psicrotróficos podem, também, ser responsáveis por esse fenômeno mesmo após o tratamento térmico (RECIO, 2000).

Os hidrolisados podem ser caracterizados utilizando-se métodos que fornecem diferentes informações como a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de uréia (ureia-PAGE), que permite boa resolução dos peptídeos com sua carga; eletroforese em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que apresenta uma relação muito boa dos peptídeos, especialmente com relação a sua massa; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de fase reversa, que permite uma resolução muito boa dos peptídeos com relação aos aspectos de hidrofobicidade e hidrofilicidade; e a de exclusão, que permite uma separação satisfatória dos peptídeos com base em seu tamanho (OLIVEIRA, 2009). Além desses, outros são também citados para esta detecção em produtos lácteos (Bremer, 2008), sendo eles colorimétricos ou imunológicos, e mais recentemente, a eletroforese capilar, a espectrometria de massa e os biosensores.

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

Os direitos dos consumidores são estabelecidos na Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990, Código de Proteção e Defesa dos consumidores. Determina como

direito básico a proteção da sua saúde e segurança. Portanto, deve atender aos parâmetros de qualidade e segurança definido pelos órgãos fiscalizadores competentes, não podendo acarretar riscos à saúde. Dispõe que são impróprios ao uso os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos a vida ou a saúde, perigosos ou, ainda, aqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação (BRASIL, 1990).

A Instrução Normativa Nº 69, de 13 de Dezembro 2006 descreve que:

“Art. 2º - Somente quando o índice de CMP for de até 30 mg/L (trinta miligramas por litro), o leite de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa poderá ser destinado ao abastecimento direto.

§ 1º Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30mg/L (trinta miligramas por litro) e 75mg/L (setenta e cinco miligramas por litro), este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos.

§ 2º Os derivados lácteos de que trata o § 1º serão avaliados tecnicamente, caso a caso, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA.

§ 3º Quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg/L (setenta e cinco miligramas por litro), este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, caso acaso, pelo DIPOA (BRASIL, 2006).”

## 2.6 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

High-performance liquid chromatography (HPLC) ou Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica usada para separar, identificar e quantificar cada um dos componentes numa mistura. Os sistemas de HPLC são atualmente utilizados em uma ampla variedade de campos de aplicação. A maior confiabilidade dos dados analíticos e a maior eficiência do processo global de análise são requisitos para o rápido desenvolvimento de novos medicamentos, para o cumprimento das regulamentações ambientais, para o controle de qualidade, entre outros (CHAGURI, 2021). Esta técnica é caracterizada pelo uso de partículas de dimensões micrométricas na fase estacionária (de 3 a 10  $\mu\text{m}$ ), com grande área superficial, para que haja um aumento na eficiência das separações. Com o uso de partículas tão pequenas ocorre o aumento da resistência à passagem da fase móvel.

Por isto, um sistema de bombeamento pressurizado (pressões de 1 a 40 MPa) é utilizado para a fase móvel alcançar uma vazão aceitável, e obter separações com ótima resolução (SKOOG, 2006).

A cromatografia inclui métodos que permitem a separação, identificação e determinação de componentes muito semelhantes de misturas complexas. A amostra é transportada por uma fase móvel que pode ser gás, líquido ou fluido supercrítico, que é então forçada a passar através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada em coluna ou superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móveis e estacionárias em graus variados. Os componentes que são retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel e vice-versa. São separadas em bandas ou zonas discretas sendo analisadas qualitativamente e quantitativamente (HOLLER, 2009).

As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio e outras. Isto se deve, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas Modernas (LANÇAS, 2009).

A CLAE utiliza sistema de bombeamento de líquido pressurizado (solvente) contendo a mistura da amostra através de uma coluna preenchida com um sólido de material adsorvente. Cada componente na amostra interage de forma ligeiramente diferente com o material adsorvente, com diferentes taxas de fluxo para os diferentes componentes, o que leva à separação dos componentes à medida que fluem para fora da coluna. Os componentes da mistura na amostra analisada são separados uns dos outros devido aos seus diferentes graus de interação entre as partículas da amostra e o solvente e a coluna (CHAGURI, 2021).

O líquido pressurizado é tipicamente uma mistura de solventes (por exemplo água, acetonitrila e / ou metanol) e é chamado de "fase móvel". A sua composição e a temperatura desempenham um papel importante no processo de separação, influenciando as interações que ocorrem com os componentes da amostra. As colunas usadas no HPLC são preenchidas com partículas de pequena dimensão (2-50 micrometros em tamanho médio de partícula) porosas ou com núcleo sólido. Isto dá

ao HPLC grande poder de resolução quando a separação de misturas, o que torna uma técnica cromatográfica popular (CHAGURI, 2021).

Um HPLC inclui, tipicamente, um amostrador, bombas, e um detector. O amostrador leva a mistura da amostra para o fluxo de fase móvel que a transporta na coluna. As bombas fornecem o fluxo pretendido e a composição da fase móvel através da coluna. O detector gera um sinal proporcional à quantidade de componente amostra emergentes da coluna, permitindo, uma análise quantitativa dos componentes da amostra. A maioria dos instrumentos de HPLC também tem um forno para aquecimento da coluna, que permite ajustar a temperatura influenciando na viscosidade do solvente, sendo um importante instrumento para a separação dos constituintes da amostra (CHAGURI, 2024).

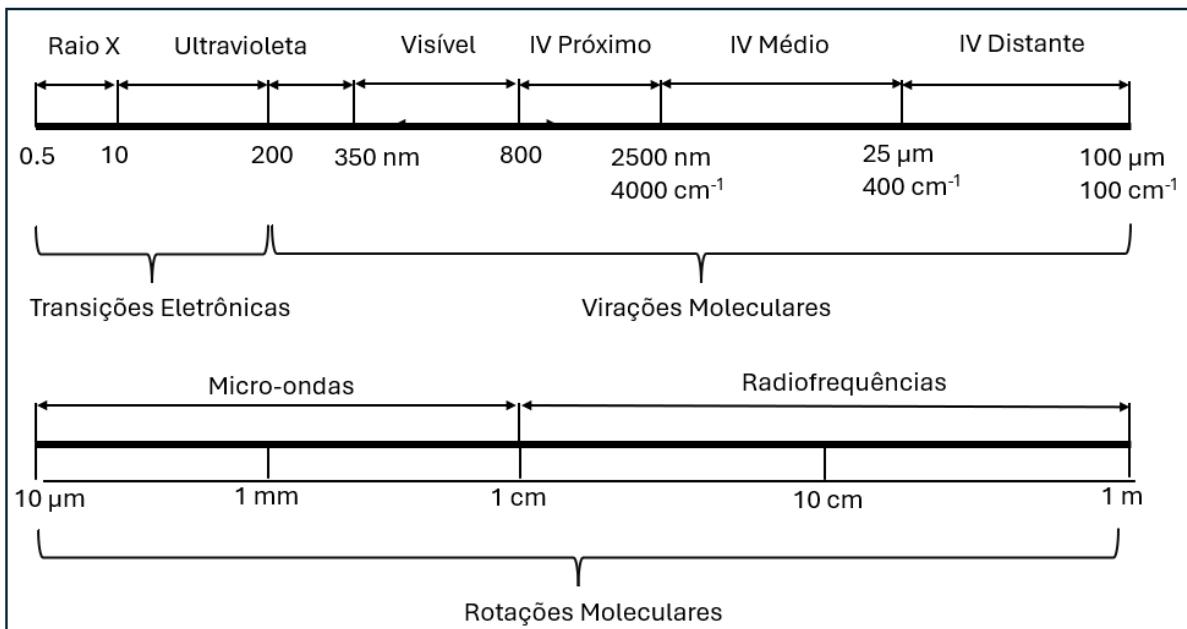
## 2.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia pode ser definida como o estudo da interação de uma onda eletromagnética com matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. Algumas regiões de interesse para fins analíticos podem ser definidas em função do comprimento de onda (DUFOUR, 2009).

Somando-se a energia eletrônica, a energia vibracional e a energia rotacional de uma molécula, obtém-se sua energia total. É possível separar suas contribuições espectrais, uma vez que estes três tipos de energia são distintos (RODRIGUES, 2012).

Os átomos que compõem uma molécula não formam uma estrutura rígida, e por isso há um movimento constante, mesmo a baixas temperaturas. As energias vibracionais e rotacionais estão relacionadas ao deslocamento dos núcleos atômicos. Devido a maior massa dos núcleos em relação aos elétrons, suas contribuições podem ser separadas, o que é conhecido por aproximação de Born-Oppenheimer. Devido a este fenômeno, os núcleos podem ser considerados como fixos em relação aos elétrons, e na prática o espectro molecular é dividido em três regiões energéticas distintas (Figura 4): a de microondas e radiofrequências (espectroscopia rotacional); infravermelho (espectroscopia vibracional) e região do visível à ultravioleta (espectroscopia eletrônica) (RODRIGUES, 2012)

Figura 4 - Regiões espectrais de importância analítica



Fonte: Adaptado de DUFOUR (2009); RODRIGUES (2012).

Segundo Pavia et al. (2010), na região espectral há comprimentos de onda em diferentes unidades de medida, e por isso, devido a ter uma relação diretamente proporcional à quantidade de energia, a unidade mais comumente usada para se referir à radiação infravermelha é o número de onda [ $\text{cm}^{-1}$ ]. Sendo assim, quanto menor o número de onda, menor a energia e vice-versa. Segundo Holler et al. (2009) o espectro IV é usualmente subdividido em três regiões: denominadas IV próximo, IV médio e IV distante, de acordo com os tipos de aplicações e instrumentação. A Tabela 06 fornece os limites aproximados de cada uma das três regiões.

Tabela 06 - Regiões espectrais do infravermelho.

Região	Comprimentos de onda ( $\lambda$ ) (nm)	Números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>Próximo</b>	780 a 2500	12800 a 4000
<b>Médio</b>	2500 a 50000	4000 a 200
<b>Distante</b>	50000 a 1000000	200 a 100

Fonte: Adaptado de HOLLER et al. (2009).

A região do infravermelho próximo (near-infrared - NIR) é a primeira exibindo bandas de absorção relacionadas às vibrações das moléculas. É caracterizada por harmônicos e bandas de combinação e é amplamente utilizada para análises de

composição de produtos alimentares. Já a região do infravermelho médio (mid-infrared - MIR) é a principal região de espectroscopia vibracional, apresentando informações sobre estrutura e conformação de moléculas orgânicas (como proteínas, polissacarídeos e lipídeos) (DUFOUR, 2009). A Tabela 7 relaciona as regiões espectrais de interesse analítico na região do IV com as características dos materiais a que se aplicam.

Tabela 7 - Regiões espectrais do infravermelho e suas principais aplicações.

Região	Números de onda (cm <sup>-1</sup> )	Aplicações
Próximo	12800 a 4000	Materiais sólidos ou líquidos e misturas de gases
Médio	4000 a 200	Sólidos, líquidos ou gases puros; misturas complexas
Distante	200 a 10	Amostras sólidas, líquidas e gasosas

Fonte: Adaptado de HOLLER *et al.* (2009).

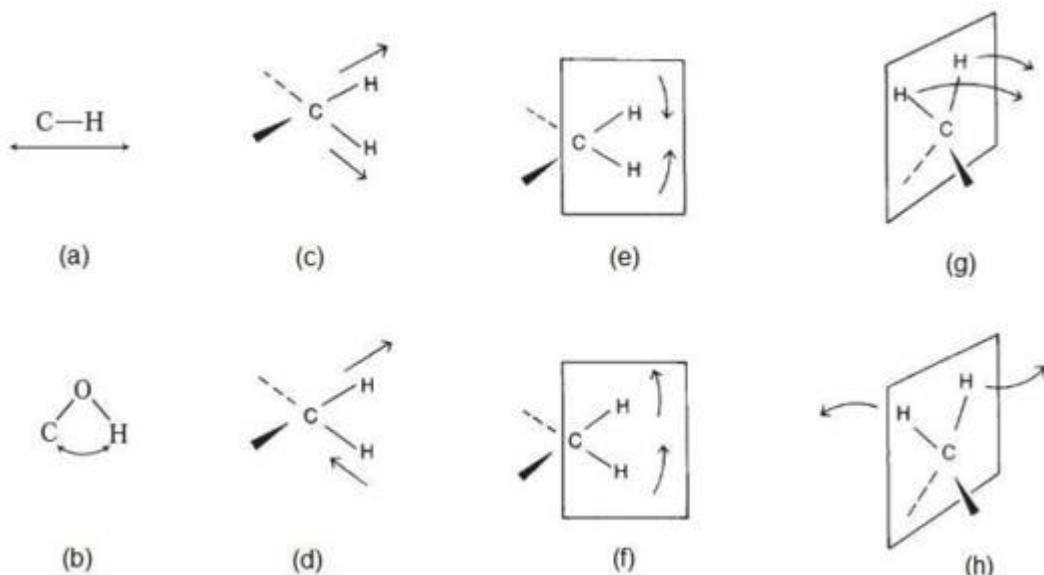
A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam. A absorção das radiações promove alterações nos modos rotacionais e vibracionais das moléculas. As alterações vibracionais convertem-se em energia de vibração molecular que configuram bandas de absorção correlacionadas aos grupos funcionais presentes em uma determinada substância. Essas bandas de absorção resultam na configuração de um perfil espectral único para cada tipo de substância, assim como, numa impressão digital capaz de identificar substâncias presentes em diferentes tipos de amostras (BARBOSA, 2007; FRANÇA E OLIVEIRA, 2011; HOLLER *et al.*, 2009; SOUYEURT *et al.* 2006).

A incidência da radiação eletromagnética nas partículas da amostra pode causar diversos tipos de fenômenos, como absorção, transmissão, refração, reflexão e difração da luz incidente (SANTOS *et. al.*, 2012).

Segundo Hooler *et al.* (2009) para absorver a radiação IV, uma molécula deve sofrer uma variação no momento de dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Não ocorre variação no momento dipolo durante a vibração ou rotação de espécies homonucleares, tais como O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ou Cl<sub>2</sub>, e como consequências tais compostos não podem absorver radiação IV.

De acordo com sua natureza, as moléculas podem apresentar diferentes tipos de vibração: modos mais simples, como os de estiramento e dobramento (Figura 5 (a) e (b), respectivamente), ou outros modos mais complexos, também ativos nesta região (Figura 5 (c), (d), (e), (f), (g) e (h)), (PAVIA, et.a. 2010).

Figura 5 - Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares (a) Estiramento, (b) Dobramento, (c) Vibração de estiramento simétrico, (d) Vibração de estiramento assimétrico, (e) Vibração de deformação tipo tesoura, (f) Vibração de deformação tipo oscilação, rotação, (g) Vibração de deformação tipo balanço, (h) Vibração de deformação tipo torção.



Fonte: Pavia et al. (2010).

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

A região chamada de infravermelho próximo, recentemente, tem recebido muita atenção, em particular com relação às análises quantitativas de amostras com matrizes complexas (BARBOSA, 2007). Nesta região as bandas de absorção são sobretons ou combinações de vibrações fundamentais de estiramento que ocorrem na região 3000 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , geralmente ligações C-H, N-H e O-H, cujas absorvividades

molares são baixas tendo como limites de detecção da ordem de 0,1% (HOLLER, 2009). Devido às absorções não serem muito intensas, muitas vezes sobrepõem-se, tornando largas as bandas e com baixa sensibilidade. Os espectros NIR em vista dos fatores citados anteriormente não são facilmente interpretáveis, havendo a necessidade, para extrair a informação contida neles, da aplicação de métodos de calibração multivariada (ALMEIDA, 2009).

Tabela 8 - Atribuições das regiões espectrais às possíveis transições espectrais

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

Fonte: FILHO (2003).

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

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

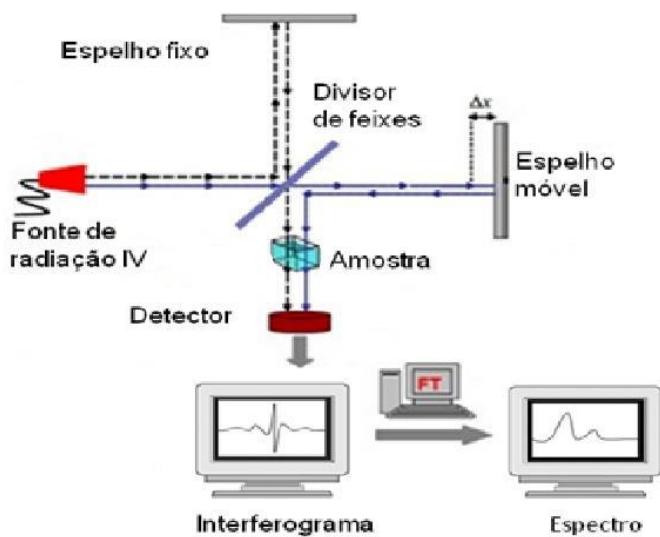
Entre as vantagens do método NIR estão: o curto período de tempo para obtenção do espectro, a não geração de resíduos químicos, o fato de ser uma técnica não invasiva e não necessitar de preparação das amostras, motivando, assim, o desenvolvimento de técnicas analíticas utilizando esta metodologia (SALA,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

### 2.7.1 NIR com transformada de Fourier (FT-NIR)

Durante mais de quarenta anos espetrômetros dispersivos foram utilizados, porém, a baixa velocidade de varredura, a presença de componentes móveis sujeitos a desgastes, aquecimento da amostra dentre outras limitações, levaram ao aprimoramento do sistema analítico por meio de reflexão. (CIENFUEGOS E VAITSMAN, 2000).

A evolução da espectroscopia se deu, principalmente, a partir da combinação da transformada de Fourier (FTIR) e da nova geometria dos espectrofotômetros com a utilização do interferograma de Michelson. O funcionamento dessa ferramenta instrumental corresponde a um sistema interferométrico, que dá origem a um sinal complexo denominado de interferograma (BARBOSA, 2007). Dessa forma, um espetrômetro FTIR possui três componentes básicos: a fonte, o interferômetro de Michelson e o detector. Na Figura 6 é apresentado esquematicamente o modelo de um espetrômetro dotado de interferômetro de transformada de Fourier.

Figura 6 - Diagrama esquemático espectrofotômetro com transformada de Fourier.



Fonte: Adaptado de HELFER et al. (2006).

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

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

A vantagem do FT-IR é que apresenta maior velocidade e sensibilidade em relação a um instrumento dispersivo. A utilização simultânea de toda a faixa do espectro nos equipamentos IR com transformada de Fourier explica a ótima relação sinal/ruído nestes equipamentos, avaliando todos os comprimentos de onda ao mesmo tempo e não somente uma faixa. A utilização de múltiplas aquisições de dados com passagem contínua da radiação vinda da fonte luminosa melhora também essa relação (ARAUJO, 2007).

## 2.7.2 Espectroscopia o infravermelho em análises de alimentos

Desde a década de 1940, a espetroscopia no infravermelho é utilizada em estudos da composição de alimentos, mas, com o passar do tempo, inovações foram ocorrendo nos equipamentos e a aplicação ampliou significativamente (HOLLER, et al., 2009). A intensificação da utilização do infravermelho na área de alimentos ocorreu na década de noventa, quando foram apresentadas as potencialidades da espectroscopia por reflexão no infravermelho médio (reflexão total atenuada, detecção fotoacústica e reflexão difusa) para análise de alimentos e sua utilização no controle industrial (WILSON E TAPP, 1999).

A obtenção de informações sobre as propriedades quantitativas e qualitativas das matérias-primas, produtos intermediários e finais está ganhando cada vez mais

importância na indústria de alimentos, principalmente devido aos seus efeitos econômicos (FAGAN et al., 2009).

Com os recentes avanços tecnológicos no projeto de máquinas e programas/aplicativos, houve o desenvolvimento de equipamentos mais compactos, portáteis e robustos, com sistemas sofisticados para suportar muito mais rápido o processamento e análise de dados espectrais, analisando em segundos, e sem geração de resíduos químicos, vários componentes simultaneamente. Tornaram-se ainda tão populares que suas aplicações práticas já são encontradas em praticamente todos os ramos das indústrias agrícolas e alimentares (LIN et al., 2009).

Neste sentido, a espectroscopia de infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR) tem potencial em uma variedade de aplicações na indústria, incluindo monitoramento de processos, determinação da qualidade e adulteração de produtos lácteos, como leite, leite em pó, manteiga e queijo (FAGAN et al., 2009).

Por ser uma técnica rápida, precisa, não invasiva, não-destrutiva e ambientalmente segura, o uso da espectroscopia vem se estabelecendo para o controle da qualidade dos alimentos (LIN et al., 2009). A espectroscopia MIR, por exemplo, é um método certificado para análise de leite para fins de pagamento no setor de lácteos pela ISO 9622: 1999, AOAC (Association of Official Analytical Chemists) e FIL (Federação Internacional de Laticínios) (CASADIO et al., 2010).

Os métodos oficiais de análise físico-químicas são regulamentados, entre outros órgãos, pela AOAC, e no Brasil, na área da bromatologia, tem-se como referência as metodologias analíticas descritas segundo o Instituto Adolf Lutz, reconhecido internacionalmente por sua competência em pesquisas laboratoriais e na vigilância epidemiológica, sanitária e ambiental requerida (LUTZ, 2008). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento tem publicado o Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, no qual constam a descrição de vários métodos e a indicação de uso de métodos de outras organizações, como a FIL (BRASIL, 2019).

Inúmeras metodologias analíticas envolvendo aplicação de radiação infravermelha demonstram o potencial dessa técnica para determinação do teor de umidade, carboidratos e lipídeos em diferentes tipos de alimentos (CASSOLI et al., 2011; KARTHEEK et al., 2011; MORGANO et al., 2005). Segundo França e Oliveira (2011), a espectroscopia no infravermelho corresponde a uma análise rápida e não destrutiva capaz de fornecer uma identificação precisa de cada diferente tipo de

substância presente no alimento. Por meio de ampla revisão sobre a aplicação do FTIR em análises de alimentos, os pesquisadores constataram o uso da técnica em bebidas alcoólicas e não alcoólicas, em óleos comestíveis, em mel, em frutos e legumes, em café, em leite, em queijos, em carnes e seus derivados.

Segundo Rodriguez-Saona e Allendorf (2011), o FTIR-MIR é comumente utilizado para identificação estrutural de compostos orgânicos, devido às vibrações fundamentais promovidas nos grupos funcionais que proporcionam boa absorção e bandas melhor definidas que no FTIR-NIR. Apesar das diferenças nos processos de absorção nas regiões do MIR e do NIR, ambos têm sido utilizados para determinação de padrões de alimentos de origem vegetal, sucos de frutas industrializados, produtos agroindustriais, óleos refinados, gorduras e em vários outros produtos alimentícios. Enfatizaram a aplicação do FTIR na detecção de grande número de adulterações, a partir de análise que demanda pequena quantidade de amostra, que dispensa preparo prévio da mesma e que proporciona resultados rápidos. Concluiram que os métodos baseados em análises de espectros vibracionais estão emergindo com rapidez, apresentando técnicas modernas e eficientes para monitoramento de adulterações e contaminações.

No entanto, a interpretação das bandas de absorção é uma tarefa muito complicada, devido à existência de bandas de absorção muitas das vezes sobrepostas e bandas de absorção correspondentes a combinações de ligações. Este problema levou a que Karl Norris (químico) a desenvolver técnicas de tratamentos de dados, possibilitando a extração de toda a informação presente nos espectros de absorção, despertando assim maior interesse nesta técnica (Ozaki et al., 2007).

## 2.8 ANÁLISE DOS DADOS (QUIMIOMETRIA)

A quimiometria não é uma disciplina da matemática, mas sim da química, isto é, os problemas que ela se propõe a resolver são de interesse e originados na química, ainda que as ferramentas de trabalho provenham principalmente da matemática, estatística e computação (FERREIRA, et al., 1999).

O termo quimiometria surgiu no final dos anos 70 para descrever as técnicas associadas ao tratamento matemático e à interpretação de dados químicos. Os instrumentos analíticos modernos utilizados pelos pesquisadores surgiram pela necessidade do desenvolvimento de novos métodos matemáticos e estatísticos para

lidar com a vasta quantidade de dados. Como resultados surgiram vários métodos de análise multivariada, que viabilizaram o tratamento rápido de extensos conjuntos de dados de um sistema qualquer. Utilizando métodos de regressão é possível detectar e quantificar os teores de vários compostos usando dados de espectroscopia (COVA, 2011).

Segundo Brereton (2003), a calibração envolve a conexão de um (ou mais) conjuntos de variáveis juntas. Geralmente um set (muitas vezes chamado de "bloco") é uma série de medições físicas, como alguns espectros ou descritores moleculares e o outro contém um ou mais parâmetros, como as concentrações de vários compostos ou atividades biológicas. Podemos prever a concentração de um composto num espectro de uma mistura ou as propriedades de um material seus parâmetros estruturais.

Além disso, a quimiometria possibilita extrair informações relevantes de dados espectrais relacionadas à estrutura molecular de carboidratos, proteínas e gorduras em produtos alimentares e abordar a relação entre sua estrutura e textura (DUFOUR, 2009).

Os métodos de análise multivariada são assim chamados pois, em caso do emprego das técnicas espectroscópicas no infravermelho, é possível manipular dados de absorbância associados a mais de uma frequência ao mesmo tempo. Estes métodos têm recentemente tornado possível modelar propriedades químicas e físicas de sistemas simples e complexos a partir de seus dados espectroscópicos (SABIN e FERRAO, 2004).

Métodos preditivos como análises por componentes principais (PCA) e os mínimos quadrados parciais (PLS) são agora amplamente utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos para a previsão de composição e qualidade de alimentos em geral (DUFOUR, 2009).

### 2.8.1 Calibração Multivariada

As técnicas instrumentais estão sendo cada vez mais utilizadas como: espectroscopia no infravermelho, espectroscopia no visível/ultravioleta, espectroscopia de massa, cromatografia, ressonância magnética nuclear, polarografia, análise por injeção em fluxo etc. Estas técnicas não produzem respostas das propriedades físicas das amostras, apenas registram espectros, sendo necessário

algum procedimento para encontrar um algoritmo matemático que analise estas propriedades a partir dos resultados registrados pelo instrumento (CARVALHO, 2007).

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

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

Em que  $X$  contém absorbância ao longo dos comprimentos de “J”, “B” é uma matriz que contém os coeficientes do modelo, e “E” é o resíduo não explicado pelo modelo.

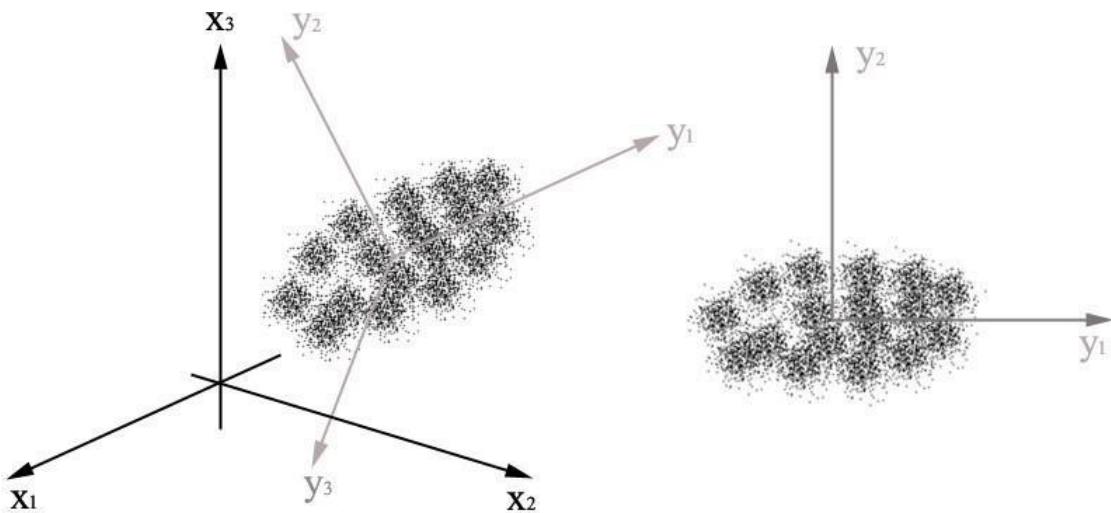
Existe uma variedade de técnicas disponíveis para os dados espectrais, dentre as mais conhecidas temos: regressão linear múltipla (multiple linear regression, MLR), análise por componentes principais (principal components analysis, PCA) e mínimos quadrados parciais (partial least squares, PLS) possibilitando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

### 2.8.2 Análise Componentes Principais (PCA)

A PCA é um algoritmo matemático que permite reduzir a dimensionalidade de um conjunto de variáveis de dados em um novo conjunto de variáveis, chamado de componentes principais. Isto aumenta a interpretabilidade dos dados (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). Para isto, faz-se uma rotação no eixo do conjunto de variáveis, de modo que uma de suas componentes tenha a mesma direção de maior variabilidade, e a segunda componente (ortogonal à primeira) tenha a segunda maior variabilidade, e assim por diante. Assim, com a rotação passamos a ter um novo sistema de coordenadas em que os seus eixos principais têm as mesmas direções de máxima variabilidade (Figura 7). A PCA é a projeção desses componentes principais, onde reduz-se o conjunto de variáveis nos dados em conjunto menores. A importância de um componente principal é expresso em termos de variância. Aonde a primeira componente principal (PC1) representa a maioria da variância envolvida nos dados, o segundo componente (PC2) a

segunda maior variância, e assim por diante (PAIVA, 2010).

Figura 7 - Representação da Análise de Componentes Principais, por meio dos sistemas decoordenadas.

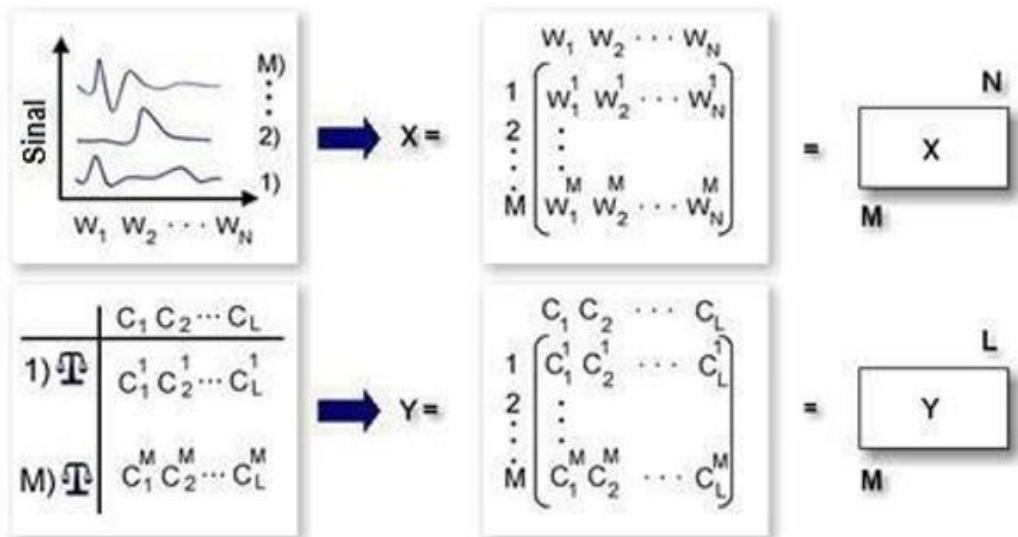


Fonte: LUIZ (2019).

### 2.8.3 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Quando o objetivo principal da análise de dados é fazer a previsão de uma variável dependente a partir de um grande número de variáveis independentes, a regressão de mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares - PLS) é um método indicado. O PLS é aplicado neste trabalho com o objetivo de correlacionar os dados espectroscópicos infravermelhos (matriz X) com os dados físico-químicos de composição (matriz Y), construindo um modelo de calibração que permita a previsão de um ou mais componentes desejados a partir de um espectro medido. A matriz Y é representada pelas variáveis relacionadas às concentrações dos constituintes (proteínas, gordura, umidade, sólidos totais, cinzas e lactose), e a matriz X pelas variáveis espectrais de cada uma das amostras (números de onda), conforme representado esquematicamente na Figura 8 (FERRARINI, 2004).

Figura 8 – Representação esquemática das matrizes X e Y no desenvolvimento do método PLS.



Fonte: Adaptado de Bruker Optics (2014).

No PLS, a calibração envolve a correlação dos dados na matriz espectral X com os dados na matriz de concentração (ou propriedades) Y, conforme ilustrado na Figura 8. As matrizes X e Y são reduzidas a apenas alguns fatores usando todas as informações disponíveis (FERRARINI, 2004).

Segundo Morgano et al. (2005) desenvolvimento do modelo, o conjunto total de amostras é dividido em dois subconjuntos: um de calibração, normalmente 70% do total de amostras e outro de validação externa, contendo os 30% restantes.

Um número ótimo de fatores (ou também denominadas variáveis latentes) é obtido a partir de uma validação cruzada completa, e para descrever e comparar o desempenho do modelo, utiliza-se o erro quadrático médio (do inglês Root Means Square Error - RMSE) e o erro relativo (do inglês Relative Error - RE) dos conjuntos de dados de calibração e validação e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) entre valores medidos e previstos. RMSE é uma medida de o quanto o modelo fará bem as previsões. Em geral, quanto mais baixo forem os valores RMSE e RE, e quanto mais próximo de 1 for o  $R^2$ , melhor serão as previsões realizadas (MORGANO et al., 2005).

## 2.9 VALIDAÇÃO CRUZADA

Esta técnica permite examinar se a estrutura identificada se repete quando investigada em uma segunda amostra. A sua utilização é importante tanto para soluções fatoriais exploratórias como para soluções fatoriais confirmatórias. Idealmente, o tamanho das amostras deveria ser suficientemente grande para permitir separar os respondentes aleatoriamente em dois grupos. Num deles seria realizada a derivação da estrutura fatorial e no outro a validação cruzada da solução fatorial identificada (Floyd & Widaman, 1995).

## 2.10 COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ )

O coeficiente de determinação, também chamado de  $R^2$ , é uma medida de ajuste de um modelo estatístico linear generalizado, como a regressão linear simples ou múltipla, aos valores observados de uma variável aleatória. O  $R^2$  varia entre 0 e 1, por vezes sendo expresso em termos percentuais. Nesse caso, expressa a quantidade da variância dos dados que é explicada pelo modelo linear. Assim, quanto maior o  $R^2$ , mais explicativo é o modelo linear, ou seja, melhor ele se ajusta à amostra (BIOESTATISTICA, 2024).

Quando se deseja estudar o comportamento simultâneo de duas ou mais variáveis, emprega-se a análise de Regressão e a de Correlação para avaliação da informação desejada. Na regressão estimamos a relação de uma variável com outra, expressando a variável dependente em função da variável independente. A regressão estuda conjuntos de variáveis que se supõe estar numa relação de causa e efeito. A correlação que às vezes se confunde com regressão, estuda o grau em que duas ou mais variáveis variam simultaneamente. Isto é, o grau de inter-relacionamento entre as variáveis. - Os métodos de regressão e correlação não podem ser aplicados em variáveis qualitativas (atributos) (BIOESTATISTICA, 2024).

## 2.11 PRECISÃO ABSOLUTA/PRECISÃO RELATIVA

### 2.11.1 Exatidão

A exatidão de uma experiência é a medida de quão próximo o resultado fica do valor verdadeiro. É uma medida de quanto o resultado é correto. A exatidão geralmente depende da capacidade técnica de controlar ou compensar os erros sistemáticos, uma vez que existem erros que fazem os resultados diferirem dos valores verdadeiros como discrepâncias reproduutíveis. Esta tendência representa uma manifestação da causa do erro, um caminho a ser pesquisado no sentido de sua minimização ou eliminação. É importante observar que, o grande valor na pesquisa do erro não tem como objetivo o seu simples conhecimento, mas sim a consciência da limitação da verdade (UFMS, 2018).

### 2.11.2 Precisão

É uma medida de quão exatamente o resultado é determinado, sem referência ao que o resultado significa. Ela depende da capacidade de superar ou analisar os erros randômicos e varia com o número de repetições da medida. Considerando a repetição de várias medidas, os resultados distribuem como uma distribuição normal, desde que os erros sejam provenientes de variáveis randômicas. Neste caso, a precisão da medida está associada ao desvio padrão e, a exatidão, ao quanto o resultado está afastado do valor verdadeiro. Assim uma grandeza física obtida experimentalmente pode ser precisa, mas não exata ou vice-versa.

## 2.12 REPETIBILIDADE

### 2.12.1 Repetibilidade Absoluta/Relativa

A repetibilidade é a proximidade da concordância entre os resultados de medições sucessivas da mesma medição, quando efetuadas nas mesmas condições de medição. As medições são efetuadas por uma única pessoa ou instrumento no mesmo artigo, nas mesmas condições e num curto período de tempo. Uma confiabilidade de teste-retest menos que perfeita causa variabilidade de teste-retest. Essa variabilidade pode ser causada, por exemplo, pela variabilidade intraindividual e inter-observador. Uma medição pode ser considerada repetível quando esta variação é menor do que um critério de aceitação pré-determinado (FRASER & FOGARTY, 1989).

### **3 OBJETIVO**

Desenvolver um modelo preditivo ou classificatório para detecção de adição de soro em quantidades que permitam classificar o leite de acordo com a Instrução Normativa N°68, a qual determina os níveis de índice de caseinomacropéptídeo (CMP) no leite.

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um modelo preditivo ou classificatório para detecção de adição de soro em quantidades que permitam classificar o leite de acordo com a Instrução Normativa N°68, a qual determina os níveis de índice de caseinomacropéptídeo (CMP) no leite.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

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

Comparar o método de espectroscopia do infravermelho próximo na determinação de soro de leite no leite cru em relação ao método utilizado em rotina: Kit Operon c-Gmp (cyclic GMP).

## 4 MATERIAL E MÉTODO

As análises de espectroscopia FT-IR foram realizadas no laboratório de recepção de leite da fábrica Nestlé unidade Montes Claros – Minas Gerais.

As análises para detecção de Caseínomacropeptideo no leite foram realizadas através do kit Operon na fábrica Nestlé unidade de Montes Claros – Minas Gerais.

As análises para quantificação de Caseínomacropeptideo no soro em pó utilizadas no estudo foram realizadas no laboratório Nestlé Quality Assurance Center localizado em Araras – São Paulo pelo método CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência).

### 4.1 AMOSTRAGEM

As amostras de leite cru utilizadas no estudo foram coletadas na rotina da recepção de leite da fábrica Nestlé unidade Montes Claros – Minas Gerais. As amostras foram separadas em dois grupos sendo: amostra em branco (livre de adulteração com soro) e amostras adulteradas (com adição intencional de soro).

Foram coletadas 886 amostras das rotas recebidas na unidade entre os períodos de de janeiro de 2022 a agosto 2023. As amostras foram analisadas de imediato após a coleta nas carretas recebidas. Após a realização das análises de cada amostra, as mesmas foram devidamente armazenadas em geladeira com temperatura controlada entre 4°C a 8°C até a realização da fortificação com soro. O período de armazenamento das amostras em cada coleta não foi superior a 24 horas.

### 4.2 SORO

Para a realização do estudo foi utilizado soro em pó: Soro de Leite em Pó Comum, Marca: Porto Alegre, Lote: 1511222, Fabricação: 15/11/2022. O mesmo foi submetido a análise de CMP (caseínomacropeptideo) por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) realizada no laboratório Nestlé Quality Assurance Center (NQAC), no qual obteve um valor de 2,776 mg/Kg.

Devido a política de confiabilidade dos produtores de leite cru que a unidade da Nestlé possui, neste estudo foi considerado apenas a adição de soro em pó,

descartando o uso de soro líquido ou até mesmo outros aspectos como efeito de proteases de bactérias psicrotróficas.

#### 4.3 ADULTERAÇÃO DO LEITE

As amostras foram adulteradas com soro em concentrações entre 15 mg/L a 150 mg/L. A adulteração do leite foi realizada utilizando uma base de cálculo conforme abaixo:

Utilizando uma soro com uma concentração de 2,776 mg/Kg de CMP, foi pesado em um bequer de 500ml uma massa em gramas de soro em pó de 2,7017 g, após foi adicionado leite cru até a massa de 250 g e homogeneizado por 5 minutos. Foi coletada uma alíquota de 10 g desta amostra e transferido para um segundo bequer de 250 ml, após foi adicionado leite cru até completar a massa de 100 g. Foi realizada a pesagem proporcional levando em consideração as concentrações finais desejadas. As massas pesadas para cada concentração são apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 9 – Relação de massa utilizada da solução padrão.

Concentração de Soro Desejado (mg/L)	Massa de Soro Pesada (g)
0	0
15	1
30	2
50	3,35
75	5
150	10

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 4.4 COLETA DOS ESPECTROS NO MIR

Para a realização da coleta dos espectros foi utilizado o equipamento Milkoscan FT2 marca FOSS (Figura 9), com apoio do programa computacional FTiR-Calibrator. O MilkoScan™ FT2 oferece uma nova abordagem inteligente para a análise de leites e derivados, incluindo o poder de testar uma ampla variedade de produtos lácteos líquidos, semissólidos e viscosos. Ele é projetado tanto para o laboratório quanto para o ambiente de produção. Possui um sistema de fluxo pode bombear uma variedade

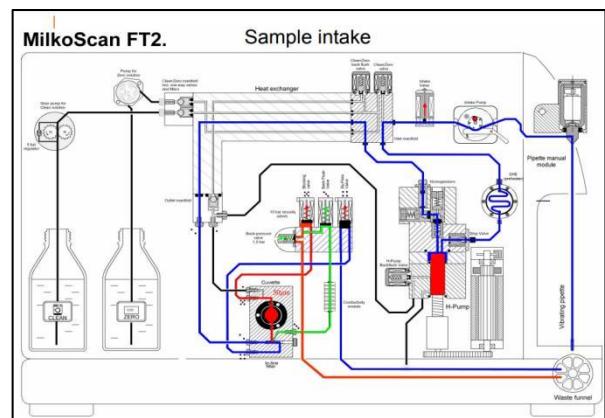
de tipos de amostras (Figura 10), incluindo algumas amostras viscosas não diluídas. Tipo de amostras de leite, nata, soro de leite, soro de leite concentrado, sorvetes, sobremesas, produtos fermentados e leite concentrado. O interferômetro mensura interferograma com uma resolução óptica de  $12\text{ cm}^{-1}$ . Uma velocidade de espelho que resulta em uma frequência de laser de  $1,5\text{ kHz}$  com comprimento de onda de  $850\text{ nm}$  é suportada. A faixa espectral é de  $1000\text{ cm}^{-1}$  a  $5000\text{ cm}^{-1}$  com ênfase na faixa de  $1000\text{ cm}^{-1}$  a  $1800\text{ cm}^{-1}$ .

Figura 9 - Milkoscan FT2



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 10 - Fluxo interno FT2



Fonte: Manual Foss (2019).

#### 4.5 MÉTODO IMUNOCROMATOGRAFICO PARA ANÁLISE DE CMP

Para realização das análises de detecção de CMP no leite foi utilizado o semi-quantitativo Kit c-GMP. O teste imunocromatográfico como kit c-GMP é muito sensível, rápido e capaz de detectar níveis de GMP que podem indicar adulteração de 4% de uso de soro de leite em leite ou ainda apontar falhas nas condições de ordenha, conservação, transporte e processamento do leite, podendo gerar entre 2% até 1% de c-GMP na amostra. O teste é realizado por meio de tiras que são imersas na amostra, previamente preparada, e então é realizada a leitura a partir da formação ou não de linhas nas tiras. O c-GMP, quando presente em amostras de leite, reage com as partículas recobertas com anticorpos monocromáticos específicos frente ao glicomaclopeptídeo. Este complexo de partículas passa por um processo cromatográfico e esta reação origina a formação de uma linha vermelha na tira de teste (MENDONÇA, et. al. 2017). A tonalidade da tira vermelha indica a quantidade de c-GMP conforme Figura 11.

Figura 11: Interpretação dos resultados de c-GMP pelo kit Operon.



Fonte: Cap-Lab, (2024).

#### 4.6 SOFTWARE PARA TRABALHO DOS DADOS DE PCA E PLS

Para realização dos trabalhos de PCA e PLS foi utilizado o software FTIR-Calibrador Versão: 5.3.0 da empresa FOSS. Este software é um programa exclusivo da empresa FOSS e para utilização do equipamento FT2. O software possui um esquema de utilização simples, conforme demonstrado no esquema a seguir:

Figura 12: Esquema de utilização Software FTiR Calibrator.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

O software demonstra informações importantes para seguimento no estudo e montagem de um modelo ideal. Estas informações estão descritas nos itens 3.5.1 a 3.5.6.

##### 4.6.1 Número de Fatores

Conforme descrito por (FOSS, 2019) o número de fatores precisa ser selecionado para cada modelo. Esta é uma descrição matemática da complexidade

do conjunto de amostras. Selecionar poucos fatores aumenta a chance de não incluir toda a variação de interesse, resultando em uma separação incorreta de amostras anormais de amostras normais. Por outro lado, a utilização de demasiados fatores no modelo aumenta o risco de incluir demasiada variação no modelo, impossibilitando assim a detecção de anormalidades. Como ponto de partida, o número de fatores deve ser definido como 10.

#### 4.6.2 Limite Amostras Normais e Anormais (Threshold)

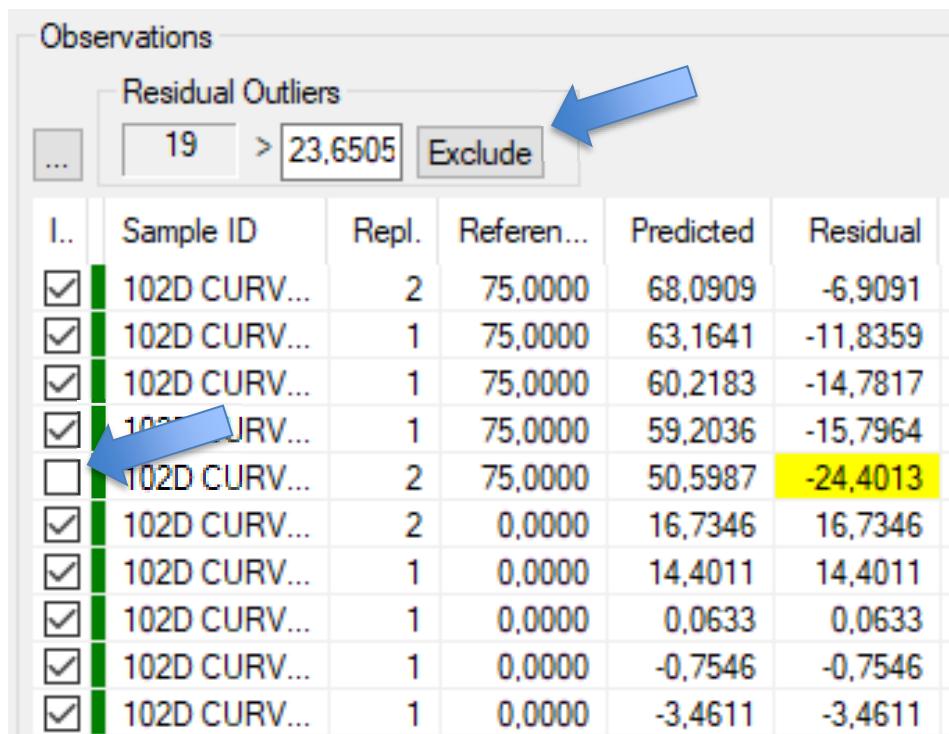
Conforme descrito por (FOSS, 2019) o limite define a distância máxima aceitável (pontuação) entre amostras normais e anormais. Se a distância (pontuação) for maior que o limite, a amostra será marcada em vermelho e classificada como anormal. Se o limite for muito estreito, o risco de amostras normais serem incorretamente identificadas como anormais aumenta. Vice-versa, se o limite for muito amplo, aumentam os riscos de obter amostras anormais que são incorretamente identificadas como normais. O objetivo é fazer com que 99% de todas as amostras normais no conjunto de calibração fiquem abaixo do limite. 1% das amostras mais extremas devem ser excluídas. Como ponto de partida, o Limite foi definido como 3.

#### 4.6.3 Valores Atípicos (Outliers)

Outlier é um termo estatístico. Refere-se a observações numa distribuição de dados que se desviam tanto das outras observações quanto à suscitar suspeitas de que foi gerada por um mecanismo diferente, e por conseguinte, pode considerar-se a possibilidade de rejeitar as observações (ROSADO, 2006).

As amostras são detectadas como valores anômalos e são mostradas na coluna Residual em amarelo quando são superiores a 2 SD (FOSS, 2019). Abaixo na Figura 13 podemos verificar um exemplo deste destaque:

Figura 13 – Imagem do software exemplificando remoção de Outliers.



Observations					
Residual Outliers					
	19	> 23,6505	Exclude		
I.	Sample ID	Repl.	Referen...	Predicted	Residual
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	2	75,0000	68,0909	-6,9091
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	1	75,0000	63,1641	-11,8359
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	1	75,0000	60,2183	-14,7817
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	1	75,0000	59,2036	-15,7964
<input type="checkbox"/>	102D CURV...	2	75,0000	50,5987	-24,4013
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	2	0,0000	16,7346	16,7346
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	1	0,0000	14,4011	14,4011
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	1	0,0000	0,0633	0,0633
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	1	0,0000	-0,7546	-0,7546
<input checked="" type="checkbox"/>	102D CURV...	1	0,0000	-3,4611	-3,4611

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 4.6.4 Suavização do comprimento de onda (Smooth)

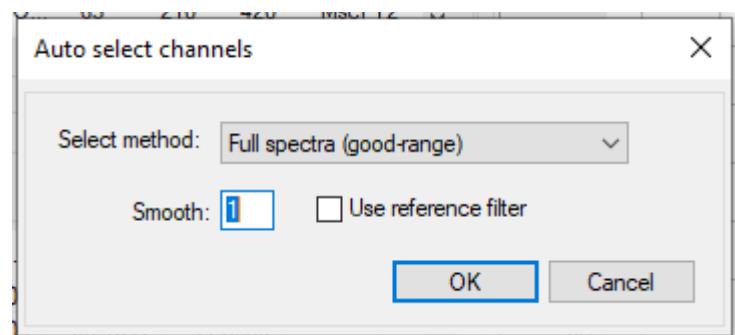
Esta é uma opção de suavização onde um número de comprimentos de onda é medido. Por exemplo, se "3" for selecionado, a média dos três primeiros comprimentos de onda será calculada em um ponto. O filtro move um ponto de comprimento de onda e faz a média novamente dos três comprimentos de onda a seguir. Os espectros FTIR são tipicamente muito "limpos" com boa resolução de picos, o que significa que muitas médias não são necessárias. Recomenda-se o uso de suavização de "3" pontos (FOSS, 2019).

#### 4.6.5 Calibragem Completa do Espectro (Full Spectra Calibrations)

É mais comum usar calibrações de "espectros completos", especialmente quando se desenvolvem calibrações com 1000 amostras coletadas em muitos instrumentos, como o Foss Global Calibrations. Além disso, as calibrações para componentes menores, como a ureia ou a acidez total e a detecção de adulterações, utilizarão sempre o Full Spectra Calibrations (FOSS, 2019). A seleção completa de

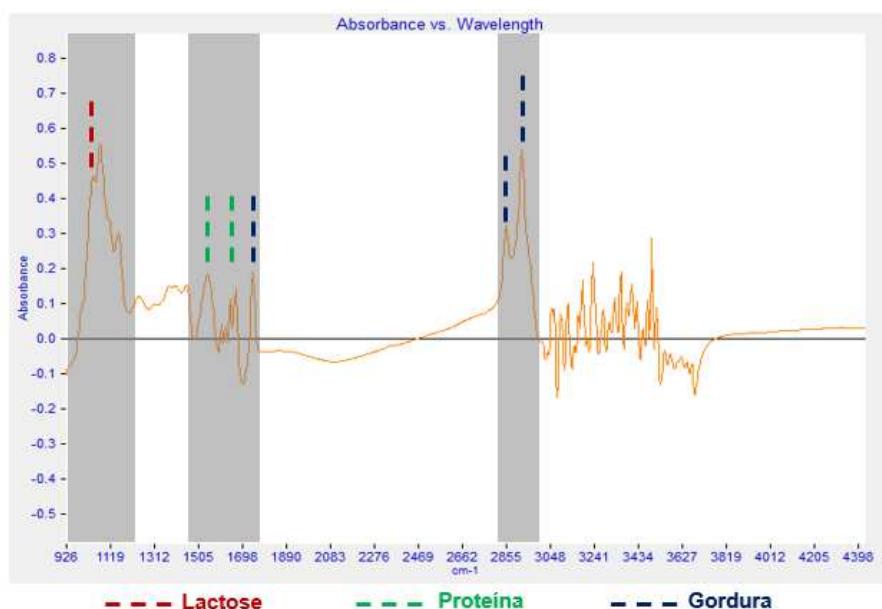
espectros é exibida nos gráficos de espectros pelas grandes áreas cinzas que cobrem todos os comprimentos de onda utilizáveis, conforme mostrado nas figuras 14 e 15.

Figura 14 - Caixa para seleção de canais do software (Full Spectra).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 15 – Exemplo área de seleção completa dos espectros do software.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 4.6.6 Filtro de Referência (Reference Filter)

Trata-se de um filtro de referência especialmente selecionado que tem baixa correlação com os componentes láteos e é utilizado como um comprimento de onda de referência pelo qual todos os comprimentos de onda são divididos. Esta é uma técnica de correção da linha de base.

#### 4.6.7 Validação Cruzada (Crossvaler)

Uma vez que a análise de referência é dispendiosa e demorada para a sua obtenção, muitas vezes só é possível dispor de um número limitado de amostras de calibração. Para não utilizar algumas das amostras de referência para efeitos de validação, é efetuada uma validação cruzada para determinar o número ótimo de fatores na calibração do PLS. Além disso, o erro de validação cruzada indica até que ponto se pode esperar que a calibração preveja ou estime o componente em questão de novas amostras. Isto é usado para ambos os modelos MLR e PLS.

Na validação cruzada, 25 % das amostras serão, por sua vez, excluídas do conjunto de calibração. A concentração é prevista ou estimada com base nas restantes amostras. Isso é feito para todas as amostras e um erro de validação cruzada é calculado como uma média de todos os erros obtidos.

No erro de validação cruzada versus plotagem de fator, o erro de validação cruzada é calculado para cada número de fatores. Selecione o menor número possível de fatores com base no menor erro de validação cruzada.

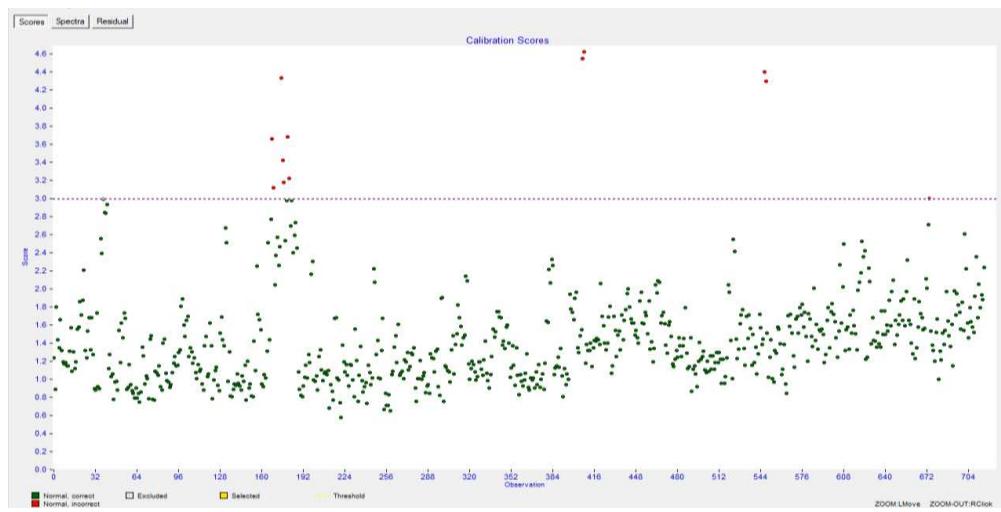
#### 4.6.8 Seletor de Canal (Channel Selector)

As Calibrações de Filtro têm uma longa história com analisadores de Leite Infravermelho da primeira geração que foram baseados em filtros discretos em uma roda de filtro. Esta técnica ainda é usada, no entanto, mais do que os quatro comprimentos de onda originais podem ser usados. Este método é adequado para o desenvolvimento de calibração de componentes principais, tais como gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

### 4.7 CONSTRUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

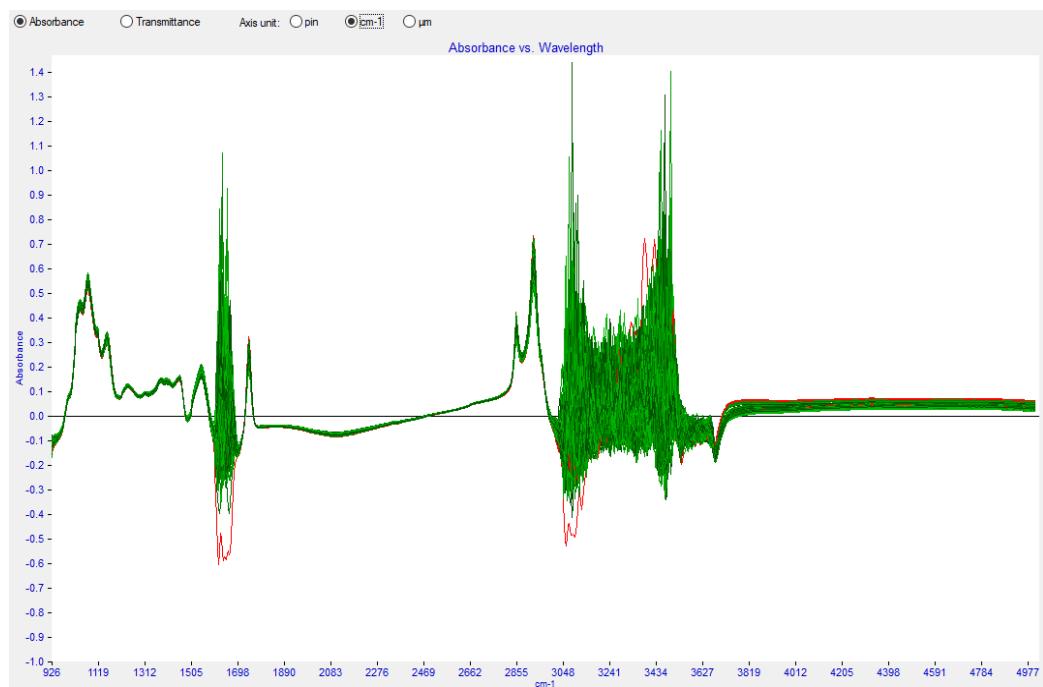
Primeiramente foi realizada uma coleta de dados espectrais do banco de dados já disponível no equipamento. Foram selecionados e avaliados 359 espectros disponíveis na biblioteca do equipamento de amostras da rotina entre os períodos de Janeiro de 2022 a Outubro de 2022. O conjunto de informações como: Scores, Espectros e Residual podem ser observados nas Figuras 16, 17 e 18.

Figura 16 - Conjunto de Scores de amostras rotina presentes na biblioteca do espectrômetro Infravermelho.



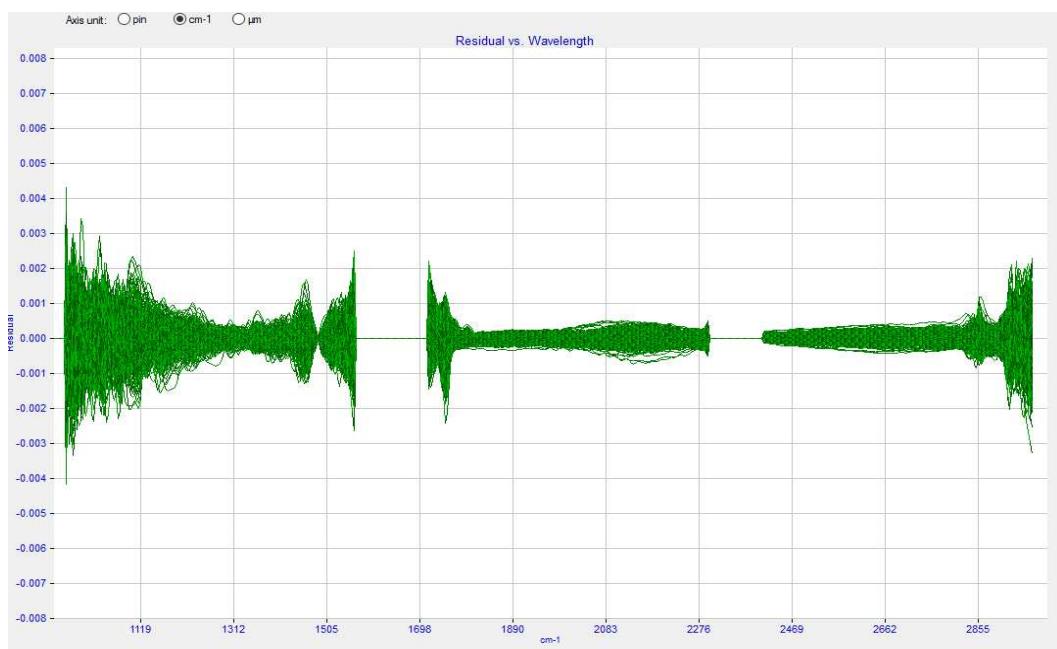
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 17 - Conjunto de Espectros das amostras de rotina presentes na biblioteca do espectrômetro Infravermelho.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 18 - Conjunto de Residual x Comprimento de Ondas amostras rotina FT2.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

O objetivo da coleta destes dados foi realizar inicialmente a PCA dos dados gerados. Com isso construir um modelo experimental no qual será a base para construção de um modelo ideal.

#### 4.7.1 Criação do ASM (Módulo de Espectro Anormal)

O Módulo de Espectro Anormal (“ASM”) permite a comparação do espectro de uma nova amostra com espectros de leite normal. Se o desvio for maior que um determinado limite, a nova amostra é classificada como anormal, independentemente da causa raiz do desvio (FOSS, 2019).

Após a realização da PCA conforme descrito no item 3.5 o Modelo ASM foi devidamente inserido no equipamento para utilização. Este modelo ASM deve ser criado para que haja uma curva de trabalho no equipamento, onde os dados irão ser coletados através deste modelo instalado no qual auxiliou para a construção de um modelo ideal.

### 4.8 CONSTRUÇÃO DO MODELO IDEAL

#### 4.8.1 Construção de Sample Set

Nesta etapa foram realizadas coletas entre o período de novembro de 2022 a dezembro de 2023 das amostras de rotinas recebidas na unidade. Além disso foram realizadas contaminações intencionais nas mesmas, com níveis de concentrações conforme descrito no item 3.3. Estas amostras foram analisadas no equipamento utilizando o Modelo Experimental conforme descrito no item 3.5.1, onde obteve um total de 608 amostras em concentrações distintas conforme monstrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Quantidade de amostras por concentração de soro adicionado.

Concentração de Soro Desejado (mg/L)	Quantidade de Amostras Analisadas
0	208
20	26
30	90
40	26
50	49
60	26
75	86
100	60
150	36

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Após a realização destas análises no equipamento, foram coletados os dados espectrais relacionados a cada amostra analisada e transferido para o software FTiR Calibrator. Foram inseridos os valores de referência para cada amostra e iniciado a interpretação visual dos dados, os ajustes necessários bem como os trabalhos de PLS para escolha do melhor modelo.

#### 4.9 CHECAGEM DA CURVA

Nesta etapa foi realizado checagem do novo modelo, onde foi comparado os valores obtidos no equipamento Milkoscan FT2 versus o kit C-Gmp bem com o pelo método de HPLC.

#### 4.10 CRITERIOS ESTABELECIDOS

Para escolha de um modelo ideal, foram estipulados alguns critérios para seleção, sendo: Melhor Correlação ( $R^2$ ) e menor erro (Crossvalerr).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE UTILIZADO NO ESTUDO

A composição média do leite utilizado no estudo está mostrada na Tabela 11 conforme abaixo:

Tabela 11 - Composição média do leite utilizado no estudo.

Componente	%
Gordura	3,79
Sólidos Totais	8,78
Proteína	3,28

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

### 5.2 AVALIAÇÃO CONCENTRAÇÃO DE CMP DAS AMOSTRAS

Para realizar a checagem das contaminações intencionais realizadas durante o estudo, foram realizadas análises do índice de CMP de 5 níveis das concentrações utilizadas. As checagens foram realizadas pelo método HPLC bem com pelo kit c-GMP. Os resultados obtidos pelo método HPLC podem ser verificados na Tabela 12:

Tabela 12: Nível de adulteração x resultado HPLC

Concentração mg/L	Resultado HPLC mg/L
Leite Isento	<15
30 mg/L	41,29
50 mg/L	68,43
70 mg/L	90,67
100 mg/L	118,37
150 mg/L	186,51

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme verificado na Tabela 12, os resultados estão coerentes visto a concentração aplicada. Houve uma tendência positiva nos resultados, porém foi considerado “normal” devido dois fatores importantes que contribuem para este

acréscimo, sendo a incerteza do método utilizado para realização da análise por HPLC é (15%) bem como o limite de quantificação (15 mg/L).

Os resultados obtidos pelo método c-GMP podem ser verificados na tabela 13:

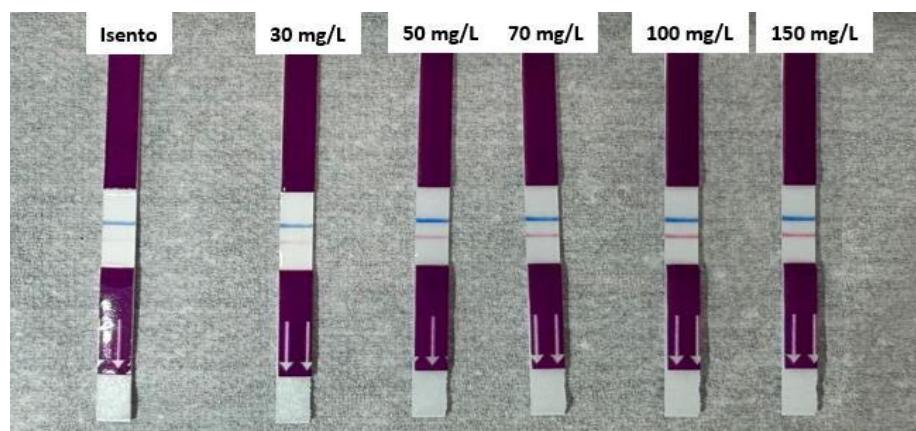
Tabela 13 - Nível de adulteração x resultado kit c-GMP

Concentração mg/L	Resultado c-GMP mg/L
Leite Isento	Negativo
30	Positivo (30)
50	Positivo (30)
70	Positivo (75)
100	Positivo (75)
150	Positivo (75)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme verificado na Tabela 13, os resultados estão coerentes visto a concentração aplicada. Como é um teste qualitativo o resultado é expresso em Positivo e Negativo (dependendo da intensidade da linha vermelha). Abaixo na Figura 19 podemos observar os resultados obtidos:

Figura 19 - Resultados de CMP pelo kit Operon das amostras adulteradas.

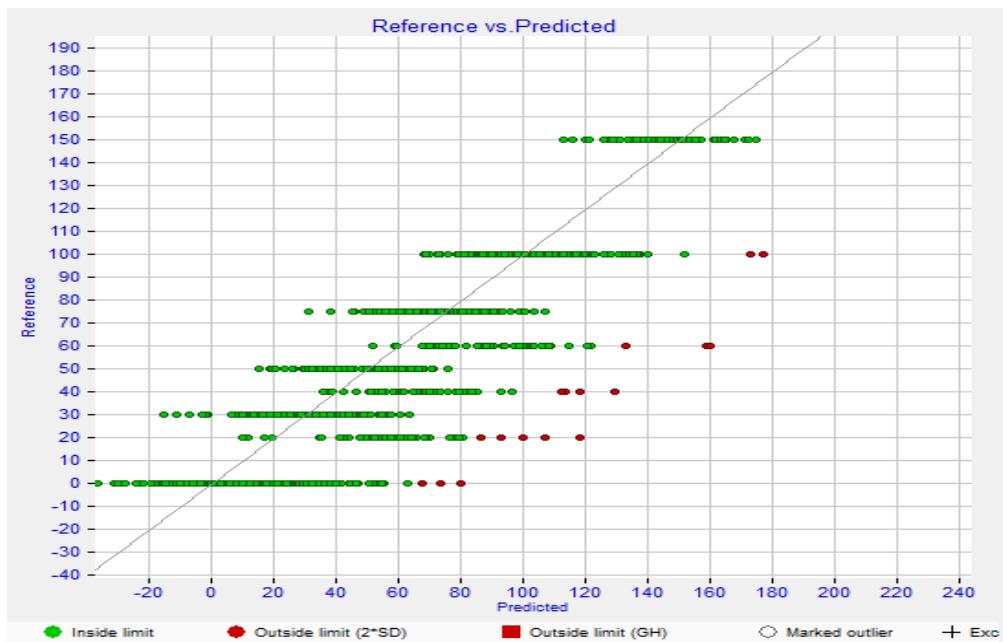


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.3 DISTRIBUIÇÃO VISUAL DOS RESULTADOS OBTIDOS

A distribuição visual dos resultados foi adquirida no software FTiR Calibrator, onde pode ser observada na Figura 20 e os espectros das amostras utilizadas no modelo experimental na Figura 15.

Figura – 20 Resultados equipamento x resultados referência.

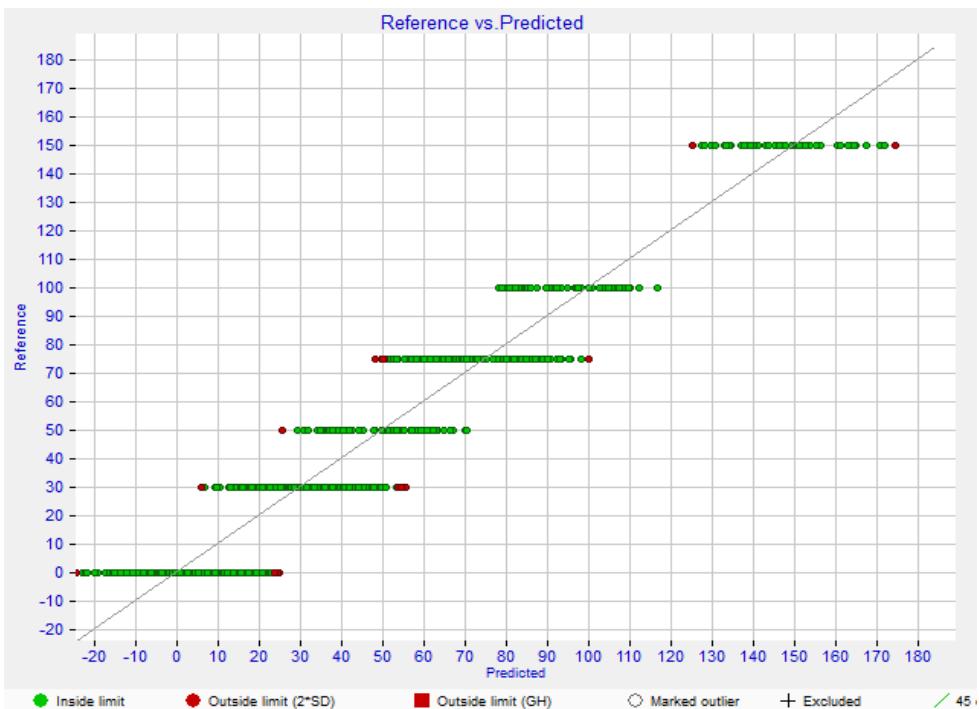


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme mostrado na Figura 20, nota-se uma boa distribuição das amostras com concentrações das amostras de concentrações: 0, 30, 50, 70, 100 e 150 mg/L. Porém houve um deslocamento com tendência positiva para os valores de 20, 40, 60 mg/L. Este fato possivelmente está relacionado à menor número de amostras com estas concentrações em comparação às demais citadas anteriormente. Observa-se também alguns pontos em vermelho, ou seja, que permaneceram fora dos limites de comparação (Outliers) entre valor de estipulado e valor real.

Foram excluídas as amostras que continham valores de Residual Outlier fora do range de 30 mg/L. Este ajuste foi necessário para que fosse possível obter um conjunto de dados com maior exatidão em comparação com os valores de referência. Também foram excluídos os conjuntos de amostras que continham as concentrações de 20, 40, 60 mg/L devido ao baixo número de amostras para cada grupo. A distribuição visual dos dados pode ser verificado na Figura 21:

Figura 21 – Distribuição resultados equipamento Milkoscan FT2 x resultados referência após exclusão de Outliers.



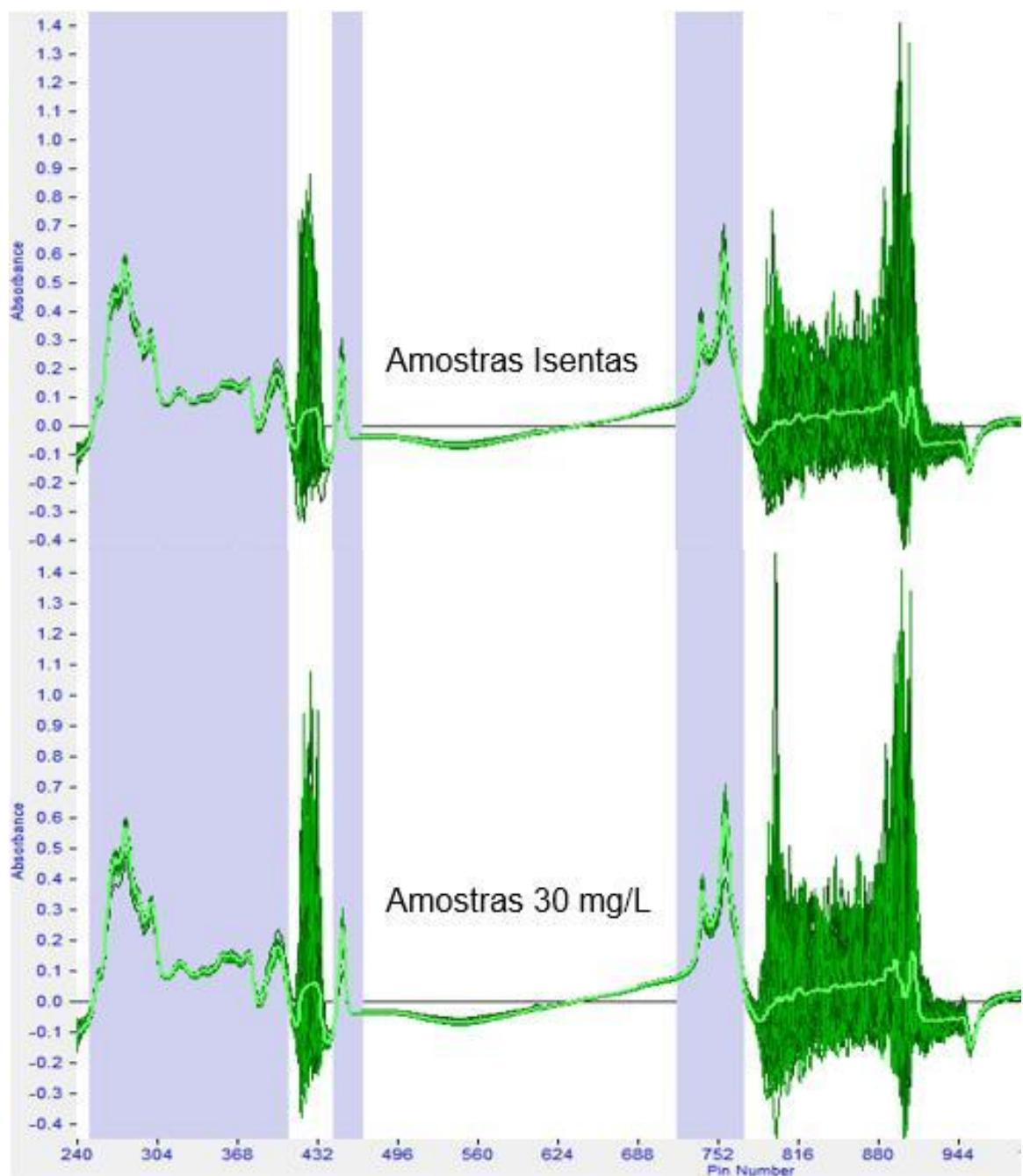
Fonte: Sotware FTiR Calibrator FOSS (2024).

Após estes ajustes nota-se uma melhoria visual na linearidade dos dados apresentados bem como uma redução significativa de Residual Outliers.

#### 5.4 AVALIAÇÃO ESPECTRAL

Nesta etapa foi realizado uma avaliação espectral dos conjuntos das amostras contaminadas nas concentrações 30 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L, em comparação as amostras “não contaminadas” intencionalmente. As Figuras 22, 23, 24 e 25 demonstram estas comparações na área em cinza, correspondendo as faixas vibracionais de Gordura, Lactose e Proteína:

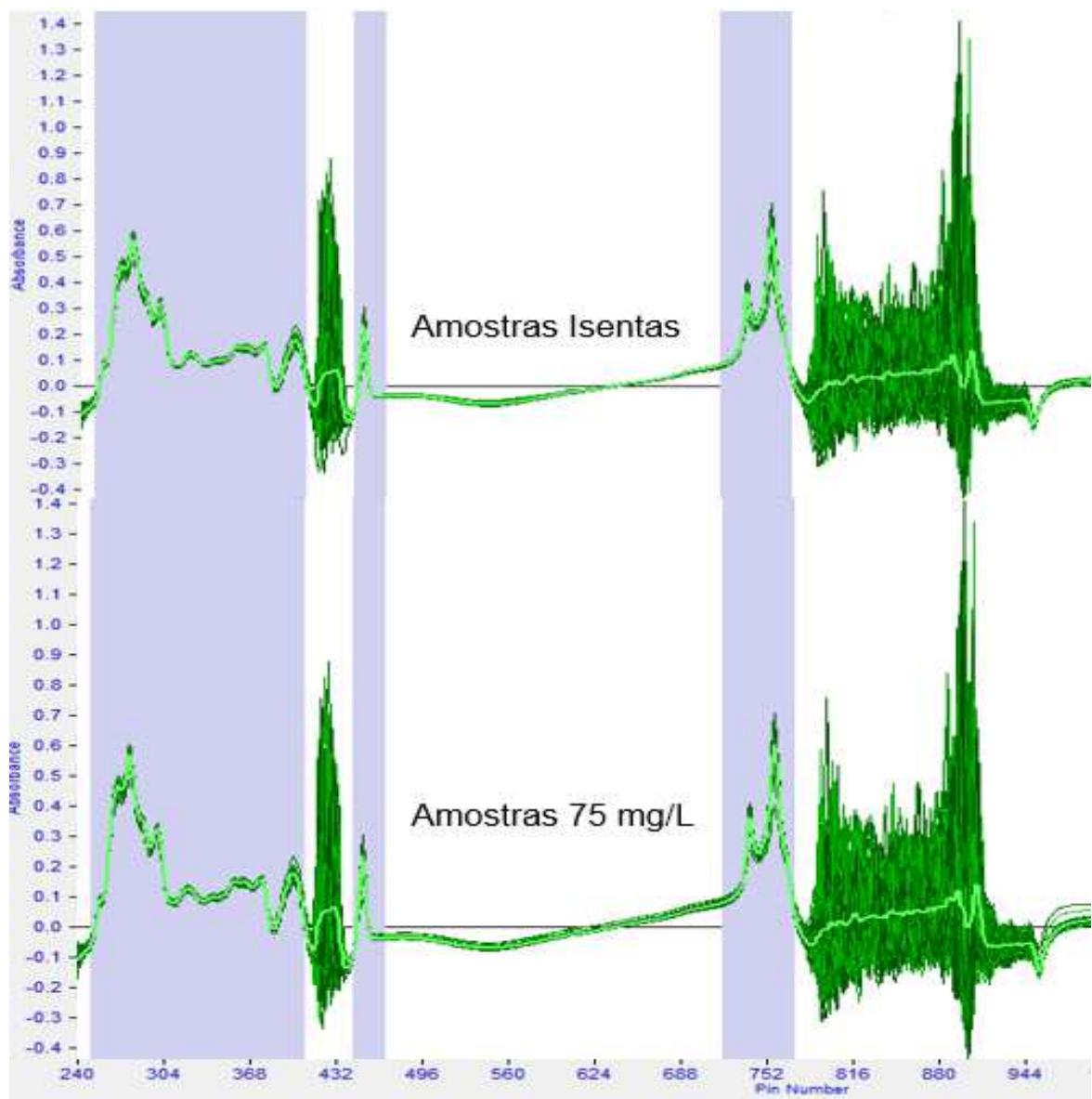
Figura 22 - Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 30 mg/L de CMP.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme evidenciado na Figura 23, nas regiões de 240 cm<sup>-1</sup> a 407 cm<sup>-1</sup>, 444 cm<sup>-1</sup> a 468 cm<sup>-1</sup> e 720 cm<sup>-1</sup> a 771 cm<sup>-1</sup> não houve diferenciação visual, permanecendo o mesmo nível de absorbância.

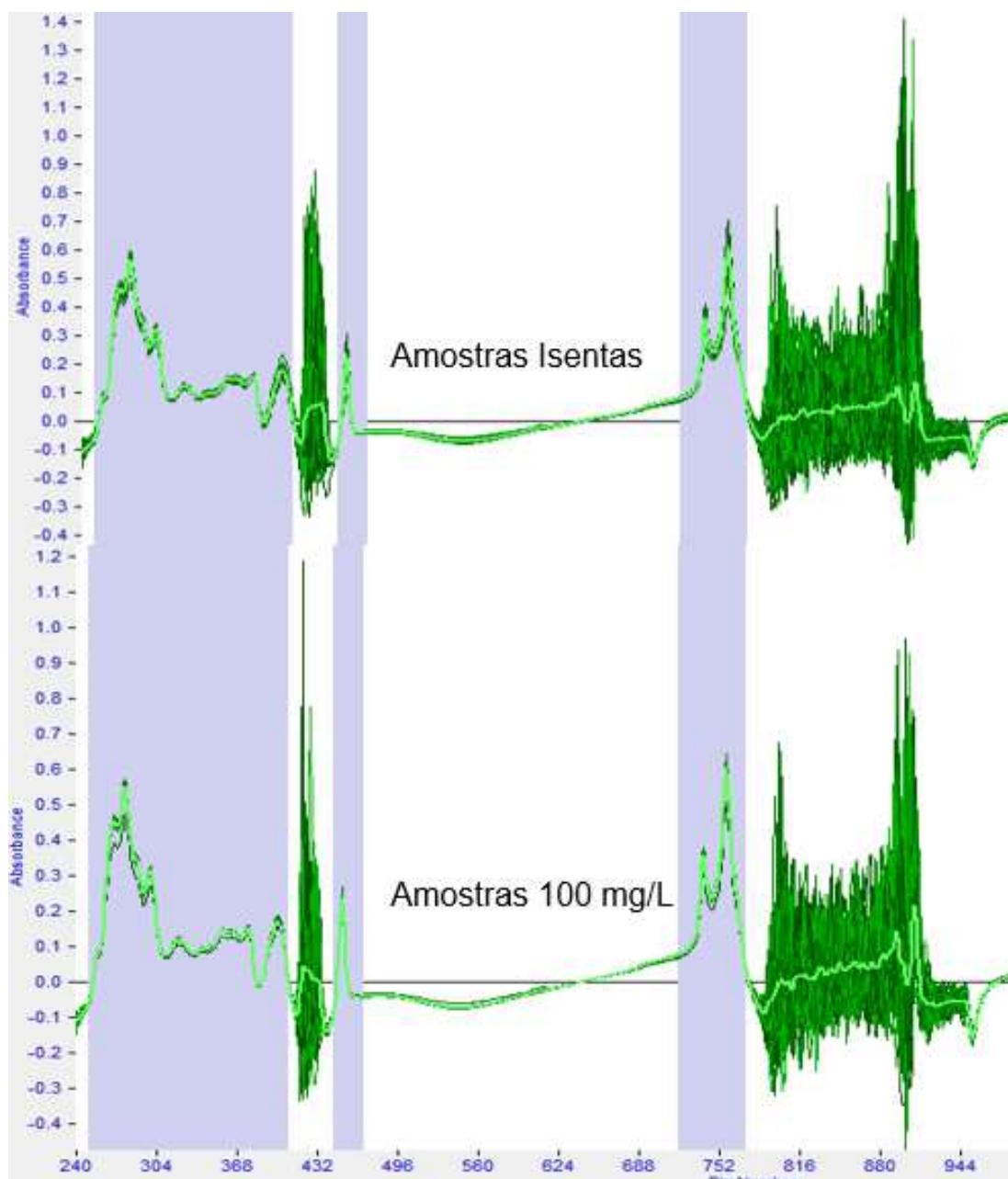
Figura 23 - Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 75 mg/L de CMP.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme evidenciado na Figura 23, nas regiões de  $240\text{ cm}^{-1}$  a  $407\text{ cm}^{-1}$ ,  $444\text{ cm}^{-1}$  a  $468\text{ cm}^{-1}$  e  $720\text{ cm}^{-1}$  a  $771\text{ cm}^{-1}$  não houve diferenciação visual, permanecendo o mesmo nível de absorbância.

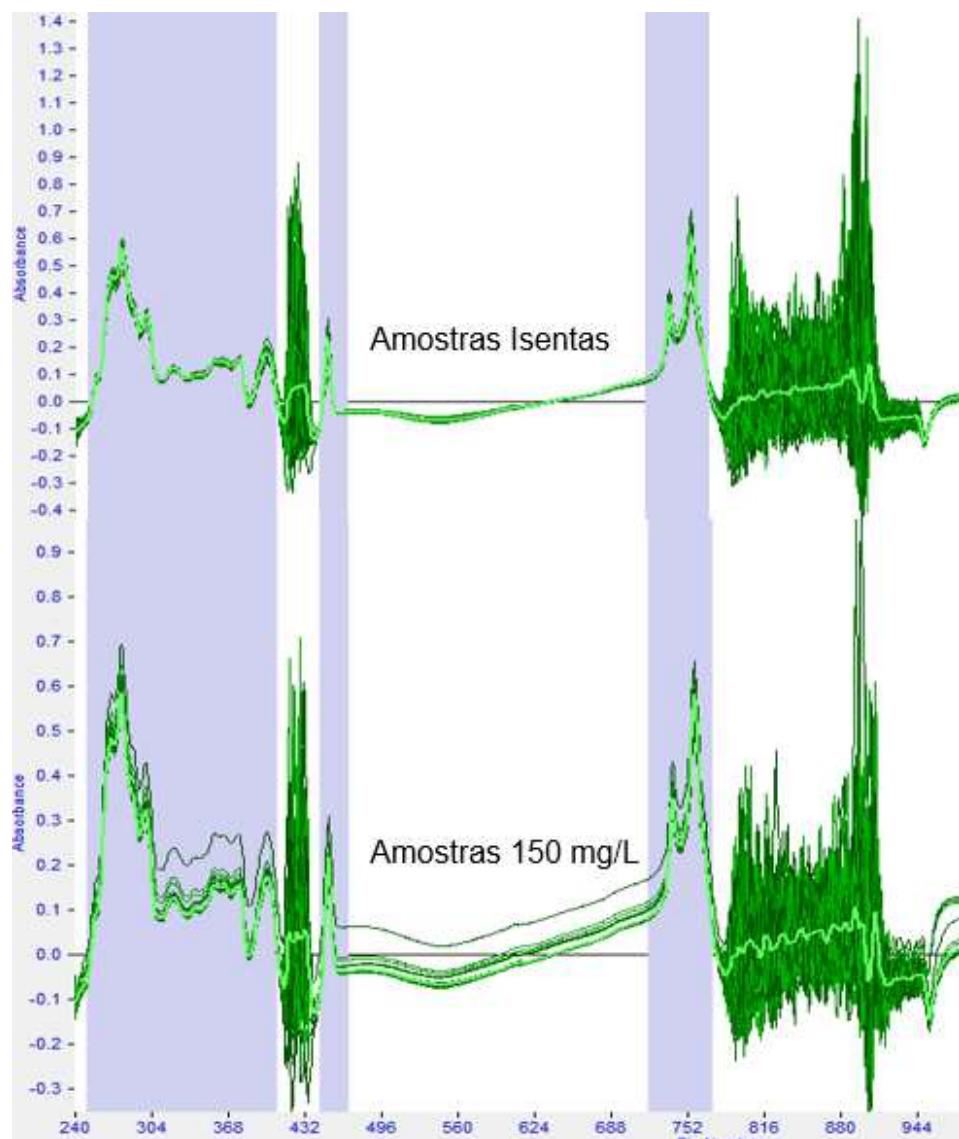
Figura 24 - Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 100 mg/L de CMP.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme evidenciado na Figura 25, na região de  $240\text{ cm}^{-1}$  a  $407\text{ cm}^{-1}$ , houve uma pequena variação na absorbância na região de  $279\text{ cm}^{-1}$  onde saiu de uma média de 0,561 para 0,526. Na região de  $400\text{ cm}^{-1}$  a variação saiu da média 0,179 para 0,167. Já na região entre  $739\text{ cm}^{-1}$  a  $758\text{ cm}^{-1}$  houve uma pequena variação na absorbância na região de  $739\text{ cm}^{-1}$  onde saiu de uma média de 0,366 para 0,341. Ou seja, nota-se que ainda assim os dados permanecem matematicamente iguais.

Figura 25 - Comparação espectral amostras isentas x amostras contaminadas com 150 mg/L de CMP.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme evidenciado na Figura 25, na região de  $240\text{ cm}^{-1}$  a  $407\text{ cm}^{-1}$ , houve uma pequena variação na absorbância na região de  $279\text{ cm}^{-1}$  onde saiu de uma média de 0,561 para 0,625. Na região de  $400\text{ cm}^{-1}$  a variação saiu da média 0,179 para 0,213. Já na região entre  $739\text{ cm}^{-1}$  a  $758\text{ cm}^{-1}$  não houve variação na média na região de  $739\text{ cm}^{-1}$  onde permaneceu em 0,366. Ou seja, nota-se que ainda assim os dados permanecem matematicamente iguais.

## 5.5 RESULTADOS PLS

### 5.5.1 Teste 1 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 1

Foram selecionados todos os 886 dados de amostras analisadas conforme descrito no Item 3.1. Foi utilizado a opção no software: “Full Spectra (good-range), Smooth-1”, onde é realizada a leitura do espectro excluindo as áreas de água e ruídos. Os resultados estão descritos na Tabela 14.

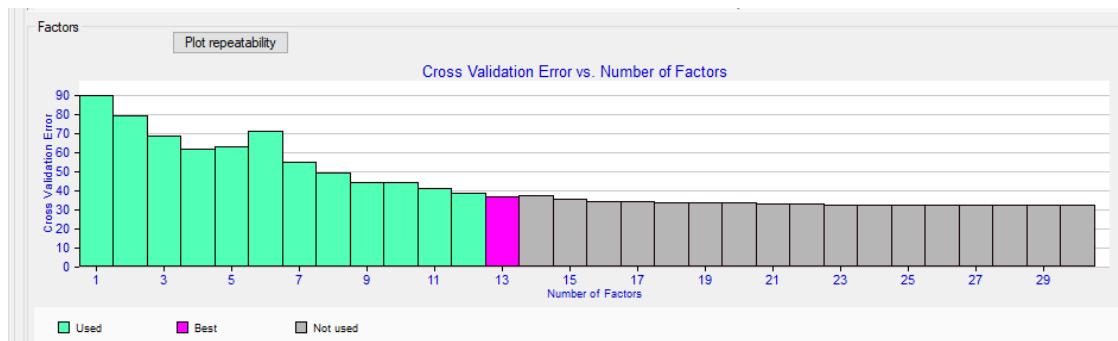
Tabela 14 - Resultados obtido pelo Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 1.

Parâmetro	1° PLS	2° PLS	3° PLS
Precisão Absoluta	33,282	14,053	12,56
Precisão Relativa	146,26%	68,02%	68,27%
Repetibilidade Absoluta	3,47	7,006	7,242
Repetibilidade Relativa	15,25%	33,91%	39,36%
Correlação ( $R^2$ )	0,472	0,855	0,86
Média	22,756	20,661	18,399
Mediana	17,028	11,802	10,582
Média das diferenças	0	0	2,055
Validação Cruzada	95,794	41,52	37,235

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme verificado na tabela acima, obtivemos um melhor resultado na PLS número 3, onde o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,86, o menor valor de Crossvaler (37,235) e o melhor fator foi o de número 13 conforme demonstrado na Figura 26:

Figura 26 - Visualização do melhor fator do teste demonstrado no Software FT2 Calibrator.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.5.2 Teste 2 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 2

Foram selecionados todos os 886 dados de amostras analisadas conforme descrito no Item 3.1. Foi utilizado a opção: Full Spectra (good-range), Smooth-2, onde é realizada a leitura do espectro excluindo as áreas de água e ruídos. Os resultados estão descritos na Tabela 15.

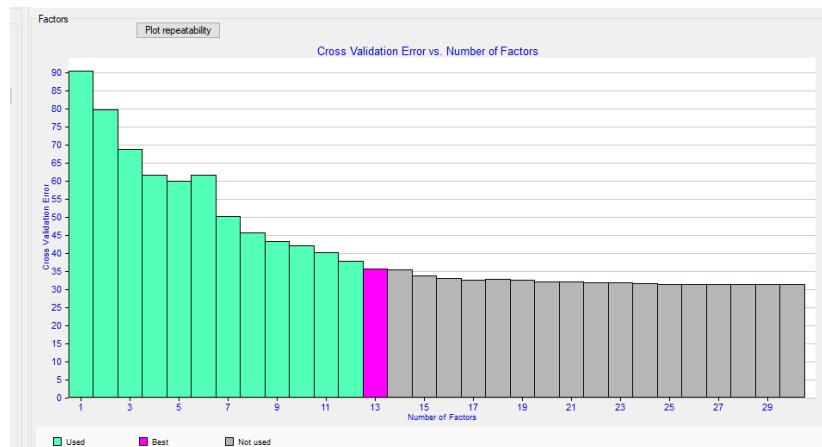
Tabela 15 - Resultados Obtidos pelo Teste 2 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 2

Parâmetros	1º PLS	2º PLS	3º PLS
Precisão Absoluta	33,359	14,037	11,948
Precisão Relativa	146,6%	67,941%	64,374%
Repetibilidade Absoluta	3,475	6,931	6,822
Repetibilidade Relativa	15,27	33,55	36,75
Correlação ( $R^2$ )	0,47	0,855	0,875
Média	22,756	20,661	18,561
Mediana	16,981	11,482	10,157
Média das diferenças	0	0	0
Validação Cruzada	95,855	41,337	35,769

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme verificado na tabela acima, obtivemos o melhor resultado na PLS número 3, onde a correlação ( $R^2$ ) foi de 0,875. O menor valor da Validação Cruzada (35,769). O melhor fator foi o de número 13 conforme demonstrado na Figura 27:

Figura 27 - Visualização do melhor fator obtido através do Teste 2 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 2



Fonte: Software FTiR Calibrator (2024).

### 5.5.3 Teste 3 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 3

Foram selecionados todos os 886 dados de amostras analisadas conforme descrito no Tabela 16. Foi utilizado a opção: Full Spectra (good-range), Smooth-3, onde é realizada a leitura do espectro excluindo as áreas de água e ruídos. Os resultados estão descritos na Tabela 16.

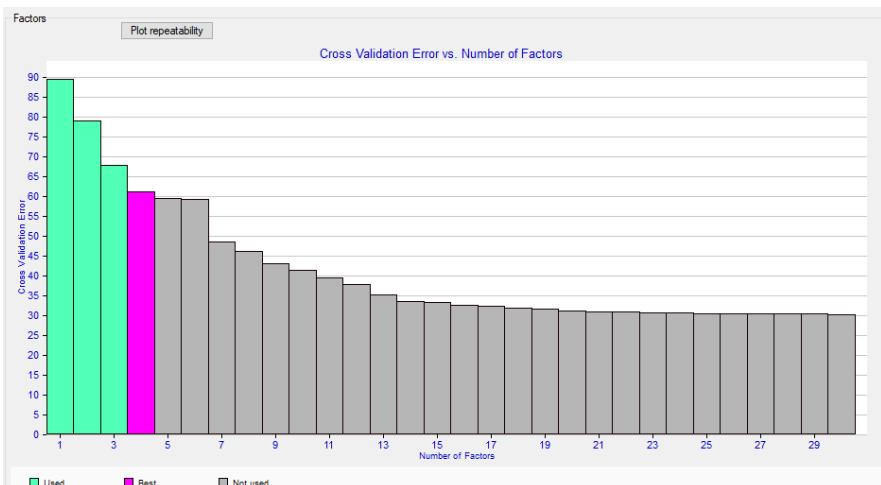
Tabela 16 - Resultados Obtidos pelo Teste 3 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 3.

Parâmetros	1° PLS	2° PLS	3° PLS
Precisão Absoluta	33,435	14,091	21,958
Precisão Relativa	146,93%	68,204%	118,97%
Repetibilidade Absoluta	3,466	6,852	2,296
Repetibilidade Relativa	15,23	33,16	12,44
Correlação ( $R^2$ )	0,468	0,854	0,568
Média	22,756	20,661	18,458
Mediana	17,061	11,368	13,764
Média das diferenças	0	0	0
Validação Cruzada	95,931	41,269	61,365

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme verificado na tabela acima, obtivemos o melhor resultado na PLS número 2, onde a correlação ( $R^2$ ) foi de 0,854. O menor valor de Validação Cruzada (41,269). O melhor fator foi o de número 4 conforme demonstrado na Figura 28:

Figura 28 - Visualização do melhor fator obtido através do Teste 3 - Dados Brutos Espectros Completos - Suavização 3.



Fonte: Software FTiR Calibrator (2024).

## 5.6 TESTES SELEÇÃO DE ÁREA

Foram selecionados todos os 886 dados de amostras analisadas conforme descrito no Item 3.1. Foi utilizado a opção: Seletor de Canal, onde é realizada a seleção de área para realização da leitura do PLS. Esta etapa teve como objetivo complementar a etapa 4.3 onde não houve diferenciação visual entre as áreas dos espectros. Foram escolhidos três intervalos de medição para realização dos cálculos sendo: 370 cm<sup>-1</sup> a 300 cm<sup>-1</sup> (área das proteínas), 451 cm<sup>-1</sup> a 453 cm<sup>-1</sup> e 739 cm<sup>-1</sup> a 748 cm<sup>-1</sup> (área dos lipídeos). A seleção das áreas pode ser observada nas Figuras 29 e 30.

### 5.6.1 Teste 1A - Seleção de área – PLS 1

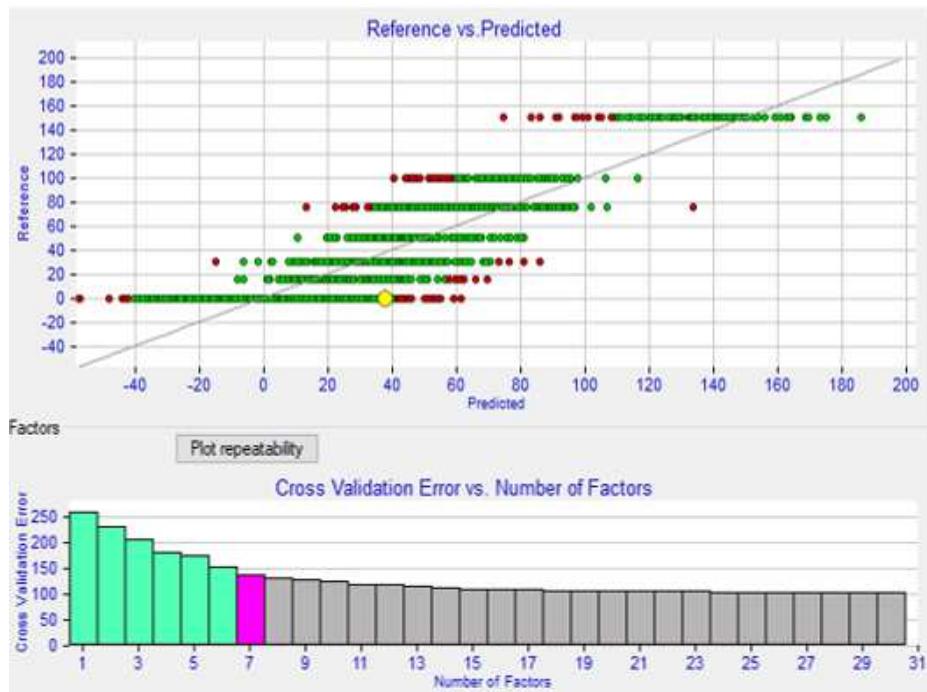
Abaixo pode-se verificar na Tabela 17, os resultados obtidos na primeira PLS e na Figura 29, a distribuição dos resultados.

Tabela 17 - Resultados teste seleção de área PLS 1

Parâmetro	1° PLS
Precisão Absoluta	20,867
Precisão Relativa	65,888%
Repetibilidade Absoluta	8,820
Repetibilidade Relativa	27,85%
Correlação (R <sup>2</sup> )	0,765
Média	31,671
Mediana	24,509
Média das diferenças	0,00
Validação Cruzada	138,91

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 29 - Distribuição dos resultados e números de fatores, teste seleção de área – PLS 1.



Fonte: Software FTiR Calibrator (2024).

Conforme mostrado nos dados apresentados na Tabela 17, a correlação ( $R^2$ ) obtida foi de 0,765 e o valor de Validação Cruzada foi de 138,91. Porém conforme verificado na figura 29, houve uma redução do número de fatores, onde o melhor a ser utilizado foi o fator 7.

#### 5.6.2 Teste 1A - Seleção de área – PLS 2

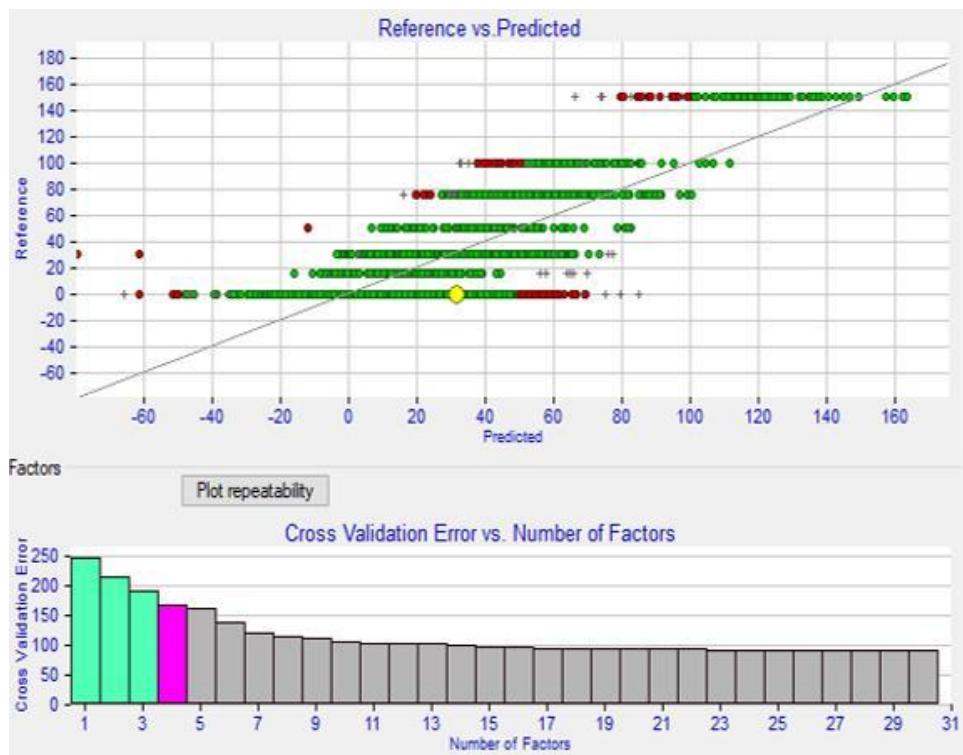
Abaixo pode-se observar na Tabela 18, podemos observar os resultados obtidos na segunda PLS e na Figura 30, a distribuição dos resultados.

Tabela 18 – Resultados do Teste1A seleção de área PLS 2

Parâmetros	2º PLS
Precisão Absoluta	24,878
Precisão Relativa	82,997%
Repetibilidade Absoluta	5,501
Repetibilidade Relativa	18,35%
Correlação ( $R^2$ )	0,644
Média	29,975
Mediana	24,974
Média das diferenças	0,00
Validação Cruzada	168,76

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 30 - Distribuição dos resultados e números de fatores, teste seleção de área – PLS 2.



Fonte: Software FTiR Calibrator (2024).

Conforme mostrado nos dados apresentados acima na Tabela 18, a correlação ( $R^2$ ) obtida foi de 0,644 e o valor de Validação Cruzada foi de 138,91. Porém conforme verificado na Figura 30, houve uma redução do número de fatores, onde o melhor a ser utilizado foi o fator 4.

### 5.6.3 Teste 1A - Seleção de área – PLS 3

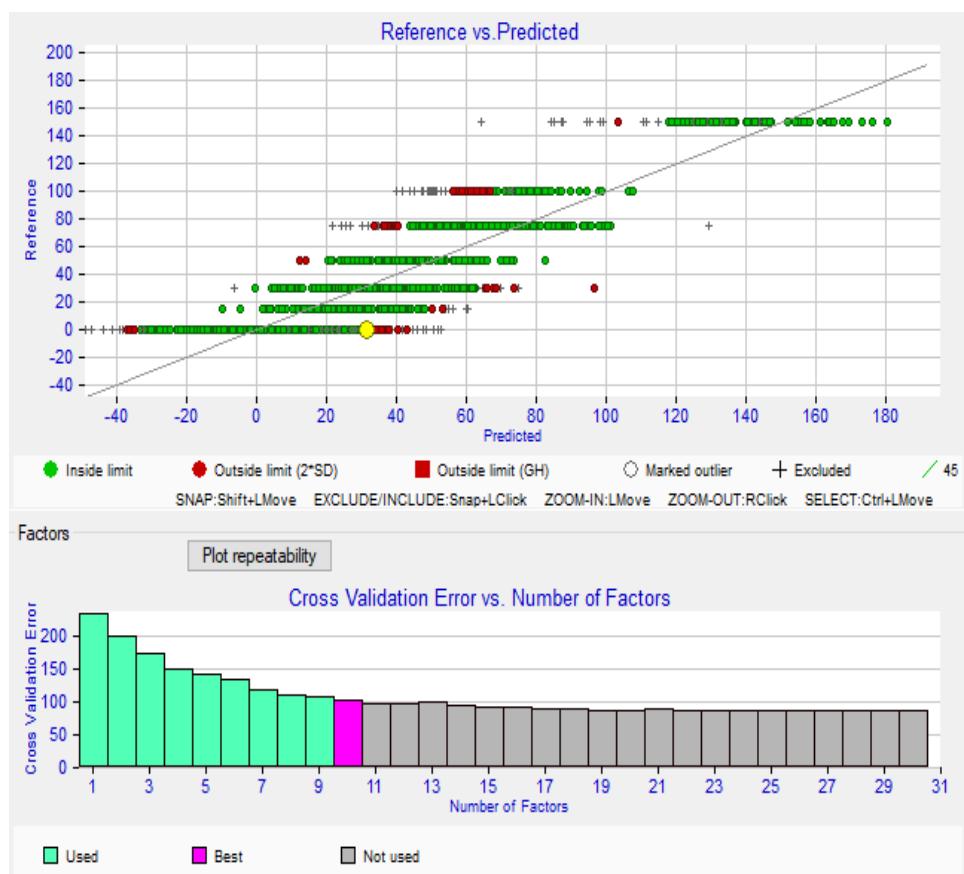
Abaixo na Tabela 19, observa-se os resultados obtidos na terceira PLS e na Figura 30, a distribuição dos resultados.

Tabela 19 - Resultados do Teste 1A seleção de área PLS 3

Parâmetros	3º PLS
Precisão Absoluta	16,544
Precisão Relativa	57,051%
Repetibilidade Absoluta	7,978
Repetibilidade Relativa	27,51%
Correlação ( $R^2$ )	0,832
Média	28,998
Mediana	20,687
Média das diferenças	0,00
Validação Cruzada	102,78

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 31 - Distribuição dos resultados e números de fatores, teste seleção de área – PLS 3.



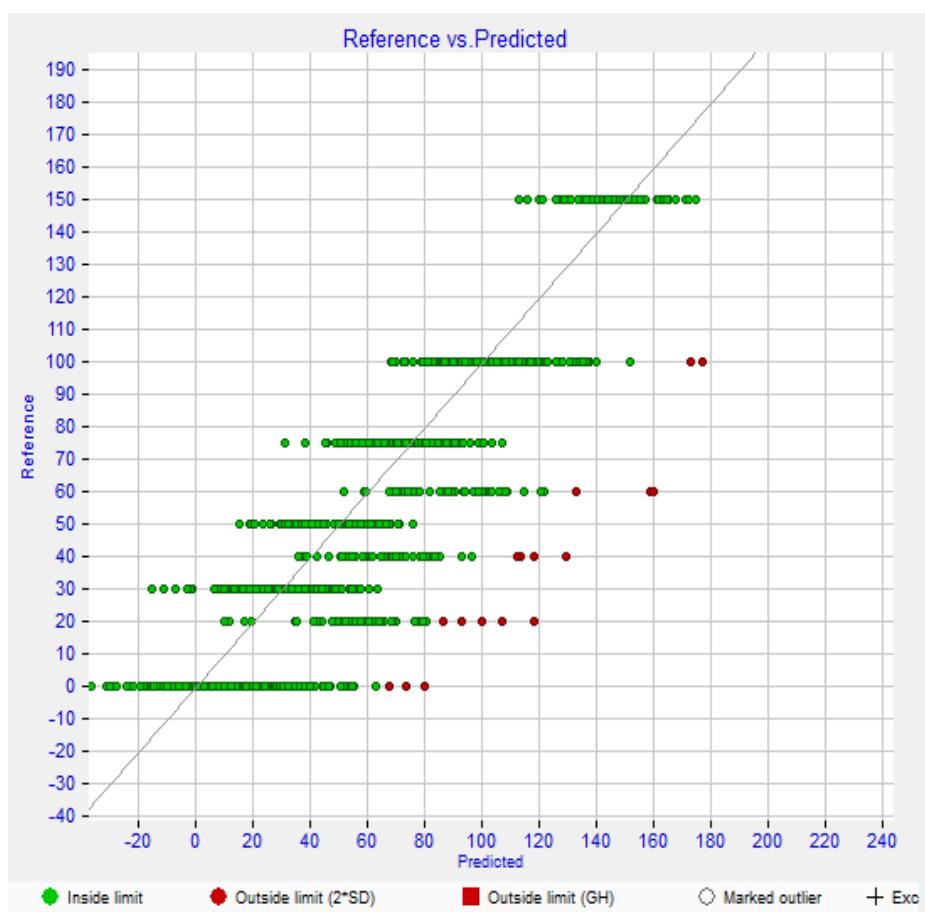
Fonte: Software FTiR Calibrator (2024).

Conforme evidenciado nos dados apresentados na Tabela 19 a correlação ( $R^2$ ) obtida foi de 0,832 e o valor de Validação Cruzada foi de 102,78. Houve um aumento significativo no número de fatores onde o melhor para ser usado foi o 10 de acordo com demonstrado na Figura 31.

#### 5.6.4 Teste 4 – Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa

Após todos os testes anteriores foi realizado um trabalho de seleção de dados para escolha dos melhores resultados possíveis perante valores de Outliers, conforme descrito no item 4.3. A figura 32 mostra a representatividade dos dados perante linearidade gráfica onde a linha das concentrações: 20 mg/L, 40 mg/L e 60 mg/L de CMP, estão deslocadas do centro (linha cinza) conforme as demais concentrações.

Figura 32 – Linearidade gráfica dos resultados.



Fonte: Software FTiR Calibrator (2024).

Este fato pode ter ocorrido devido algum erro na diluição do padrão de soro para montagem da curva. Devido a este comportamento observado, foi realizado a exclusão destes dados da curva a fim de realizar uma melhora da linearidade da mesma. A figura 33 mostra a visualização destes pontos após a realização destas exclusões.

Figura 33 - Linearidade gráfica dos resultados após exclusão os resultados com possíveis erros.



Fonte: Software FTiR Calibrator (2024).

Conforme verificado na Figura 33, a linearidade gráfica obteve uma melhora significativa em relação a Figura 32. Após esta etapa de seleção, restaram um total de 474 amostras com seus devido espectros para realização do trabalho de PLS.

Após a realização destes ajustes foi realizado teste de PLS utilizando a opção: Escolha Espectros Completos Boa Faixa e separado utilizando as opções Suavização 1, 2 e 3. Esta opção foi escolhida devido melhor performance obtida nos teste anteriores.

Abaixo na Tabela 20, demonstra os resultados obtidos na PLS 1, 2 e 3 – Suavização 1.

Tabela 20 - Resultados obtidos Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa  
PLS 1, 2 e 3 – Suavização 1

Parâmetros	1° PLS	2° PLS	3PLS
Precisão Absoluta	13,651	12,889	12,497
Precisão Relativa	31,813	30,087	29,316
Repetibilidade Absoluta	7,427	7,321	7,264
Repetibilidade Relativa	17,31	17,09	17,04
Correlação ( $R^2$ )	00,909	0,919	0,924
Média	42,911	42,84	42,627
Mediana	34,108	34,196	34,004
Média das diferenças	0,00	0	0
Validação Cruzada	31,207	28,488	27,458

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

De acordo com a Tabela 20 o melhor resultado foi obtido na PLS-3, onde a correlação foi de 0,924 e o menor valor de Validação Cruzada com valor de 27,448.

Abaixo na Tabela 21, demonstra o menor valor de validação cruzada obtidos na PLS 1, 2 e 3 – Suavização 2.

Tabela 21 – Resultados obtidos Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa  
PLS 1, 2 e 3 – Suavização 2

Parâmetros	1° PLS	2° PLS	3PLS
Precisão Absoluta	13,768	13,050	12,578
Precisão Relativa	32,084	30,481	29,477
Repetibilidade Absoluta	7,489	7,331	7,209
Repetibilidade Relativa	17,45	17,12	16,89
Correlação ( $R^2$ )	0,908	0,917	0,923
Média	42,611	42,812	42,669
Mediana	33,776	34,054	33,325
Média das diferenças	0,00	0,00	0,00
Validação Cruzada	31,259	28,671	27,610

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

De acordo com a Tabela 21 o melhor resultado foi obtido na PLS-3, onde a correlação foi de 0,923 e o menor Validação Cruzada com valor de 27,610.

Abaixo na Tabela 22, monstra os resultados obtidos na PLS 1, 2 e 3 – Suavização 3.

Tabela 22 - Resultados obtidos Teste de Escolha Espectros Completos Boa Faixa  
PLS 1, 2 e 3 – Suavização 3.

Parâmetros	1° PLS	2° PLS	3°PLS
Precisão Absoluta	13,825	12,991	12,023
Precisão Relativa	32,217	30,386	28,026
Repetibilidade Absoluta	7,549	7,255	7,249
Repetibilidade Relativa	17,59	16,97	16,90
Correlação ( $R^2$ )	0,907	0,17	0,930
Média	42,911	42,754	42,897
Mediana	33,509	34,307	34,244
Média das diferenças	0,00	0,00	0,00
Validação Cruzada	31,349	28,278	26,374

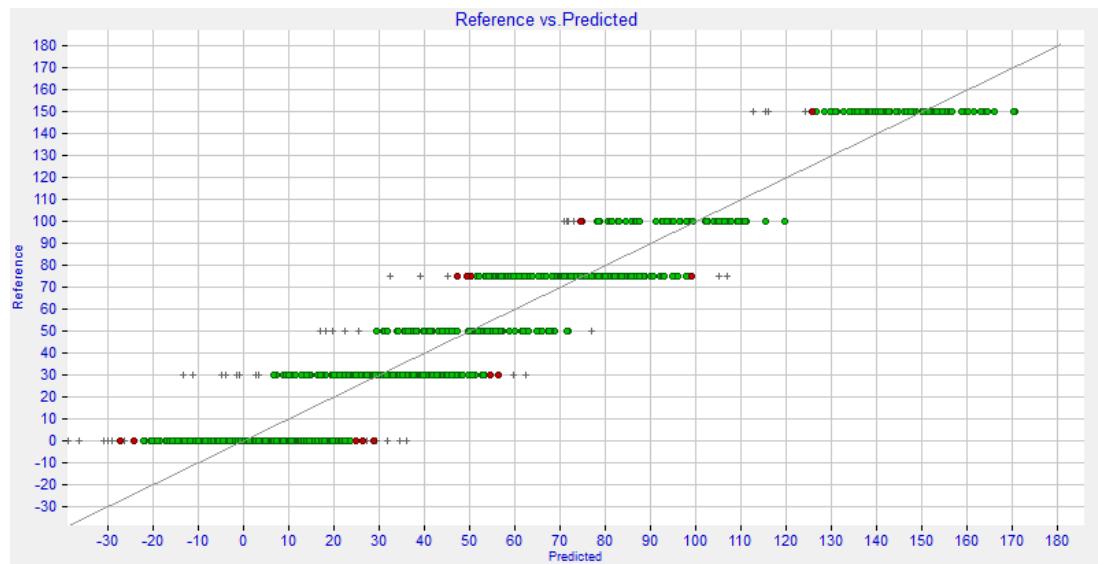
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

De acordo com a Tabela 22 o melhor resultado foi obtido na PLS-3, onde a correlação foi de 0,930 e o menor valor de Validação Cruzada com valor de 26,374.

Observando as melhores performance dos testes anteriores, verifica-se que o melhor modelo foi o construído através da PLS-3 Suavização 3.

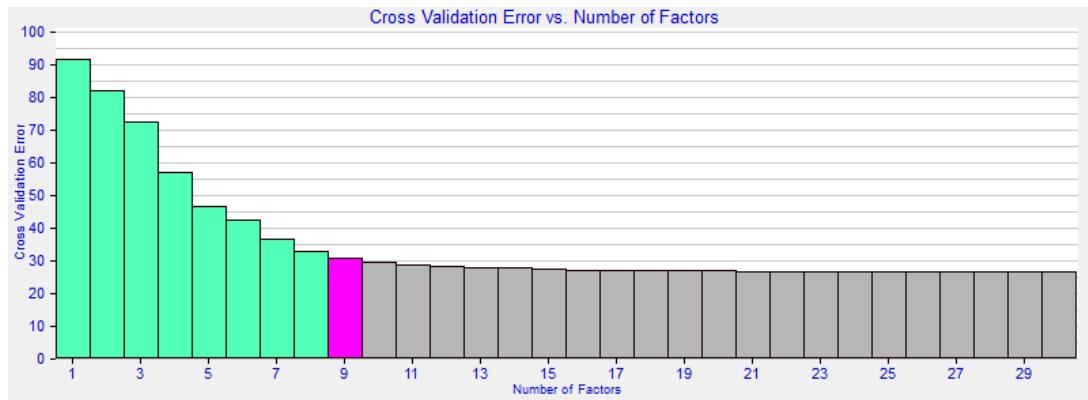
Abaixo na Figura 34, podemos observar a linearidade visual dos dados e na Figura 35 o resultado visual do melhor fator escolhido (Factor 9).

Figura 34: Demonstração da linearidade do melhor modelo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 35: Demonstração da escolha do fator 9 pela PLS.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 5.7 TESTES CONFIRMATÓRIOS

Para realizar a validação do modelo, o mesmo foi inserido no equipamento Milkoscan FT2, e realizado análise pelo HPLC bem como pelo Kit c-Gmp. Os testes foram realizados em dias diferentes para aumentar a variabilidade do leite recebido da unidade, onde o Teste 1 foi realizado no mês de janeiro de 2024 e o Teste 2 foi realizado em abril de 2024. As concentrações das amostras analisadas são demonstradas na Tabela 23:

Tabela 23 - Concentrações realizadas Teste 1 e Teste 2.

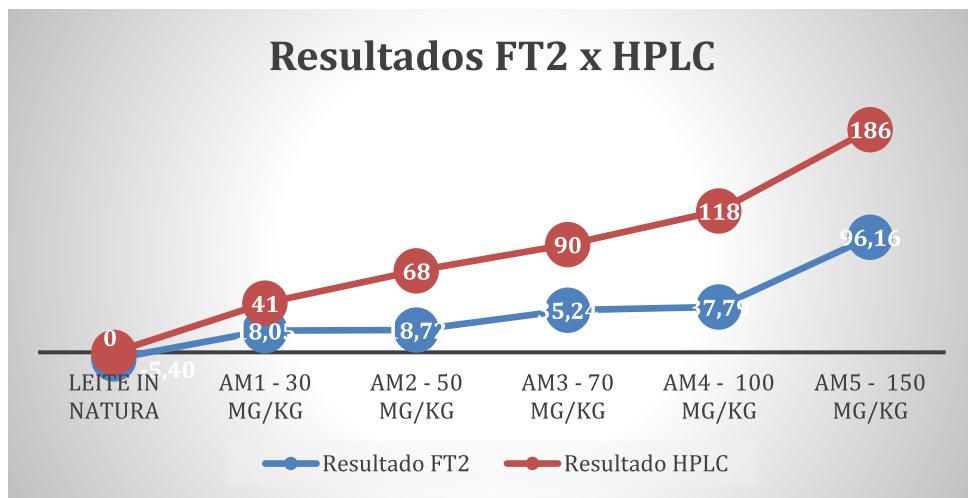
Teste 1 Concentrações (mg/L)	Teste 2 Concentrações (mg/L)
0 (sem adição)	0 (sem adição)
30	15
50	30
70	50
100	75
150	100

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

### 5.7.1 Teste 1 Confirmatório Milkoscan Ft2 x método HPLC.

Os resultados do Teste 1 podem ser verificados na Figura 36:

Figura 36: Resultados Teste 1 Confirmatório – FT2 x HPLC.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme verificado na Figura 36, nota-se uma boa correlação entre os valores obtidos pelo equipamento Milkoscan FT2 em comparação ao resultado obtido pelo HPLC. Porém o equipamento Milkoscan FT2 demonstrou uma tendência de resultados menores do que os resultados obtidos pelo HPLC. Fato já esperado devido ao valor de Validação Cruzada obtido ter sido de 26,376 conforme descrito no item 4.6. No caso de amostra zero (isenta de adição) o resultado obtido pelo equipamento Milkoscan FT2 foi negativo devido a tendência que o equipamento está apresentando. Já o resultado obtido pelo HPLC no gráfico está como zero, porém o resultado foi de <0,15mg/kg devido ao limite de detecção do método.

Abaixo na Tabela 24 podemos observar a comparação dos dois métodos (Milkoscan FT2 e HPLC) pelo Kit c-GMP:

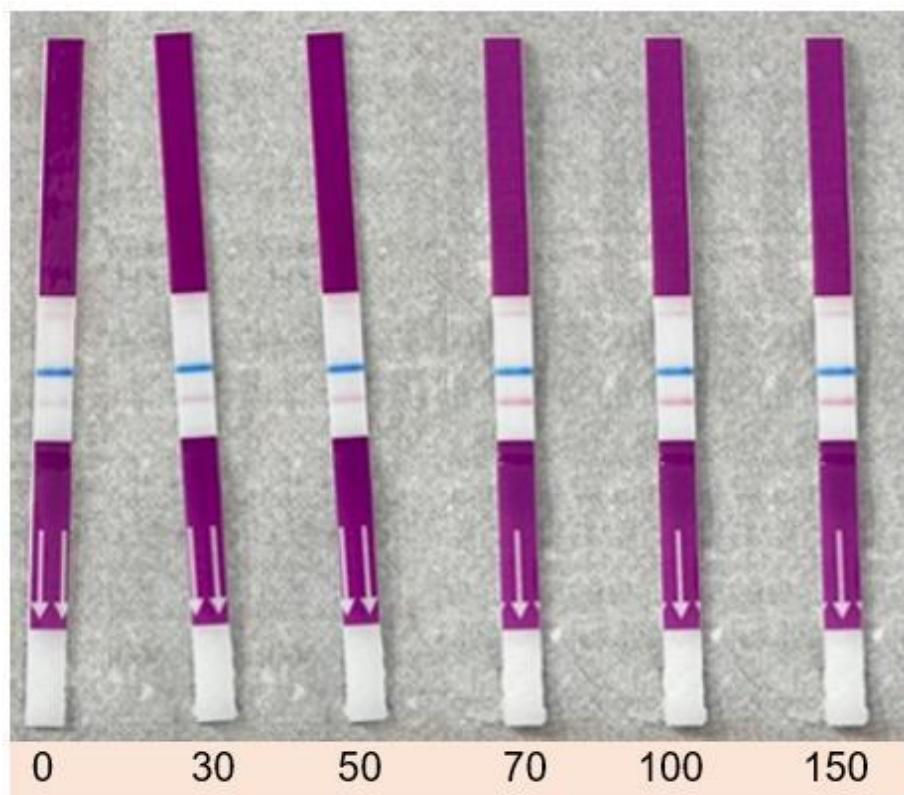
Tabela 24 - Resultados Teste 1 método: Milkoscan FT2, HPLC e Kit c-GMP

Amostra	Mikoscan FT2 (mg/L)	HPLC (mg/L)	Kit c-GMP (mg/L)
Leite in Natura	-5,40	<15	Negativo
AM1 - 30	18,05	41	Positivo (Faixa de 30)
AM2 - 50	18,72	68	Positivo (Faixa de 30)
AM3 - 70	35,24	90	Positivo (Faixa de 70)
AM4 - 100	37,79	118	Positivo (Faixa de 70)
AM5 – 150	96,16	186	Positivo (Faixa de 70)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme observado na Tabela 24, o método imunocromatográfico Kit c-GMP obteve resultado negativo apenas na amostra isenta de adição, fazendo correlação com o resultado obtido pelo HPLC (<15 mg/L) em concentrações abaixo do limite de quantificação do kit (30 mg/L). As amostras com concentrações teóricas entre 30 mg/L e 50 mg/L, o kit c-GMP apresentou resultados positivos na faixa de 30 mg/L, fato que se confirma perante resultados obtidos pelo método de HPLC sendo de 41 mg/L e 68 mg/L. As amostras com concentrações teóricas entre 70 mg/L e 150 mg/L, o kit c-GMP apresentou resultados positivos na faixa de 70 mg/L, fato que se confirma perante resultados obtidos pelo método de HPLC sendo de 90 mg/L, 118 mg/L e 186 mg/L. Os resultados do Kit c-GMP podem ser observados na Figura 37.

Figura 37 – Resultados obtidos pelo Kit c-GMP Teste Confirmatório 1 em mg/L.

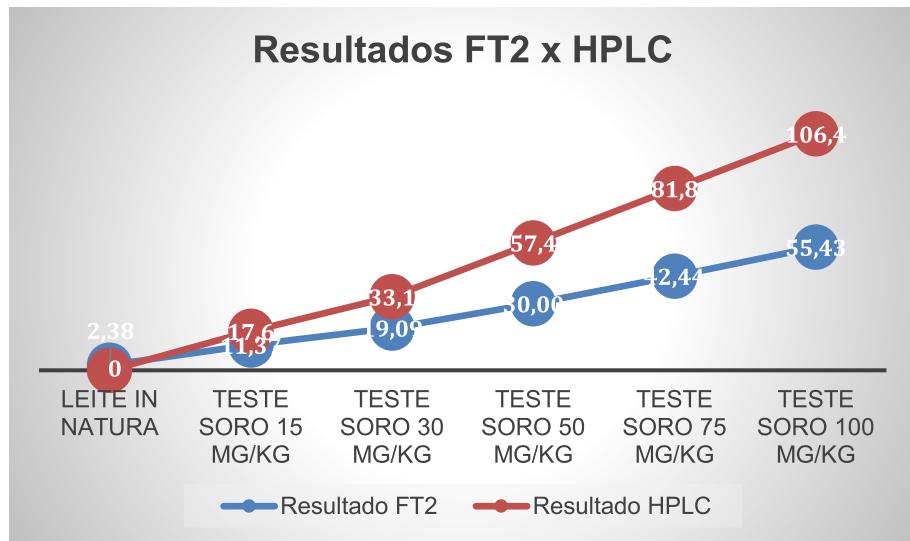


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

#### 5.7.2 Teste 2 Confirmatório Milkoscan Ft2 x método HPLC

Os resultados do Teste 2 Confirmatório podem ser observados no Figura 38:

Figura 38 - Resultados Teste 2 Confirmatório – FT2 x HPLC.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme verificado na Figura 38, nota-se novamente uma boa correlação entre os valores obtidos pelo equipamento Milkoscan FT2 em comparação ao resultado obtido pelo HPLC. Porém conforme ocorrido no Teste 1 o equipamento demonstrou uma tendência de resultados menores do que os resultados obtidos pelo HPLC.

Abaixo na Tabela 25 podemos observar a comparação dos dois métodos (Milkoscan FT2 e HPLC) pelo Kit c-GMP:

Tabela 25 - Resultados Teste 2 métodos: Milkoscan FT2, HPLC e Kit c-GMP

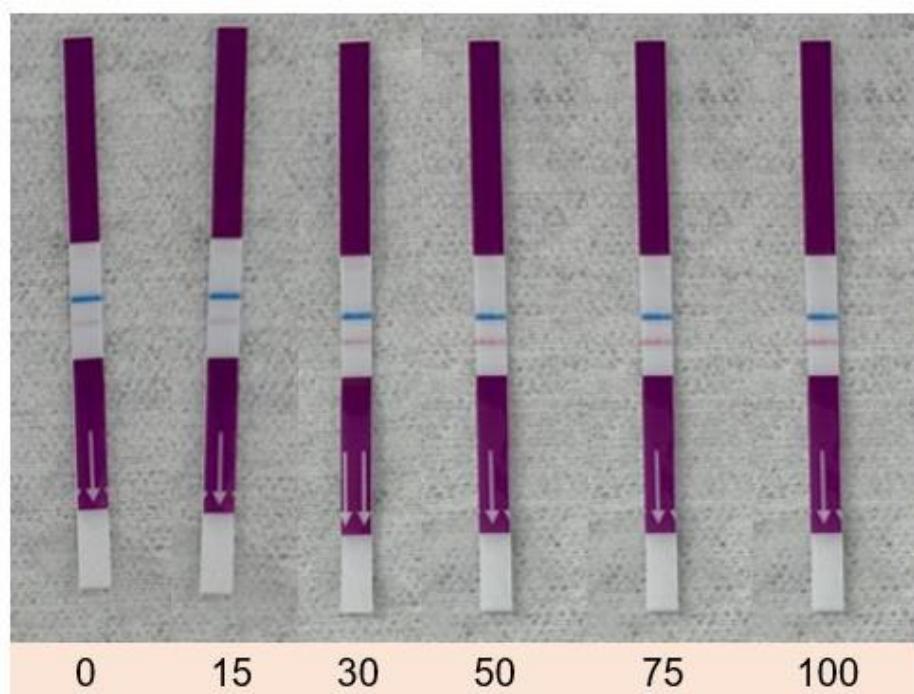
Amostra	Milkoscan FT2 (mg/L)	HPLC (mg/L)	Kit c-GMP (mg/L)
Leite in Natura	2,38	<15	Negativo
AM1 - 15	11,37	17,6	Negativo
AM2 - 30	19,09	33,1	Positivo (30)
AM3 - 50	30,00	57,4	Positivo (70)
AM4 - 75	42,44	81,8	Positivo (70)
AM5 - 100	55,43	106,4	Positivo (70)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Conforme observado na Tabela 25, o método imunocromatográfico Kit c-GMP obteve resultado negativo na faixa de contaminação entre 0 e 15 mg/L, fazendo correlação com o resultado obtido pelo HPLC (<15 mg/L e 17,6 mg/L). As amostras com concentrações teóricas entre 30 mg/L e 50 mg/kg, o kit c-GMP presentaram

resultados positivos na faixa de 30 mg/kg, fato que se confirma perante resultados obtidos pelo método de HPLC sendo de 33,1 mg/kg e 57,4 mg/L. As amostras com concentrações teóricas entre 75 mg/L e 100 mg/L, o kit c-GMP apresentou resultados positivos na faixa de 70 mg/L, fato que se confirma perante resultados obtidos pelo método de HPLC sendo de 81,8 mg/L, 106,4 mg/L. Os resultados do Kit c-GMP podem ser observados na Figura 37.

Figura 39 – Resultados Kit c-GMP Teste Confirmatório 2 em mg/L.

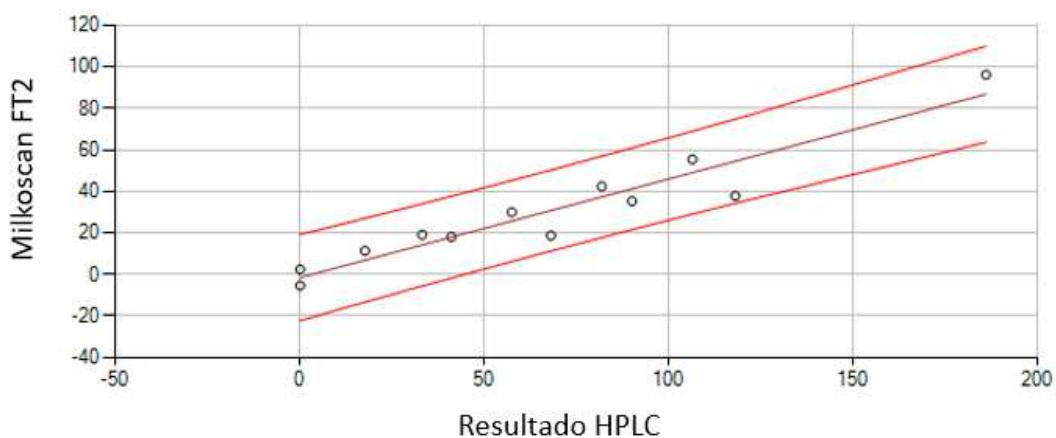


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Apesar dos resultados do equipamento Milkoscan FT2 demonstrarem uma tendência de resultados menores que o do HPLC, nota-se que o mesmo possui uma boa correlação com os níveis de concentrações atribuídas, conforme demonstrado na Figura 38.

Figura 40 - Regressão linear – Coeficiente de Determinação  $R^2 = 0,912$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

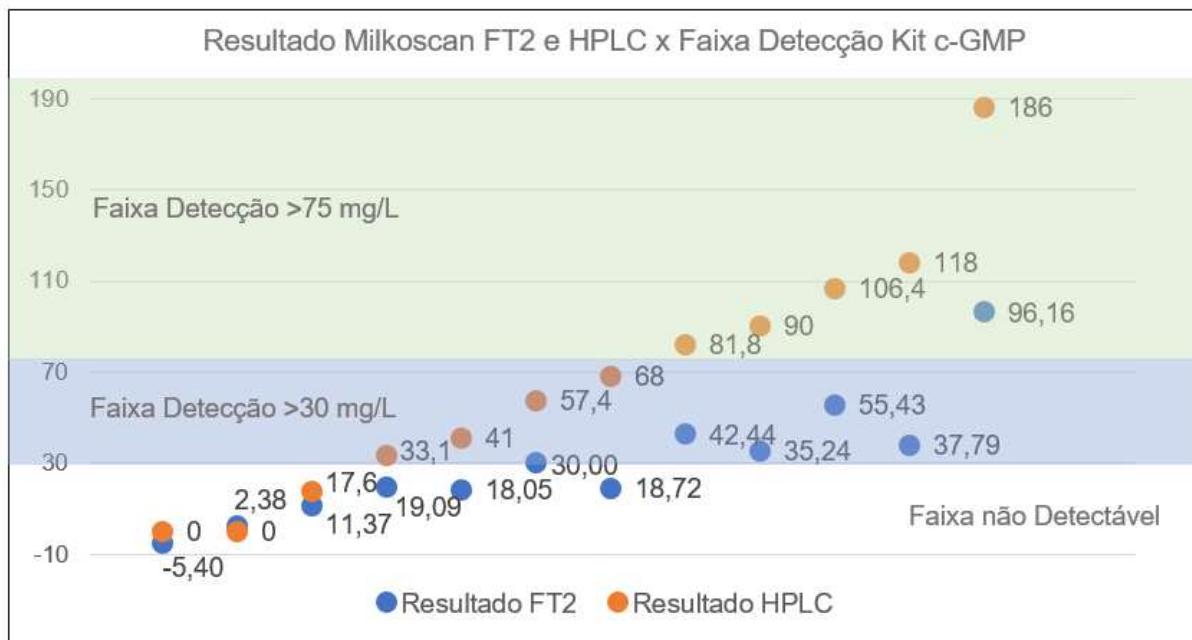
A diferença de resultados entre o método Milkoscan Ft2 e HPLC entre as faixas de concentração de 0 a 50 mg/L é em média de -16,8 mg/L, já na faixa de concentração entre 70 a 150 mg/L a diferença média é de -57,09. Com isso podemos observar que quanto maior a concentração maior o erro atribuído a medida realizada.

A média de diferença entre os resultados do método Milkoscan FT2 e HPLC foi de -36,05 mg/L. Isso mostra uma coerência devido a contribuição do erro (Validação Cruzada) que foi atribuído na construção da curva do equipamento Milkoscan FT2: 26,374 conforme demonstrado na Tabela 22.

Além disso vale destacar que a incerteza do método de referência utilizado (HPLC) é de 15% no qual seria um grande contribuidor para aumentar o erro atribuído ao estudo.

Com relação ao comparativo entre Milkoscan FT2 e Kit c-GMP, foi realizado uma demonstração visual para melhor entendimento, conforme Figura 39:

Figura 41 - Resultados Milkoscan FT2 e HPLC x Faixa Detecção do imunocromatográfico Kit c-GMP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme observado na Figura 41, demonstra um gráfico sequencial dos resultados demonstrados nas Tabelas 24 e 25, obtidos pelo FT2 e HPLC e a correlação da faixa de detecção do Kit c-GMP, sendo 3 faixas: 0 a 30 mg/L (área branca) - Não Detectável, 30 a 75 mg/L (área azul) – Positivo (entre 30 e 75 mg/L) e >75 mg/L (área verde) – Positivo (>75 mg/L).

Diante dos resultados apresentados na Figura 39, a área branca (0 a 30 mg/L) – Não Detectável, foram obtidas 3 confirmações de resultados pelo método HPLC, sendo 2 resultados <15mg/L e 17,6 mg/L. Ao verificar os resultados obtidos pelo Milkoscan FT2 podemos observar que também foram confirmados, sendo 2 resultados como 0 mg/L e 11,37 mg/L.

Diante dos resultados apresentados na Figura 39 na área azul (30 a 75 mg/L) - Positivo, foram obtidos a confirmação de 4 resultados pelo método HPLC, sendo: 33,1 mg/L, 41 mg/L, 57,4 mg/L e 68 mg/L. Porém ao verificar os resultados obtidos pelo Milkoscan FT2 pode-se observar que 3 resultados permaneceram na área branca (0 a 30 mg/L) – Não Detectável e 1 resultado na área azul ( 30 a 75 mg/L) - Positivo.

Diante dos resultados apresentados na Figura 39 na área verde (>75 mg/L) - Positivo, foram obtidos a confirmação de 5 resultados pelo método HPLC, sendo: 81,8 mg/L, 90 mg/L, 106 mg/L, 118 mg/L e 186 mg/L. Porém ao verificar os resultados

obtidos pelo Milkoscan FT2 observa-se que 4 resultados permaneceram na área azul (30 a 75 mg/L) – Positivo e 1 resultado na área verde (>75 mg/L) - Positivo.

## 7 CONCLUSÃO

Baseando-se nos estudos apresentados pode-se concluir que o método de espectroscopia de infravermelho próximo foi eficaz para detecção/quantificação do soro de leite no leite cru. O método mostrou uma correlação positiva em relação a metodologia HPLC.

Porém ao avaliar a comparação do método ao nível de detecção do kit c-GMP observa-se que o equipamento Milkoscan FT2 não foi satisfatoriamente capaz de realizar a quantificação em níveis entre 30 mg/L e 75 mg/L. Entretanto o equipamento demonstrou que ao realizar leituras com níveis superiores a 75 mg/L o mesmo quantifica em níveis mais baixos (entre 30 mg/L e 75 mg/L), com isso podendo ser útil na quantificação de níveis superiores a 75 mg/L. Essa limitação é atribuída a três fatores principais: (1) a inerente semelhança de composição entre o soro de leite e o leite in natura; (2) a possível presença de pseudo-CMP no leite in natura e (3) as limitações do método PLS utilizado pelo equipamento Milkoscan FT2.

Independentemente do nível de quantificação obtido, a metodologia permitirá reduzir o uso do kit Operon, fazendo uma triagem com o equipamento FT2. Dessa forma, a seleção de amostras para o uso do kit deixará de ser aleatória, reduzindo o uso do kit.

Para reduzir o erro do método PLS será necessário um estudo e desenvolvimento mais aprofundado utilizando outras ferramentas mais robustas, como por exemplo RNA (Redes Neurais Artificiais). Acreditamos que este procedimento é mais robusto. Contudo, o equipamento FT2 somente conta com limitação de software, tendo disponíveis ferramentas multivariadas de PCA e PLS somente. Como trabalho futuro espera-se poder incluir RNAs como método de calibração.

## REFERÊNCIAS

- AIRES, Andréia Gomes. O soro de leite como suplemento proteico para atletas. 2010. Trabalho de conclusão do curso (Graduação de Engenharia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.
- ALCANTARA, Lizzy Ayra. Otimização do fracionamento das proteínas do soro de leite por extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos. 2009. Dissertação – (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- ALMEIDA, Filipa Margarida Neves. Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite bovino.** 1. ed. Barueri: Manole, 2003. p. 26-30.
- ARAUJO, Augusto Maynard. Monitoramento de processos em tempo real via espectrofotometria no infravermelho próximo. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Sergipe, 2007.
- BALDASSO, Camila. Concentração, purificação e fracionamento das proteínas de soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas. 179 f. Dissertação (Mestre) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BARBOSA Luiz Claudio de Almeida. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. p.189.
- BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l], v. 1767, p. 1073–1101, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272807001375>. Acesso em: 4 abr. 2024.
- BIOESTATISTICA, Correlação Linear, Tipos de Correlação, Regressão Linear pelo Estudo da Correção Utilizando os Mínimos Quadrados. Aula 10. Disponível em: [https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalago/09222427022012Bioestatistica\\_Aula\\_10.pdf](https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalago/09222427022012Bioestatistica_Aula_10.pdf). Acesso: 2024.
- BRERETON, Richard. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.** UK: University of Bristol, 2003.
- BRASIL. Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 de setembro de 1990.

BRASIL. Instrução Normativa nº69, de 13 de dez. 2006. Estabelece 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”.

BRASIL. Instrução Normativa nº76, de 26 de nov. 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A.

BRASIL. Instrução Normativa nº77, de 26 de nov. 2018. Estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. 2. ed. Brasília: MAPA, 2019. 158 p. ISBN 978-85-7991-134-7.

Bremer MCEG, Kemmers-Voncken AEM, Boers EAM, Frankhuizen R, Haasnoot W. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. *Int Dairy J.* 2008;18:294-302.

BRITO, M. et al. Composição. Brasilia, 8 dez. 2021. Disponível em:  
[https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/composicao#:~:text=O%20leite%20%C3%A9%20uma%20combin%C3%A7%C3%A3o,prote%C3%ADnas%2C%20sais%20minerais%20e%20vitaminas. Acesso em: 18/03/2024.](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/composicao#:~:text=O%20leite%20%C3%A9%20uma%20combin%C3%A7%C3%A3o,prote%C3%ADnas%2C%20sais%20minerais%20e%20vitaminas. Acesso em: 18/03/2024.)

Carvalho Bruna Mara Aparecida, Carvalho Lorendane Milena, Alcântara Lizzy Ayra Pereira Alcantara, Bonomo Renata Cristina Ferreira. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. *RedVet.* 2007;8(6):1695-7504.

CARVALHO, GLAUCO R., Consumo mundial de leite: de 2000 a 2021. EMBRAPA, Anuario do Leite, 2023, p.56.

CASADIO, Y. S. et al. Evaluation of a Mid-Infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk. *Journal of Human Lactation*, v. 26, n. 4, p. 376-383, 2010.

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

CHAGURI, J.; Cromatografia Líquida, Centro de Assistencia Toxicologica, Botucatu, 2021, Universidade Estadual Paulista, Disponivel em:  
[https://ceatox.ibb.unesp.br/padrao.php?id=15#:~:text=High%2Dperformance%20liquido%20chromatography%20\(HPLC,um%20dos%20componentes%20 numa%20mistura. Acesso em: 18/03/2024](https://ceatox.ibb.unesp.br/padrao.php?id=15#:~:text=High%2Dperformance%20liquido%20chromatography%20(HPLC,um%20dos%20componentes%20 numa%20mistura. Acesso em: 18/03/2024)

Chu, L.; Macleod, A.; Ozimek, L. 1996: Isolation of glycomacropeptide from sodium caseinate hydrolysate solution by ultrafiltration. *Milchwissenschaft* 51(6): 303-306

CIENFUEGOS F.; VAITSMAN D. S. Análise instrumental. Rio de Janeiro: Interciênciac, 2000. 606 p.

COLLINS, Carlos H., BRAGA, Giberto.L., BONATO, Pierina.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

CORTEZ, N. Diagnóstico da produção do soro de queijo no estado do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

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

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

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

Duarte, V. S., et al. (2020). Comparative evaluation of cheese whey microbial composition from four Italian cheese factories by viable counts and 16S rRNA gene amplicon sequencing. *International Dairy Journal*, 104, 104656.

Dracz S. Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de queijo em leite [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1996.

DUFOUR, Éric. *Principles of Infrared Spectroscopy*. In: SUN, Da-Wen (Org.). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. 1. ed. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009. p. 3–26. 9780123741363.

ETZION, Y.; LINKER, R.; COGAN, U.; SHMULEVICH, I. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, v. 87 (9), p. 2779-88. 2004.

FAGAN, C. C. et al. Milk and dairy products. In: SUN, D. (Org.). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. 1. ed. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009. p. 241-267.

FAGNANI, R. Principais fraudes em leite. [Paraná], 13 jun. 2016. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/rafael-fagnani/principais-fraudes-em-leite-100551n.aspx>. Acesso em: 20 set. 2021.

FERRÃO, M. F.; MELLO, C.; BORIN, A.; MARETTO, D. A.; POPPI, R. J. LSSVM: uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. *Comparação de*

modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. *Química Nova*, v.30, n.4, p.852-859, 2007.

FERRARINI, Hair. Determinação de teores nutricionais do milho por Espectroscopia no Infravermelho e Calibração Multivariada. Universidade Federal do Paraná, 2004.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v. 22, p. 724–731, 1999.

FILHO, Paulo Augusto, Estudo comparativo de técnicas de inteligência artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

Floyd, F. J., & Widaman K. F. (1995). Factor analysis in the development and refinement of clinical assessment instruments. *Psychological Assessment*, 7, 286-299.

FOSS, MilkoScan FT1, Software Manual - 60044622, Rev. 11, 2019.

FOX, P. F. Advanced Dairy Chemistry. Ed. Chapman & Hall. v.3, 519 p.1997.

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

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

FRANÇA, A.S.; OLIVEIRA, L. S. Potential Uses of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). *Food Processing and Engineering*, cap. 4, p. 211-257, 2011.

FRASER, C. G.; FOGARTY, Y. (1989). "Interpreting laboratory results". *BMJ (Clinical Research Ed.)*. 298 (6689): 1659–1660.

FUKUDA, S.P.; ROIG, S.M.; PRATA, L.F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *Lait*, v. 84, p.501-512, 2004.

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

FURTADO, Marco Antonio Morerira. *Fraudes em leite de consumo: Limites de detecção*. Revista Leite e Derivados, n. 29. Julho/Agosto, 1996.

HANFORD, C.E.; CAMPBELL, K.; ELLIOTT, C. T. Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.15, n. 1, p. 130-142, 2016.

HELPFER, G. A.; FERRÃO, M. F.; FERREIRA, C. V.; HERMES, N. Aplicação de

métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. Ciência e Tecnologia de Alimentos v. 26 (4), p. 779-786. 2006.

HOLLER, James.; SKOOG, Douglas. A.; CROUCH, Stanley. R. Princípios de análise instrumental. 6º edição. São Paulo: Bookman. 2009, 1056 p.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal Component Analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions Series A, Mathematical, physical and engineering sciences*, v. 374, n. 2065, 2016.

KARTHEEK M. A.; SMITH A.; MUTHU A. K.; MANAVALAN R. Determination of adulterants in food: A review. *J. Chem. Pharm. Res.* v. 3 (2), p. 629-636. 2011.

KONG J.; YU SHAONING. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* v. 39(8): p. 549–559. 2007.

LANÇAS, F. M., A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Revista Trimestral do Instituto Internacional de Cromatografia Scientia Chromatographica* v. 1: p.37, 2009

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

LIN, M. et al. Infrared (IR) Spectroscopy - Near- Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy. In: SUN, D. (Org.). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. 1. ed. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009. p. 119-143.

LUIZ, Leonardo Conceição. Espectroscopia óptica para detecção de resíduo de antibióticos em leite, Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2019.

LUTZ, I. A. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. 1020 p.

LYNCH, J. M. et al. Precalibration Evaluation Procedures for Mid-Infrared Milk Analyzers. *Journal of Dairy Science*. v. 89 (7), 2006.

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. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MAGANHA, M. F. B. Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos - Série P + L. São Paulo: CETESB, 2008. 95p.

MAPA, Mapa do Leite, 2023, Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/portal-do-leite/mapa-do-leite/>.

Mendonça L. S. O. , L.S., Mendonça, A.S., Santana, A. C. de M.. Detecção de soro de leite como adição fraudulenta em leites comercializados no município de Itabuna, BA. Higiene Alimentar - Vol.31 - nº 266/267 - Março/Abril de 2017. páginas 75-79.

Merkel, A., Voropaeva, D., & Ondrušekc, M. (2021). The impact of integrated nanofiltration and electrodialytic processes on the chemical composition of sweet and acid whey streams. *Journal of Food Engineering*, 298, 110500.

MONTEIRO, F.K.C Utilização da espectroscopia de infravermelho próximo para quantificação de adição de soro em leite. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015. p. 17.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. *Food Science and Technology*, v. 25 (1), p. 25-31. 2005.

Oliveira GB, Gatti MDS, Valadão RC, Martins JFP, Luchese RH. Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*.

Oliveira DT, Camera L, Noskoski L. Adulteração em leite fluído – Revisão Bibliográfica. XVI Seminário. Interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão. UNICRUZ, Cruz Alta (RS), 2011.

Oliveira GBO. Detecção da Adição Fraudulenta de Soro de Queijo em leite: Interferência da Atividade de Proteases Bacterianas [dissertação de mestrado]. Seropédica (RJ): Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2009.

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

Ozaki Y, McClure WF, Christy AA. Livestock Animal By-Products. In: *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. 10th ed. New Jersey; Wiley-Interscience 2007.311 p.

PAIVA A.L.C., Teixeira R.B., Yamaki M, Menezes GRO, Leite CDS, Torres RA. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. *Rev Bras Zootec.* 2010;39(2):285–288.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. *Introdução à Espectroscopia*. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

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

P.R. Lobato, J.P.M. Heringer, M.E.R. Fortini, L.F. Ferreira, F.A.C. Feijó, M.O. Leite, M.M.O.P. Cerqueira, C.A.M. Penna, M.R.. Souza, L.M. Fonseca. Índice de CMP em leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais, Brasil, durante os anos de 2011 a 2017.

PINTO, A.T., UBERTI, A., O Leite e suas principais fraudes. Revista: Ciência e Tecnologia de Alimentos: o avanço da ciência no Brasil, Vol. 1, Editora Científica Digital, p. 153, 2022.

Pires, A. F., et al. (2021). Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. Foods, 10, 1067.

Recio I, Garcia-Risco MR, Ramos M, López-Fandin R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on k-casein. J Dairy Res.2000;67:625-30.

RENHE,Italo Tuler; PERRONE, Paulo Henrique Fonseca da Silva. Leite Condensado. Identidade, qualidade e tecnologia, Juiz de Fora: Templo, 2011, p 45-47.

RENTERO, Nelson; Carta ao leitor In: Anuário Leite Embrapa 2019. Edição Digital em: embrapa.br/gado-de-leite p.3-4. Acessado em: 10 de outubro 2020.

RODRIGUES, L. do N. Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados para a produção de etanol celulósico. 2012. 143f. Dissertação (Mestrado em física) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; ALLENDORF, M.E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. Annual Review of Food Science and Technology v. 2, n. 1, p. 467–483 , 2011.1941-1413.

ROSADO, Fernando, Outliers em Dados Estatísticos, Lisboa, Sociedade Portuguesa de Estatística, 2006.

SABIN, JANUSA GOELZER; FERRAO, MARCO FLÔRES. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. Rev. Bras. Cienc. Farm. [online]. 2004, vol.40, n.3, pp. 387-396. ISSN 1516-9332.

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

SANTOS, P. M. et al. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. Revista Brasileira de Engenharia Biomedica v. 28, n. 4, p. 398–409 , 2012.

- Schuck, P., et al. (2004). Drying of whey and derivatives: role of lactose and water dynamics. *Le lait*, 84(3), 243-268.
- Setiowati, A. D., Wijaya, W., & Meeran, P. V. (2020). Whey protein-polysaccharide conjugates obtained via dry heat treatment to improve the heat stability of whey protein stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 150-161.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *RevNutr*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- SILVA, N. F. N. Desfosforilação de caseínas por via enzimática e química. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- SKOOG, Douglas; WEST, Donald; HOLLER, James; CROUCH, Stanley. Fundamentos de química analítica. Tradução da 8<sup>a</sup> ed. norte americana, editora Thomson, 2006.
- SOUZA, A. B. Avaliação da influência tecnológica da relação soro-proteína/caseínas durante condições simuladas de processamento térmico. 2013 - Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- SOYEURT, H. et al. Estimating Fatty Acid Content in Cow Milk Using Mid-Infrared Spectrometry. *J. Dairy Sci.* v.89, p.3690–3695. 2006.
- Tavares, G. M. (2020). Proteínas do soro de leite: aspectos físico-químicos e estruturais. In Carvalho, A. F., et al. (Org.), *Química e tecnologia do soro de leite* (1 ed., pp. 19-27). Juiz de Fora: Innóvite.
- TERRA, L. A. Avaliação de transformação polimórfica em comprimidos do fármaco carbamazepina por espectroscopia de imagem no infravermelho próximo e ferramentas quimiometricas. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- TORRES, R. A. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. *Rev. Brasileira de Zootec*, v. 39, n. 2, p. 285-288, 2010.
- TSERMOULA, P., et al. (2021). WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 230-241.
- UFMS. Unidade II – Teoria De Erros. Disponível em: <https://infi.ufms.br/files/2018/07/Aula-3-UNIDADE-II-TEORIA-DE-ERROS.pdf>. Acesso em: 20/04/2024.
- VIANA, Livia Cassia. Uso da espectroscopia no infravermelho próximo para predição de propriedades tecnológicas da madeira de eucalyptus. 2008 - Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VIOTTO, W.H. Ultrafiltração de soro doce de queijo minas fescal: efeito de pré tratamento de soro no desempenho na membrana de ultrafiltração e na composição e solubilidade do concentrado protéico de soro. 1993. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

WALSTRA, Pieter., WOUTERS, Jan. , & GEURTS, Tom. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2. ed. Taylor & Francis Group, Inc. Broken Sound Parkway, New York. 763 p.

Wherry, B., Barbano, D. M., & Drake, M. A. (2019). Use of acid whey protein concentrate as an ingrediente in nonfat cup set-style yogurt. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 8768-8784.

WILSON, R. H.; TAPP, H. S. Mid-infrared spectroscopy for food analysis: Recent new applications and relevant developments in sample presentation methods. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 18 (2), p. 85-93. 1999.

Zhang, L., et al. (2021). Heat-induced denaturation and bioactivity changes of whey proteins. *International Dairy Journal*, 123, 105175.

Zhao, C., Chen, N., & Ashaolu, T. J. (2022). Whey proteins and peptides in health-promoting functions – A review. *International Dairy Journal*, 126, 105269.

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/portal-do-leite/mapa-do-leite>. Acessado em 15/12/2022.

<https://operon.es/stick-cgmp/>. Acessado em 11/01/2023.