

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Física

Thiago de Oliveira Mendes

Espectroscopia FT-MIR e calibração multivariada para determinação simultânea dos teores de gordura, proteínas e lactose e adulterações por adição de água em amostras de leite.

Juiz de Fora

2011

Thiago de Oliveira Mendes

Espectroscopia FT-MIR e calibração multivariada para determinação simultânea dos teores de gordura, proteínas e lactose e adulterações por adição de água em amostras de leite.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, na área de concentração em Física da matéria condensada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientadora: Dra. Maria José Valenzuela Bell

Juiz de Fora

2011

Ficha catalográfica elaborada através do Modelo Latex do CDC da UFJF
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes, Thiago de Oliveira.

Espectroscopia FT-MIR e calibração multivariada para determinação simultânea dos teores de gordura, proteínas e lactose e adulterações por adição de água em amostras de leite. / Thiago de Oliveira Mendes. – 2011. 72 f. : il.

Orientadora: Dra. Maria José Valenzuela Bell

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física, 2011.

1. Infravermelho. 2. Leite. 3. Controle de qualidade. I. Bell, Maria José Valenzuela. II. Título.

Thiago de Oliveira Mendes

Espectroscopia FT-MIR e calibração multivariada para determinação simultânea dos teores de gordura, proteínas e lactose e adulterações por adição de água em amostras de leite.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, na área de concentração em Física da matéria condensada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada em: 5 de agosto de 2011

BANCA EXAMINADORA

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

Professor Dra. Marta Fonseca Martins Guimarães
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Professor Dr. Marco Antônio Moreira Furtado
Universidade Federal de Juiz de Fora

Professor Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meus caminhos e guiar minha vida.

A minha esposa BRENDA, pois sem ela, nem sei...

Aos meus pais, José Calixto e Maria Aparecida, por todo apoio e compreensão.

A minha orientadora, professora Maria José, que acreditou em mim e me concedeu a oportunidade de trabalhar no laboratório de espectroscopia de materiais.

Ao chefe de grupo, professor Virgílio pelo apoio à pesquisa e ao professor Marcone pela atenção com os tratamentos estatísticos.

Aos demais familiares que de alguma forma contribuíram para a minha saga e aos companheiros do curso de física, em especial para a minha turma de mestrado: Rochedo, gato Félix, Cyborg, Zé Henrique, Baiano e Rodrigo. Ao Geraldo pela ajuda com o Latex e ao Frajola pela experiência nos trabalhos com leite.

Agradeço ao Domingos, secretário da pós-graduação, por toda a sua cordialidade.

A Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Física (minha segunda casa).

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq e Fapemig pelo auxílio financeiro do projeto.

- 1: A matemática é a linguagem da natureza.
- 2: Tudo pode ser representado e compreendido através de números.
- 3: Ao fazer gráficos dos números de quaisquer sistemas, surgem padrões.

Darren Aronofsky

RESUMO

A quantificação dos constituintes do leite é determinante para o estabelecimento de sua qualidade nutricional, adequação ao consumo humano e valor de mercado do produto. Estima-se que o leite possua aproximadamente 100 mil constituintes distintos, embora a maioria deles ainda não tenham sido identificados. Os principais constituintes do leite são a água, lipídeos (gordura), proteínas e a lactose, já os minerais e vitaminas são chamadas de constituintes secundários. Estes constituintes, sua distribuição e interações determinam as características físicas do leite, tais características são monitoradas por instituições especializadas a fim de verificar a ocorrência de problemas que afetam a composição do leite bem como verificar as suspeitas de adulteração do produto após a ordenha. O objetivo do presente trabalho foi de aplicar a técnica de espectroscopia na região do infravermelho-médio para a identificação e quantificação dos constituintes principais do leite (gordura, proteínas e lactose), bem como a determinação do percentual de água adicionada em amostras de leite líquido. A técnica aplicada apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade de resultados. Como resultados verificou-se que a metodologia de análise desenvolvida neste trabalho não apresentou diferença quando comparada com os resultados obtidos pelas metodologias oficiais de análise na quantificação dos teores de gordura, proteínas e lactose em amostras de leite líquido, o mesmo foi observado para a determinação do percentual de água adicionada ao leite. As vantagens de se utilizar esta técnica espectroscópica na análise de leite é que além de ser uma técnica rápida quando comparada aos tradicionais métodos de bancada, pode-se analisar cerca de 40 amostras em uma hora, também é de baixo custo, já que não são necessários reagentes químicos nem preparo da amostra.

Palavras-chave: Infravermelho. Leite. Controle de qualidade.

ABSTRACT

The quantification of the constituents of milk is crucial for the establishment of its nutritional quality, fitness for human consumption and market value of the product. It is estimated that milk has approximately 100,000 different constituents, although most of them have not yet been identified. The main constituents of milk are water, lipids (fats), proteins and lactose, and the minerals and vitamins are called secondary constituents. These constituents, their distribution and interactions determine the physical characteristics of milk, that are monitored by specialized institutions to verify the occurrence of problems that affect the composition of milk and check the suspected tampering of the product after milking. The objective of this study was to apply the technique of infrared spectroscopy in the medium-red region for the identification and quantification of the major constituents of the milk (fat, protein and lactose), as well as determining the percentage of added water in samples of liquid milk. The technique used has high sensitivity and reproducibility of results. As a result it was found that the methodology of analysis developed in this study showed no difference compared with the results obtained by official methods of analysis to quantify the levels of fat, protein and lactose in samples of liquid milk, the same was observed for the determination the percentage of water added to milk. The advantages of using this spectroscopic technique in the analysis of milk is that, besides being a rapid technique compared to traditional methods of chemical analysis, you can analyze about 40 samples in one hour, it is also inexpensive, since it is not necessary any chemical reagents or sample preparation.

Key-words: Infrared. Milk. Quality control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Formação da estrutura química da molécula de gordura.	18
Figura 2	–	Formação da estrutura química da molécula de proteína.	20
Figura 3	–	Formação da estrutura química da molécula de lactose.	21
Figura 4	–	Modelo para interação do campo \vec{E} com a matéria.	23
Figura 5	–	Modelo para o cálculo de \vec{P}	24
Figura 6	–	Massa-mola e a frequência natural de oscilação.	25
Figura 7	–	Interferência.	26
Figura 8	–	Intensidade de luz em função de δ e respectivo padrão de franjas de interferência.	28
Figura 9	–	Esquema do Interferômetro de Michelson.	29
Figura 10	–	Simulação das funções $f(t)$, $g(\omega)$ e $G(\omega)$ para uma fonte monocromática.	32
Figura 11	–	Simulação das funções $f(t)$, $g(\omega)$ e $G(\omega)$ para uma fonte não-monocromática.	32
Figura 12	–	Medida de transmitância - Espectrofotômetro por transformada de Fourier.	33
Figura 13	–	Parâmetros da Lei de Beer-Lambert.	34
Figura 14	–	Representação de um tensor de ordem zero, primeira e segunda ordem.	37
Figura 15	–	Interface do software utilizado para a regressão PLS.	41
Figura 16	–	Emissão da lâmpada de infravermelho do espectrofotômetro Bruker-Vextex70.	44
Figura 17	–	Espectro de transmitância da janela de CaF_2 utilizada no porta amostra.	45
Figura 18	–	Porta amostra.	45
Figura 19	–	Espectro de transmitância na região do infravermelho médio - amostra de leite líquido. Á esquerda o espectro de absorbância da mesma amostra.	46
Figura 20	–	Espectro de transmitância da água em diferentes temperaturas - regiões de interesse para quantificação dos constituintes principais do leite.	48
Figura 21	–	Derivada segunda da transmitância para amostra de leite. Destaque para as regiões de absorção da lactose - L, gordura - G e proteína - P.	49
Figura 22	–	Preparo da amostra para determinação dos teores de gordura, proteína e lactose em amostras de leite UHT.	50
Figura 23	–	Preparo da amostra para determinação dos teores de gordura, proteínas e lactose em amostras de leite cru.	51
Figura 24	–	Preparo da amostra para determinação do percentual de água adicionada em amostras de leite UHT.	52
Figura 25	–	Resposta da regressão PLS - Gráficos de scores para gordura, proteína e lactose.	61
Figura 26	–	Tabela de valores da distribuição t-student.	71
Figura 27	–	Tabela de valores da distribuição F.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Produção mundial de leite de vaca em 2007.	15
Tabela 2	– Constituintes do Leite.	15
Tabela 3	– Métodos de análise de água no leite.	17
Tabela 4	– Métodos de análise de gordura no leite.	19
Tabela 5	– Métodos de análise de proteína no leite.	20
Tabela 6	– Métodos de análise de lactose no leite.	22
Tabela 7	– Representação de um planejamento fatorial $N = 2^2$	36
Tabela 8	– Matriz B da Regressão Linear Múltipla.	38
Tabela 9	– Matriz X da Regressão Linear Múltipla.	39
Tabela 10	– Matriz Y da Regressão Linear Múltipla.	39
Tabela 11	– Planejamento fatorial para determinação das condições experimentais.	47
Tabela 12	– Condições experimentais otimizadas.	48
Tabela 13	– Matriz Y - concentração dos constituintes principais do leite pelo método LactoScope.	53
Tabela 14	– Matriz X - medida de transmitância pelo método FTIR.	54
Tabela 15	– Matriz B - coeficientes da regressão MLR para leite UHT.	54
Tabela 16	– Percentual de gordura, proteína e lactose obtidos pelo LactoScope e MLR - FTIR.	55
Tabela 17	– Diferença percentual entre as medidas realizadas pelo método LactoScope e FTIR.	56
Tabela 18	– Matriz Y - concentração dos constituintes principais do leite obtidos através dos métodos de referência Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon, respectivamente.	57
Tabela 19	– Matriz X - medida de transmitância pelo método FTIR.	58
Tabela 20	– Matriz B - coeficientes da regressão MLR para leite cru.	58
Tabela 21	– Percentual de gordura, proteína e lactose obtidos pelos métodos oficiais (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon, respectivamente) e MLR - FTIR.	59
Tabela 22	– Diferença percentual entre as medidas realizadas pelo método oficial (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon) e pelo método de FTIR utilizando regressão MLR.	60
Tabela 23	– Percentual de gordura, proteína e lactose obtidos pelos métodos oficiais (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon, respectivamente) e PLS - FTIR.	61
Tabela 24	– Diferença percentual entre as medidas realizadas pelos métodos oficiais (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon) e pelo método de FTIR utilizando regressão PLS.	62
Tabela 25	– Dados obtidos para a elaboração da regressão do percentual de água adicionada no leite.	63
Tabela 26	– Percentual de água adicionada ao leite pelo método de crioscopia eletrônica e pelo método de FTIR e diferença percentual entre as duas medidas.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaF ₂	Fluoreto de Cálcio
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
FTMIR	Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Mid Infrared</i>)
HPLC	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IDF	Federação Internacional de Lácteos (<i>International Dairy Federation</i>)
ILCT	Instituto de Laticínios Cândido Tostes
IN51	Instrução Normativa número 51
IN68	Instrução Normativa número 68
KBr	Brometo de Potássio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MLR	Regressão Linear Múltipla (<i>Multiple Linear Regression</i>)
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Square</i>)
UHT	Ultrapasteurizado por tratamento térmico especial (<i>Ultra Right Temperature</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	O OBJETO DE ESTUDO: O LEITE	14
2.1	VISÃO GERAL	14
2.2	CONSTITUINTES PRINCIPAIS DO LEITE E MÉTODOS DE ANÁLISE	15
2.2.1	ÁGUA	16
2.2.2	GORDURA	17
2.2.3	PROTEÍNAS	19
2.2.4	LACTOSE	21
3	ASPECTOS TEÓRICOS	23
3.1	ABSORÇÃO MOLECULAR	23
3.2	ESPECTROSCOPIA COM TRANSFORMADA DE FOURIER	26
3.3	QUIMIOMETRIA	35
3.3.1	Planejamento de Experimentos	35
3.3.2	Regressão	37
3.3.2.1	<i>Regressão Linear Múltipla MLR</i>	38
3.3.2.2	<i>Regressão por Mínimos Quadrados Parciais PLS</i>	39
3.3.3	Testes Estatísticos	41
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	44
4.1	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE UHT	49
4.2	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE CRU	50
4.3	DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE ÁGUA ADICIONADA EM AMOSTRAS DE LEITE UHT	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE UHT	53
5.2	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE CRU	56
5.3	DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE ÁGUA ADICIONADA EM AMOSTRAS DE LEITE UHT	62
6	CONCLUSÃO	65

REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A – Protótipo Dedicado a Determinação Do Percentual De Água Adicionada Ao Leite.	70
ANEXO A – Distribuição t-student	71
ANEXO B – Distribuição F	72

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de alimentos baseia-se principalmente em duas abordagens: a medida de propriedades físicas como fonte de informação e a automação de métodos químicos [1]. Como medida de propriedades físicas pode-se citar a medida da densidade, índice de refração, condutividade elétrica, ponto de congelamento, energia vibracional molecular e outras. Já como métodos químicos uma caracterização exige por muitas vezes o preparo da amostra, com passos de extração com solventes, saponificação, derivatização, para uma posterior classificação por meio de reações químicas ou ainda, no caso das técnicas de separação, utiliza-se padrões das substâncias para construção da curva de calibração, mas se analisa apenas uma classe de compostos.

Destes métodos analíticos, os que são baseados em medidas de propriedades físicas através da espectroscopia são considerados os mais rápidos [1]. A espectroscopia pode ser dividida em dois grandes grupos: a espectroscopia fotônica, relacionada a interação da radiação eletromagnética com a matéria, e, por um abuso de linguagem, a espectroscopia de massas, relacionada a medida de partículas, ambas com alto potencial analítico.

O presente trabalho tem dois objetivos. O primeiro é de verificar a sensibilidade da espectroscopia na região do infravermelho médio para identificação e quantificação dos constituintes principais do leite em amostras de leite líquido, visto que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura utilizam a região do infravermelho próximo quando existe grande quantidade de água nas amostras [2–7]. Isso acontece porque a água tem baixa absorção na região do infravermelho próximo.

A segundo objetivo tem como finalidade inferir sobre possíveis adulterações no leite devido a adição de água e posteriormente, desenvolver fotômetros microcontrolados dedicados à análise da qualidade do leite.

Na seção 2 apresenta-se o objeto de estudo, o leite oriundo de vaca, e discute-se sobre a necessidade de um método de análise de rotina que seja rápido [8] e reprodutível pois se trata de um grande volume de amostra a ser analisada, além do fato do leite de ser um material perecível. Nesta seção também são apresentados os principais métodos de análise previstos na Instrução Normativa Número 51 (IN51) para análise dos constituintes principais do leite [9].

Uma discussão sobre a formulação teórica do problema físico envolvido na caracterização das moléculas de interesse presentes no leite é feita na seção 3. Nesta seção também é apresentada uma abordagem clássica da interação da radiação eletromagnética com a matéria e do mecanismo instrumental utilizado nos experimentos, a espectroscopia com transformada de Fourier. Esta técnica apresenta inúmeras vantagens quando comparada com a utilização de equipamentos dispersivos [10]. Ainda na seção de aspectos teóricos

discute-se sobre o tratamento de dados por métodos quimiométricos.

Na seção 4 é descrito o procedimento experimental utilizado, espectrofotômetro de infravermelho, parâmetros de aquisição de dados, cuidados com a amostra, além do planejamento de experimentos realizado para melhorar o sistema de análise.

Os resultados decorrentes das medidas experimentais são apresentados na seção de número 5, com ênfase para as curvas de calibração dos analitos gordura, proteína e lactose em leite UHT e leite cru. Também são apresentados os resultados do modelo de previsão para determinação do percentual de água adicionada ao leite bem como testes estatísticos para comparação de medidas realizadas pela espectroscopia no infravermelho e pelas medidas realizadas a partir da metodologia oficial.

Ao final tem-se as conclusões e perspectivas deste trabalho e na sequência as referências para a elaboração do mesmo.

2 O OBJETO DE ESTUDO: O LEITE

2.1 VISÃO GERAL

Entende-se por leite, sem outra especificação, como o produto oriundo da ordenha de vacas. O leite proveniente de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda [11], ou seja, leite de cabra ou leite de búfala. O leite é um produto oriundo da secreção da glândula mamária, sendo uma mistura extremamente complexa e nutritiva com cerca de 12 a 13% de sua composição devido a diversos elementos sólidos que se encontram em solução ou em suspensão em aproximadamente 87% de água [12].

Os principais constituintes do leite são a água, lipídeos (gordura), proteínas e a lactose, e os minerais e vitaminas os constituintes secundários. A caseína, principal proteína do leite [13], encontra-se na forma de partículas (micelas) sólidas muito pequenas que ficam em suspensão. A gordura, também em suspensão, forma pequenos glóbulos que não se misturam com a água. A lactose, sais e vitaminas estão totalmente dissolvidos na água presente no leite.

Estes constituintes, sua distribuição e interações determinam as características físicas do leite. Tais características são monitoradas por instituições especializadas [9] a fim de verificar a ocorrência de problemas que afetam a composição do leite bem como verificar as suspeitas de adulteração do produto após a ordenha.

Além de importante fonte de alimento em uma dieta saudável, caracterizado como um dos alimentos mais ricos que se pode desfrutar [14], o leite tem também grande impacto econômico e social. Tanto na base da produção, zona rural, como nos centros de beneficiamento do produto, zona urbana, uma grande logística está envolvida, desde a escolha do terreno, trato do rebanho, cuidados com a ordenha, transporte, processamento e produtos secundários até sua comercialização como produto final.

Neste sentido é relevante mensurar a produção de leite que está diretamente relacionada com o volume de análises que devem ser realizadas diariamente. Esta grande produção de leite determina diretamente a técnica laboratorial de análise a ser empregada, técnica esta que deve proporcionar uma análise rápida, já que se trata de um produto altamente perecível. A tabela abaixo dá um panorama da produção mundial de leite de vaca [15].

Tabela 1 – Produção mundial de leite de vaca em 2007.

País	Produção de anual de Leite (toneladas)
Estados Unidos da América	85.9
Índia	48.1
China	35.2
Rússia	32.6
Brasil	28.0
Nova Zelândia	17.0
Paquistão	12.4
Ucrânia	11.6
Peru	11.6
Mexico	10.9
Argentina	10.3

Fonte: O AUTOR.

A maior parte da produção de leite no Brasil é devida a produção da região sudeste [16], com maior destaque para a produção do estado de Minas Gerais que entra no balanço com 28% do total da produção nacional [17], com aproximadamente 7 milhões de litros de leite por ano [16].

2.2 CONSTITUINTES PRINCIPAIS DO LEITE E MÉTODOS DE ANÁLISE

A quantificação dos constituintes do leite é determinante para o estabelecimento de sua qualidade nutricional, estabelecer se é ou não adequado ao consumo humano além de classificar o produto com um determinado valor de mercado. Estima-se que o leite possua aproximadamente 100 mil constituintes distintos, embora a maioria deles ainda não tenham sido identificados [18]. A composição do leite de vaca é apresentada na tabela abaixo [19].

Tabela 2 – Constituintes do Leite.

Constituinte	Teor (%)	Variação (%)
Água	87,3	85,5-88,7
Lactose	4,6	3,8-5,3
Gordura	3,9	2,4-5,5
Proteínas	3,25	2,3-4,4
Substâncias minerais	0,65	0,53-0,8
Ácidos orgânicos	0,18	0,13-0,22
Outros	0,12	-

Fonte: O AUTOR.

A quantidade de leite produzido assim como a sua composição apresentam variações decorrentes dos seguintes fatores: raça do gado, alimentação ingerida pelos animais, estação

do ano, doenças e período da lactação e ainda fraudes e adulterações.

A Instrução Normativa número 51 (IN51) [9] descreve os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade dos diferentes tipos de leite comercializados no Brasil, já os métodos oficiais de análises físico-químicas para o controle de leite e produtos lácteos adotados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são descritos pela Instrução Normativa número 68 (IN68) [20]. Uma descrição sucinta de tais métodos de análise é apresentada nas subseções que se seguem.

2.2.1 ÁGUA

A água é o constituinte encontrado em maior proporção no leite, sua maior parte encontra-se como água livre [18], embora haja água ligada a outros componentes como proteínas, lactose e substâncias minerais. A quantidade de água no leite é regulada pela quantidade de lactose sintetizada pelas células secretoras da glândula mamária. A água do leite provém do complexo de golgi, a partir da difusão da lactose para o interior das vesículas. Nesta migração, a água é incorporada por osmose [21]. A produção de leite é rapidamente afetada pelo suprimento de água e diminui no mesmo dia em que a água destinada ao consumo animal é limitada ou não está disponível.

A tabela 3 abaixo descreve a principal metodologia de análise para a determinação da quantidade de água adicionada ao leite, a crioscopia eletrônica, esta é a técnica oficial do MAPA. Ainda na tabela 3 é apresentado o funcionamento básico da quantificação de substâncias por métodos espectroscópicos onde se enquadra a metodologia discutida no presente trabalho, a espectroscopia no infravermelho médio.

Tabela 3 – Métodos de análise de água no leite.

Método	Princípio
Depressão do ponto de congelamento (IN68).	O super congelamento de uma amostra de leite a uma temperatura apropriada e aplicação de uma agitação mecânica ocasiona um rápido aumento da temperatura até um patamar o qual corresponde ao ponto de congelamento da amostra. Esta medida é realizada com um crioscópio eletrônico. O grau crioscópico do leite fraudado com água tende a aproximar-se de $0C$, ponto de congelamento da água. Uma leitura superior a $-0,530H(-0,512C)$ sugere indícios de adulteração por adição de água [9, 11, 18].
Espectroscopia.	O princípio utilizado na quantificação de analitos, por meio de métodos espectroscópicos, é a lei de Lambert-Beer, que estabelece que a quantidade de luz absorvida num determinado comprimento de onda, é diretamente proporcional a concentração da amostra. A molécula de água, apresenta forte absorção nas regiões próximas a 1660 , 3400 e em $2131cm^{-1}$. [22, 23].

Fonte: O AUTOR.

O método padrão para determinação do percentual de água adicionada ao leite segundo o Ministério da Agricultura é a crioscopia eletrônica [24], mas a medida do índice de refração e da densidade do leite também são indicadores de adição de água no leite.

2.2.2 GORDURA

A gordura, ocorre em sua maioria em pequenos glóbulos na forma de triacilglicerídeos formados pela ligação de glicerol a ácidos graxos. Cada glóbulo com diâmetro que varia de $0,1$ a $15 \mu m$ [19], é revestido por uma camada de fosfolipídios que previne os glóbulos de se agregarem entre si, esses fosfolipídeos provocam a repulsão a outros glóbulos de gordura e a atração de moléculas de água. O leite apresenta cerca de 440 ésteres diferentes [18], provenientes principalmente de unidades do glicerol esterificadas com ácidos de cadeia curta (menos de 8 átomos de carbono), mas também com ácidos de cadeia longa (acima de 12 carbonos), predominantemente o ácido oleico (monoinsaturado) e o ácido linoleico (poliinsaturado) [13]. A gordura é o constituinte que sofre a maior variação (tabela 2) em razão da alimentação, raça e estação do ano, e também é o constituinte mais avaliado no momento de agregar valor ao produto.

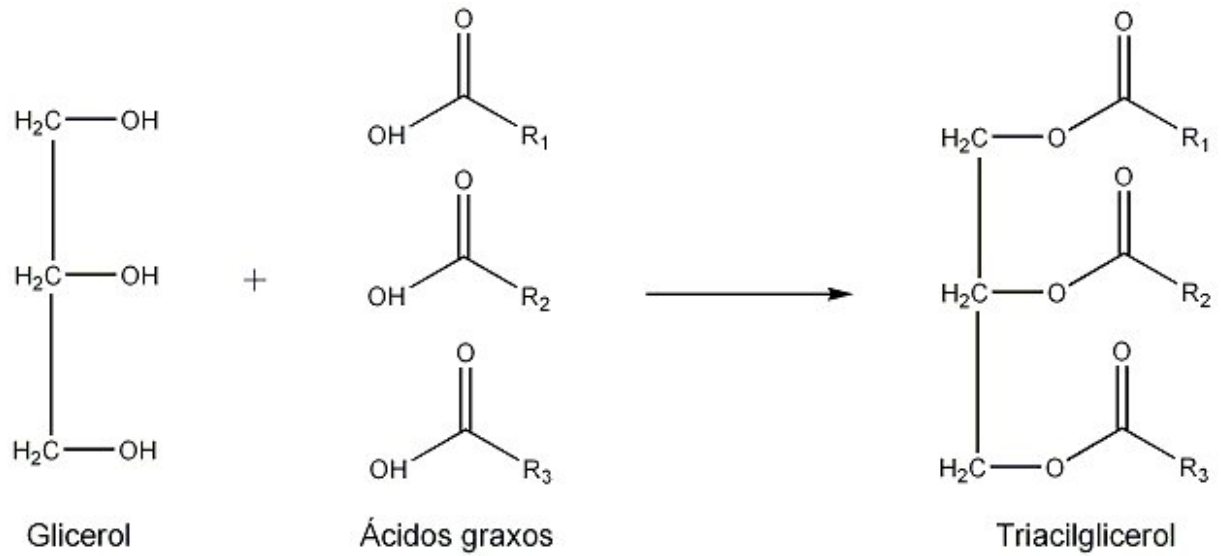


Figura 1 – Formação da estrutura química da molécula de gordura.

Fonte: O AUTOR.

R_1, R_2, R_3 , na figura 1, são cadeias carbônicas presentes nos ácidos graxos (oléico, linoleico...) que dão origem aos triacilglicerídeos suas características individuais [25].

A tabela 4 apresenta o método padrão para determinação da concentração de gordura total presente no leite e a região de interesse para a quantificação dos teores de gordura por meio de medidas espectroscópicas.

Tabela 4 – Métodos de análise de gordura no leite.

Método	Princípio
Roesse-Gottlieb (IN68).	Baseia-se no uso de hidróxido de amônio para solubilizar a caseína, neutralizar a acidez e reduzir a viscosidade; de álcool etílico para quebrar a emulsão gordura-caseína e da mistura éter etílico-éter de petróleo para extrair a gordura. O éter de petróleo é usado para diminuir a solubilidade das substâncias não lipídicas, solúveis no éter etílico. A gordura assim extraída é determinada gravimetricamente.
Butirométrico (Gerber) (IN68).	Baseia-se no ataque seletivo da matéria orgânica por meio de ácido sulfúrico, com exceção da gordura que será separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool amílico, que modifica a tensão superficial. A leitura é feita diretamente no Butirômetro de Gerber.
Espectroscopia.	O princípio utilizado é a lei de Lambert-Beer. O grupo carbonila presente nos ésteres, figura 1, absorve na região entre a $1736 - 1805\text{cm}^{-1}$ [22, 26–29], esta faixa espectral também é chamada de <i>gordura A</i> . Grupos CH, figura 1, (presentes em R_1, R_2, R_3, \dots) absorvem na região em torno de $2800 - 3000\text{cm}^{-1}$ [22, 26–29], esta região é chamada de <i>gordura B</i> . Estas absorções estabelecem os teores de gordura.

Fonte: O AUTOR.

Existem outros métodos que podem ser utilizados na determinação da gordura total presente no leite, contudo, os métodos de análise indicados pelo MAPA são os descritos na tabela 4. Neste trabalho, foi utilizado o método de Gerber para analisar o percentual de gordura presente no leite.

2.2.3 PROTEÍNAS

As proteínas representam 95% do total de compostos nitrogenados do leite bovino, o nitrogênio protéico é constituído por cerca de 80% de nitrogênio caseínico e 20% de nitrogênio não-caseínico (albuminas e globulinas) [12]. Diversos fatores influenciam na composição das proteínas do leite tais como a temperatura ambiente, doenças do animal, número de parições e teor energético da alimentação. Os blocos construtores das proteínas são os aminoácidos, a figura abaixo apresenta a estrutura geral de uma proteína, aminoácidos unidos por ligações peptídicas.

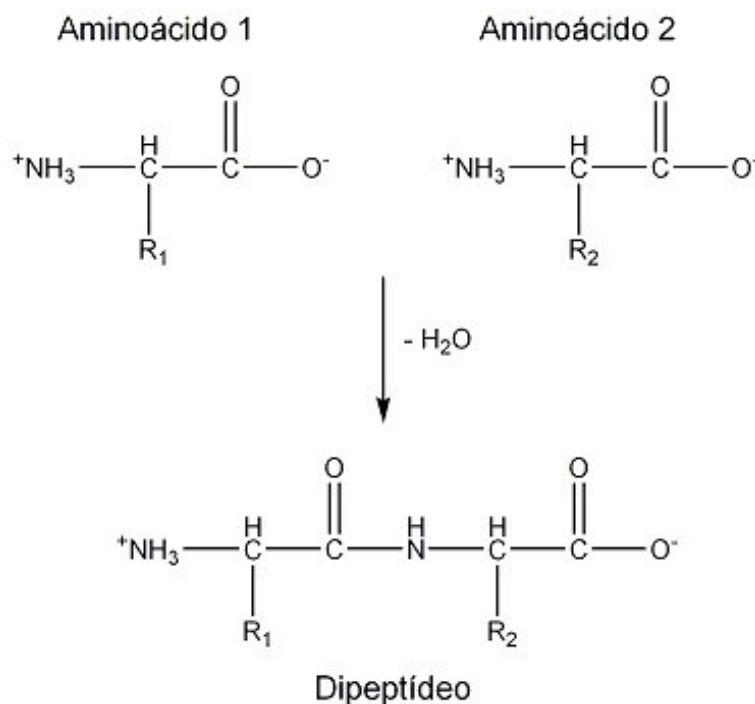


Figura 2 – Formação da estrutura química da molécula de proteína.

Fonte: O AUTOR.

A tabela 5 descreve o método padrão para a determinação da concentração de proteínas presentes no leite e a região de interesse para a quantificação dos teores de proteínas por meio de medidas espectroscópicas.

Tabela 5 – Métodos de análise de proteína no leite.

Método	Princípio
Nitrogênio total (Kjeldahl) (IN68).	Baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico p.a. e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada [11, 26].
Espectroscopia.	O princípio utilizado é a lei de Lambert-Beer. As proteínas são formadas pela união do grupo amino de um aminoácido com o grupo carboxila de outro aminoácido, a junção destes dois grupos dá origem a um grupo amida, chamada de ligação peptídica [30], figura 2. Estas ligações peptídicas absorvem em torno de $1538 - 1570\text{cm}^{-1}$ [22, 26–29] e são relacionadas aos teores de proteínas totais do leite.

Fonte: O AUTOR.

O método utilizado neste trabalho para determinar o teor de proteínas no leite foi o método de Kjeldahl. Este é considerado método referência para a determinação do percentual de proteínas presente no leite [24], entretanto, outros métodos são utilizados para esta determinação, como métodos colorimétricos e titulação, que embora sejam mais rápidos e mais práticos que o Kjeldahl não são considerados como métodos de referência pelo MAPA.

2.2.4 LACTOSE

A lactose é o carboidrato característico do leite [12], formado a partir da união de uma molécula de glicose com uma molécula de galactose, figura 3, sendo o constituinte sólido presente no leite que sofre menor variação de sua composição, tabela 2.

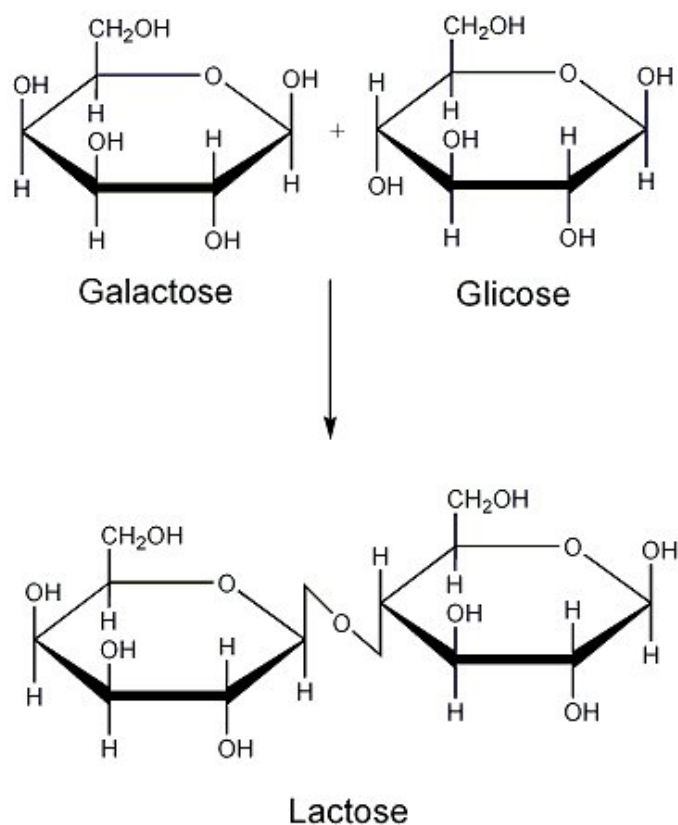


Figura 3 – Formação da estrutura química da molécula de lactose.

Fonte: O AUTOR.

A tabela abaixo descreve uma das principais metodologias disponíveis para a determinação da concentração de lactose no leite e a região de interesse para a quantificação dos teores de lactose por meio medidas espectroscópicas.

Tabela 6 – Métodos de análise de lactose no leite.

Método	Princípio
Lane-Eynon (IN68).	Fundamenta-se na redução dos íons cúpricos a íons cuprosos pelo açúcar redutor em meio alcalino, a quente [11, 26].
Cloramina-T (IN68).	Fundamenta-se na quantidade de iodo liberada por uma amostra adicionada de cloramina-T e iodeto de potássio.
Espectroscopia.	O princípio utilizado é a lei de Lambert-Beer. Os grupos hidroxila da lactose, figura 3, absorvem em torno de $1039 - 1041\text{cm}^{-1}$ [22, 26, 27, 29], a absorção nesta região determina os teores de lactose presente no leite.

Fonte: O AUTOR.

A metodologia padrão descrita pela Federação Internacional de Lácteos (*International Dairy Federation* - IDF) para análise de lactose é através de cromatografia a líquido de alta eficiência - HPLC e também pela medida de absorção na região do ultra-violeta em 340 nm após adequado tratamento da amostra [24].

Contudo, o MAPA considera como oficiais os métodos descritos na tabela 6, neste trabalho utilizou-se o método de Lane-Eynon na determinação dos teores de lactose presente no leite.

3 ASPECTOS TEÓRICOS

3.1 ABSORÇÃO MOLECULAR

O objetivo desta seção é apresentar a formulação teórica do fenômeno físico envolvido na interação entre uma onda eletromagnética e o meio material, centrando a discussão no que diz respeito à absorção molecular.

Um modelo clássico para a abordagem desta seção é apresentado pela figura abaixo:

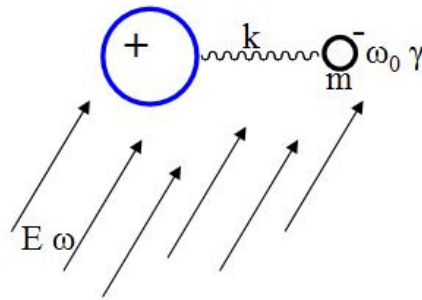


Figura 4 – Modelo para interação do campo \vec{E} com a matéria.

Fonte: O AUTOR.

A equação de movimento para o elétron com carga $-e$, com massa m preso ao núcleo atômico por uma força elástica que o faz oscilar com frequência ω_0 em torno da posição de equilíbrio, sujeito a um amortecimento e forçado pela atuação de um campo elétrico \vec{E} é descrita por [31]:

$$m \frac{d^2 \vec{x}}{dt^2} + \gamma m \frac{d\vec{x}}{dt} + m\omega_0^2 \vec{x} = -e\vec{E} \quad (3.1)$$

Usando a aproximação de que o elétron não tem inércia, ou seja, ele irá oscilar com a mesma frequência ω do campo \vec{E} aplicado, tem-se:

$$x = x_0 e^{-i\omega t} \quad (3.2)$$

onde \vec{x} representa o vetor posição do elétron e γ , presente na força de arraste, é a constante de amortecimento proporcional a velocidade de oscilação do elétron. Substituindo a solução de (3.2) em (3.1), chega-se à:

$$\vec{x} = -\frac{e}{m} (\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)^{-1} \vec{E} \quad (3.3)$$

Como a contribuição para o momento de dipolo, por elétron é:

$$\vec{P} = -e\vec{x} \quad (3.4)$$

usando a eq. (3.3) pode-se escrever o momento de dipolo \vec{P} como:

$$\vec{P} = \frac{e^2}{m}(\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega)^{-1}\vec{E} \quad (3.5)$$

Generalizando este resultado para N moléculas por unidade de volume e cada átomo com Z elétrons, fig. 5 abaixo, tem-se a eq. (3.5) modificada para

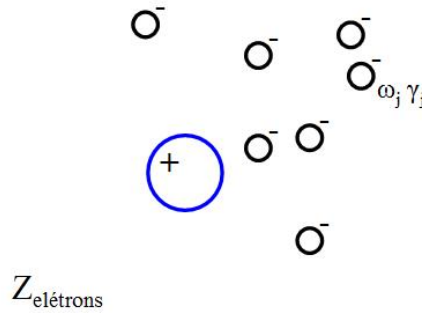


Figura 5 – Modelo para o cálculo de \vec{P} .

Fonte: O AUTOR.

$$\vec{P} = \sum \vec{P}_j = \frac{Ne^2}{m} \sum f_j(\omega_j^2 - \omega^2 - i\gamma_j\omega)^{-1}\vec{E} \quad (3.6)$$

onde tem-se f_j elétrons por molécula e a soma deste é Z elétrons por molécula ($= \text{sum} f_j$).

Nesta equação, (3.6), pode-se ver claramente que o comportamento da polarização da molécula muda abruptamente quando a frequência ω do campo \vec{E} aplicado se aproxima da frequência ω_j natural de oscilação do elétron. Quando isso ocorre, o denominador da eq. (3.6), entre parenteses, tem um mínimo, logo, o valor de \vec{P} um máximo.

Fazendo o uso das equações de Maxwell no meio material [32]: eq:m1 $\nabla \times \vec{E} = -\mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t}$
 eq : m2 $\nabla \times \vec{H} = \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} + \vec{J}$
 eq : m3 $\nabla \cdot \vec{E} = -\frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \vec{P}$
 eq : m4 $\nabla \cdot \vec{H} = 0$ tomando o rotacional de (??) e com o uso de (??) e (3.6), chega-se a:

$$\nabla^2 \vec{E} = \mu\varepsilon \left(1 + \frac{Ne^2}{\varepsilon m} \cdot \frac{1}{\omega_j^2 - \omega^2 - i\gamma_j\omega} \right) \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (3.7)$$

Com a eq. (3.7) e a forma do vetor campo elétrico, $E = E_0 e^{i(kx - \omega t)}$, chega-se facilmente a:

$$\kappa^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \left(1 + \frac{Ne^2}{\varepsilon m} \cdot \frac{1}{\omega_j^2 - \omega^2 - i\gamma_j\omega} \right) \quad (3.8)$$

ou seja, conclui-se que o número de onda κ é uma quantidade complexa. Desta forma, tem-se:

$$\kappa = k_{\text{real}} + ik_{\text{imag}} = k + i\alpha \quad (3.9)$$

Este resultado implica na atenuação do campo elétrico dado por:

$$E = E_0 e^{-\alpha x} e^{i(kx - \omega t)} \quad (3.10)$$

Ou seja, a natureza complexa do número de onda κ , eq. (3.1), obtido pelo sistema baseado na figura (4) implica em uma atenuação do campo elétrico dado pela eq. (3.10), esta atenuação ocorre quando existe uma ressonância entre a frequência ω do campo aplicado no material e a frequência natural de oscilação ω_0 do meio material. Esta atenuação, ou perda na energia do campo \vec{E} que atravessa um determinado material, é a quantidade a ser medida em algumas técnicas espectroscópicas, como a que será discutida adiante, e que caracteriza inequivocadamente a amostra em estudo, pois a absorção de energia é uma característica única de cada tipo de grupamento químico, como uma assinatura da estrutura molecular do objeto em estudo.

A determinação algébrica das frequências naturais de oscilação de uma molécula não é uma tarefa fácil, a determinação mais simples que pode ser feita é baseada em um sistema de massa-mola, como o apresentado na figura 6 abaixo, este sistema é chamado de oscilador harmônico para molécula diatômica:

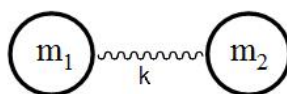


Figura 6 – Massa-mola e a frequência natural de oscilação.

Fonte: O AUTOR.

A frequência de oscilação para este sistema é dada por [33]:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.11)$$

onde μ é a massa reduzida do sistema composto por m_1 e m_2 , dois átomos, e k é a constante de ligação entre esses átomos.

Para moléculas complexas, as energias de absorção, ou o espectro característico, são obtidos por meio de cálculos computacionais complexos ou a partir de uma medida espectroscópica feita com a substância pura. As moléculas que são objeto de estudo do presente trabalho são de extrema complexidade e seus espectros de infravermelho característicos estão descritos na literatura, as regiões de interesse estão descritas na seção de número 2.

Agora que se sabe um pouco sobre a interação física que ocorre num processo de absorção molecular passa-se para a próxima seção afim de discutir sobre o mecanismo de obtenção de tais medidas.

3.2 ESPECTROSCOPIA COM TRANSFORMADA DE FOURIER

As medidas de transmitância realizadas no presente trabalho foram obtidas com o uso de um espectrofotômetro com Transformada de Fourier que opera na região do infravermelho médio do espectro eletromagnético ($400 - 4000\text{cm}^{-1}$), técnica comumente denominada por FT-MIR. Sendo assim, o objetivo desta subseção é apresentar os principais fenômenos físicos envolvidos nos quais são baseados os arranjos experimentais da técnica de espectroscopia com transformada de Fourier.

Inicia-se esta discussão abordando o fenômeno da interferência. A interferência consiste na interação de movimentos ondulatórios com mesmas frequências de oscilação e amplitude mas que mantém, entre si, uma diferença de fase δ [34].

Para visualizar esta situação basta analisar a figura 7, composta por uma fonte S que irradia luz monocromática de frequência ω e comprimento de onda λ que se propaga no espaço com velocidade c .

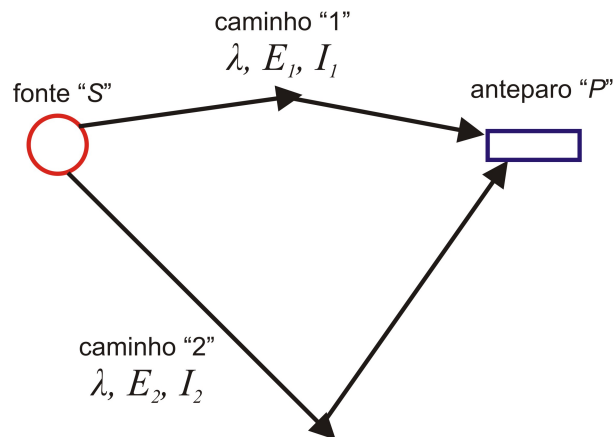


Figura 7 – Interferência.

Fonte: O AUTOR.

A intensidade de luz I que chega no ponto P , um anteparo qualquer, é dada pela média temporal do vetor de Poynting \vec{S} , cuja magnitude fornece a densidade de fluxo de energia associada a uma onda eletromagnética, esta grandeza pode ser medida e tem dimensão de $\left[\frac{\text{watt}}{\text{metro}}\right]$ no sistema internacional de unidades de medida.

$$I = \langle \vec{S} \rangle \quad (3.12)$$

O vetor de Poynting é definido por [32]:

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H} \quad (3.13)$$

Nesta equação, \vec{E} representa o vetor campo elétrico e \vec{H} o vetor campo magnético. Como a magnitude de \vec{H} se relaciona com \vec{E} por

$$H = \epsilon c E \quad (3.14)$$

tem-se então:

$$\vec{S} = \epsilon c \vec{E} \times (\vec{E} \times \hat{k}) \quad (3.15)$$

onde ϵ é a permissividade elétrica na qual a onda eletromagnética se propaga, \hat{k} é o vetor de onda unitário, que fornece a direção de propagação da onda eletromagnética. Pelo princípio da superposição o campo eletromagnético resultante \vec{E} que chega no anteparo P , da figura 7, é dado por

$$\vec{E} = \vec{E}_1 + \vec{E}_2 \quad (3.16)$$

onde

$$E_1 = A e^{(kx - \omega t)} \quad (3.17)$$

e

$$E_2 = B e^{(kx - \omega t + \delta)} \quad (3.18)$$

onde a letra grega δ presente na exponencial do campo \vec{E}_2 representa a diferença de fase entre as duas ondas \vec{E}_1 e \vec{E}_2 provocada pela diferença de caminho no percurso da fonte S até a chegada no anteparo P , da figura 7.

Desta forma, um detector colocado no anteparo P faria a seguinte medida de intensidade de luz que ali chega:

$$I = \langle \vec{S} \rangle = \epsilon c \langle \vec{E} \cdot \vec{E} \rangle \quad (3.19)$$

como o vetor campo elétrico \vec{E} é resultante das contribuições provenientes de \vec{E}_1 e \vec{E}_2 , pode-se escrever:

$$I = \epsilon c (\langle E_1^2 \rangle + \langle E_2^2 \rangle + \langle E_1 \cdot E_2^* \rangle + \langle E_1^* \cdot E_2 \rangle) \quad (3.20)$$

ou

$$I = \epsilon c (I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \delta) \quad (3.21)$$

Nesta equação os termos I_1 e I_2 são, respectivamente, a intensidade de luz proveniente do feixe de luz que viajou pelos caminhos 1 e 2 da figura 7. O termo $2\sqrt{I_1 I_2} \cos \delta$ é chamado termo de interferência.

Esta equação mostra que a intensidade de luz que chega no detector depende do comportamento da função cosseno onde, para que se tenha uma irradiância máxima em P é necessário que a diferença de caminho δ entre os dois feixes seja proporcional a $0, 2\pi, 4\pi, \dots$ com a mesma análise conclui-se que tem-se mínimos de intensidade de luz em P quando a

diferença de caminho δ é proporcional a $\pi, 3\pi, \dots$, uma visualização deste comportamento é apresentada na figura 8.

A diferença de fase δ presente na equação que introduz a diferença de caminho percorrida pelos dois feixes pode ser escrita como:

$$|\delta| = kx' \quad (3.22)$$

Para o caso de irradiâncias iguais a equação (3.21) se reduz a:

$$I(x') = \epsilon c(I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos kx') = I_0(1 + \cos kx') \quad (3.23)$$

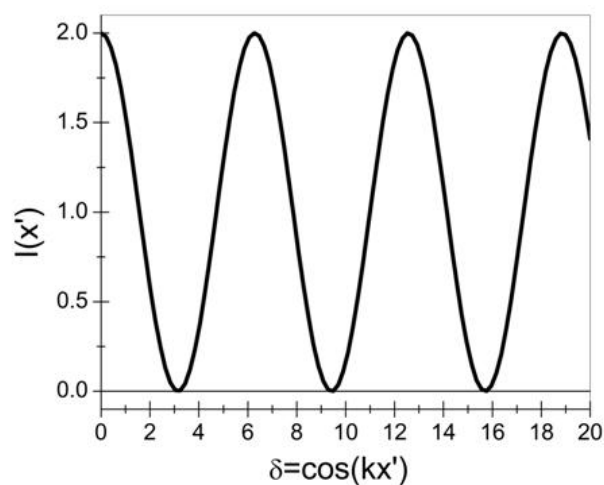


Figura 8 – Intensidade de luz em função de δ e respectivo padrão de franjas de interferência.

Fonte: O AUTOR.

A este comportamento da intensidade $I(x')$, que pode ser máxima ou mínima, dependendo da diferença de fase δ , figura 8, entre os dois movimentos ondulatórios \vec{E}_1 e \vec{E}_2 , dá-se o nome de interferência construtiva e interferência destrutiva, respectivamente, e aos padrões de regiões claras e regiões escuras alternadamente, dá-se o nome de franjas ou figuras de interferência.

Interferômetros são configurações que usam este fenômeno da interferência para a determinação de algumas grandezas físicas.

Existem dois tipos de interferômetros [35]: interferômetros de divisão de frente de onda, quando o feixe é dividido ao passar por diferentes aberturas colocadas lado a lado (semelhante ao experimento de Young [32] de dupla fenda) e interferômetros de divisão de amplitude, quando o feixe é dividido em superfícies parcialmente refletoras (como no interferômetro de Michelson fig.9 [32]).

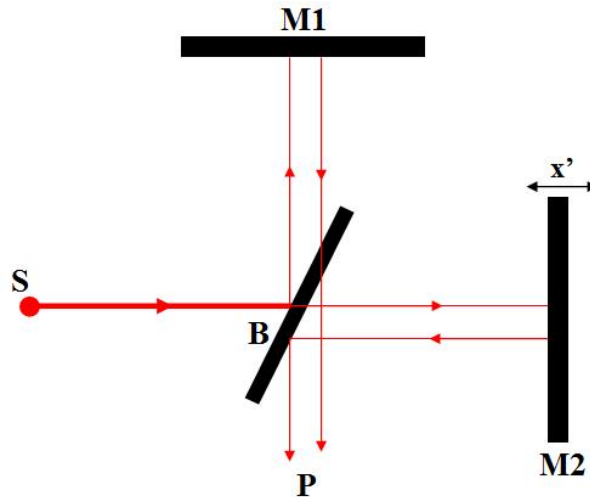


Figura 9 – Esquema do Interferômetro de Michelson.

Fonte: O AUTOR.

O interferômetro de Michelson, esquematizado na figura 9, ficou amplamente conhecido por sua contribuição para a formulação da teoria da relatividade especial de Einstein quando Michelson e Morley provaram a inexistência do éter. Suas aplicações, como a medida de pequenos deslocamentos e do índice de refração da luz, ficaram limitadas por muitos anos até o advento da computação, que tornou possível os cálculos matemáticos necessários nas integrações da espectroscopia de Fourier. Num interferômetro de Michelson, um feixe luminoso proveniente da fonte S incide em um semi-espelho divisor de feixe B (*beamsplitter*) e é dividido em dois feixes, um viaja até o espelho fixo $M1$ e o outro viaja até o espelho móvel $M2$. Os feixes refletem nestes espelhos $M1$ e $M2$ e retornam até o divisor de feixe B , estes dois feixes então se recombinam e viajam até um ponto de observação em P .

Analisando a expressão (3.23), experimentalmente, pode-se introduzir um detector na saída do interferômetro, este detector serviria para registrar a intensidade de luz em função do deslocamento x' do espelho $M2$ do interferômetro, I_0 independe do movimento deste espelho e o termo $\cos kx'$ é o termo de interferência.

Entretanto, para aplicações espectroscópicas, no lugar de uma fonte de luz monocromática deve-se utilizar uma fonte de luz não-monocromática, que tenha emissão em uma determinada região de interesse do espectro eletromagnético, para então obter um

padrão de interferência proveniente de diferentes comprimentos de onda λ , ou seja, uma análise espectral.

Neste caso, com a utilização de uma fonte de luz não monocromática, a expressão da irradiância (eq. 3.23) que chega ao detector precisa ser modificada, sendo necessária a adição de um termo que pondere a intensidade de luz emitida pela fonte em cada comprimento de onda λ_n do espectro no lugar da contribuição devido a um único comprimento de onda λ , este termo é chamado de distribuição espectral $G(k)$. Fazendo tal modificação obtêm-se:

$$I(x') = \int_0^{\infty} G(k)dk[1 + \cos kx'] \quad (3.24)$$

a função cosseno, presente no integrando, pode ser escrita em termos de exponenciais, desta forma:

$$I(x') = \int_0^{\infty} G(k)dk + \frac{1}{2} \left(\int_0^{\infty} G(k)e^{ikx'} dk + \int_0^{\infty} G(k)e^{-ikx'} dk \right) \quad (3.25)$$

observando que a primeira integral independe da diferença de caminho x' e, fazendo uma troca de variáveis k por $-k$, apenas na última integral, pode-se escrever:

$$I(x') = I_0 + \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \sqrt{\frac{\pi}{2}} G(k)e^{ikx'} dk \quad (3.26)$$

que é o mesmo que

$$W(x') = I(x') - I_0 = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \sqrt{\frac{\pi}{2}} G(k)e^{ikx'} dk \quad (3.27)$$

a função $W(x')$ recebe o nome de interferograma. Seu comportamento descreve a intensidade de luz que chega ao detector em função da diferença de caminho x' provocada pelo movimento de um dos braços ($M2$) do interferômetro.

É interessante a descrição matemática da função $W(x')$, a forma de $W(x')$ na expressão (3.27) é chamada de transformada de Fourier da função $G(k)$ e, pelo teorema da inversão de Fourier [36] obtemos a relação inversa:

$$G(k) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} W(x')e^{-ikx'} dx' \quad (3.28)$$

A função $G(k)$, que recebe o nome de distribuição espectral, fornece a intensidade de luz que chega ao detector em cada número de onda k . Desta maneira a função $G(k)$ descreve o espectro eletromagnético que é irradiado pela fonte S .

Este passo matemático que muda o espaço das funções de $W(x')$ para $G(k)$, ou seja, um interferograma para um espectro, dá origem ao nome da técnica "espectroscopia com transformada de Fourier". A espectroscopia com transformada de Fourier consiste em gravar $W(x')$ como uma função de x' e transformar matematicamente esta relação para obter $G(k)$ em função de k .

Na prática, $W(x')$ é substituída por uma função $f(t)$, pois como o espelho do interferômetro se move com velocidade constante, $v = x't$, a aquisição de dados para o interferograma é feita em determinados intervalos de tempo t , por isso a expressão para $W(x')$ é conhecida como domínio de tempo. De forma análoga, a função $G(k)$ é substituída por uma $g(\omega)$, pois como $\omega = ck$, é usual registrar a dependência em frequência ω , e a expressão fica conhecida como domínio das frequências. Como $f(t)$ e $g(\omega)$ são pares de transformada de Fourier, uma função opera em um espaço e a outra no espaço recíproco. Desta forma tem-se então:

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} g(\omega) e^{-i\omega t} d\omega \quad (3.29)$$

e

$$g(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{i\omega t} dt \quad (3.30)$$

No entanto, as equações (3.29) e (3.30) não podem ser empregadas como estão escritas porque não é possível mover o espelho a um comprimento infinito e, porque a radiação não assume valor nulo. Neste ponto então, é necessário um tratamento matemático chamado de apodização [37, 38], a apodização tem por objetivo avaliar o interferograma que será convertido em um espectro por meio do cálculo da transformada de Fourier apenas em uma região apreciável, ou seja, cortar o interferograma em uma certa região com a finalidade de reduzir picos laterais que não contribuem para a análise espectral. Esta truncagem pode ser feita por um corte quadrado, como na função de apodização *Boxcar*, mas também pode ser feita a apodização *Triangular* ou ainda utilizar funções mais complexas que suavizam mais ainda este corte, como a função *NB Strong*, *Happ Genzel* e outras [39].

Uma boa aproximação para resolver o problema dos limites de integração, é assumir que em um espectrofotômetro real a irradiância que emerge do interferômetro se comporta como um pulso finito de ondas senoidais. Considere então um trem de ondas se repetindo n vezes tantas quantas forem os pontos onde ocorrem interferências construtivas devido ao movimento do espelho do interferômetro. Estas variações podem ser escritas em termos da função:

$$f(t) = \begin{cases} e^{-i\omega_0 t} dt & \text{se } -\frac{\tau_0}{2} < t < \frac{\tau_0}{2} \\ 0 & \text{senão} \end{cases} \quad (3.31)$$

Tal aproximação para a função $f(t)$, na eq.(3.31), de assumir um determinado comportamento em uma região e ser nula em todo o restante, é análogo ao procedimento utilizado na apodização *Boxcar*. Substituindo a eq. (3.31) em (3.30), tem-se:

$$g(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\frac{\tau_0}{2}}^{\frac{\tau_0}{2}} e^{i(\omega - \omega_0)t} dt \quad (3.32)$$

desprezando a parte imaginária e o fato da paridade ímpar da função seno, obtêm-se:

$$g(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\frac{\tau_0}{2}}^{\frac{\tau_0}{2}} \cos [(\omega - \omega_0)t] dt = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\sin [(\omega - \omega_0)\frac{\tau_0}{2}]}{\omega - \omega_0} \quad (3.33)$$

Graficamente, figura 10, tem-se: para uma fonte monocromática, a parte real de $f(t)$, eq.(3.31) que representa o "trem de ondas finito", $g(\omega)$ eq.(3.32) que ilustra a transformada de Fourier de $f(t)$ e finalmente, $G(\omega) = |g(\omega)|^2$ que representa a densidade de energia ou distribuição espectral.

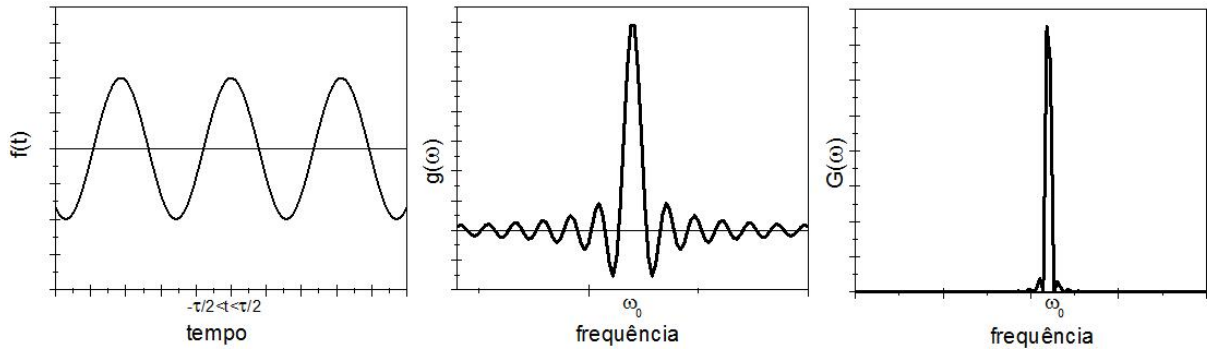


Figura 10 – Simulação das funções $f(t)$, $g(\omega)$ e $G(\omega)$ para uma fonte monocromática.

Fonte: O AUTOR.

Para o caso de uma fonte de luz não monocromática (caso real em espectroscopia por transformada de Fourier) pode ser feita a mesma aproximação, de um "trem de ondas finito", onde deve-se corrigir que a contribuição em $f(t)$ não se deve apenas a uma única frequência ω_0 como na eq. (3.31) mas sim a uma distribuição contínua de frequências ω_n que caracterizam a emissão de uma lâmpada em uma determinada região do espectro eletromagnético. Supondo uma lâmpada hipotética com emissões bem definidas apenas em torno das frequências $\omega_0, \omega_1, \omega_2$, tem-se os seguintes esboços da forma de $f(t)$, $g(\omega)$ e $G(\omega)$.

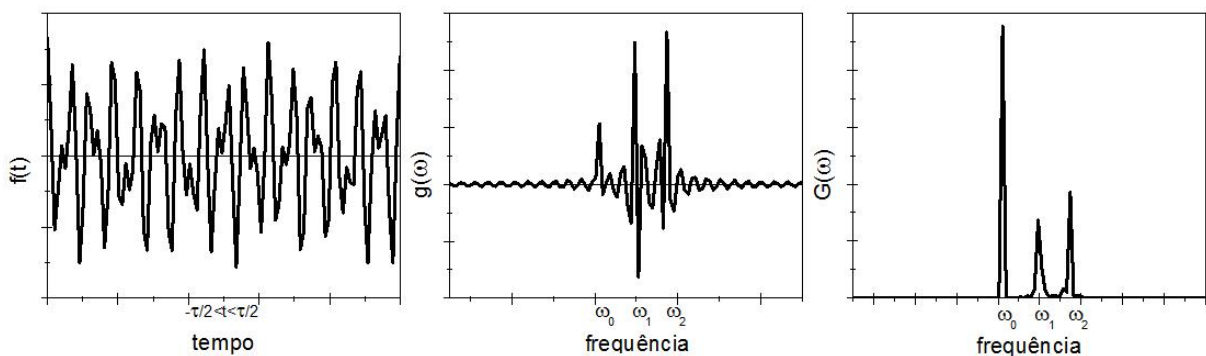


Figura 11 – Simulação das funções $f(t)$, $g(\omega)$ e $G(\omega)$ para uma fonte não-monocromática.

Fonte: O AUTOR.

Até este momento foi descrito como se obter o espectro de emissão de uma fonte de luz não-monocromática com a utilização de um Interferômetro de Michelson em vez de

um mecanismo dispersivo como um prisma ou uma rede de difração, ou seja, discutiu-se o funcionamento da espectroscopia por transformada de Fourier. O próximo passo é introduzir a amostra a ser analisada, para isso, considera-se o esquema abaixo:

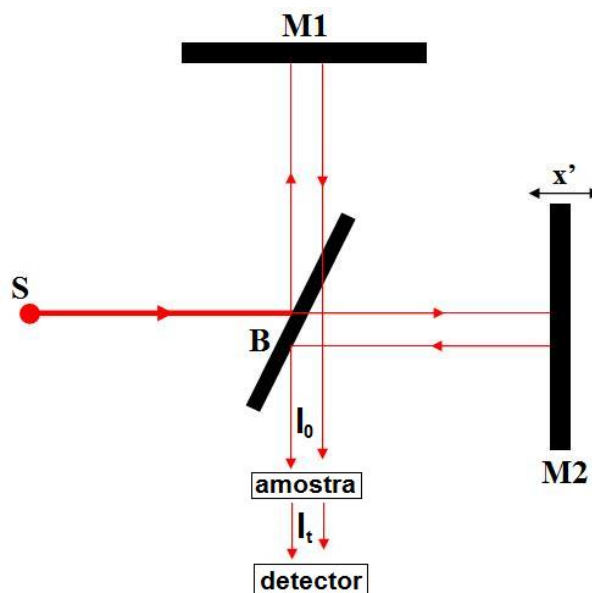


Figura 12 – Medida de transmitância - Espectrofotômetro por transformada de Fourier.

Fonte: O AUTOR.

A figura 12 mostra que, a intensidade de luz que emerge do interferômetro I_0 é a radiação emitida pela lampada utilizada, esta porção I_0 incide na amostra colocada na saída do interferômetro e o detector mede somente uma fração desta, ou seja, a fração que atravessa a amostra, denotada por I_t . Deve-se ressaltar que as quantidades I_0 e I_t são medidas individualmente para cada frequência ω e a combinação da sequência de cada ω medido forma um espectro.

Na seção anterior (3.1 - Absorção molecular) discutiu-se que apenas as frequências próximas as frequências de ressonância de cada ligação química promovem excitação da molécula pela absorção de uma energia característica. A análise espectroscópica consiste em incidir uma determinada radiação na amostra de interesse e medir se esta radiação foi absorvida ou não. Como tais absorções são muito bem definidas para cada tipo de grupamento químico a análise espectroscópica de um determinado material permite extrair informações a respeito de sua estrutura química além de quantificar estas estruturas de interesse.

As medidas espectroscópicas realizadas neste trabalho são chamadas de medidas de transmitância. Transmitância é uma propriedade definida pela razão entre a quantidade de luz que atravessa um meio e a quantidade de luz que sobre ele incide [34].

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (3.34)$$

Nesta equação, $T = 1$ significa que a quantidade de luz que atravessou a amostra I_t é igual a quantidade de luz que incidiu sobre a amostra I_0 , diz-se então que nenhuma porção de luz foi absorvida pela amostra e, para $T < 1$ tem-se que alguma porção da quantidade de luz que incidiu sobre a amostra foi absorvida. A Lei de Beer-Lambert [40] diz quantitativamente como a atenuação da intensidade de luz I depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho óptico sobre o qual ocorre a absorção.

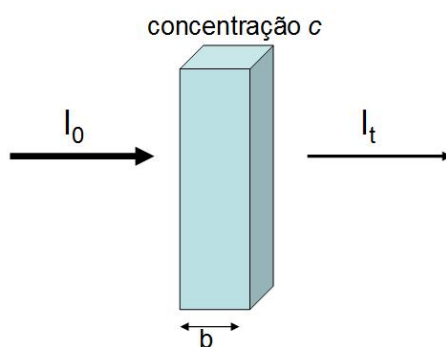


Figura 13 – Parâmetros da Lei de Beer-Lambert.

Fonte: O AUTOR.

À medida que a luz atravessa um meio que contém uma espécie absorvedora, um decréscimo de sua intensidade ocorre na proporção que a espécie é excitada. Para uma solução de determinada concentração c , quanto mais longo for o caminho óptico b mais unidades absorvedoras estarão no caminho, e maior será a atenuação. Da mesma forma, para um caminho óptico b fixo, quanto maior for a concentração c de absorventes, maior será a atenuação [41]. Algebricamente, a Lei de Beer-Lambert é escrita por:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t} \propto bc \quad (3.35)$$

É importante comentar que na região do infravermelho é muito comum encontrar espectros de absorvância ou transmitância em função da unidade de medida cm^{-1} , essa unidade é chamada de número de onda, considere o número de onda sendo representado pela letra $\bar{\nu}$, onde $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$.

Sendo assim, com a obtenção do espectro da amostra analisada pode-se identificar e quantificar as moléculas de interesse. Tendo discutido os mecanismos fundamentais da técnica de espectroscopia por transformada de Fourier e o procedimento para obter medidas de transmitância que vão gerar as regressões de interesse, passa-se agora a apresentar as principais ferramentas quimiométricas para otimizar experimentos e avaliar os resultados experimentais.

3.3 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma ciência relativamente jovem, nasceu no final da década de 60 sendo que o nome "quimiometria" foi utilizado pela primeira vez no início da década de 70 [42] pelo cientista sueco Svante Wold que culminou na fundação da Sociedade Internacional de Quimiometria no ano de 1974. Quimiometria é, de acordo com a atual definição da Sociedade Internacional de Quimiometria, a disciplina química que faz o uso de formulações matemáticas, estatísticas e lógica formal para:

- Delinear e selecionar as condições ótimas para procedimentos e medidas;
- Fornecer o máximo de informações relevantes do objeto químico em estudo através da análise de dados;
- Obter o conhecimento de sistemas químicos através de métodos matemáticos e estatísticos que foram utilizados inicialmente em psicologia, biologia e agricultura no início do século passado.

As técnicas quimiométricas mais empregadas podem ser separadas em três grandes blocos, a saber:

- O primeiro bloco explora as condições ótimas para a elaboração de um procedimento/experimento e tem como finalidade maximizar (ou minimizar, conforme a aplicação) a resposta (ou medida) de uma determinada quantidade que se deseja monitorar. As ferramentas utilizadas neste primeiro bloco são comumente conhecidas como Planejamento de Experimentos.

- O segundo bloco é uma etapa posterior a descrita pelo primeiro bloco, no qual, após a determinação das condições ótimas de se realizar um procedimento por meio do planejamento de experimentos, deseja-se elaborar um modelo matemático de previsão para se quantificar analitos de interesse dentro de um conjunto de amostras. Este passo é chamado de Calibração ou Regressão [43], para os quais existem tratamentos uni ou multivariados e as vezes com uso de algoritmos matemáticos de alta complexidade.

- O terceiro bloco, por fim, é o que atua no objeto de estudo com o uso de ferramentas estatísticas. Este bloco, de descrição estatística, tem como suas principais ferramentas os Testes de Hipóteses para se fazer comparações entre dois ou mais grupos de medidas e procedimentos afim de verificar se há ou não falta de ajuste nos modelos de calibração descritos pelo segundo bloco além da análise de erros em medidas sucessivas.

As ferramentas quimiométricas empregadas no presente trabalho são descritas a seguir.

3.3.1 Planejamento de Experimentos

A finalidade do planejamento de experimentos é determinar as condições que forneçam a melhor resposta para realização de um procedimento. Para isso o analista

determina os fatores e níveis experimentais que estão a disposição para se trabalhar e, com o monitoramento das repostas a escolha da condição ideal é feita.

O planejamento de experimento tem por objetivos substituir o método de "tentativa e erro", no qual é quase impossível se determinar uma condição ótima pois não se conhece suficientemente a contribuição de cada fator e cada nível. Esta ferramenta permitiu explorar as condições experimentais de forma multivariada, variando tudo ao mesmo tempo, em oposição ao mecanismo univariado onde fixa-se um determinado parâmetro e varia-se os demais.

O planejamento utilizado neste trabalho é denominado planejamento fatorial. Este planejamento foi utilizado com o objetivo de selecionar os parâmetros e níveis mais importantes para se maximizar a resposta do espectrofotômetro de infravermelho na aquisição de espectros de amostras de leite. O número de ensaios N a se realizar em um planejamento fatorial é escrito na forma:

$$N = l^k \quad (3.36)$$

onde k representa os fatores (por exemplo: temperatura e velocidade) e l representa os níveis (por exemplo, temperatura: a $25^{\circ}C$ e $40^{\circ}C$ e velocidade: a $10m/s$ e $25m/s$).

A escolha da condição ideal é facilmente verificada quando o planejamento fatorial é organizado em uma tabela, como em 7, onde, por simplicidade, foi ilustrado um planejamento fatorial de 2 fatores e 2 níveis (representados por "+" como o nível alto e "-" como o nível baixo de um fator):

Tabela 7 – Representação de um planejamento fatorial $N = 2^2$.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Resposta
1	+	+	R_1
2	+	-	R_2
3	-	+	R_3
4	-	-	R_4
5	0	0	R_5
6	0	0	R_6

Fonte: O AUTOR.

Neste exemplo, tab.7, foram adicionados os ensaios de número 5 e 6, em duplicatas autênticas, para se estimar os erros associados as repostas. O nível representado por "0" é um nível intermediário aos valores de "+" e "-" para os dois fatores. Esta escolha é chamada de Planejamento fatorial com duplicata no ponto central. Um valor da coluna "Resposta" é escolhido como o de melhor resposta, o ensaio ao qual corresponde este valor escolhido será o procedimento a ser utilizado como padrão para os experimentos futuros.

3.3.2 Regressão

A regressão é uma descrição matemática que estabelece uma correlação entre um conjunto de variáveis (por exemplo concentração) e um conjunto de medidas (por exemplo absorvâncias). O objetivo desta seção é apresentar a formulação necessária para se determinar um modelo de previsão dos analitos de interesse a partir de uma medida espectrofotométrica, este modelo de previsão também é chamado de regressão ou curva analítica.

Dependendo do objeto de estudo e da instrumentação utilizada para a aquisição de dados, a resposta pode ser um escalar, um vetor, uma matriz e assim por diante, tais arranjos são chamados em álgebra linear de tensores de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem [44], respectivamente, veja figura 14.

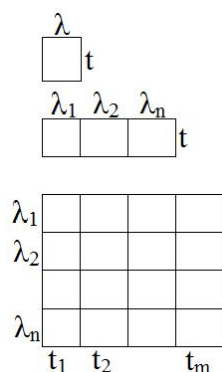


Figura 14 – Representação de um tensor de ordem zero, primeira e segunda ordem.

Fonte: O AUTOR.

Para um modelo de calibração de ordem zero, um só valor é monitorado, como por exemplo, dado um espectro de absorção de um determinado material, monitorar um valor de absorvância em um só comprimento de onda λ em um tempo fixo t . Este tipo de calibração é denominada calibração univariada.

Métodos de calibração de primeira ordem requerem um vetor de medidas para cada amostra [45], retomando o exemplo de uma medida espectrofotométrica, é um modelo no qual é monitorado a absorvância em vários comprimentos de onda λ_n em um mesmo tempo t , uma calibração de primeira ordem é denominada calibração multivariada, diversos modelos de calibração multivariada vem sendo utilizados em quimiometria, sendo os mais empregados a Regressão Linear Múltipla (MLR), a Regressão por Componentes Principais (PCR) e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Na sequência discute-se sobre modelo de MLR e PLS que foram utilizados neste trabalho.

Para concluir o raciocínio e o esquema da figura 14, tem-se ainda aplicações onde deseja-se monitorar, por exemplo, a evolução temporal t_n da absorvância em vários

comprimentos de onda λ_n , um experimento com esse tipo de resposta gera uma matriz de dados e é dita uma calibração de segunda ordem, que requerem algoritmos complexos para a elaboração da curva analítica.

3.3.2.1 Regressão Linear Múltipla MLR

A Regressão Linear Múltipla, expressão (3.37) [46], é uma ferramenta utilizada quando mais de uma quantificação é feita em uma única amostra e também quando se tem problemas com ruídos e/ou interferentes desconhecidos. Como exemplo, em espectroscopia, analisar uma amostra com mais de um analito de interesse, e cada um destes analitos tenha uma ou mais absorções características em diferentes comprimentos de onda. No lugar de uma regressão para cada analito este mecanismo permite a quantificação de todos, de uma só vez, por meio de um cálculo matricial, onde, para tal, é necessário conhecer as regiões de absorção de interesse e a quantidade de cada analito para a construção da regressão.

$$B = (X^t X)^{-1} X^t Y \quad (3.37)$$

Em (3.37) cada coluna da matriz B fornece a resposta em concentração do analito que esta sendo investigado, a primeira linha de B é o termo independente, coeficiente linear da regressão, e as demais linhas, os coeficientes de cada comprimento de onda que estão sendo monitorados, ou seja:

Tabela 8 – Matriz B da Regressão Linear Múltipla.

α	β	γ
a	d	g
b	e	h
c	f	i

Fonte: O AUTOR.

Esta matriz B fornece as seguintes equações de regressão:

$$\text{concentração do primeiro analito } c_1 = \alpha + a.A_{\lambda_1} + b.A_{\lambda_2} + c.A_{\lambda_3} \quad (3.38)$$

$$\text{concentração do segundo analito } c_2 = \beta + d.A_{\lambda_1} + e.A_{\lambda_2} + f.A_{\lambda_3} \quad (3.39)$$

$$\text{concentração do terceiro analito } c_3 = \gamma + g.A_{\lambda_1} + h.A_{\lambda_2} + i.A_{\lambda_3} \quad (3.40)$$

Nestas equações, o termo A_{λ_n} se refere a absorbância lida em cada comprimento de onda λ .

Desta forma a matriz B fornece as regressões que desejamos determinar pelo método MRL. Esta matriz é calculada por meio da eq. (3.37), onde os sobrescritos t e -1 denotam matriz transposta e matriz inversa, respectivamente. Para elaborar as regressões

(3.38, 3.39, 3.40), ou seja, construir a matriz B , fornece-se para o modelo uma matriz com os dados medidos em cada comprimento de onda, matriz X , e uma matriz com as concentrações conhecidas dos analitos de interesse, a matriz Y . O cálculo descrito por (3.37) faz uma correlação entre os valores medidos X e as concentrações conhecidas Y para elaborar um modelo de previsão B . Este cálculo matricial pode ser feito em softwares como Microsoft Excel, OpenOffice e outros. Neste trabalho foi utilizado o Microsoft Excel pelo comando:

$(MATRIZ.MULT((MATRIZ.MULT((MATRIZ.INVERSO(MATRIZ.MULT$
 $((TRANSPOR(X_{11} : X_{nn})), X_{11} : X_{nn}))), TRANSPOR(X_{11} : X_{nn}))), Y_{11} : Y_{nn}))$,
 onde X_{11} e X_{nn} são respectivamente o primeiro e o último elemento da matriz X , e de forma análoga para Y_{11} e Y_{nn} .

Tabela 9 – Matriz X da Regressão Linear Múltipla.

1	$A_{\lambda_1\#1}$	$A_{\lambda_2\#1}$	$A_{\lambda_3\#1}$
1	$A_{\lambda_1\#2}$	$A_{\lambda_2\#2}$	$A_{\lambda_3\#2}$
1	$A_{\lambda_1\#3}$	$A_{\lambda_2\#3}$	$A_{\lambda_3\#3}$
1	$A_{\lambda_1\#4}$	$A_{\lambda_2\#4}$	$A_{\lambda_3\#4}$

Fonte: O AUTOR.

Onde a primeira coluna da matriz X é totalmente preenchida com o número um [47]. Esta coluna esta relacionada a determinação dos coeficientes independentes α, β, γ dos modelos de regressão eq.(3.38, 3.39, 3.40) e os termos $A_{\lambda_n\#k}$ representam o valor de absorvância lido no comprimento de onda λ_n na k -ésima medida feita.

Tabela 10 – Matriz Y da Regressão Linear Múltipla.

$c_{1\#1}$	$c_{2\#1}$	$c_{3\#1}$
$c_{1\#2}$	$c_{2\#2}$	$c_{3\#2}$
$c_{1\#3}$	$c_{2\#3}$	$c_{3\#3}$
$c_{1\#4}$	$c_{2\#4}$	$c_{3\#4}$

Fonte: O AUTOR.

Os termos $c_{1,2,3\#k}$ da matriz Y , representam as concentrações conhecidas dos analitos 1, 2 e 3, respectivamente, na k -ésima medida feita.

3.3.2.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais PLS

O PLS é comumente apresentado como a principal técnica de regressão para dados multivariados [47]. Como em regressão linear múltipla, a principal finalidade da Regressão por Mínimos Quadrados Parciais é construir um modelo linear semelhante ao descrito pela eq.(3.37), onde se correlaciona uma matriz de valores medidos por uma determinada

técnica a uma matriz de concentrações de analitos. Uma importante diferença entre a regressão MLR e a regressão PLS é que, na MRL, utilizando o exemplo de espectroscopia, é necessário conhecer quais são as regiões de absorção mais relevantes para a quantificação, já na regressão PLS não é necessário conhecer a amostra (não é necessário informar quais comprimentos de onda serão monitorados), ou seja, a correlação de dados matriciais pode ser feita com todo o espectro, por isso o PLS é chamado de método *full-spectrum* [48].

O cálculo feito para regressão PLS é realizado por meio de um processo iterativo, segundo o algoritmo *NIPALS* (do inglês, *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*), comumente apresentado sobre a linguagem do *Matlab* [49]. Este algoritmo extrai um pequeno grupo de "novas" variáveis, denominadas variáveis latentes, que explicam o máximo da variância num range espectral, ou seja, decompõe simultaneamente as matrizes X e Y em uma soma de um pequeno número de variáveis. Desta forma o PLS permite identificar fatores (combinações lineares das variáveis X , os espectros) que melhor modelam as variáveis dependentes Y , as concentrações.

A ideia geral do PLS é alcançar, tanto quanto possível, uma relação ótima entre cada fator espectral e seu fator concentração correspondente, ou seja, encontrar uma relação perfeitamente linear entre as projeções dos dados espectrais e de concentração, maximizando a correlação entre uma variável independente de X com uma variável dependente de Y .

Na prática, para esta poderosa ferramenta de regressão, é necessário um software específico ou apresentar passo-a-passo o algoritmo a ser seguido em uma linguagem qualquer, como a *Matlab*, fornecer o conjunto de variáveis X como os espectros e as respectivas concentrações Y , o software então retorna um modelo de regressão que explica um percentual da correlação entre os dois conjuntos de valores fornecidos. Neste trabalho a rotina PLS foi realizada através do software *Matlab* com o uso do pacote de serviços *PLS Toolbox* versão 5.0, a interface de trabalho deste software é ilustrada abaixo:

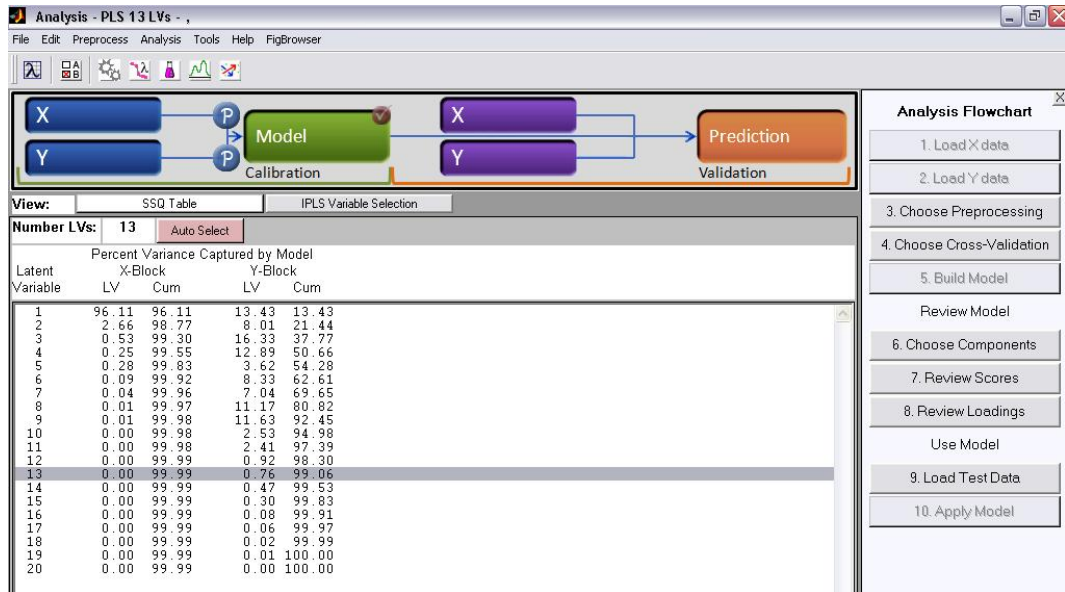


Figura 15 – Interface do software utilizado para a regressão PLS.

Fonte: O AUTOR.

3.3.3 Testes Estatísticos

Nesta seção apresenta-se de maneira sucinta o mecanismo estatístico empregado pela quimiometria quando se deseja comparar dois grupos de medidas feitas, por exemplo, a partir de um conjunto de amostras heterogêneas submetidas a análise por duas técnicas diferentes e os testes de linearidade empregados para avaliar um modelo de regressão.

Para avaliar dois grupos de medidas obtidos por metodologias de análise distintas, a pergunta que é feita é: Existe alguma diferença, a um certo nível de confiança, entre as medidas feitas pelo método *A* em relação as medidas que foram realizadas pelo método *B*?

Para responder esta questão, a partir de um grupo de amostras heterogêneas, utiliza-se o teste-t pareado [40]:

$$t_{calc} = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_d} \quad (3.41)$$

onde eq:a1 $d_i = x_i - y_i; i = 1, 2, \dots, n$

$$eq : a2 \bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}$$

eq : a3 $S_d^2 = \frac{1}{n-1} \left[\sum d_i^2 - \frac{(\sum d_i)^2}{n} \right]; S_d = +\sqrt{S_d^2}$ e o conjunto de valores d_i , diferença entre as medidas x_i realizadas por um método e as medidas y_i realizadas pelo outro método, formam uma distribuição normal.

Para este teste estatístico, as hipóteses a serem testadas são:

- Hipótese nula: a média das medidas feitas pelo método 1 é igual a média das medidas feitas pelo método 2.

- Hipótese alternativa: a média das medidas feitas pelo método 1 é diferente da média das medidas feitas pelo método 2.

A hipótese nula é aceita se o valor de t_{calc} obtido pela eq. (3.41) for menor que o valor de t_{tab} , dado pela distribuição t [50], os valores da distribuição t se encontram em anexo na figura 26, caso contrário, a hipótese alternativa é aceita.

$$t_{tab} = t_{(n-1;\alpha/2)} \quad (3.42)$$

Onde n é o número de pares de medidas e α é o nível de confiança desejado.

Com este teste pode-se afirmar, estatisticamente, se existe ou não alguma diferença entre as medidas feitas por um método ou outro.

Para avaliar a linearidade de uma regressão para um dado método analítico, onde entende-se por linearidade como a capacidade de uma metodologia analítica, através de um modelo matemático, demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado [51], ou seja, se o modelo de previsão está bem ajustado, dois testes podem ser analisados.

O primeiro teste é determinar o coeficiente de correlação $r = \sqrt{R^2}$, que avalia os desvios das respostas observadas em relação à média pelo seguinte cálculo de variâncias:

$$R^2 = \frac{\sum [(y_p)_i - \bar{y}]^2}{\sum [(y_o)_i - \bar{y}]^2} \quad (3.43)$$

onde o somatório corre sobre o índice i que denota cada medida realizada, $(y_p)_i$ é o valor previsto de cada medida obtida por meio da regressão que está sendo testada, $(y_o)_i$ é o valor observado de cada medida e \bar{y} é o valor médio de todas as medidas observadas.

Quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas, recomenda-se que o valor de r deva ser de 0,99 [51].

Um segundo teste de linearidade para avaliar se o modelo é adequado é examinar a distribuição dos resíduos ao longo dos valores da variável independente [43]. Esse teste pode ser feito pelo chamado teste de hipótese *a priori* [52], que compara a soma quadrática do desvio padrão da falta de ajuste com a soma quadrática do erro puro levando em consideração os respectivos números de graus de liberdade [53], este teste é realizado por meio da equação:

$$F_{calc} = \frac{\sum [(y_p)_i - \bar{y}_{im}]^2 / (m - 2)}{\sum [(y_o)_i - \bar{y}_{im}]^2 / (n - m)} \quad (3.44)$$

onde o somatório corre sobre o índice i que denota cada medida realizada, $(y_p)_i$ é o valor previsto de cada medida obtida por meio da regressão que está sendo testada, $(y_o)_i$ é o valor observado de cada medida, \bar{y}_{im} é o valor médio por nível, uma vez que m denota o número de níveis, n é o número total de medidas e o fator -2 em $(m - 2)$ se refere ao número de parâmetros da regressão, coeficiente angular e coeficiente linear.

Neste teste de hipótese *a priori* as hipóteses a serem testadas são:

- Hipótese nula: a equação da reta é adequada para descrever os dados.
- Hipótese alternativa: a equação da reta não é adequada para descrever os dados.

A hipótese nula é aceita se o valor de F_{calc} obtido pela eq. (3.44) for menor que o valor de F_{tab} , eq. (3.45), dado pela distribuição F [50], os valores da distribuição F se encontram em anexo na figura (27), ou seja, se $F_{calc} < F_{tab}$ o teste indica ausência de falta de ajuste, caso contrário, a hipótese alternativa é aceita.

$$F_{tab} = F_{\alpha; f1=m-2; f2=n-m} \quad (3.45)$$

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os ensaios espectroscópicos para determinar os teores de gordura, proteína e lactose e percentual de adição de água em amostras de leite foram realizados em um equipamento de FTIR fabricado pela Bruker, modelo Vertex70, o espectro de emissão da lâmpada deste equipamento é mostrado na figura 16:

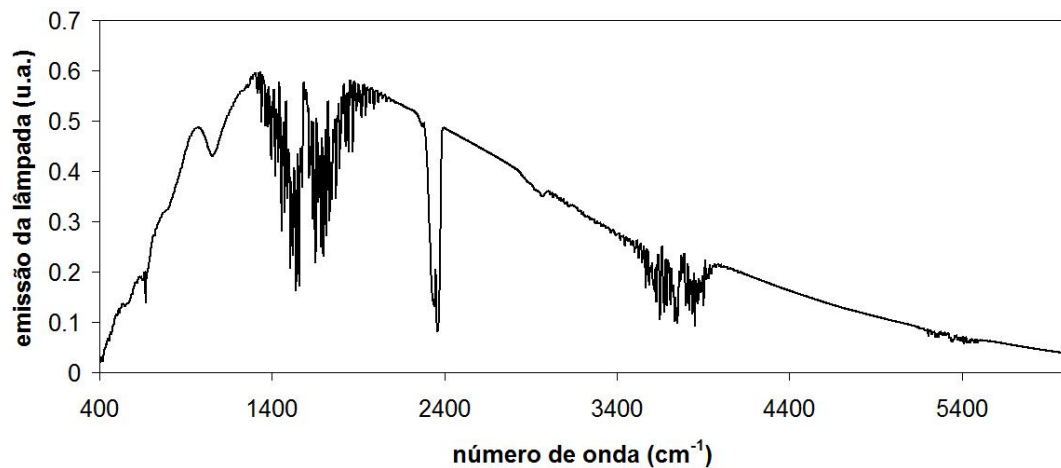


Figura 16 – Emissão da lâmpada de infravermelho do espectrofotômetro Bruker-Vextex70.

Fonte: O AUTOR.

A figura 17, a seguir, mostra o espectro de transmitância do fluoreto de cálcio. É relevante avaliar tal figura pois fica claro que ao se usar um porta amostra desse material, parte da intensidade de luz emitida pela lâmpada do equipamento será totalmente absorvida, restando somente a faixa espectral após os 1000cm^{-1} para promover interações com a amostra. Este fato não trouxe problemas para as quantificações feitas no presente trabalho, pois todas as absorções de interesse puderam ser visualizadas com a utilização da janela de CaF_2 .

O material mais comum em aplicações de infravermelho é o brometo de potássio KBr , material transparente em grande parte do infravermelho, inclusive é utilizado como divisor de feixe no interferômetro do equipamento. A grande dificuldade de se trabalhar com amostras líquidas e utilizar uma janela de KBr no porta amostra se deve ao fato de que o KBr é um sal higroscópico [54], com alta solubilidade em água, cerca de $65,86\text{g}/100\text{ml}_{\text{água}}$. Como o leite, objeto de estudo, tem em sua composição quase 90% de água, uma janela de KBr seria dissolvida após algumas medidas. A alternativa foi utilizar janelas de fluoreto de cálcio, CaF_2 , material que não apresenta problemas de solubilidade em água, $0,0016\text{g}/100\text{ml}_{\text{água}}$, e é transparente na região onde são feitas as quantificações.

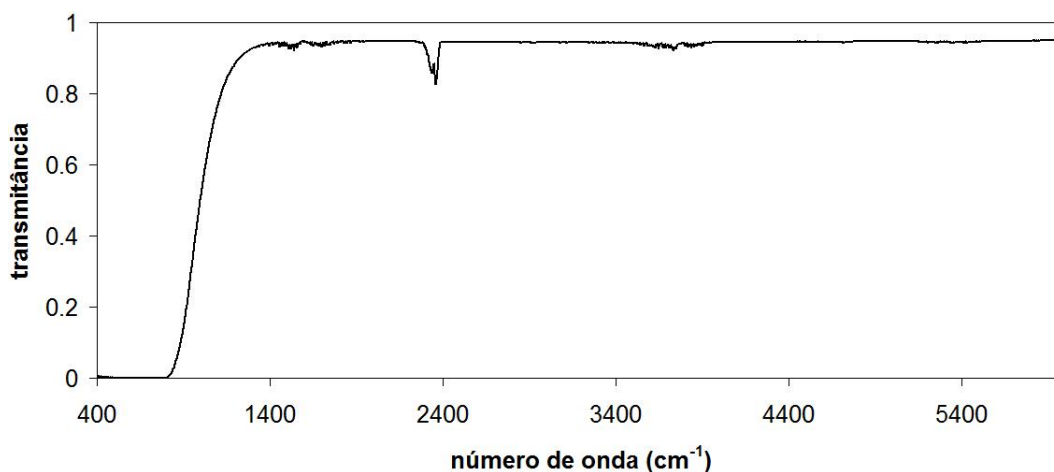


Figura 17 – Espectro de transmitância da janela de CaF_2 utilizada no porta amostra.

Fonte: O AUTOR.

O porta amostra utilizado foi adaptado a partir de um porta amostra comercial do tipo cela, para análise de líquidos, com um espaçador de teflon de $32\mu m$ de espessura e um par de janelas de CaF_2 . O porta amostra é montado como um sanduíche de janela-espaçador-janela onde a espessura do espaçador utilizado é que determina o caminho óptico no qual a radiação infravermelha interage com a amostra. A amostra é injetada no porta amostra com auxílio de mangueiras e seringa, como mostrado na figura 18.

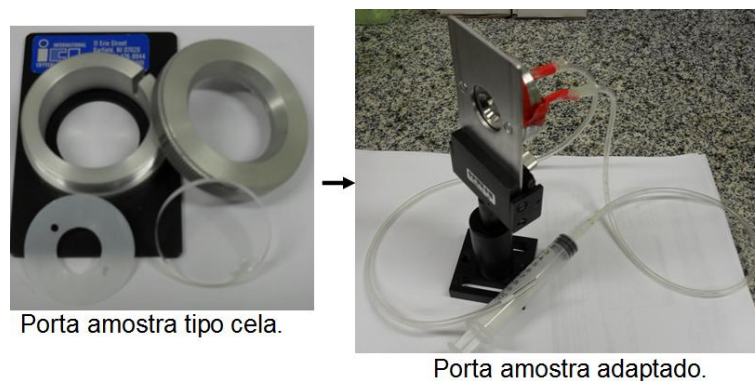


Figura 18 – Porta amostra.

Fonte: O AUTOR.

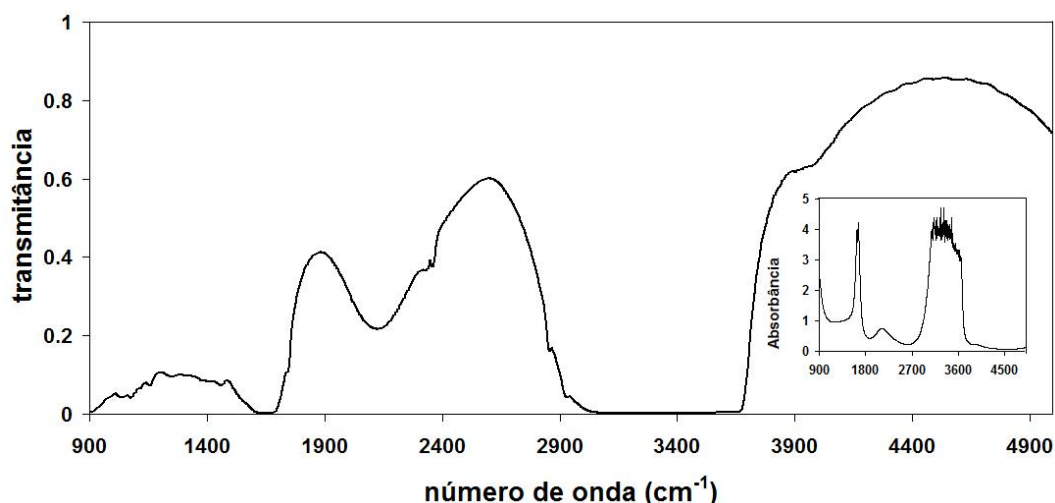


Figura 19 – Espectro de transmitância na região do infravermelho médio - amostra de leite líquido. À esquerda o espectro de absorbância da mesma amostra.

Fonte: O AUTOR.

A figura 19 mostra um espectro de amostra de leite na região do infravermelho médio, as bandas de absorção próximas a 1660cm^{-1} e 3400cm^{-1} se devem a forte absorção da água presente no leite [22]. Estas duas regiões provocavam um saturamento nos espectros, levando a zero de transmitância, o que poderia prejudicar as medidas futuras.

Para melhorar esta saturação devida a forte absorção da molécula de água, foi realizado um planejamento fatorial completo 5^2 de forma aleatória e com triplicata no ponto central. Sua finalidade era de determinar quais as condições experimentais que promoveriam um levantamento do espectro de transmitância para erradicar possíveis medidas descartadas por valores muito pequenos de transmitância.

Os fatores escolhidos foram fator 1: a velocidade de scan, que é a velocidade de movimento do braço do interferômetro, e fator 2: o diâmetro do feixe de luz que incide na amostra. Estes dois fatores estão diretamente relacionados a intensidade de luz que chega no detector do equipamento. O planejamento de experimentos descrito abaixo fornece a condição ótima de trabalho para a amostra em estudo.

Tabela 11 – Planejamento fatorial para determinação das condições experimentais.

Ensaio	Fator 1 (KHz)	Fator 2 (mm)	Resposta em 1751cm^{-1}	Resposta em 1550cm^{-1}
1	20	8	0,0733	0,0184
2	20	6	0,0801	0,0203
3	20	4	0,1024	0,0259
4	20	3	0,1272	0,0323
5	20	2	0,1570	0,0399
6	10	8	0,0740	0,0188
7	10	6	0,0809	0,0207
8	10	4	0,1037	0,0264
9	10	3	0,1279	0,0326
10	10	2	0,1577	0,0403
12	7,5	6	0,0819	0,0209
13	7,5	4	0,1040	0,0265
14	7,5	3	0,1277	0,0325
15	7,5	2	0,1573	0,0401
18	5	4	0,1042	0,0264
19	5	3	0,1256	0,0320
20	5	2	0,1571	0,0398
25	2,5	2	0,1569	0,0400
26	10	5	0,0875	0,0216
27	10	5	0,0874	0,0217
28	10	5	0,0876	0,0217

Fonte: O AUTOR.

Os ensaios de número 11, 16, 17, 21 à 24 foram omitidos da análise pois apresentaram forte saturação e/ou regiões de transmitância maior que 100%, o que não é aceitável. A resposta monitorada foi a transmitância nas regiões de 1751cm^{-1} e 1550cm^{-1} , regiões de interesse para a quantificação dos teores de gordura e proteínas, que estão em torno de uma forte banda de absorção da molécula de água figura 19. Os ensaios de número 26, 27 e 28 são triplicatas autênticas realizadas no ponto central dos níveis testados com o objetivo de estimar o desvio padrão das medidas ($\sigma = 0,0001$). O ensaio de número 10 foi o que gerou os maiores valores de transmitância, logo, para a aquisição de todos os espectros no equipamento de FTIR da Bruker a velocidade de scan foi fixada em 10KHz e o diâmetro do feixe de luz fixo em 2mm.

Outro fator explorado foi a temperatura da amostra. A literatura relata que existem diferenças nos espectros de absorção da água em função da temperatura [23]. A figura 20 mostra as diferenças que foram observadas nos valores de transmitância da água em função da temperatura.

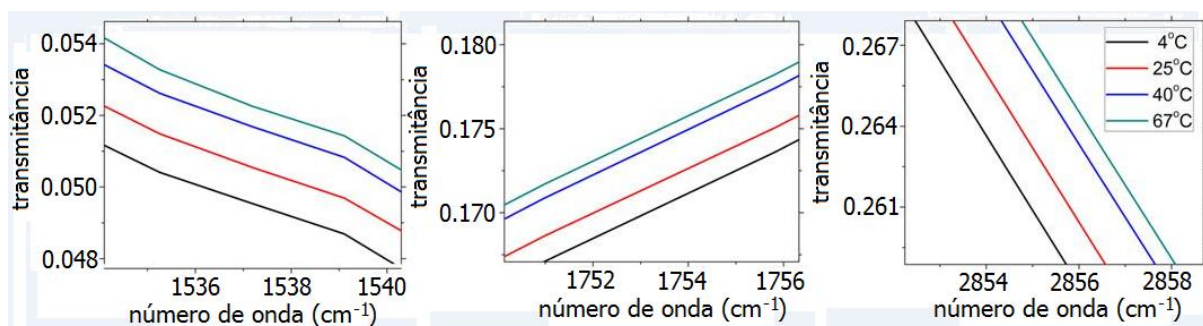


Figura 20 – Espectro de transmitância da água em diferentes temperaturas - regiões de interesse para quantificação dos constituintes principais do leite.

Fonte: O AUTOR.

Como a temperatura é um fator relevante no processo de quantificação, figura 20, todos os ensaios foram realizados a temperatura fixa de 40°C , este valor foi escolhido pois é a temperatura na qual os constituintes principais do leite estão homogeneamente dispersos.

A tabela abaixo esquematiza todos os parâmetros experimentais utilizados para aquisição dos espectros de transmitância.

Tabela 12 – Condições experimentais otimizadas.

janela	CaF_2
espassador	teflon $32\mu\text{m}$
velocidade scan	10KHz
diâmetro feixe	2mm
resolução	4cm^{-1}
range	$900 \text{ à } 5000\text{cm}^{-1}$
varreduras	32
temperatura amostra	40°C

Fonte: O AUTOR.

O número de 32 varreduras, ou *scans*, significa que cada espectro adquirido para análise é obtido a partir de uma média de 32 espectros que foram registrados por amostra, em menos de 30 segundos. Essa é uma vantagem da espectroscopia por transformada de Fourier onde o espectro é obtido por completo de uma só vez em um intervalo de tempo muito pequeno diferentemente de espectrofotômetros dispersivos, onde para cada espectro registrado é gasto um tempo de aproximadamente 4 minutos.

A figura 21 mostra o espectro da segunda derivada da transmitância para uma amostra de leite. Neste espectro estão destacadas as regiões de interesse para análise de gordura, proteínas e lactose que serão utilizadas na determinação do teor destes

componentes em amostras de leite cru e de leite UHT (*Ultra High Temperature*, leite ultrapasteurizado por tratamento térmico especial) e discutidas nas próximas seções.

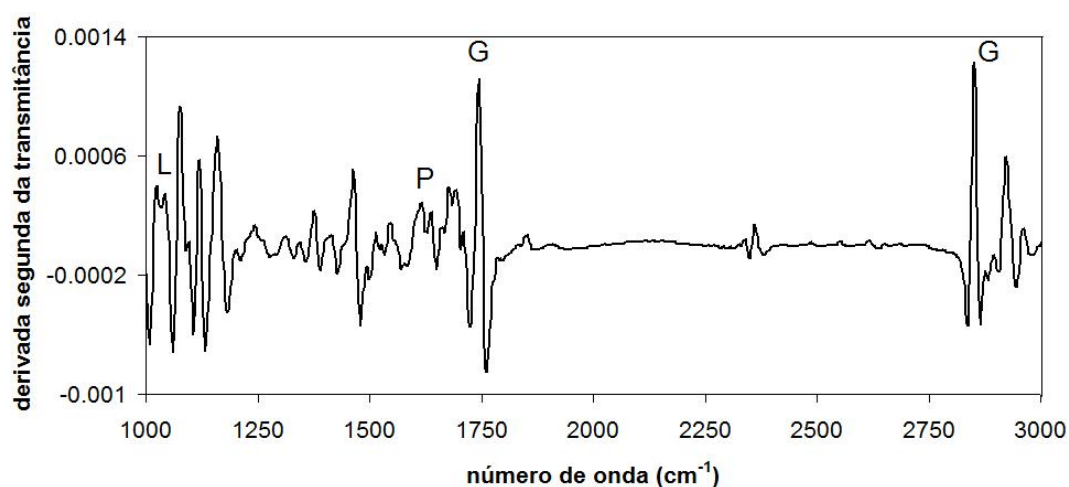


Figura 21 – Derivada segunda da transmitância para amostra de leite. Destaque para as regiões de absorção da lactose - L, gordura - G e proteína - P.

Fonte: O AUTOR.

4.1 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE UHT

A determinação dos teores de gordura, proteína e lactose em amostras de leite UHT foi realizada a partir de 15 amostras de leite UHT de diferentes laticínios sendo, 10 amostras utilizadas para a construção do modelo multivariado MLR, ou seja, para a elaboração da curva de regressão e as demais 5 amostras para a comparação de medidas, todas as leituras foram feitas em duplicatas.

As amostras foram adquiridas no comércio local, e de cada uma foram retiradas 2 alíquotas de 80 mL para a realização das medidas. Estas alíquotas foram levadas ao banho-maria até atingirem a temperatura de 40°C , o controle da temperatura foi feito com um termômetro digital, e por fim cada alíquota foi submetida a técnica de FTIR e a um equipamento de análise eletrônica de leite, o LactoScope fabricado pela Delta Instruments.

O LactoScope é um equipamento de análise eletrônica baseado em medidas de absorção na região do infravermelho com a utilização de filtros especiais descritos pela IDF através da publicação IDF-141C [55]. Tal equipamento vem sendo recorridamente citado pela Associação Americana de Ciência Láctea [56,57], comparado com os métodos clássicos de análises [8,58] e fornecendo resultados confiáveis utilizados em outras publicações [59–61].

As instalações de um laboratório de física, normalmente não oferecem as condições necessárias para se trabalhar com reagentes químicos na determinação dos componentes principais do leite. Desta forma, por todas as características citadas anteriormente, bem

como, por não exigir um tratamento para a amostra é que o LactoScope foi escolhido para fornecer as medidas necessárias para a implementação do modelo de previsão, e também, posteriormente, para a etapa de comparação com os teores obtidos a partir da técnica de FTIR.

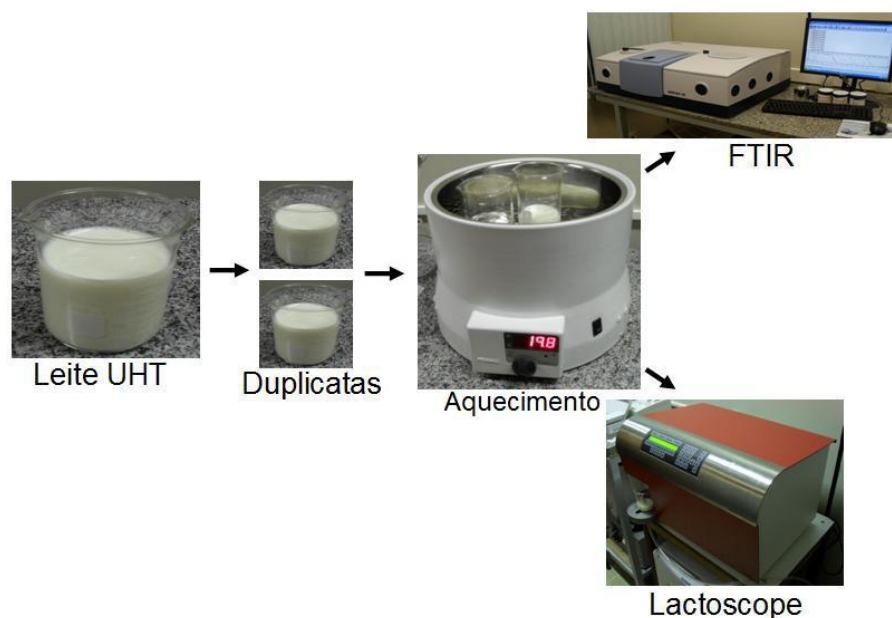


Figura 22 – Preparo da amostra para determinação dos teores de gordura, proteína e lactose em amostras de leite UHT.

Fonte: O AUTOR.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE CRU

A determinação dos teores de gordura, proteína e lactose em amostras de leite cru foi realizada a partir de 13 amostras de leite cru sendo, 9 para a construção do modelo multivariado, ou seja, para a elaboração da regressão e as demais 4 amostras para a validação do modelo, todas as leituras foram feitas em triplicatas genuínas.

As amostras de leite cru foram cedidas pelo Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT). As amostras foram coletas num período de 3 meses, sendo 2 amostras por semana, uma na quarta-feira e outra na sexta-feira pois estes eram os dias de recebimento de leite no ILCT.

Em cada dia de análise de leite cru eram retiradas 6 alíquotas de um mesmo reservatório de leite, destas, 3 alíquotas eram destinadas à quantificação dos teores de gordura, proteína e lactose pelos métodos oficiais de análise, respectivamente método Gerber, método Kjeldahl e Lane-Eynon, estas análises foram realizadas por técnicos especializados no próprio ILCT. As outras 3 alíquotas eram destinadas à medida pela

técnica de FTIR após a homogeneização e estabilização da temperatura a 40°C em banho-maria.

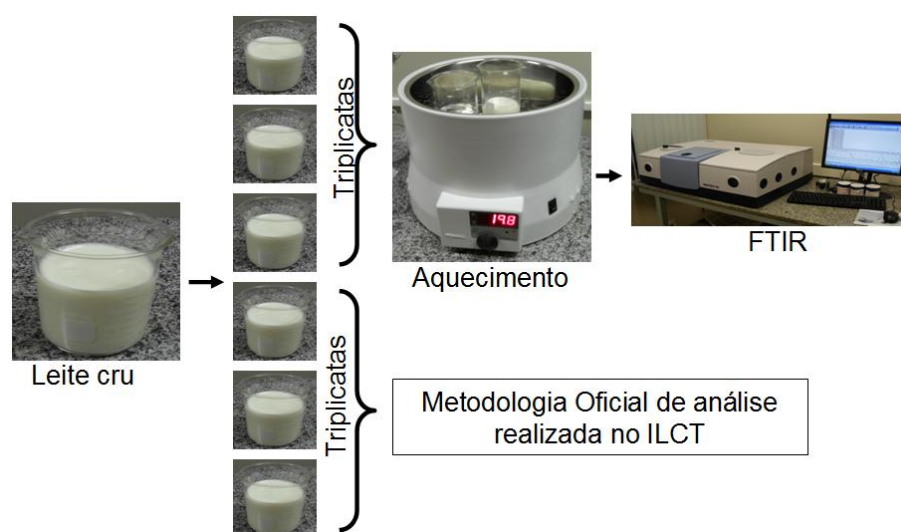


Figura 23 – Preparo da amostra para determinação dos teores de gordura, proteínas e lactose em amostras de leite cru.

Fonte: O AUTOR.

4.3 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE ÁGUA ADICIONADA EM AMOSTRAS DE LEITE UHT

A determinação do percentual de água adicionada às amostras de leite UHT foi realizada utilizando amostra de um único laticínio. Desta amostra foram preparados 5 níveis de adição de água em duplicatas genuínas e os valores espectrais obtidos foram utilizados na construção de uma curva de calibração.

Foram preparados também outros 4 níveis de concentração para a finalidade de comparação do modelo implementado com a metodologia oficial.

As 5 amostras para a construção do modelo de regressão foram preparadas da seguinte forma: em dez balões volumétricos de 10mL foram adicionados em duplicatas os volumes de 1mL, 1,5mL, 2mL, 2,5mL e 3mL de água com micropipeta, depois o volume de cada balão foi completado com leite UHT proveniente de um mesmo estoque. As outras 4 amostras, para a comparação de medidas, foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente mas com os seguintes volumes de água adicionada 1,25mL, 1,75mL, 2,25mL e 2,75mL. Após esta etapa de preparação, cada alíquota foi submetida à técnica de FTIR e à técnica de crioscopia eletrônica, metodologia oficial, com um equipamento modelo MK540 Flex do fabricante ITR.

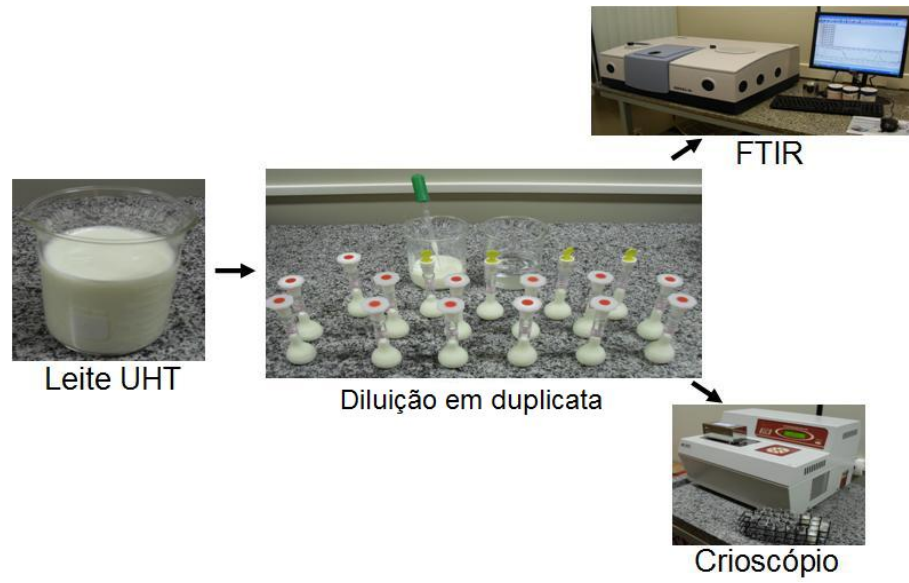


Figura 24 – Preparo da amostra para determinação do percentual de água adicionada em amostras de leite UHT.

Fonte: O AUTOR.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos, os mesmos serão apresentados separadamente, em 3 etapas, assim como foram realizadas as etapas experimentais.

5.1 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE UHT

A leitura das 10 amostras de leite, em duplicatas autênticas, forneceram os seguintes conjuntos de valores para a elaboração do modelo de regressão:

Tabela 13 – Matriz Y - concentração dos constituintes principais do leite pelo método LactoScope.

% Gordura	% Proteína	% Lactose
3,05	3,15	4,39
3,06	3,16	4,40
3,05	3,16	4,40
3,06	3,17	4,41
3,43	3,10	4,55
3,43	3,11	4,56
2,79	3,23	4,44
2,80	3,24	4,45
3,36	3,26	4,44
3,36	3,26	4,45
3,12	3,21	4,46
3,12	3,21	4,46
2,91	2,86	4,27
2,92	2,87	4,28
2,85	3,15	4,32
2,86	3,16	4,32
2,90	3,22	4,58
2,91	3,22	4,59
3,15	3,21	4,20
3,15	3,21	4,21

Fonte: O AUTOR.

Tabela 14 – Matriz X - medida de transmitância pelo método FTIR.

	T em $\bar{\nu}_1$	T em $\bar{\nu}_2$	T em $\bar{\nu}_3$	T em $\bar{\nu}_4$
1	0,1595	0,1555	0,0413	0,0406
1	0,1596	0,1559	0,0417	0,0402
1	0,1605	0,1558	0,0421	0,0410
1	0,1603	0,1554	0,0418	0,0405
1	0,1548	0,1469	0,0418	0,0396
1	0,1548	0,1469	0,0418	0,0397
1	0,1646	0,1601	0,0431	0,0423
1	0,1659	0,1607	0,0436	0,0423
1	0,1574	0,1491	0,0432	0,0423
1	0,1579	0,1494	0,0436	0,0427
1	0,1580	0,1514	0,0410	0,0404
1	0,1582	0,1515	0,0408	0,0401
1	0,1603	0,1578	0,0428	0,0414
1	0,1603	0,1578	0,0426	0,0410
1	0,1613	0,1585	0,0410	0,0410
1	0,1615	0,1588	0,0411	0,0406
1	0,1614	0,1561	0,0411	0,0393
1	0,1615	0,1561	0,0411	0,0390
1	0,1563	0,1506	0,0403	0,0419
1	0,1567	0,1510	0,0405	0,0418

Fonte: O AUTOR.

Onde $T_{\bar{\nu}_1}$ é o valor de transmitância em $1755cm^{-1}$, que se refere a absorção do grupo carbonila presente nos ésteres das moléculas de gordura, figura 1, $T_{\bar{\nu}_2}$ é o valor de transmitância em $2856cm^{-1}$, que se refere aos grupos CH da molécula de gordura, figura 1, $T_{\bar{\nu}_3}$ é o valor de transmitância em $1539cm^{-1}$, que se refere a absorção das ligações peptídicas, figura 2, presentes nas moléculas de proteínas e $T_{\bar{\nu}_4}$ é o valor de transmitância lido em $1041cm^{-1}$, que se referem aos grupos hidroxila da lactose, figura 3.

A partir das duas tabelas anteriores, e pelo uso da eq. (3.37), encontramos a matriz dos coeficientes da regressão múltipla dada por:

Tabela 15 – Matriz B - coeficientes da regressão MLR para leite UHT.

coef. Gordura	coef. Proteína	coef. Lactose
9,93352664	-1,64041326	2,238249924
-21,28495171	110,6243744	76,58031291
-34,7483536	-70,39071292	-51,97151575
52,35150099	-85,04289365	38,83878715
-7,423467363	38,31613954	-89,32403613

Fonte: O AUTOR.

Como nas relações (3.38, 3.39 e 3.37), as colunas da matriz B fornecem as seguintes

equações de regressão:

concentração de gordura em %:

$$\% = 9,93352664 - 21,28495171.T_{\bar{\nu}_1} - 34,7483536.T_{\bar{\nu}_2} + 52,35150099.T_{\bar{\nu}_3} - 7,423467363.T_{\bar{\nu}_4} \quad (5.1)$$

concentração de proteína em %:

$$\% = -1,64041326 + 110,6243744.T_{\bar{\nu}_1} - 70,39071292.T_{\bar{\nu}_2} - 85,04289365.T_{\bar{\nu}_3} + 38,31613954.T_{\bar{\nu}_4} \quad (5.2)$$

concentração de lactose em %:

$$\% = 2,238249924 + 76,58031291.T_{\bar{\nu}_1} - 51,97151575.T_{\bar{\nu}_2} + 38,83878715.T_{\bar{\nu}_3} - 89,32403613.T_{\bar{\nu}_4} \quad (5.3)$$

O conjunto restante, de 5 amostras, em duplicatas autênticas, foi utilizado para a comparação entre os resultados de percentual de gordura, proteína e lactose fornecido pelo LactoScope e pelo FTIR através do modelo de previsão descrito pelas equações (5.1, 5.2, e 5.3), os resultados obtidos por cada método são apresentados na tabela que segue abaixo:

Tabela 16 – Percentual de gordura, proteína e lactose obtidos pelo LactoScope e MLR - FTIR.

LactoScope			MLR - FTIR		
% Gordura	% Proteína	% Lactose	% Gordura	% Proteína	% Lactose
3,13	3,31	4,50	3,10	3,30	4,53
3,14	3,32	4,51	3,09	3,32	4,54
3,06	3,39	4,53	3,02	3,34	4,57
3,07	3,40	4,54	3,04	3,31	4,58
2,83	3,16	4,46	2,85	3,18	4,46
2,83	3,17	4,47	2,85	3,19	4,50
2,96	3,20	4,49	2,96	3,21	4,50
2,96	3,20	4,49	2,95	3,20	4,51
2,98	3,28	4,60	2,99	3,23	4,55
3,00	3,29	4,61	3,01	3,22	4,56

Fonte: O AUTOR.

Abaixo, tem-se a diferença percentual entre os valores obtidos pelas duas técnicas de análise.

Tabela 17 – Diferença percentual entre as medidas realizadas pelo método LactoScope e FTIR.

diferença % Gordura	diferença % Proteína	diferença % Lactose
1,10	0,31	-0,75
1,47	0,14	-0,56
1,23	1,42	-0,91
1,12	2,65	-0,88
-0,79	-0,70	-0,03
-0,60	-0,50	-0,63
0,01	-0,43	-0,26
0,34	-0,06	-0,48
-0,31	1,39	1,13
-0,33	2,07	0,98

Fonte: O AUTOR.

O máximo valor de diferença entre os dois métodos foi de 2,4%, o que sugere uma boa resposta da regressão múltipla frente a medida feita pelo LactoScope. Para comparar os resultados obtidos a partir destes dois métodos de análise foi realizado um teste t pareado. Inicialmente foi verificado que o conjunto de valores a ser comparado apresenta uma distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

O teste t pareado, equação (3.42), fornece para o grupo de medidas referente ao percentual de gordura $t_{calc} = 1,3055$, para o grupo de medidas do percentual de proteína $t_{calc} = 1,8008$ e para o grupo de medidas do percentual de lactose $t_{calc} = 0,7166$, como o valor de $t_{tab} = 2,262$ foi maior que o de t_{calc} , ou seja, $t_{tab} > t_{calc}$, conclui-se que a um nível de 95% de confiança, não existe diferença entre as medidas feitas a partir do LactoScope e pela metodologia de FTIR descrita neste trabalho.

5.2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA, PROTEÍNA E LACTOSE EM AMOSTRAS DE LEITE CRU

A leitura de 9 das 13 amostras de leite, em triplicatas genuínas, foram utilizadas para a elaboração do modelo de previsão dos teores de gordura, proteína e lactose por dois mecanismos distintos, uma regressão MLR e uma regressão PLS, onde ambos os modelos foram calibrados a partir das quantificações realizadas pelos métodos oficiais de análise no Instituto de Laticínios Cândido Tostes.

A regressão linear múltipla MLR foi elaborada de forma análoga a descrita na seção anterior, com o uso da equação (3.37) e o monitoramento da transmitância sobre as seguintes regiões do espectro $1755cm^{-1}$, $2856cm^{-1}$, $1539cm^{-1}$ e $1041cm^{-1}$. Os dados coletados para elaborar o modelo de previsão são apresentados abaixo:

Tabela 18 – Matriz Y - concentração dos constituintes principais do leite obtidos através dos métodos de referência Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon, respectivamente.

% Gordura	% Proteína	% Lactose
4,2	3,07	4,91
4,2	3,07	4,88
4,2	3,06	4,97
4,2	3,52	5,16
4,2	3,53	5,14
4,2	3,55	5,18
4,5	2,88	5,05
4,5	2,96	5,07
4,5	2,94	5,05
4,1	3,14	4,79
4,1	3,13	4,77
4,1	3,17	4,79
4,6	3,24	4,60
4,6	3,19	4,54
4,6	3,21	4,53
4,3	3,66	4,80
4,3	3,68	4,83
4,3	3,82	4,59
4,0	3,70	5,05
4,0	3,79	5,04
4,0	3,60	5,05
4,6	3,22	5,10
4,6	3,21	5,06
4,6	3,26	5,10
4,8	3,66	5,20
4,8	3,50	5,19
4,8	3,46	5,08
4,7	3,70	4,94
4,5	3,21	4,58
4,2	3,11	5,00

Fonte: O AUTOR.

Tabela 19 – Matriz X - medida de transmitância pelo método FTIR.

	T em $\bar{\nu}_1$	T em $\bar{\nu}_2$	T em $\bar{\nu}_3$	T em $\bar{\nu}_4$
1	0,1489	0,1439	0,0389	0,0392
1	0,1500	0,1454	0,0392	0,0394
1	0,1497	0,1453	0,0391	0,0395
1	0,1544	0,1501	0,0396	0,0395
1	0,1534	0,1487	0,0394	0,0396
1	0,1544	0,1499	0,0395	0,0395
1	0,1509	0,1443	0,0407	0,0400
1	0,1515	0,1447	0,0417	0,0397
1	0,1507	0,1443	0,0409	0,0402
1	0,1523	0,1482	0,0379	0,0393
1	0,1521	0,1478	0,0378	0,0396
1	0,1537	0,1499	0,0376	0,0396
1	0,1514	0,1453	0,0398	0,0401
1	0,1502	0,1436	0,0392	0,0400
1	0,1510	0,1446	0,0396	0,0400
1	0,1512	0,1446	0,0402	0,0402
1	0,1505	0,1440	0,0399	0,0401
1	0,1508	0,1444	0,0402	0,0401
1	0,1560	0,1495	0,0402	0,0376
1	0,1582	0,1513	0,0413	0,0364
1	0,1581	0,1506	0,0415	0,0361
1	0,1476	0,1394	0,0385	0,0380
1	0,1476	0,1391	0,0386	0,0380
1	0,1475	0,1390	0,0389	0,0383
1	0,1548	0,1498	0,0413	0,0397
1	0,1557	0,1506	0,0412	0,0400
1	0,1555	0,1505	0,0416	0,0396
1	0,1519	0,1462	0,0394	0,0399
1	0,1502	0,1454	0,0382	0,0392
1	0,1532	0,1479	0,0391	0,0397

Fonte: O AUTOR.

A partir das duas tabelas anteriores, e pelo uso da eq. (3.37), encontramos a matriz dos coeficientes da regressão múltipla dada por:

Tabela 20 – Matriz B - coeficientes da regressão MLR para leite cru.

coef. Gordura	coef. Proteína	coef. Lactose
-0,884304982	-10,27558194	7,924270519
52,55245157	183,5777834	-76,79431418
-69,68531812	-100,5619568	58,87030226
65,09062745	-47,45781324	99,883427
124,1731909	58,21822593	-98,92763874

Fonte: O AUTOR.

Como nas relações (3.38, 3.39 e 3.37), as colunas da matriz B fornecem as seguintes equações de regressão:

concentração de gordura em %:

$$\% = -0,884304982 + 52,55245157.T_{\bar{v}_1} - 69,68531812.T_{\bar{v}_2} + 65,09062745.T_{\bar{v}_3} + 124,1731909.T_{\bar{v}_4} \quad (5.4)$$

concentração de proteína em %:

$$\% = -10,27558194 + 183,5777834.T_{\bar{v}_1} - 100,5619568.T_{\bar{v}_2} - 47,45781324.T_{\bar{v}_3} + 58,21822593.T_{\bar{v}_4} \quad (5.5)$$

concentração de lactose em %:

$$\% = 7,924270519 - 76,79431418.T_{\bar{v}_1} + 58,87030226.T_{\bar{v}_2} + 99,883427.T_{\bar{v}_3} - 98,92763874.T_{\bar{v}_4} \quad (5.6)$$

O conjunto restante de amostras foi utilizado para a comparação entre os resultados de percentual de gordura, proteína e lactose fornecido pelos métodos de referência, IN68, e pelo método de FTIR através do modelo de previsão descrito pelas equações (5.4, 5.5, e 5.6), os resultados por cada método são apresentados na tabela que segue abaixo:

Tabela 21 – Percentual de gordura, proteína e lactose obtidos pelos métodos oficiais (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon, respectivamente) e MLR - FTIR.

Métodos oficiais			MLR - FTIR		
% Gordura	% Proteína	% Lactose	% Gordura	% Proteína	% Lactose
4,1	3,01	4,82	4,39	3,31	5,13
4,1	3,02	4,86	4,43	3,32	5,09
4,7	3,62	4,94	4,45	3,35	4,89
4,7	3,52	4,94	4,42	3,42	4,87
4,5	3,20	4,55	4,28	3,20	4,84
4,5	3,31	4,57	4,31	3,12	4,85
4,2	3,08	5,00	4,31	3,36	4,86
4,2	3,06	5,00	4,21	3,34	4,81

Fonte: O AUTOR.

A diferença percentual entre as medidas obtidas pelos métodos oficiais e as obtidas a partir da regressão MLR para as medidas realizadas pela técnica de FTIR são apresentadas abaixo:

Tabela 22 – Diferença percentual entre as medidas realizadas pelo método oficial (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon) e pelo método de FTIR utilizando regressão MLR.

diferença % Gordura	diferença % Proteína	diferença % Lactose
-7,03	-9,85	-6,44
-7,94	-9,87	-4,82
5,23	7,51	1,08
5,85	2,85	1,37
4,80	-0,04	-6,47
4,14	5,62	-6,18
-2,55	-9,04	2,71
-0,16	-9,18	3,81

Fonte: O AUTOR.

Para comparar os resultados obtidos a partir destes dois métodos de análise, métodos oficiais e método de FTIR, foi realizado um teste t pareado. Inicialmente foi verificado que o conjunto de valores a ser comparado apresenta uma distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

O teste t pareado, equação (3.42), fornece para o grupo de medidas referente ao percentual de gordura $t_{calc} = 0,2848$, para o grupo de medidas do percentual de proteína $t_{calc} = 0,8747$ e para o grupo de medidas do percentual de lactose $t_{calc} = 1,11$, como o valor de $t_{tab} = 2,365$ foi maior que o de t_{calc} , ou seja, $t_{tab} > t_{calc}$, conclui-se que a um nível de 95% de confiança, não existe diferença entre as medidas feitas a partir dos métodos de Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon e pela metodologia de FTIR descrita neste trabalho.

O mesmo conjunto de amostras foi submetido a regressão por mínimos quadrados parciais PLS com o objetivo de verificar se ocorreria uma redução na diferença percentual entre os resultados obtidos pelos métodos oficiais e pela técnica de FTIR.

A regressão PLS foi modelada com o pacote de serviços *PLS Toolbox* versão 5.0 sobre a plataforma do software *Matlab* sendo a matriz $X_{30 \times 2126}$ da calibração obtida a partir dos espectros de transmissão de 9 amostras em triplicatas autênticas num range espectral de 900 à 5000cm^{-1} em intervalos de 4cm^{-1} .

Os gráficos de dispersão entre os valores obtidos a partir da regressão PLS (*predicted*) e os valores de referência obtidos pelos métodos oficiais de análise (*measured*) são apresentados abaixo:

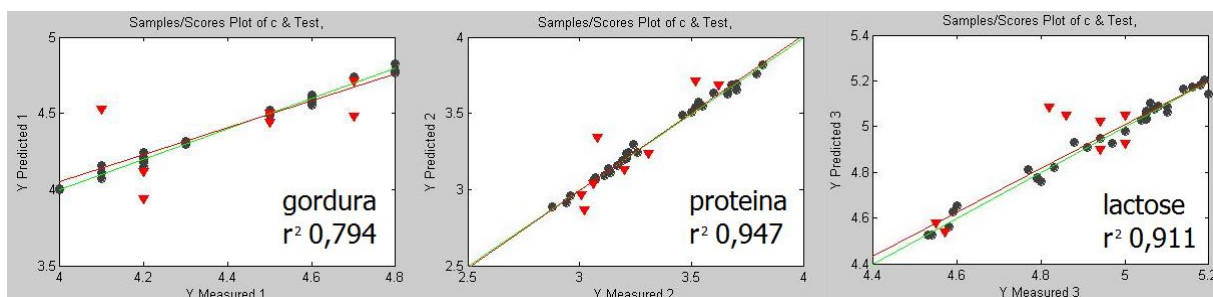


Figura 25 – Resposta da regressão PLS - Gráficos de scores para gordura, proteína e lactose.

Fonte: O AUTOR.

Na figura acima é possível verificar que o coeficiente de correlação r^2 para a quantificação dos teores de gordura é inferior aos coeficiente encontrados para proteína e lactose. Isso se deve a precisão dos valores de referência dos teores de gordura fornecidos pela metodologia oficial de análise, método Gerber, utilizados para calibrar o modelo de regressão, tais valores com apenas uma casa decimal geram um erro grande no percentual de gordura ao efetuar a leitura pelo método butirométrico esse erro é refletido no modelo de regressão. Outro fato que explica esta correlação $r^2 = 0,794$ se deve a dificuldade de homogeneização das amostras antes da leitura, feitas com bastão de vidro e banho térmico a 40 graus celsius.

A tabela abaixo mostra os valores obtidos para os teores de gordura, proteína e lactose pelos métodos oficiais e por FTIR a partir da regressão PLS.

Tabela 23 – Percentual de gordura, proteína e lactose obtidos pelos métodos oficiais (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon, respectivamente) e PLS - FTIR.

Métodos oficiais			MLR - FTIR		
% Gordura	% Proteína	% Lactose	% Gordura	% Proteína	% Lactose
4,1	3,01	4,82	4,53	2,96	5,08
4,1	3,02	4,86	4,52	2,87	5,05
4,7	3,62	4,94	4,48	3,68	4,90
4,7	3,52	4,94	4,71	3,71	5,02
4,5	3,20	4,55	4,44	3,13	4,58
4,5	3,31	4,57	4,50	3,23	4,54
4,2	3,08	5,00	4,12	3,34	4,93
4,2	3,06	5,00	3,94	3,04	5,05

Fonte: O AUTOR.

A tabela abaixo mostra os valores de diferença percentual obtidos entre os métodos padrão de análise e os obtidos a partir da regressão PLS.

Tabela 24 – Diferença percentual entre as medidas realizadas pelos métodos oficiais (Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon) e pelo método de FTIR utilizando regressão PLS.

diferença % Gordura	diferença % Proteína	diferença % Lactose
-10,49	1,66	-5,39
-10,24	4,97	-3,91
4,68	-1,66	0,81
-0,21	-5,40	-1,62
1,33	2,19	-0,66
0,00	2,42	0,66
1,90	-8,44	1,40
6,19	0,65	-1,00

Fonte: O AUTOR.

Para comparar os resultados obtidos a partir destes dois métodos de análise, métodos oficiais e método de FTIR, foi realizado um teste t pareado. Inicialmente foi verificado que o conjunto de valores a ser comparado apresenta uma distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

O teste t pareado, equação (3.42), fornece para o grupo de medidas referente ao percentual de gordura $t_{calc} = 0,324$, para o grupo de medidas do percentual de proteína $t_{calc} = 0,348$ e para o grupo de medidas do percentual de lactose $t_{calc} = 1,439$, como o valor de $t_{tab} = 2,365$ foi maior que o de t_{calc} , ou seja, $t_{tab} > t_{calc}$, conclui-se que a um nível de 95% de confiança, não existe diferença entre as medidas feitas a partir dos métodos de Gerber, Kjeldahl e Lane-Eynon e pela metodologia de FTIR descrita neste trabalho.

Observando-se os resultados gerados a partir das duas formas de cálculo de regressão utilizadas nesta seção, MLR e PLS, percebe-se que as duas quando comparadas com as técnicas oficiais de análise levam a erros inferiores a 10,5%. Ainda que a regressão PLS seja mais refinada que a MLR, ambas mostraram-se semelhantes para a finalidade de aplicação deste trabalho. Sendo assim, pode-se dizer que no caso deste trabalho, a regressão MLR é mais vantajosa já que não necessita de software específico para sua execução.

5.3 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE ÁGUA ADICIONADA EM AMOSTRAS DE LEITE UHT

A leitura dos 5 níveis de adição de água ao leite, em duplicatas, forneceram os seguintes conjuntos de valores para a elaboração do modelo de regressão:

Tabela 25 – Dados obtidos para a elaboração da regressão do percentual de água adicionada no leite.

amostra	% de adição de água - Crioscópio	Transmitância em 2131cm^{-1} – FTIR
1a	10,74	0,1961
1b	10,74	0,1963
2a	15,74	0,1953
2b	15,55	0,1951
3a	20,92	0,1936
3b	20,74	0,1934
4a	25,92	0,1920
4b	25,92	0,1918
5a	30,92	0,1904
5b	31,11	0,1903

Fonte: O AUTOR.

A partir da tabela acima, pelo método dos mínimos quadrados, obtemos a regressão para o percentual de água adicionada ao leite em função do valor de transmitância em 2131cm^{-1} ($\bar{\nu}_5$), região de absorção da molécula de água, esta regressão é dada por:

$$\% = -3362,8.T_{\bar{\nu}_5} + 671,3 \quad (5.7)$$

Os testes de linearidade da regressão (5.7) foram realizados com o conjunto de dados apresentados na tabela 25, o primeiro teste foi determinar o coeficiente de correlação $r = \sqrt{R^2}$ a partir da equação (3.43), o resultado obtido foi $R^2 = 0,9927$. Logo o valor do coeficiente de correlação é $r = 0,9963$ valor superior ao recomendado de 0,99. Com esse teste é possível afirmar que existem evidências de uma boa relação linear entre os valores de transmitância em 2131cm^{-1} e o percentual de adição de água.

O segundo teste de linearidade utilizado foi o teste de hipótese *a priori*, a partir da eq. (3.44) o valor encontrado foi $F_{calc} = 4,520$ e como $F_{tab} = 5,41$, ou seja, $F_{calc} < F_{tab}$, o teste de hipótese *a priori* indica ausência de falta de ajuste no modelo de previsão, a um nível de 95% de confiança.

O conjunto restante, de 4 amostras, foi utilizado para a comparação entre os resultados de percentual de água adicionada ao leite fornecido pelo método oficial de criscopia eletrônica e pelo método de FTIR através do modelo de previsão descrito pela equação (5.7), os resultados obtidos por cada método são apresentados na tabela que segue abaixo:

Tabela 26 – Percentual de água adicionada ao leite pelo método de crioscopia eletrônica e pelo método de FTIR e diferença percentual entre as duas medidas.

amostra	% de adição de água - Crioscópio	% de adição de água - FTIR	diferença %
1	13,14	12,19	7,22
2	18,33	17,91	2,30
3	23,51	23,29	0,94
4	28,70	28,33	1,28

Fonte: O AUTOR.

O máximo valor de diferença entre os dois métodos foi de 7,5% apenas para uma medida, as demais apresentam diferença percentual inferior a 2,5%, o que sugere uma boa resposta da regressão frente a medida feita pelo Crioscópio. Para comparar os resultados obtidos a partir destes dois métodos de análise foi realizado um teste t pareado. Inicialmente foi verificado que o conjunto de valores a ser comparado apresenta uma distribuição normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

O teste t pareado, equação (3.42), fornece para o grupo de medidas avaliado $t_{calc} = 3,0872$ como o valor de $t_{tab} = 3,182$ foi maior que o de t_{calc} , ou seja, $t_{tab} > t_{calc}$, conclui-se que a um nível de 95% de confiança, não existe diferença entre as medidas feitas a partir da crioscopia eletrônica e pela metodologia de FTIR descrita neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que a técnica de FTIR na região do infravermelho médio juntamente com o uso de ferramentas quimiométricas empregadas na elaboração de modelos de regressão multivariados para a previsão dos teores de gordura, proteína e lactose em amostras de leite líquido, UHT e cru, são equivalentes às metodologias oficiais de análise de leite.

O modelo de regressão MLR elaborado a partir do monitoramento dos valores de transmitância em 1041, 1539, 1755 e 2856cm^{-1} não apresentou diferenças quanto aos resultados obtidos pelo equipamento de análise eletrônica LactoScope, a um nível de 95% de confiança, para a quantificação dos teores de gordura, proteína e lactose em amostras de leite UHT.

Sabe-se que a regressão PLS é mais refinada que a MLR, contudo, ambas mostraram-se semelhantes para a determinação dos teores de gordura, proteínas e lactose em amostras de leite cru, mostrando que a um nível de 95% de confiança não diferem das metodologias oficiais de análise para estes constituintes. Portanto pode-se dizer que no caso deste trabalho a regressão MLR é mais vantajosa já que não necessita de software específico para sua execução.

O modelo de regressão linear obtido a partir do monitoramento do valor de transmitância em 2131cm^{-1} não apresentou diferenças quando comparado com os resultados encontrados a partir da metodologia oficial de análise, crioscopia eletrônica, a um nível de 95% de confiança, para a determinação dos percentuais de água adicionada em amostras de leite UHT.

A técnica de FTIR mostrou-se bastante sensível e capaz de identificar e quantificar os constituintes principais do leite, gordura, proteína e lactose, bem como na identificação da adição de água ao leite. Estes resultados ressaltam a eficiência da técnica de FTIR para a análise e controle de qualidade do leite.

Em apêndice é apresentada uma perspectiva deste trabalho, que inicia a etapa de elaboração de protótipos, fotômetros microcontrolados, dedicados à análise da qualidade do leite.

REFERÊNCIAS

- 1 Da-Wen Sun, Infrared Espectroscopy For Food Quality Analysis and Control, First Edition, Chapter 1, (2009).
- 2 Rodriguez-Otero J.L., Maria Hermida M., Juan Centeno J., Analysis of Dairy Products by Near-Infrared Spectroscopy: A Review, Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.45, n.8, (1997).
- 3 Laporte M.F., Paquin P., Near-Infrared Analysis of Fat, Protein, and Casein in Cow's Milk, Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.47, n.7, (1999).
- 4 Buning-Pfaue H., Analysis of water in food by near infrared spectroscopy, Food Chemistry, n.82, p.107-115, (2003).
- 5 Adamopoulos K.G., Goula A.M., Petropakis H.J., Quality Control During Processing of Feta Cheesec - NIR Application, Journal of food composition and analysis, n.14, p.431-440, (2001).
- 6 Karoui Romdhane, Baerdemaeker Josse De, A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products, Food Chemistry, n.102, p.621-640, (2007).
- 7 Sultaneh A., Rohm H., Using near infrared spectroscopy for the determination of total solids and protein content in cheese curd, International Journal of Dairy Technology, V.60, N.4, (2007).
- 8 Silveira T.M.L. , Fonseca L.M. , Cançado S.V. , Ferraz V., Comparação entre os métodos de referência e a análise eletrônica na determinação da composição do leite bovino, Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia, v.56, n.6, p.782-787, (2004).
- 9 Brasil, Instrução Normativa Nº 51, Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, (2002).
- 10 Cienfuegos F., Vaistsman D., Análise Instrumental, Ed. Interciência,(2000).
- 11 Instituto Adolfo Lutz, Métodos físico-químicos para análise de alimentos, coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, capítulo 27, São Paulo, (2008).
- 12 Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Agencia de informação Embrapa, Agronegócio do Leite, disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>, acessado em 19/02/2011.
- 13 Wattiaux Michel A., Essenciais em Gado de Leite - Lactação e Ordenha, Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira, Internacional University of Wisconsin-Madison, capítulo 19.
- 14 Dez especialistas opinam sobre leite, disponível em <http://www.bebaleite.com.br>, acessado em 26/11/2010.
- 15 Bulletin of the International of Dairy Federation 446/2010, International of Dairy Federation, endereço eletrônico <http://www.fil-idf.org>.

- 16 Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite, Ranking da Produção Anual Leite por Estado no Brasil 2007, disponível em <http://www.cnppl.embrapa.br>, acessado em 19/02/2011.
- 17 Levantamento Top 100, Os 100 maiores produtores de leite do Brasil em 2002, Milkpoint, disponível em <http://www.milkpoint.com.br>, acessado em 19/02/2011.
- 18 Silva P.H.F., Leite - Aspectos de composição e propriedades, Química Nova na Escola, n.6, (1997).
- 19 Walstra P., Jenness R., Química y física lactológica, Zaragoza: Editorial Acribia, (1984).
- 20 Brasil, Instrução Normativa N° 68, Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, (2006).
- 21 Silva P.H.F., Aspectos bioquímicos e tecnológicos da água como constituinte dos produtos lácteos, Milknet, disponível em <http://www.milknet.com.br>, acessado em 16/02/2011.
- 22 Inñón F.A., Garrigues S., Guardia M., Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques, Analytica Chimica Acta, n.513, p.401-412, (2004).
- 23 Freda M., Piluso A., Santucci A., Sassi P., Transmittance Fourier Transform Infrared Spectra of Liquid Water in the Whole Mid-infrared Region: Temperature Dependence and Structural Analysis. Applied Spectroscopy, v.59, n.9, (2005).
- 24 Standard Methods for the examination of Dairy Products, Ed. Alpha, 17 edition, (2004).
- 25 Curi R., Pompéia C., Miayasaka C.K., Procopio J., Entendendo a gordura - Os ácidos graxos, Ed. Manoele, Primeira edição, (2002).
- 26 González F.H.D., Durr J.W., Fontaneli R.S., Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras, Biblioteca Setorial da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, (2001).
- 27 Voort F.R. van de, Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis, Food Research International, n.25, p.397-403, (1992).
- 28 Marchi M., Fagan C.C., Donnell C.P., Cecchinato A., Dal Zotto R., Cassandro M., Penasa M., Bittante G., Prediction of coagulation properties, titratable acidity, and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy, Journal of Dairy Science, Vol.92, N.1, p.423-432, (2009).
- 29 Kaylegian K.E., Houghton G.E., Lynch J.M., Fleming J.R., Barbano D.M., Calibration of Infrared Milk Analyzers: Modified Milk Versus Producer Milk, Journal of Dairy Science, Vol.89, N.8, p.2817-2832, (2006).
- 30 Solomons G., Fryhle C., Química orgânica, Ed. LTC, Oitava edição, vol.2, (2006).
- 31 Jackson J.D., Classical Eletrodynamics, Ed. Wiley, Third edition, (1999).

- 32 Fowles G.R., Introduction to modern optics, Dover publications, Second edition, (1989).
- 33 Nakamoto K., Infrared and Raman Spectra os Inorganic and Coordination Compounds - Part A, Ed. Wiley, Sixth edition, (2009).
- 34 Roditi I., Dicionário Houaiss de física, Ed. Objetiva, Primeira edição, (2005).
- 35 Falcão M., Interferómetro de Michelson: princípios e aplicações, Universidade de Aveiro, Dep. Física, (1999).
- 36 Arfken G.B., Weber H.J., Física Matemática - Métodos matemáticos para engenharia e física, Ed. Campus, Sexta edição, Capítulo 15, (2007).
- 37 Zilio S.C., Óptica Moderna - Fundamentos e aplicações, e-book IFSC-USP, disponível em <http://www.fotonica.ifsc.usp.br/ebook/e-book1.php>, acessado em 20/03/2011.
- 38 Homes C.C., Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Condensed Matter Physics and Materials Science Department - Brookhaven National Laboratory, (2007).
- 39 Bretzlaff R.S., Bahder T.B., Apodization effects in Fourier transform infrared difference spectra, *Revue de Physique Appliquée*, N.12, (1986).
- 40 Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., Fundamentos de química analítica, Ed. Cengage Learning, oitava edição, (2006).
- 41 Custodio R., Kubota L.T., Andrade J.C., Lei dos Processos de Absorção da Radiação, Chemkeys, (2000).
- 42 Einax W.J., Chemometrics in analytical chemistry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, n.380, p.368-369, (2004).
- 43 Neto B.B., Pimentel M.F., Araújo M.C.U., Recomendações para calibração em química analítica Parte 1 - Fundamentos e calibração com um componente (Calibração univariada), *Química Nova*, Vol.25, N.5, p.856-865, (2002).
- 44 Booksh K.S., Kowalski B.R., Theory of analytical chemistry, *Analytical Chemistry*, n.66, p.782A-791A, (1994).
- 45 Olivieri A.C., Faber N.M., Ferré J., Boqué R., Kalivas J.H., Mark H., Uncertainty estimation and figures of Merit for multivariate calibration, IUPAC Technical Report, *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 78, N. 3, p.633-661, (2006).
- 46 Pimentel M.F., Galvão R.K.H., Araújo M.C.U., Recomendações para calibração em química analítica Parte 2 - Calibração Multianálito, *Química Nova*, Vol.31, N.2, p.462-467, (2008).
- 47 Brereton R.G., Chemometrics - Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, Ed. Wiley, (2003).
- 48 Borin A., Poppi R.J., Application of mid infrared spectroscopy and iPLS for the quantification of contaminants in lubricating oil, *Vibrational Spectroscopy*, n.37, p.27-32, (2005).

- 49 Ferreira M.M.C., Antunes A.M., Melgo M.S., Volpe P.L.O., *Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial*, Química Nova, n.22, (1999).
- 50 Harris D.C., *Análise Química Quantitativa*, Ed. LTC, Sexta edição, (2005).
- 51 Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, D.O.U. - Diário Oficial da União, Poder Executivo, (2003).
- 52 Danzer K., Currie L.A., *Guidelines for calibration in analytical chemistry - Fundamentals and single component calibration*, IUPAC Recommendations, Pure and Applied Chemistry, v.70, n.4, p.993-1014, (1998).
- 53 Neto B.B., Scarminio I.S., Bruns R.E., *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, ed. Unicamp, terceira edição, (2007).
- 54 Vogel A.I., *Química Analítica Qualitativa*, Ed. Mestre Jou, Quinta edição, (1981).
- 55 IDF 141C, Whole milk - Determination of milkfat, protein and lactose content - guidance on the operation of mid-infrared instruments, International Dairy Federation, (2000).
- 56 Kaylegian K.E., Dwyer D.A., Lynch J.M., Bauman D.E., Fleming J.R., Barbano D.M., Impact of fatty acid composition on the accuracy of mid-infrared fat analysis of farm milks, *Journal of Dairy Science*, Vol.92, N.6, p.2502-2513, (2009).
- 57 Kaylegian K.E., Lynch J.M., Fleming J.R., Barbano D.M., Influence of fatty acid chain length and unsaturation on mid-infrared milk analysis, *Journal of Dairy Science*, Vol.92, N.6, p.2485-2501, (2009).
- 58 Sion I., Dabija A., Modern methods for physical-chemical and bacteriological analysis of raw milk and fermented milk products, *Scientific Researches. Agroalimentary Processes and Technologies*, Vol.11, N.2, p.357-362, (2005).
- 59 Evans J., Zulewska J., Newbold M., Drake M.A., D. M. Barbano D.M., Comparison of composition and sensory properties of 80% whey protein and milk serum protein concentrates, *Journal of Dairy Science*, Vol.93, N.5, p.1824-1843, (2010).
- 60 Alisa A.V., Nistor I.D., Leonte M., Moroi A.M., Modelation and optimization of milk fermentation Process for obtaining of cow fresh cheese By factorial analysis, *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, N.65, (2008).
- 61 Cope C.M., Mackenzie A.M., Wilde D., Sinclair L.A., *Journal of Dairy Science*, Vol.92, N.5, p.2128-2135, (2009).

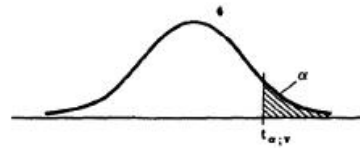
**APÊNDICE A – Protótipo Dedicado a Determinação Do Percentual De
Água Adicionada Ao Leite.**

OBSERVAÇÃO: Esta seção foi removida por sigilo de patente.

ANEXO A – Distribuição t-student

Distribuição t-student utilizada no teste de hipóteses para determinar se há ou não diferença entre o conjunto de medidas obtidos a partir de dois métodos de análise distintos para amostras heterogêneas. A conclusão do teste é feita a partir da comparação do valor obtido por meio desta tabela, denominado t_{tab} , e do valor t_{calc} obtido pela equação (3.41).

TABELA PARA DISTRIBUIÇÃO t DE STUDENT



Nota. A tabulação é unilateral, isto é, vale para os valores positivos de t . Para $|t|$ os valores de α devem ser duplicados.

ν	α						
	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,0005
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	318,31	636,62
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,326	31,598
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,213	12,924
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,869
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,408
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610	3,922
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,825	3,552	3,850
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
120	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,160	3,373
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291

Figura 26 – Tabela de valores da distribuição t-student.

Fonte: www.wikipedia.org

ANEXO B – Distribuição F

Distribuição F utilizada no teste de hipóteses para determinar se uma regressão linear é ou não adequada para descrever os dados obtidos, este teste também é chamado de verificação de falta de ajuste no modelo de regressão. A conclusão do teste é feita a partir da comparação do valor obtido por meio desta tabela, denominado F_{tab} , e do valor F_{calc} obtido pela equação (3.44).

TABELA F : VALORES CRÍTICOS PARA UM TESTE UNILATERAL ($\alpha = 0,05$)

$v_1 \backslash v_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,9	245,9	248,0	249,1	250,1	251,1	252,2	253,3	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00

Figura 27 – Tabela de valores da distribuição F.

Fonte: www.wikipedia.org