

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

APLICAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS E TÉCNICAS
ESPECTROANALÍTICAS COMBINADAS COM QUIMIOMETRIA
PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM
LEITE BOVINO

POLIANA MACEDO DOS SANTOS*

Tese de doutorado apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

*Bolsista FAPESP

São Carlos-SP
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S237ai

Santos, Poliana Macedo dos.

Aplicação de imagens digitais e técnicas espectroanalíticas combinadas com quimiometria para detecção e quantificação de adulteração em leite bovino / Poliana Macedo dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2013. 79 f.

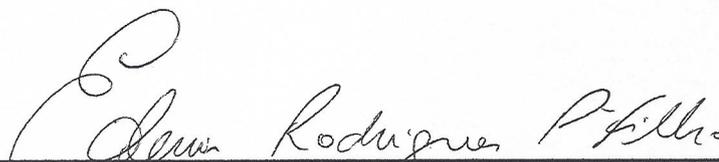
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química analítica. 2. Imagem digital. 3. Infravermelho. 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Quimiometria. 6. Leite. I. Título.

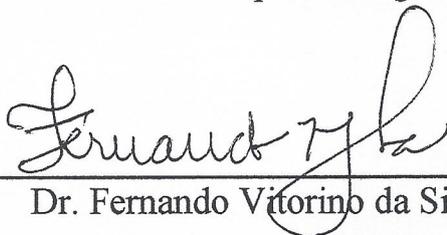
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata Poliana Macedo dos Santos, realizada em 22 de fevereiro de 2013:


Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho


Prof. Dr. Luis Enrique Rodriguez Saona


Dr. Fernando Vitorino da Silva


Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi


Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini

A minha família por não medirem esforços e sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Edenir Rodrigues Pereira Filho pela orientação, confiança e amizade demonstrada ao longo desses anos de convivência;

Aos professores Drs. Joaquim Araújo Nóbrega e Ana Rita Araujo Nogueira pelas importantes sugestões durante o desenvolvimento do trabalho;

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago pela parceria neste projeto de doutorado;

Ao Dr. Luis Rodriguez-Saona pela recepção, oportunidade e colaboração no trabalho realizado junto ao departamento de Food Science and Technology da The Ohio State University;

Aos colegas da The Ohio State University e os integrantes do grupo Spectroscopic Analysis Lab pela ajuda, paciência e convivência;

Aos membros da banca por aceitarem o convite para participar da avaliação desta tese de doutorado;

A empresa de laticínios Satule e a Embrapa Pecuária Sudeste por fornecer as amostras de leite;

A empresa Alibra por fornecer as amostras de soro de leite em pó;

Aos funcionários do DQ/UFSCar, em especial as secretárias da secretaria de Pós-Graduação;

A todos os colegas do Grupo de Análise Instrumental Aplicada – GAIA, por estes anos de convivência e ensinamentos;

Aos colegas da Embrapa Instrumentação;

Aos colegas de São Carlos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2009/01345-6) pela bolsa concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – 1001-11-6) pela bolsa de doutorado sanduíche concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 578259/2008-7) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATR – Refletância total atenuada, do inglês *Attenuated total reflectance*
- b* – coeficiente tricromático azul, do inglês *blue*
- CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill
- dpi – do inglês, *dots per inch*
- DTGS – Sulfeto de triglicerina deuterada, do inglês *Deuterated triglycine sulfate*
- FAO – *Food and Agricultural Organization*
- FIR – Infravermelho na região do distante, do inglês *Far Infrared*
- g* – coeficiente tricromático verde, do inglês *green*
- HSV – Matiz, saturação e valor, do inglês *Hue, Saturation e Value*
- HSI – Matiz, saturação e intensidade, do inglês *Hue, Saturation e Intensity*
- ICD – Distância entre as classes, do inglês *Interclass distance*
- InGaAs – Arsenieto de gálio e índio, do inglês *Indium gallium arsenide*
- Jpg – *Join Photografic Experts Group*
- k* – Número de vizinhos próximos
- KNN – K-ésimo vizinho mais próximo, do inglês *K-Nearest Neighbor*
- L – Luminosidade, do inglês *Luminosity*
- MIR – Infravermelho na região do médio, do inglês *Middle Infrared*
- n* – número de amostras
- NIR – Infravermelho na região do próximo, do inglês *Near Infrared*
- nt* – número de médias
- PbSe – Seleneto de chumbo, do inglês *Lead Selenide*
- PCA – Análise por componentes principais, do inglês *Principal Components Analysis*
- PCR – Regressão por componentes principais, do inglês *Principal components regression*
- PCs – Número de componentes principais

Pixel – *Picture Element*

PLS – Regressão por mínimos quadrados parciais, do inglês *Partial Least Squares*

r – coeficiente tricromático vermelho, do inglês *red*

rCal – Coeficiente de correlação do conjunto de calibração, do inglês *Correlation coefficient of calibration*

RGB – Vermelho, verde e azul, do inglês *Red, Green e Blue*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN-DT – Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo

rVal – Coeficiente de correlação do conjunto de validação, do inglês *Correlation coefficient of validation*

SEC – Erro padrão de calibração, do inglês *Standard error of calibration*

SECV – Erro padrão da validação cruzada, do inglês *Standard error of cross validation*

SEP – Erro padrão de predição, do inglês *Standard error of prediction*

SIMCA – *Soft Independent Modeling of Class Analogy*

T_1 – Tempo de relaxação longitudinal

T_2 – Tempo de relaxação transversal

VL – Variáveis latentes

UHT – Ultra alta temperatura, do inglês *Ultra High Temperature*

USP – *U.S. Pharmacopeial Convention*

ZnSe – Seleneto de zinco, do inglês *zinc selenide*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Indicadores ácido-base.....	11
TABELA 1.2. Descrição dos adulterantes utilizados e a faixa de adulteração (% v/v), bem como o número de amostras obtidas e o planejamento experimental aplicado para análise de misturas de adulterantes.	13
TABELA 1.3. Parâmetro de cor (média \pm desvio padrão, n = 52) para as amostras de leite não adulterada e adulterada com água em 5, 15, 25, 35 e 50 % v/v.....	19
TABELA 1.4. Distância entre as classes do modelo SIMCA obtido com as amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50 % v/v.	20
TABELA 1.5. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v.	21
TABELA 1.6. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada.....	22
TABELA 1.7. Parâmetros de cor (média \pm desvio padrão, n = 8) para leite de boa qualidade, azedo e adulterado com NaOH.....	27
TABELA 1.8. Comparação dos parâmetros estatísticos obtidos com os modelos PLS e PCR para quantificação de adulterantes em amostras de leite.....	28
TABELA 2.1. Valores de ICD entre as amostras de leite não adulterada e adulterada com soro, leite sintético, urina sintética, ureia e peróxido de hidrogênio após supressão do sinal da água. Estes espectros foram coletados no espectrômetro MIR modelo 4200 FlexScan.	49
TABELA 2.2. Comparação dos parâmetros estatísticos dos modelos PLS obtidos com os diferentes espectrômetros portáteis de infravermelho.....	51
TABELA 3.1. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v.	63

TABELA 3.2. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada.....	63
TABELA 3.3. Parâmetros estatísticos obtidos com o modelo PLS para quantificação da porcentagem de adulteração em leite bovino.....	64
TABELA 3.4. Valores de T_2 para as amostras de leite.	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Cubo de cores do modelo RGB. Os pontos ao longo da diagonal principal têm valores na escala de cinza desde a cor preta (0,0,0) na origem até branco no ponto (1,1,1).....	6
FIGURA 1.2. (A) triângulo de cores do modelo HSV e (B) cubos de cores do modelo RGB.	7
FIGURA 1.3. Sólido de cores do modelo HSV.....	7
FIGURA 1.4. Representação esquemática do procedimento utilizado para a obtenção e análise das imagens digitais.....	16
FIGURA 1.5. Gráfico de scores obtido com as amostras de leite não adulterado e adulterado em diferentes concentrações.	17
FIGURA 1.6. Gráfico de loadings obtido a partir da PCA das amostras de leite não adulterado e adulterado em diferentes concentrações.....	18
FIGURA 1.7. Representação esquemática do procedimento de preparo de amostras para verificação da adulteração em leite bovino com soda cáustica. ..	24
FIGURA 1.8. Gráfico dos scores obtido com o indicador vermelho de metila para as amostras de leite de boa qualidade (□), leite azedo (○) e leite azedo adulterado com mais NaOH (▲).	25
FIGURA 1.9. Gráfico de loadings das amostras de leite de boa qualidade, leite azedo e leite azedo adulterado com mais naoh.	25
FIGURA 1.10. Correlação entre as concentrações reais de adulterantes presentes nas amostras de leite e as previstas pelos modelos (A) PLS e (B) PCR.	29
FIGURA 2.1. Espectros de MIR e NIR obtidos com amostras de leite não adulterada e adulterada obtidas nos espectrômetros: (A) NIR Excalibur 3500, (B) MIR 4200 FlexScan, (C) MIR Cary 630 e (D) NIR microPHAZIR.....	38

FIGURA 2.2. Espectros de MIR obtidos nos espectrômetro 4200 FlexScan com amostras de leite após serem submetidas a um processo de secagem a vácuo. .40	
FIGURA 2.3. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de NIR coletados no espectrômetro microPHAZIR.....41	
FIGURA 2.4. Gráfico de pesos da PC1 obtido com os espectros de NIR coletados no espectrômetro microPHAZIR.....42	
FIGURA 2.5. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan.....44	
FIGURA 2.6. Gráfico de pesos da PC2 obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan.....44	
FIGURA 2.7. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro Cary 630.....45	
FIGURA 2.8. Gráfico de pesos da PC1 obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro Cary 630.....46	
FIGURA 2.9. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan com as amostras de leite submetidas a um processo de secagem a vácuo.....47	
FIGURA 2.10. Gráfico de pesos da PC1 e PC2 obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan com as amostras de leite submetidas a um processo de secagem a vácuo.....48	
FIGURA 2.11. Gráfico de correlação entre as porcentagens de adulteração reais presentes nas amostras de leite e as previstas pelo modelo PLS. Modelo obtido espectrômetro MIR modelo Cary 630.52	
FIGURA 3.1. Ilustração da sequência de pulso CPMG.58	
FIGURA 3.2. Curva de relaxamento de T_2 obtidas através da sequência de pulsos CPMG para uma amostra de leite bovino de boa qualidade.60	

FIGURA 3.3. Gráfico de scores para amostras de leite não adulteradas e adulteradas com água, soro, urina sintético e leite sintético.....	61
FIGURA 3.4. Gráfico de scores para amostras de leite não adulteradas e adulteradas com peróxido de hidrogênio.....	61
FIGURA 3.5. Correlação entre a porcentagem de adulteração medida e prevista pelo modelo PLS para o conjunto de calibração e validação.	64
FIGURA 3.6. Curvas de CPMG das amostras de leite não adulterado e adulterado com água em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v.....	65
FIGURA 3.7. Correlações obtidas entre os valores de T_2 e as porcentagens de adulteração para as amostras de leite adulteradas com água (A), soro (B), leite sintético (C), urina sintética (D) e peróxido de hidrogênio (E).....	68

RESUMO

APLICAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS E TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS COMBINADAS COM QUIMIOMETRIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE BOVINO

O leite bovino é considerado um alimento básico na alimentação humana, especialmente para crianças, contribuindo com os nutrientes essenciais que estas requerem para o seu crescimento e desenvolvimento. Recentemente, diversas reportagens têm sido divulgadas sobre o problema da adulteração em leite, causando preocupações entre seus fabricantes e consumidores. Neste contexto, esta tese de doutorado tem como objetivo principal aplicar a análise por imagens digitais para verificar a autenticidade do leite bovino. Os resultados obtidos serão comparados com os obtidos com as técnicas espectroanalíticas de infravermelho (IR) e ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT). As amostras de leite foram adulteradas com água, peróxido de hidrogênio, leite sintético, soro, urina sintética, ureia e soda cáustica, em diferentes porcentagens de adulteração. No caso da soda cáustica, as amostras de leite de boa qualidade foram submetidas a um processo natural de degradação e, em seguida, adicionado soda cáustica para re-estabelecer o pH original. Modelos de classificação demonstraram a habilidade do procedimento de análise por imagens digitais em discriminar as amostra de leite não adulterado e adulterado com uma alta porcentagem de acerto. Os modelos de classificação obtidos com os métodos de RMN-DT e IR permitiram discriminar as amostras de acordo com a porcentagem de adulteração e o tipo de adulterante. Modelos de regressão demonstraram que o procedimento de análise por imagens digitais é capaz de quantificar adulterantes em leite bovino quando a porcentagem de adulteração é $\geq 6\%$ v/v. Resultados obtidos com as técnicas RMN-DT e IR apresentaram uma habilidade para quantificação de adulterantes em concentrações $\leq 3\%$ v/v.

ABSTRACT

APPLICATION OF DIGITAL IMAGE AND SPECTROANALYTICAL TECHNIQUES COMBINED WITH CHEMOMETRICS ANALYSIS TO DETECT AND QUANTIFY ADULTERATION IN BOVINE MILK

Milk provides essential nutrients (carbohydrate, fat, protein, minerals and vitamins) of great nutritional relevance for humans, particularly during childhood. Nowadays, the occurrence of milk adulteration is a major issue in the dairy industry, and has been causing concerns among costumers and food manufacturers. In this context, the objective of this study was developed a simple, fast and non-expensive method to identify and quantify milk adulteration. In this study, three different methods were proposed based on digital image, infrared spectroscopy (IR) and time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR). Milk samples were adulterated by addition of tap water, whey, synthetic milk, synthetic urine, urea, hydrogen peroxide and caustic soda, in different concentrations, except for caustic soda. In this case, fresh milk samples were put at ambient temperature and waited to turn sour. Later, a 10-mol/L commercial NaOH solution was added into the sourish milk to establish its original pH. Classification models obtained with digital images exhibited tight and well-separated clusters allowing the discrimination of control from adulterated milk samples. Results obtained with TD-NMR and IR allowed the discrimination of milk samples according to the level of adulteration and the type of adulterant used in the adulteration process. In the case of adulteration with NaOH, the method developed with digital image was able to discriminate fresh from adulterated milk samples. Regression models obtained with digital image showed that the method was able to detect adulteration level $\geq 6\%$ v/v. In the other hand, the models obtained with IR and TD-NMR allowed the quantification of adulteration at levels $\leq 3\%$ v/v.

SUMÁRIO

MOTIVAÇÃO	1
AVALIAÇÃO DO USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE BOVINO.....	4
1.1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1.1. Imagem digital.....	5
1.1.1.1. Aplicações com imagem digital	8
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
1.3.1. Amostras	10
1.3.2. Reagente e soluções.....	10
1.3.3. Equipamentos e acessórios	11
1.3.4. Preparo da amostra e digitalização	11
1.3.5. Tratamento dos dados	14
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
1.4.1. Desenvolvimento de modelos de classificação para discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada	16
1.4.1.1. Discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada com soda cáustica	23
1.4.2. Quantificação de adulteração em leite.....	28
APLICAÇÃO DE ESPECTRÔMETROS DE INFRAVERMELHO PORTÁTEIS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE BOVINO.....	31
2.1. INTRODUÇÃO.....	32
2.1.1. Espectrometria na região do infravermelho	32
2.1.1.1. Aplicações com espectrômetros portáteis operando na região do infravermelho próximo e médio	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.3.1. Amostras	34
2.3.2. Reagentes e soluções	34
2.3.3. Preparo da amostra	35
2.3.4. Equipamentos e acessórios	35
2.3.4.1. Medidas de infravermelho na região do próximo	35
2.3.4.2. Medidas de infravermelho na região do médio	36
2.3.5. Tratamento dos dados	37
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
2.4.1. Caracterização dos espectros de infravermelho	37
2.4.2. Desenvolvimento de modelos de classificação para discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada	41
2.4.3. Quantificação de adulteração em leite	49
2.5. CONCLUSÃO PARCIAL	53
AVALIAÇÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NO DOMÍNIO DO TEMPO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ADULTERAÇÃO EM LEITE BOVINO	46
3.1 INTRODUÇÃO	55
3.1.1. Ressonância magnética nuclear no domínio do tempo	55
3.1.1.1. Aplicações da RMN-DT	56
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	57
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.3.1. Amostras utilizadas	57
3.3.2. Reagente e Soluções	58
3.3.3. Preparo da amostra	58
3.3.4. Equipamentos e acessórios	58
3.3.5. Tratamento dos dados	59
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.4.1. Análise multivariada	59

3.4.1.1. Desenvolvimento de modelos de classificação para discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada.....	62
3.4.1.2. Quantificação de adulteração em leite.....	64
3.4.2. Análise univariada	65
3.5. CONCLUSÃO PARCIAL.....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

MOTIVAÇÃO

O leite é definido como um fluido biológico de alto valor nutritivo que se apresenta como uma emulsão de glóbulos de gordura e uma suspensão de micelas de caseína (caseína, cálcio, fósforo), todas suspensas em uma fase aquosa que contém solubilizadas moléculas de lactose, proteína do soro do leite e alguns minerais^{1,2,3}. Suas propriedades físico-químicas são bem conhecidas, destacando-se a sua coloração branca (devido aos glóbulos de gordura e às micelas de caseína), ausência de sabores e odores estranhos e pH na faixa de 6,6-6,9. Estima-se que o leite possua em torno de 100.000 constituintes distintos, sendo a maioria deles ainda não identificados³. Porém, de uma maneira geral o leite é composto por gordura, proteínas (basicamente caseína e albumina), glicídios (principalmente lactose), minerais, vitaminas e água^{1,3,4}. No entanto, esta composição e a concentração destas substâncias pode variar em função da espécie do mamífero, raça, estágio de lactação, nutrição do animal, entre outros fatores. Devido a presença destes constituintes, o leite é considerado um alimento básico na alimentação humana, especialmente para crianças, contribuindo com os nutrientes essenciais que estas requerem para o seu crescimento e desenvolvimento^{5,6}.

Segundo dados publicados pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) o Brasil produziu cerca de 23,3 bilhões de litros de leite bovino no ano de 2005, ocupando o sétimo lugar na produção mundial⁷. No ano de 2010 esta produção passou para 31,6 bilhões de litros de leite e o Brasil passou a ocupar o quinto lugar na produção mundial, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América, Índia, China e Rússia. Apesar deste lugar de destaque, os produtos lácteos tem sido alvo de constantes problemas relacionados à adulteração, como mostrado frequentemente pela mídia escrita e televisiva. Um estudo realizado por pesquisadores da *U.S. Pharmacopeial Convention* (USP) e da Universidade de Michigan revelou que o leite é uns dos

sete alimentos mais suscetíveis à adulteração, juntamente com azeite, mel, açafraão, café, suco de maçã e laranja⁸. Em 2007 diversas reportagens foram divulgadas sobre a mistura de soda cáustica, peróxido de hidrogênio (comumente chamada de água oxigenada), sal de cozinha e açúcar ao leite UHT (do inglês, *Ultra High Temperature*) produzido por algumas cooperativas do Triângulo Mineiro no Estado de Minas Gerais^{9,10}. Estas substâncias têm como finalidade mascarar aspectos indesejáveis do leite com qualidade inadequada para o consumo humano, aumentar o prazo de conservação e o volume do produto. Como, por exemplo, a adição de peróxido de hidrogênio para aumentar o prazo de conservação do produto, devido à ação bactericida que desempenha. No entanto, estudos revelaram que a adição desta substância provoca a destruição das vitaminas A e E presente no leite¹¹. No ano de 2008 diversas reportagens foram divulgadas sobre a adição de melamina em leite e em formulações infantis na China¹². Esta substância foi adicionada com objetivo de aumentar a concentração aparente de proteína, após realizar a diluição do produto com adição de água. Esta adulteração resultou na hospitalização de mais de 51.000 bebês e morte de seis.

Em 2011, Souza et al.¹³ monitoraram a possível presença de amido, cloretos, formol, peróxido de hidrogênio e urina em leite. Um total de 100 amostras de leite do tipo UHT, processadas em seis diferentes estados Brasileiros (Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Goiás), foram analisadas. Os resultados mostraram que, com exceção do amido, todas as amostras apresentavam a presença de pelo menos uma das substâncias estudadas.

Diante deste contexto e da atual necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e de baixo custo, esta tese de doutorado tem como objetivo principal a aplicação da análise de imagens digitais para detecção e quantificação de adulteração em leite bovino. Atualmente, as análises de leite são realizadas de acordo com os métodos estabelecidos na Instrução Normativa

nº 51/2002 e baseiam-se na determinação de algumas propriedades físico-químicas do produto como: acidez, densidade, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, índice crioscópico, entre outras. No entanto, muitas vezes esses métodos são incapazes de detectar, de uma forma direta, a autenticidade do produto. Aliado a este problema, estes testes despendem muito tempo, consomem muitos reagentes químicos e necessitam de equipamentos específicos. Desta forma, o uso de imagens digitais apresenta como vantagens sobre as demais técnicas analíticas a possibilidade do desenvolvimento de procedimentos rápidos, robustos, não destrutivos, não invasivos com aplicações automáticas e em tempo real. Para validação do procedimento desenvolvido, os resultados obtidos serão comparados com aos obtidos com as técnicas espectroanalíticas de infravermelho (IR, do inglês *Infrared*) e ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT).

Para melhor apresentação e compreensão dos estudos realizados, a presente tese está organizada em três capítulos, sendo cada capítulo constituído por introdução, objetivos específicos, materiais e métodos, resultados e discussão e conclusão parcial. As referências bibliográficas serão apresentadas ao final da tese.

No Capítulo 1 está descrita todo o procedimento desenvolvido e os resultados obtidos para a detecção e quantificação de adulterantes em leite bovino a partir da aplicação de imagens digitais.

No Capítulo 2 serão apresentados os resultados obtidos para a detecção e quantificação de adulterantes em leite bovino a partir do uso de diferentes espectrômetros portáteis na região do infravermelho.

Finalmente, no Capítulo 3 estão expostos os resultados obtidos com a ressonância magnética nuclear no domínio do tempo.

Capítulo 1

**Avaliação do uso de imagens digitais para
detecção e quantificação de adulteração em leite
bovino**

1.1. Introdução

1.1.1. Imagem digital

Uma imagem digital é definida como uma função bidimensional $f(x,y)$ onde x e y são coordenadas planas, e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x,y) é chamada de intensidade ou nível de cinza da imagem no referido ponto¹⁴. Em outras palavras, uma imagem digital pode ser representada através de uma matriz de m linhas e n colunas, onde em cada posição contém um valor discreto, denominado de pixel (*picture element*). Pixel é definido como o menor componente de uma imagem digital, que juntos formam uma imagem inteira. De uma maneira geral, quanto maior a quantidade de pixels presentes na imagem digital, maior será a sua resolução^{15,16}.

As imagens digitais podem ser coloridas ou monocromáticas. No caso das imagens coloridas, as imagens RGB (abreviatura do sistema de cores aditivas formado por vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*)) são as que apresentam um maior número de aplicações. Nas imagens RGB cada pixel é representado como um tensor de dimensão $m \times n \times 3$, onde cada matriz apresenta os valores referentes às cores primárias vermelho, verde e azul. Estas imagens normalmente são de 24 bits (8 bits para cada cor), totalizando cerca de 16 milhões de cores ($256^3 = 16.777.216$)^{15,16}. Na Figura 1.1, tem-se a representação geométrica do modelo de cor RGB que pode ser visto como um cubo, onde três de seus vértices são as cores primárias e outros três as cores secundárias. O vértice junto à origem é o preto e o mais afastado da origem corresponde à cor branca. Neste modelo, a escala de cinza se estende através de uma linha (a diagonal do cubo) que sai da origem (preto) até o vértice mais distante (branco).

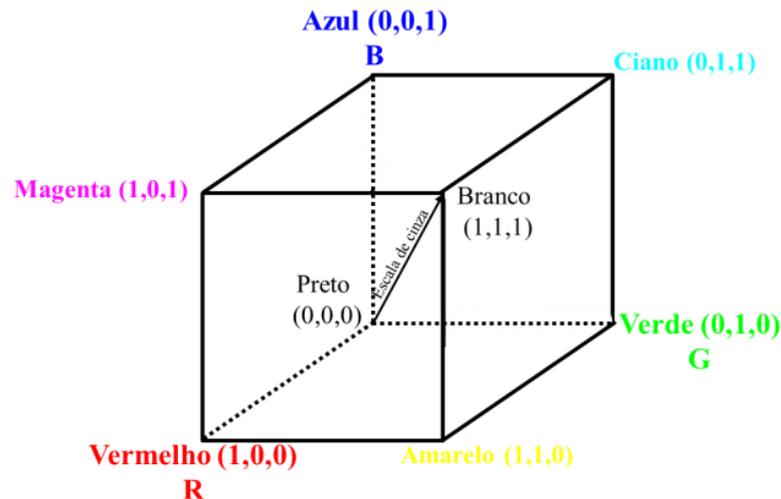


FIGURA 1.1. Cubo de cores do modelo RGB. Os pontos ao longo da diagonal principal têm valores na escala de cinza desde a cor preta (0,0,0) na origem até branco no ponto (1,1,1).

Outro modelo bastante utilizado para descrever as propriedades de uma imagem é o HSV, onde H é definido como a matiz da cor (do inglês *Hue*, H), S a saturação (*Saturation*, S) e V o valor (*Value*, V). Este modelo é de grande interesse, pois está diretamente relacionado com a percepção humana de cor¹⁶. Matiz é um atributo associado com o comprimento de onda dominante em uma mistura de ondas de luz. Assim, o matiz representa a cor dominante percebida pelo observador. A saturação refere-se à pureza relativa ou quantidade de luz branca misturada com o matiz. Já o valor é uma propriedade difícil de ser medida, pois está diretamente relacionado com o brilho da cor.

Geometricamente, o modelo HSV é definido como um triângulo de cores como ilustrado na Figura 1.2A, o qual é obtido a partir, de um corte transversal, no cubo de cores do modelo RGB (Figura 1.2B). Neste triângulo os vértices contêm as cores primárias e o centro corresponde à combinação destas cores em iguais proporções.

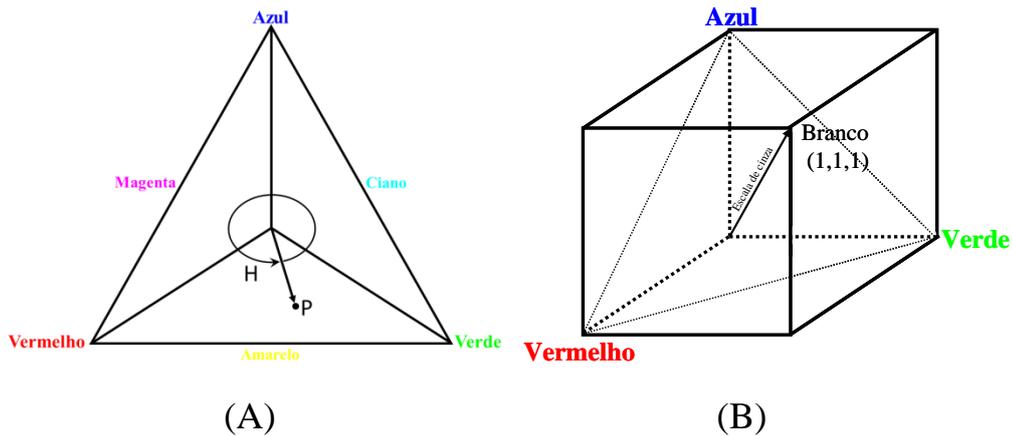


FIGURA 1.2. (A) Triângulo de cores do modelo HSV e (B) Cubos de cores do modelo RGB.

Na Figura 1.2A, o valor do H (*Hue*) no ponto P, corresponde ao ângulo do vetor da cor P em relação a cor vermelha. Assim, quando $H = 0^\circ$, a cor é vermelha, quando $H = 60^\circ$, a cor é amarela, e assim por diante. O valor da S (*Saturation*) no ponto P é a medida que a cor esta diluída pelo branco. Esta propriedade é proporcional à distância do ponto P até o centro do triângulo. Quanto mais distante o ponto P estiver do centro do triângulo, mais saturada será a cor. O valor é medida em relação a uma linha perpendicular ao triângulo, passando através do seu centro. Este parâmetro pode ser visualizado, de forma mais clara, na Figura 1.3.

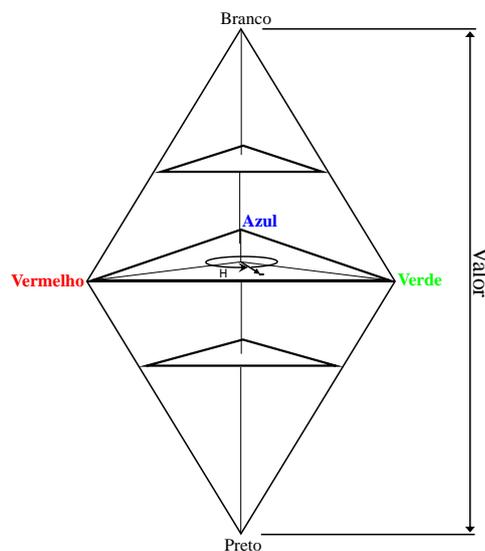


FIGURA 1.3. Sólido de cores do modelo HSV.

A conversão do modelo RGB para o modelo HSV é facilmente obtida através de softwares matemáticos utilizando as equações mostradas a seguir.

$$V = \max(R, G, B) \quad \text{equação 1.1}$$

$$S = 1 - \frac{3}{R + G + B} [\min(R, G, B)] \quad \text{equação 1.2}$$

$$H = \cos^{-1} \left\{ \frac{1/2[(R - G) + (R - B)]}{[(R - G)^2 + (R - B)(G - B)]^{1/2}} \right\} \quad \text{equação 1.3}$$

onde min e max são o menor e o maior valor para as cores R, G e B, respectivamente.

1.1.1.1. Aplicações com imagem digital

Nas últimas décadas, o interesse pelo uso de imagem digital vem crescendo notavelmente e, como consequência, novas aplicações têm sido desenvolvidas e utilizadas em diversas áreas. As principais vantagens dos procedimentos baseados no uso de imagens digitais são o baixo custo, simplicidade, rapidez e a possibilidade de realização de uma análise *in-situ*. Entre os trabalhos encontrados na literatura, destaca-se as aplicações na área de controle de qualidade de alimentos como o monitoramento do processo de produção de pães¹⁷, qualidade de presunto¹⁸, determinação de acidez em vinhos¹⁹, entre outras^{20,21,22}.

Borin et al.²³ empregaram os modelos de cores RGB e HSI para efetuar uma contagem automática de lactobacilos em leite fermentado. No caso do modelo HSI, I é definido como a intensidade da cor (do inglês *Intensity*), e é obtido através da média dos valores de R, G e B. As imagens digitais, das amostras de leite fermentado, foram obtidas utilizando um scanner de mesa e com auxílio de ferramentas quimiométricas foi possível estabelecer modelos de

calibração com erros inferiores a 10%, indicando o grande potencial do procedimento desenvolvido.

Borah e Bhuyan²⁴ utilizaram o método de análise por imagens digitais para monitorar a fermentação em chás. Para o desenvolvimento deste estudo, uma câmera digital, acoplada com um arranjo de iluminação, foi utilizada para capturar as imagens durante o processo de fermentação. Os resultados obtidos mostraram uma boa concordância com os obtidos com o procedimento oficial.

Antonielli et al.²⁵ aplicaram o método de análise por imagens digitais para verificar a qualidade de pestos, um molho de massa vegetal típico italiano. O pesto apresenta alta variabilidade de cor, principalmente devido à evolução tecnológica (matérias-primas, processos) e à degradação da clorofila durante o armazenamento. Os resultados obtidos apresentaram uma boa correlação com os observados a partir de uma avaliação visual em um teste com provadores treinados.

Van Dalen²⁶ aplicou as análises por imagens digitais para determinação do tamanho de grãos de arroz e a quantidade de arroz quebrado. Neste estudo, 80 g de arroz foram divididas em frações de 10 g utilizando um sistema automático de amostragem. Estas amostras foram dispostas em uma placa de vidro e digitalizadas em um scanner de mesa. O procedimento foi testado com amostras de arroz branco e parboilizados, de diferentes variedades. A partir dos resultados, concluiu-se que o procedimento desenvolvido apresenta uma maior precisão e menor tempo de análise do que o rotineiramente utilizado. Em um trabalho semelhante, Courtois et al.²⁷ avaliaram o potencial da análise por imagem para avaliar a presença de rachaduras em grãos de arroz parboilizado e, os resultados foram bastante satisfatórios, confirmando o potencial do método de análise por imagens digitais para este tipo de aplicação.

1.2. Objetivos específicos

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da análise por imagem digital para o desenvolvimento de um procedimento simples, rápido e de baixo custo para a determinação e quantificação de adulteração em amostras de leite bovino.

1.3. Materiais e métodos

1.3.1. Amostras

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizadas amostras de leite bovino cru, de boa qualidade. Essas amostras foram gentilmente fornecidas pela indústria de laticínios Salute, localizada na cidade de São Carlos, São Paulo - SP.

1.3.2. Reagente e soluções

Todos os adulterantes aplicados neste trabalho foram preparados de modo a obter um leite adulterado com características similares aos reportados na literatura. A solução de soda cáustica (NaOH) foi obtida através da dissolução de hidróxido de sódio comercial em água de torneira. A concentração final da solução foi de 10 mol/L. O adulterante soro foi preparado a partir da dissolução do soro de leite doce, parcialmente desmineralizado, em água. Este produto foi gentilmente fornecido pela empresa Alibra, localizada na cidade de Campinas, São Paulo – SP. O preparo desta solução foi realizado de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A aplicação de soro de leite em pó foi utilizada com o objetivo de evitar possíveis interferências causadas pela utilização de soro obtido a partir da produção de queijo. O adulterante leite sintético e urina sintética foram preparados de acordo com procedimentos descritos por Sadat et al.²⁸ e Laube et al.²⁹, respectivamente. O leite sintético foi obtido através da mistura de água, uréia, detergente e óleo. Esta combinação de reagentes tem como função obter uma solução com características similares ao

do leite natural. A urina sintética foi preparada utilizando água purificada e produtos químicos puros ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , KCl , NH_4Cl , ureia e creatinina) com o objetivo de obter uma solução com propriedades químicas semelhantes da urina natural. A adulteração com água foi realizada através da adição de água de torneira e a adulteração com peróxido de hidrogênio pela adição de um reagente P.A., disponível no laboratório.

Os indicadores utilizados para na etapa de *spot-test* foram do tipo ácido-base, tais como: azul de bromofenol, verde de bromocresol, vermelho de metila e 4-nitro-fenol. Na Tabela 1.1 pode-se visualizar a descrição destes indicadores, como a faixa de viragem e a coloração em meio ácido e básico.

TABELA 1.1. Indicadores ácido-base.

Indicadores	Cor em meio ácido	Cor em meio básico	Faixa de viragem
Azul de bromofenol	Amarela	Azul	2,8 – 4,6
Verde de bromocresol	Amarelo	Azul	3,6 – 5,2
Vermelho de metila	Vermelha	Amarela	4,2 – 6,3
4-nitro-fenol	Incolor	Amarela	5,0 – 7,0
Yamada	Diferentes colorações a cada variação de pH		

1.3.3. Equipamentos e acessórios

Todas as amostras foram digitalizadas em um scanner de mesa da marca HP, modelo color laserjet CM1312 MFP. Para a aquisição das imagens digitais, as amostras foram adicionadas em béqueres de 10 mL de capacidade. Um anteparo de cor preta foi utilizado para impedir a entrada de fontes difusas de iluminação, que não são provenientes do scanner, durante o processo de digitalização.

1.3.4. Preparo da amostra e digitalização

As amostras de leite cru foram, inicialmente, submetidas a um processo de adulteração através da adição de água, soda cáustica, leite sintético,

peróxido de hidrogênio, soro, leite sintético e urina sintética. Estes adulterantes foram adicionados ao leite em diferentes proporções de modo a obter amostras com 5, 15, 25, 35 e 50% v/v de adulteração (experimentos 2-6, Tabela 1.2). Neste trabalho ainda foram analisadas amostras de leite adulteradas através da adição de dois ou mais adulterantes. Neste caso, foi realizado um planejamento experimental com dois níveis de adulteração (25 e 50% v/v, porcentagem final de adulteração após a adição de dois ou mais adulterantes), resultando em seis conjuntos binários (experimentos 7-12), quatro conjuntos terciários (experimentos 13-16) e um conjunto quaternário (experimento 17), como descrito na Tabela 1.2.

No caso da adulteração com soda cáustica, amostras de leite de boa qualidade foram submetidas a um processo natural de degradação (azedamento, resultando em um decréscimo do pH) e, em seguida, foi adicionado soda cáustica para re-estabelecer o pH original.

Após adulteração, 5 mL da amostra foi transferida para um béquer e adicionado 100 μ L de indicador ácido-base (Tabela 1.1), para realização do *spot-test*. Realizado o *spot-test*, imagens digitais das amostras de leite (adulteradas e não adulteradas) foram obtidas no formato *Joint Photographic Experts Group* (jpg) de 24 bits, com uma resolução de 300 dpi (*dots per inch*). Estas imagens foram importadas para o MatLab (versão 2009a) e, utilizando uma rotina desenvolvida no laboratório, regiões de 101 x 101 pixels foram selecionadas para cada amostra. Um arranjo de dimensões {101,101,3}, onde o número 3 corresponde às matrizes das cores R, G e B foi obtido e a média dos valores de R, G e B foi obtido. A partir destes valores, foram calculadas as médias para as demais variáveis: luminosidade (L, definida como a soma de R, G e B), H, S, V e os coeficientes tricromáticos *r* (vermelho relativo, definido como: R/L), *g* (verde relativo, definido como G/L) e *b* (azul relativo, definido como B/L). Ao final, para cada imagem, obteve-se um total de 10 variáveis (R, G, B, L, *r*, *g*, *b*, H, S e V).

TABELA 1.2. Descrição dos adulterantes utilizados e a faixa de adulteração (% v/v), bem como o número de amostras obtidas e o planejamento experimental aplicado para análise de misturas de adulterantes.

Experimento	Legenda	Água	Soro	Leite sintético	Urina sintética	Peróxido de hidrogênio	Número de amostras (n)
1	Leite sem adulterante	-	-	-	-	-	135
2		5-50	-	-	-	-	165
3	Um adulterante	-	5-50	-	-	-	184
4		-	-	5-50	-	-	156
5		-	-	-	5-50	-	130
6		-	-	-	-	5-50	173
7		12,5-25	12,5-25	-	-	-	6
8	Dois adulterantes	12,5-25	-	12,5-25	-	-	6
9	(misturas	12,5-25	-	-	12,5-25	-	6
10	binárias)	-	12,5-25	12,5-25	-	-	6
11		-	12,5-25	-	12,5-25	-	6
12		-	-	12,5-25	12,5-25	-	6
13	Três adulterantes	8,3-17	8,3-17	8,3-17	-	-	6
14	(misturas	8,3-17	8,3-17	-	8,3-17	-	6
15	terciárias)	8,3-17	-	8,3-17	8,3-17	-	6
16		-	8,3-17	8,3-17	8,3-17	-	6
17	Quatro adulterantes (misturas quaternárias)	6,3-12,5	6,3-12,5	6,3-12,5	6,3-12,5	-	6

1.3.5. Tratamento dos dados

Os dados obtidos (média dos parâmetros de cor: R, G, B, L, r , g , b , H, S e V) foram analisados a partir de métodos multivariados e univariados. Os resultados foram organizados na forma de uma matriz de dados \mathbf{X} ($n \times p$), com p medidas experimentais (parâmetros de cor) obtidas para n amostras.

O procedimento de análise univariado foi aplicado para o desenvolvimento de um modelo capaz de detectar a adulteração em leite *via* adição de soda cáustica. Para isso, uma correlação direta entre a média dos parâmetros de cores (R, G, B, L, r , g , b , H, S e V) e a qualidade do leite (leite de boa qualidade, azedo, e adulterado com NaOH) foi obtida. Para validação do procedimento proposto, um teste t pareado, com 95% de confiança, foi aplicado.

As análises multivariadas foram realizadas no programa computacional Pirouette (Infometrix Inc., Woodville, WA, EUA) versão 4.0. Os dados foram pré-processados através do autoescalamiento, de forma que todas as variáveis passam a apresentar a mesma importância, ou seja, média zero e desvio padrão igual a 1. Inicialmente, uma análise exploratória *via* análise por componentes principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*) foi realizada com o objetivo de verificar a tendência de separação e/ou agrupamento das amostras, efetuar uma seleção de variáveis e identificar a presença de amostras anômalas³⁰. Modelos de classificação foram desenvolvidos com o objetivo de verificar a habilidade do procedimento proposto em discriminar as amostras de leite de acordo: (1) com a porcentagem de adulteração e (2) amostras não adulterada e adulterada. Esses modelos foram obtidos através do uso das ferramentas quimiométricas de reconhecimento supervisionado de padrões K-ésimo vizinho mais próximo (KNN, do inglês *K nearest neighbor*) e *Soft independent modeling of class analogy* (SIMCA). Para obtenção destes modelos, o conjunto de dados foi dividido em dois grupos: calibração (composto por 75 % do total das amostras) e validação (composto por 25 % do total das amostras). O desempenho dos modelos foi avaliado e

comparado em termos da porcentagem de acerto das amostras do conjunto de validação. No caso dos modelos obtidos com SIMCA, o desempenho dos modelos também foi avaliado de acordo com o valor das distâncias entre as classes (ICD, do inglês *interclass distance*)³¹. A distância entre duas classes r e q é definida como sendo:

$$D^{r,q} = \sqrt{\frac{(s_r^q)^2 + (s_q^r)^2}{(s_o^q)^2 + (s_o^r)^2}} - 1 \quad \text{equação 1.4}$$

onde $(s_r^q)^2$ é a variância residual dos pontos na classe r se ajustarem ao modelo da classe q e vice versa para $(s_q^r)^2$, calculada para todas as variáveis.

Um valor próximo de zero indica que as duas classes r e q são praticamente idênticas. Valores maiores que 3,0 indicam diferenças reais³¹.

A estimativa da concentração de água, leite sintético, peróxido de hidrogênio, soro e urina sintética nas amostras de leite foi determinada a partir da calibração multivariada através de análise por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *partial least squares*) e regressão *via* componentes principais (PCR, do inglês *principal components regression*). Assim como para a obtenção dos modelos de classificação, o conjunto de dados foi inicialmente dividido em conjunto de calibração (75 %) e validação (25 %). O desempenho dos modelos obtidos foi avaliado a partir da comparação dos valores do erro padrão de calibração (SEC, do inglês *standard error of calibration*), erro padrão da validação cruzada (SECV, do inglês *standard error of cross validation*), erro padrão de predição (SEP, do inglês *standard error of prediction*) e os coeficientes de correlação do conjunto da calibração (rCal) e validação (rVal). Nas equações 1.5, 1.6 e 1.7 tem-se a definição de como é obtido o valor de SEC, SECV e SEP, respectivamente.

$$SEC = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - k} \right)^{1/2} \quad \text{equação 1.5}$$

$$SECV = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_{CV}} \right)^{1/2} \quad \text{equação 1.6}$$

$$SEP = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N} \right)^{1/2} \quad \text{equação 1.7}$$

onde N é o número de amostras, y_i o valor medido da amostra i e \hat{y}_i o valor previsto para a amostra i ,

Na Figura 1.4 tem-se a representação esquemática de todo o procedimento utilizado para obtenção e análise das imagens digitais.

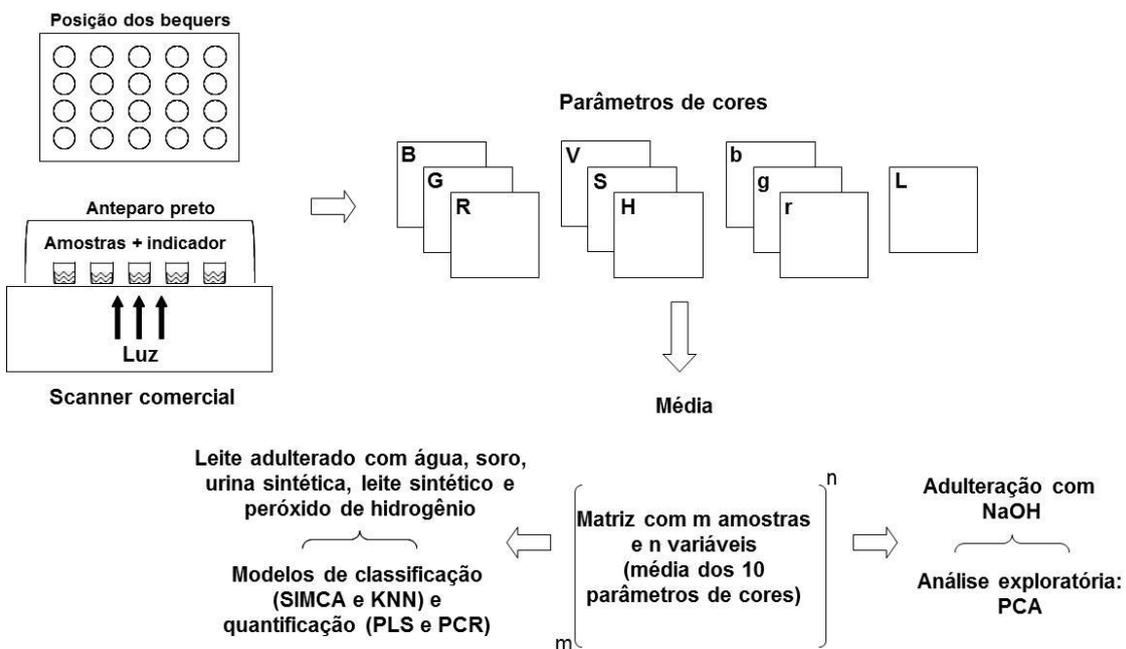


FIGURA 1.4. Representação esquemática do procedimento utilizado para a obtenção e análise das imagens digitais.

1.4. Resultados e discussão

1.4.1. Desenvolvimento de modelos de classificação para discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada

O uso de imagem digital permitiu o desenvolvimento de modelos de classificação para a discriminação das amostras de leite adulterado e não

adulterado. Como o processo de adulteração através da adição de água, soro, leite sintético, peróxido de hidrogênio e urina sintética não resultou em variações significativas no pH, todos os indicadores listados na Tabela 1.1 foram utilizados na etapa do *spot-test* e, os melhores resultados foram obtidos com o indicador azul de bromofenol.

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória *via* PCA, com o conjunto de dados obtidos nos experimentos 1-6 (Tabela 1.2), para avaliar possíveis sobreposições e/ou tendências de separação entre as amostras. A partir do gráfico de scores (Figura 1.5) observou-se o agrupamento das amostras de acordo com a porcentagem de adulteração. Nenhuma separação foi obtida baseada no tipo de adulterante utilizado no processo de adulteração. Ainda neste gráfico, verificou-se uma sobreposição entre as classes das amostras de leite adulteradas em 5, 15 e 25 % v/v, indicando similaridades entre as mesmas.

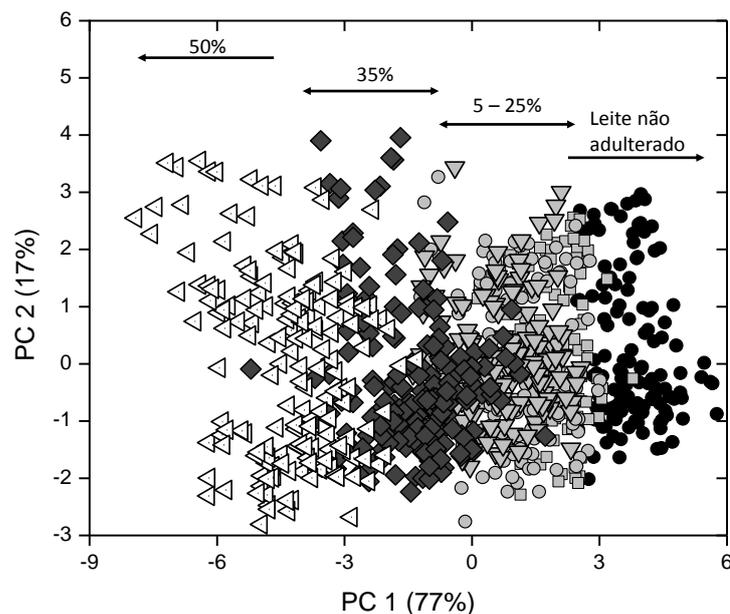


FIGURA 1.5. Gráfico de scores obtido com as amostras de leite não adulterado e adulterado em diferentes concentrações.

No gráfico de loadings (Figura 1.6) é possível observar quais variáveis são mais importantes para a separação e/ou agrupamento das amostras. De acordo com os dados apresentados na Figura 1.6, observa-se que as amostras de leite não adulterado e adulterado em 5, 15 e 25 v/v apresentaram valores de R, G, B, V, r e g superiores aos apresentados pelas amostras adulteradas em 35 e 50% v/v.

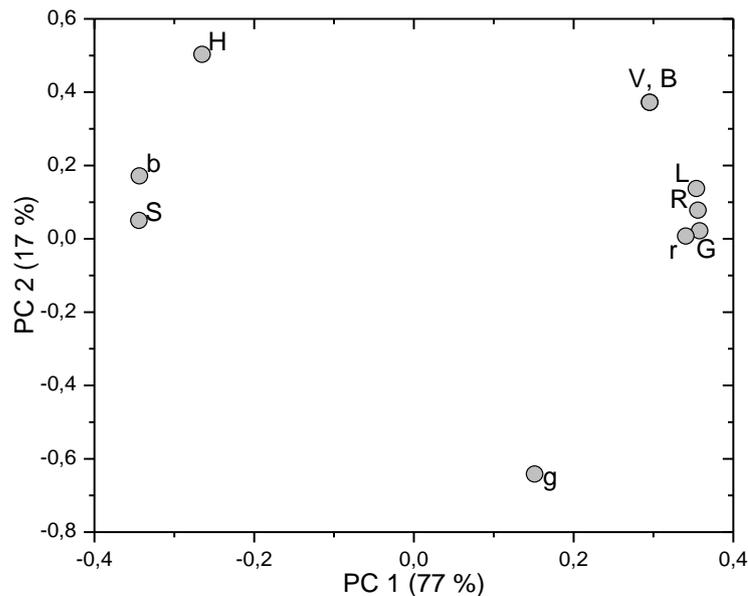


FIGURA 1.6. Gráfico de loadings obtido a partir da PCA das amostras de leite não adulterado e adulterado em diferentes concentrações.

Na Tabela 1.3 têm-se os valores médios e desvios-padrão para os parâmetros de cores obtidos com as amostras de leite não adulterado e adulterado com água em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v. Os resultados apresentados na Tabela 1.3 estão de acordo com os apresentados na Figura 1.6, onde se verifica um decréscimo nos valores de R, G e B à medida que ocorre um aumento na porcentagem de adulteração. Este mesmo efeito foi observado para as amostras de leite adulteradas com soro, peróxido de hidrogênio, leite sintético e urina sintética.

TABELA 1.3. Parâmetro de cor (média \pm desvio padrão, n = 52) para as amostras de leite não adulterada e adulterada com água em 5, 15, 25, 35 e 50 % v/v.

	Controle	5%	15%	25%	35%	50%
R \downarrow	98 \pm 5	94 \pm 4	92 \pm 4	90 \pm 4	83 \pm 4	76 \pm 5
G \downarrow	160 \pm 4	156 \pm 5	155 \pm 4	153 \pm 4	147 \pm 4	139 \pm 5
B \downarrow	191 \pm 4	188 \pm 5	189 \pm 5	189 \pm 4	186 \pm 4	182 \pm 4
H \Rightarrow	0,556 \pm 0,004	0,557 \pm 0,004	0,559 \pm 0,003	0,560 \pm 0,003	0,563 \pm 0,005	0,556 \pm 0,004
S \uparrow	0,486 \pm 0,021	0,500 \pm 0,019	0,513 \pm 0,018	0,525 \pm 0,014	0,549 \pm 0,021	0,582 \pm 0,023
V \downarrow	0,752 \pm 0,017	0,741 \pm 0,018	0,742 \pm 0,019	0,743 \pm 0,017	0,731 \pm 0,016	0,715 \pm 0,017
r \Rightarrow	0,219 \pm 0,006	0,215 \pm 0,006	0,211 \pm 0,005	0,208 \pm 0,004	0,201 \pm 0,006	0,191 \pm 0,007
g \Rightarrow	0,356 \pm 0,003	0,356 \pm 0,003	0,355 \pm 0,003	0,355 \pm 0,003	0,353 \pm 0,004	0,351 \pm 0,004
b \Rightarrow	0,426 \pm 0,006	0,430 \pm 0,006	0,434 \pm 0,006	0,438 \pm 0,005	0,446 \pm 0,008	0,458 \pm 0,006
L \downarrow	450 \pm 12	439 \pm 12	436 \pm 12	433 \pm 11	418 \pm 10	398 \pm 13

Em seguida, uma nova análise exploratória foi realizada incluindo as amostras adulteradas com misturas de adulterantes (experimentos 7-17, Tabela 1.2). Os resultados obtidos mostraram a mesma tendência de separação apresentada na Figura 1.5, com o agrupamento das amostras baseada na porcentagem final de adulteração e não de acordo com o adulterante presente na amostra.

Modelos de classificação foram obtidos com o objetivo de verificar a habilidade do procedimento desenvolvido em classificar as amostras de acordo com: (1) a porcentagem de adulteração e (2) amostras de leite adulteradas e não adulteradas. Na Tabela 1.4 são apresentados os valores de ICD para o modelo SIMCA desenvolvido com as amostras de leite não adulterada e adulterada com água, soro, leite sintético, peróxido de hidrogênio e urina sintética com diferentes porcentagens de adulteração (5-50% v/v).

TABELA 1.4. Distância entre as classes do modelo SIMCA obtido com as amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50 % v/v.

	0 %	5 %	15 %	25 %	35 %	50 %
0 %	0					
5 %	2,16	0				
15 %	4,02	0,55	0			
25 %	5,99	1,52	0,44	0		
35 %	13,58	6,71	3,24	1,77	0	
50 %	30,95	23,95	14,83	14,83	4,65	0

Os valores de ICD variaram de 2,16 (para o leite adulterado em 5% v/v) até 30,95 (para o leite adulterado em 50% v/v) (Tabela 1.4), indicando a habilidade do procedimento em discriminar as amostras de leite não adulterada e adulterada quando a porcentagem de adulteração é maior que 5 % v/v. No entanto, o valor de ICD entre as classes das amostras adulteradas em 5, 15 e 25

% foi inferior a 2,0, sugerindo uma similaridade de cores entre as mesmas, como mostrado anteriormente no gráfico de scores (Figura 1.5).

Na Tabela 1.5 têm-se as porcentagens de acerto obtidas com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v. Para o desenvolvimento desses modelos, o número de componentes principais (PCs) variou de 4-5 e o número de vizinhos próximos (k) foi igual a 4. A partir dos resultados apresentados na Tabela 1.5, verificou-se um aumento na quantidade de amostras corretamente classificadas à medida que se aumentava na porcentagem de adulteração. Os melhores resultados foram obtidos com as amostras de leite não adulterada e adulterada em 35 e 50% v/v (Tabela 1.5). Estes resultados fornecem conclusões que estão de acordo com os apresentados na Figura 1.5 e Tabela 1.4, onde verificou-se uma similaridade entre as amostras de leite adulteradas em 5, 15 e 25% v/v.

TABELA 1.5. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v.

	Calibração (n = 733)		Validação (n = 210)	
	SIMCA	KNN	SIMCA	KNN
Leite não adulterado	87	90	66	80
Leite adulterado em 5 %	43	57	25	40
Leite adulterado em 15 %	46	43	34	24
Leite adulterado em 25 %	38	51	58	58
Leite adulterado em 35 %	76	77	74	67
Leite adulterado em 50 %	90	94	85	89

Modelos desenvolvidos para a discriminação das amostras de leite não adulterado e adulterada apresentaram uma média na probabilidade de acerto

de 82 (SIMCA) e 92% (KNN) (Tabela 1.6), o que significa que a maior parte das amostras foi corretamente classificada em suas respectivas classes. O número de k e PCs utilizado no desenvolvimento destes modelos foi igual a 4 e 4-6, respectivamente.

TABELA 1.6. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterado e adulterado.

	Calibração (n = 733)		Validação (n = 210)	
	SIMCA	KNN	SIMCA	KNN
Leite não adulterado	95	91	85	90
Leite adulterado	86	98	80	95

As amostras de leite adulteradas através da mistura de adulterantes (experimentos 7-17, Tabela 1.2) mostraram resultados similares aos apresentados na Tabela 1.6.

Estes resultados confirmaram a potencialidade do uso da análise de imagem digital para discriminar as amostras de leite não adulterado e adulterado. No entanto, o procedimento não foi capaz de discriminar as amostras de acordo com a porcentagem de adulteração e o tipo de adulterante utilizado no processo de adulteração.

Ainda neste trabalho, as amostras de leite foram submetidas à análise quantitativa para determinação do teor de lactose, gordura e proteína. Estas análises foram realizadas no laboratório da Clínica do Leite localizado na cidade de Piracicaba – SP. A partir dos resultados verificou-se que, em geral, a adição dos adulterantes (água, soro, leite sintético e urina sintética) resultou em um decréscimo na concentração de lactose, gordura e proteína. Como por exemplo, o teor de proteína variou de 3,14 (leite não adulterado) para 1,86% m/m (leite adulterado em 50% v/v). No entanto, a adição de urina sintética resultou em um aumento na concentração aparente de proteína, passando para

3,76% m/m (leite adulterado em 50% v/v). Este efeito pode ser justificado devido à alta concentração de nitrogênio (proveniente da ureia) presente na urina sintética.

De acordo com as normas estabelecidas pela legislação brasileira, para que o leite possa ser comercializado, ele deve apresentar um teor mínimo de proteína de 2,9% m/m. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos no laboratório da clínica do leite, verificou-se uma concentração de proteína inferior ao estabelecido pela legislação brasileira (2,9% m/m) quando a porcentagem de adulteração é $\geq 15\%$ v/v. Assim, conclui-se que o procedimento desenvolvido pode ser utilizado para verificar a autenticidade do leite bovino, pois possibilita a discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada quando a porcentagem de adulteração é $\geq 5\%$ v/v.

1.4.1.1. Discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada com soda cáustica

Para a identificação de adulteração *via* adição de soda cáustica, as amostras de leite de boa qualidade foram submetidas a um processo natural de degradação (azedamento, resultando em um decréscimo do pH) e, em seguida, foi adicionado soda cáustica para reestabelecer o pH original. Na Figura 1.7, tem-se a representação esquemática do procedimento utilizado para o desenvolvimento deste estudo, juntamente com os valores de pH obtidos para a amostra antes e após o processo de azedamento.

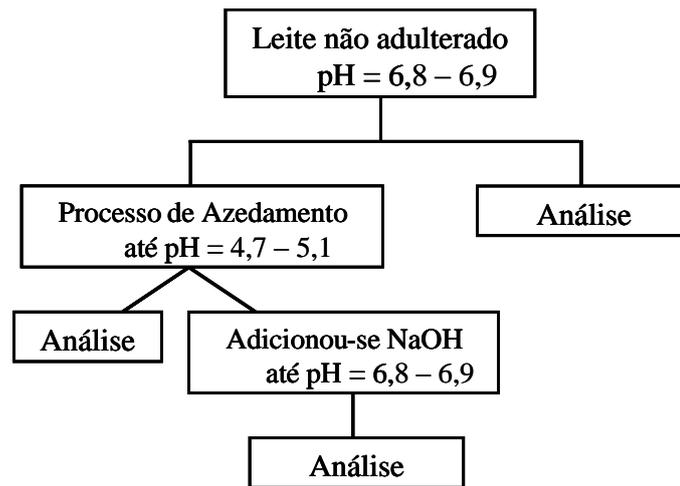


FIGURA 1.7. Representação esquemática do procedimento de preparo de amostras para verificação da adulteração em leite bovino com soda cáustica.

Devido a diferença de pH entre as amostras de leite não adulterada e azeda, procurou-se utilizar indicadores que apresentassem uma faixa de viragem entre, aproximadamente, 4,7 a 6,8. Desta forma, o indicador utilizado na etapa de *spot-test* foi o vermelho de metila (ver detalhes na Tabela 1.1).

Na Figura 1.8, tem-se o gráfico dos scores para as amostras de leite não adulterada (círculo), leite azedo (quadrado) e leite azedo adulterado com NaOH (triângulos). Neste gráfico é possível visualizar a separação das amostras em três grupos distintos, sendo cada um composto pelas amostras de leite não adulterado, leite azedo e leite adulterado (pH “reconstituído” através da adição de soda cáustica). A partir desta análise, verificou-se que apesar das amostras de leite não adulterada e adulterada com soda cáustica apresentarem o mesmo valor de pH, devido as condições do meio reacional serem diferentes (presença de ácido láctico, e soda cáustica no leite adulterado) é possível realizar a separação das mesmas.

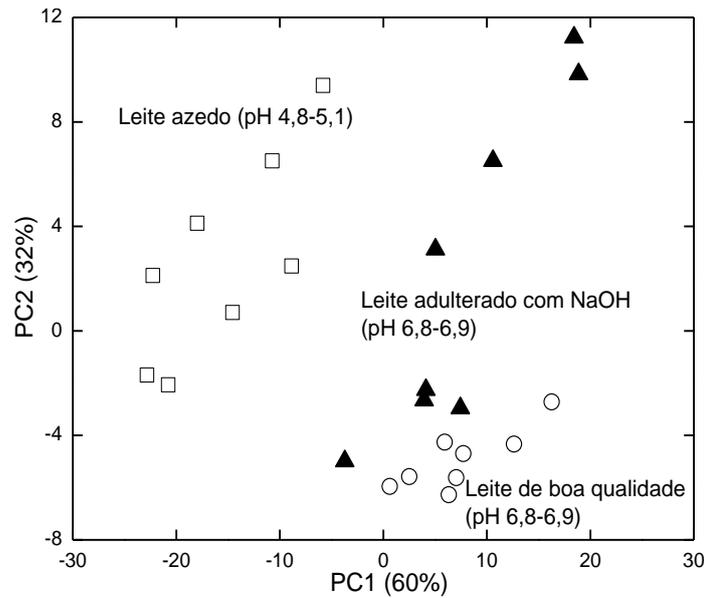


FIGURA 1.8. Gráfico dos scores obtido com o indicador vermelho de metila para as amostras de leite de boa qualidade (□), leite azedo (○) e leite azedo adulterado com mais NaOH (▲).

A partir do gráfico de loadings (Figura 1.9), observou-se que todas as variáveis contribuíam para a discriminação das amostras de leite não adulteradas e adulteradas com soda cáustica.

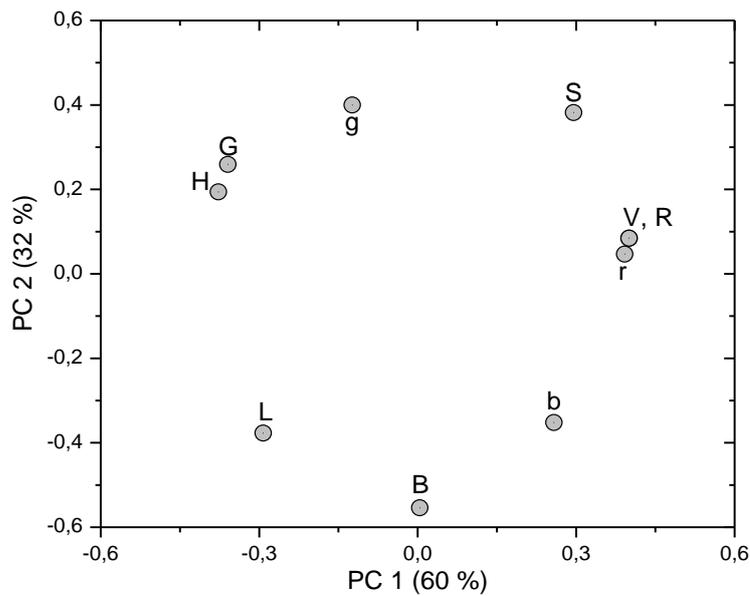


FIGURA 1.9. Gráfico de loadings das amostras de leite de boa qualidade, leite azedo e leite azedo adulterado com mais NaOH.

No entanto, a partir de uma análise univariada, verificou-se que a discriminação das amostras poderia ser realizada utilizando somente alguns parâmetros de cores. Na Tabela 1.7 têm-se os valores médios e desvios-padrão para os três grupos de amostras ($n = 8$, para cada grupo). De acordo com estes resultados, verificou-se que as maiores diferenças são encontradas entre as amostras de leite de boa qualidade e leite azedo (observação já esperada). Um teste t pareado, com um intervalo de confiança de 95%, confirmou que as variáveis eram estatisticamente diferentes. Por outro lado, o procedimento proposto deve ser capaz de diferenciar as amostras de leite de boa qualidade e leite adulterado com NaOH. Na Tabela 1.7, observa-se que os parâmetros de cores B, S, g e b são os que apresentam maiores diferenças (marcadas com dois asteriscos) entre as amostras de leite de boa qualidade e adulterado com NaOH. Este resultado foi confirmado ao realizar um teste t pareado, com um intervalo de confiança de 95%.

TABELA 1.7. Parâmetros de cor (média \pm desvio padrão, n = 8) para leite de boa qualidade, azedo e adulterado com NaOH.

Amostras	R	G	B**	H	S**	V	r	g**	b**	L
Leite de boa qualidade	205 \pm 4	196 \pm 3	162 \pm 2	0,130 \pm 0,001	0,212 \pm 0,006	0,805 \pm 0,015	0,365 \pm 0,001	0,348 \pm 0,001	0,287 \pm 0,002	563 \pm 9
Leite azedo	205 \pm 4	173 \pm 4	161 \pm 5	0,044 \pm 0,008	0,212 \pm 0,020	0,803 \pm 0,015	0,380 \pm 0,004	0,321 \pm 0,002	0,299 \pm 0,005	539 \pm 12
Leite adulterado com NaOH	203 \pm 3	194 \pm 4	169 \pm 8	0,127 \pm 0,013	0,168 \pm 0,043	0,794 \pm 0,014	0,359 \pm 0,008	0,343 \pm 0,001	0,298 \pm 0,009	565 \pm 13
Valor de t para amostras de leite de boa qualidade e adulterado*	1,474	0,978	2,347	0,759	2,882	1,474	2,053	13,996	3,536	0,426

* t tabelado = 2,145 (n = 14, com 95% de confiança).

** Cores que apresentaram maior diferenças entre as amostras de leite de boa qualidade e adulterado com NaOH.

Assim, conclui-se que a análise univariada de imagem digital pode ser utilizada para verificação da adulteração de leite bovino por adição de soda cáustica.

1.4.2. Quantificação de adulteração em leite

Modelos de calibração PLS e PCR foram desenvolvidos com o objetivo de quantificar a porcentagem de adulteração nas amostras de leite. Estes modelos foram construídos utilizando as imagens obtidas nos experimentos 1-6 (Tabela 1.2), tendo como variável dependente a porcentagem de adulteração. Um único modelo foi obtido visto à tendência de agrupamento das amostras de acordo com a concentração de adulterante (Figura 1.5). Ainda com base nos resultados previamente obtidos, o indicador utilizado na etapa de *spot-test* foi o azul de bromofenol.

Na Tabela 1.8 são apresentados os valores de rCal, rVal, SEC, SECV e SEP obtidos com os modelos PLS e PCR. O número de variáveis latentes (VL) utilizados para cada modelo foi determinado através do SECV. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1.8, verificou-se que os modelos apresentaram uma habilidade de predição muito semelhante, com valores de rVal e rCal $> 0,93$ e SECV e SEP $< 5,86$.

TABELA 1.8. Comparação dos parâmetros estatísticos obtidos com os modelos PLS e PCR para quantificação de adulterantes em amostras de leite.

Método	Calibração (n = 733)			Validação (n = 210)		
	Número de fatores	rCal	SEC	SECV	rVal	SEP
PLS	4	0,94	5,84	5,84	0,94	5,85
PCR	3	0,93	5,84	5,84	0,93	5,86

Na Figura 1.10 observa-se que os modelos PLS (Figura 1.10 A) e PCR (Figura 1.10 B) apresentaram uma boa correlação entre a porcentagem de

adulteração medida e as previstas pelos modelos, tanto para as amostras do conjunto de calibração (círculos negros), quanto para as amostras do conjunto de validação (círculos cinzas). Estes resultados indicam que o procedimento desenvolvido pode ser utilizado para estimar a porcentagem de adulteração em leite bovino.

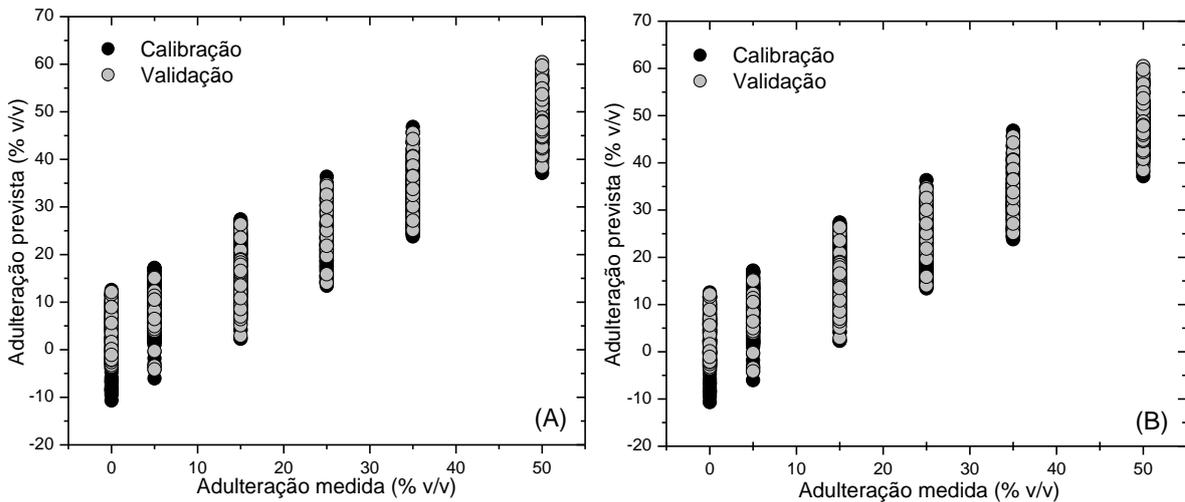


FIGURA 1.10. Correlação entre as concentrações reais de adulterantes presentes nas amostras de leite e as previstas pelos modelos (A) PLS e (B) PCR.

1.5. Conclusão parcial

A partir destes resultados, conclui-se que o procedimento proposto, quando combinada com métodos de análise multivariada, pode ser aplicado para detecção de água, soro, leite sintético, peróxido de hidrogênio e urina sintética em amostras de leite adulteradas, quando a porcentagem de adulteração é $\geq 5\%$ v/v. No caso da adulteração com soda cáustica, um procedimento univariado foi proposto, o que permitiu a discriminação das amostras de leite de boa qualidade e adulterada. Os modelos de quantificação PLS e PCR permitiram a quantificação de adulterantes em leite bovino com baixos valores de SEP (5,86% v/v) e altos de rVal (0,93).

Ao comparar os resultados de imagens digitais com os obtidos no laboratório da clínica do leite, verificou-se que o procedimento desenvolvido é capaz de verificar se o leite está adulterado quando a porcentagem de

adulteração é ≥ 5 % v/v, enquanto que o protocolo utilizado no laboratório da clínica do leite é capaz de verificar que o leite esta fora das normas estabelecidas somente após uma adulteração de 15 % v/v.

As principais vantagens do procedimento proposto quando comparado com os protocolos oficiais são redução no tempo e custo da análise, pouca manipulação das amostras e diminuição na geração de resíduos químicos, contribuindo desta forma para a Química Verde.

Capítulo 2

Aplicação de espectrômetros de infravermelho portáteis para detecção e quantificação de adulteração em leite bovino

2.1. Introdução

2.1.1. Espectrometria na região do infravermelho

A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho esta situada após a região do visível e abrange a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} ou comprimento de onda de 780 a 100000 $\text{nm}^{32,33}$. Esta região é basicamente dividida em três faixas: a radiação no infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) que compreende de 12800 a 4000 cm^{-1} , a radiação no infravermelho médio (MIR, do inglês *Mid Infrared*) de 4000 a 200 cm^{-1} e a radiação no infravermelho distante (FIR, do inglês *Far Infrared*) que compreende de 200 a 10 cm^{-1} . No entanto, na literatura científica podem ser encontradas divergências quanto ao início e término de cada faixa.

A radiação infravermelha não é energética o suficiente para causar as transições eletrônicas, desta forma, a condição necessária para que ocorra absorção desta radiação é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional. No caso dos movimentos vibracionais, eles podem ocorrer de duas maneiras distintas: estiramento ou deformação. As vibrações de estiramentos envolvem uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, enquanto que as vibrações de deformação são caracterizadas pela mudança no ângulo entre duas ligações.

A espectrometria na região do infravermelho tem despertado grande interesse em diferentes áreas devido à necessidade do desenvolvimento de novos procedimentos analíticos, alternativos aos tradicionais. O uso desta técnica, quando associada a métodos de calibração multivariada, tem possibilitado o desenvolvimento de procedimentos rápidos, simples, robustos, não destrutivos e não invasivos. Além disso, a miniaturização dos

espectrômetros de infravermelho permitiu a utilização deste método em aplicações automáticas e em tempo real.

2.1.1.1. Aplicações com espectrômetros portáteis operando na região do infravermelho próximo e médio

A utilização de espectrômetros portáteis é relativamente atual e, desta forma, não são encontrados muitos estudos na literatura. Dentre os procedimentos já desenvolvidos, destaca-se o uso deste método para efetuar o controle de qualidade de produtos alimentícios. As principais vantagens destes procedimentos são a rapidez, simplicidade e, muitas vezes, a possibilidade de análise em amostras intactas ou com o mínimo de preparo da mesma. Como por exemplo, Sánchez et al.³⁴ efetuaram a caracterização e o controle de qualidade de morangos intactos através da utilização de um NIR portátil. Estes mesmos autores também desenvolveram um procedimento para determinação da qualidade de nectarinas intactas³⁵. Os parâmetros avaliados foram tamanho (peso e diâmetro), firmeza da polpa e teor de sólidos solúveis totais.

Cayuela et al.³⁶ utilizaram dois espectrômetros portáteis, operando na região do NIR, para monitorar a qualidade de laranjas. Quatro diferentes variedades de laranjas foram estudadas e os parâmetros monitorados foram: teor de sólidos solúveis, acidez, acidez titulável, índice de maturação, firmeza da polpa, volume de suco, peso do fruto, peso da casca, cor do fruto e do suco. Os resultados mostraram uma boa concordância com os protocolos oficiais de análises.

Zamora-Rojas et al.³⁴ verificaram o desempenho de espectrômetros portáteis para quantificação de gordura, proteína e umidade em amostras de carne. As análises foram realizadas em um espectrômetro na região do NIR e os resultados indicaram que o procedimento pode ser utilizado para monitorar de forma rápida, *in-situ* e *on-line* os parâmetros de qualidade de carne.

Birkel et al.³⁸ desenvolveram um procedimento rápido para quantificar o teor de gordura trans em óleos comestíveis. As análises foram realizadas em um espectrômetro portátil na região do MIR e os resultados obtidos foram similares aos obtidos com espectrômetros convencionais.

Allendorf et al.³⁹ aplicaram espectrômetros portáteis na região do MIR para monitorar as variações químicas que ocorrem durante o processo de oxidação em óleos comestíveis e quantificar o teor de ácidos graxos. Os resultados encontrados foram comparados com os obtidos em espectrômetros de bancada, e foi observada uma boa concordância entre os resultados.

2.2. Objetivos específicos

Neste contexto, o objetivo desta tese doutorado foi desenvolver e comparar o desempenho de diferentes espectrômetros portáteis de infravermelho para identificação e quantificação de adulteração em leite bovino.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Amostras

As amostras de leite bovino foram adquiridas em um supermercado localizado na cidade de Columbus, OH, EUA. Para o desenvolvimento deste estudo, foram adquiridas amostras de leite da mesma marca durante um período de seis meses (Novembro/2011 - Maio/2012). A marca foi selecionada devida a parceria do fabricante com o departamento de Food Science and Technology da The Ohio State University com o fabricante. O leite utilizado foi integral e pasteurizado.

2.3.2. Reagentes e soluções

Os reagentes e soluções utilizadas neste estudo foram os mesmos descritos no capítulo 1. No entanto, neste capítulo também foram efetuados

testes para detecção e quantificação da adulteração em leite através da adição de ureia. A solução de ureia foi preparada a partir da dissolução da ureia p.a. em água de torneira. A concentração final desta solução foi igual a 25 g/L.

2.3.3. Preparo da amostra

As amostras de leite foram adulteradas através da adição de água, soro, leite sintético, urina sintética, ureia e peróxido de hidrogênio seguindo um processo de diluição de 3 a 50% v/v. A concentração final dos adulterantes também foi calculada e variou de 1,87-30 g/L para soro, 0,78-12,5 g/L para a adulteração com urina sintética e ureia (concentração de ureia), 0,05-0,8 g/L para a adulteração com leite sintético (concentração de ureia) e 0,009-0,15 g/L de peróxido de hidrogênio.

Neste trabalho duas estratégias de análises foram estudadas. Na primeira, os espectros de IR das amostras de leite foram obtidos sem efetuar nenhum procedimento prévio de preparo. Na segunda, as amostras de leite foram inicialmente submetidas a um processo de extração da gordura, através da mistura de leite com clorofórmio e, em seguida, o sobrenadante (fase solúvel em água) passou por um procedimento de secagem a vácuo. Este procedimento foi aplicado com o objetivo de suprimir o sinal da água nos espectros de infravermelho.

2.3.4. Equipamentos e acessórios

2.3.4.1. Medidas de infravermelho na região do próximo

As medidas de infravermelho da região do próximo foram realizadas em um espectrômetro de bancada modelo Excalibur 3500 com transformada de Fourier (Varian Inc., Palo Alto, CA, EUA) e em um modelo portátil microPHAZIR no modo dispersivo (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, MA, EUA).

O espectrofotômetro Excalibur 3500 com transformada de Fourier era equipado com separador de feixe de quartzo e um detector de seleneto de chumbo (PbSe, do inglês *Lead selenide*). As medidas foram realizadas no modo de reflectância difusa através da utilização do acessório Integrat IRTM (Pike Technologies, Madison, WI, EUA). Para aquisição dos espectros, 1 mL da amostra foi adicionado em uma placa de petri (diâmetro 3 mm) e, com auxílio de um reflector de alumínio (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA), os espectros de NIR foram coletados com uma resolução de 4 cm⁻¹, na região espectral de 10000-4000 cm⁻¹. Um total de 64 varreduras, por espectro, foi obtido com objetivo de aumentar a razão sinal-ruído.

O espectrofotômetro microPHAZIR era equipado com uma lâmpada de tungstênio e detector de arsenieto de gálio e índio (InGaAs, do inglês *Indium gallium arsenide*). O espectrofotômetro ainda era equipado com um adaptador para aquisição dos espectros de amostras líquidas no modo de reflectância difusa. Os espectros foram coletados com uma resolução de 11 nm, 64 varreduras, na região de 1600-2400 nm (6250-4170 cm⁻¹).

2.3.4.2. Medidas de infravermelho na região do médio

As medidas de infravermelho da região do médio foram realizadas em dois equipamentos portáteis: 4200 FlexScan (Figura 2.1 A) e Cary 630 (Figura 2.1 B) com transformada de Fourier (Agilent Technologies Inc., Danbury, CT, EUA). Estes equipamentos eram equipados com um separador de feixe de PbSe, detector de sulfeto de triglicerina deuterada (DTGS, do inglês *deuterated triglycine sulfate*) e interferômetro de Michelson.

Os espectros de MIR obtidos com espectrômetro Cary 630 foram coletados através da utilização da interface Dialpath. Com este acessório, os espectros são adquiridos de forma rápida sem a necessidade do preparo prévio da amostra. Para aquisição dos espectros das amostras de leite não adulterada e adulterada, uma alíquota da amostra foi adicionada sobre o cristal de ZnSe e o

caminho ótico foi fixado em 30 μm . Os espectros foram coletados na região espectral de 4000-650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e um total de 64 varreduras, por amostra.

Para aquisição dos espectros com o espectrômetro 4200 FlexScan dois procedimentos de análises foi testado. No primeiro experimento, os espectros de MIR foram adquiridos através da adição direta de uma alíquota da amostra de leite sobre o cristal de reflexão total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflexion*). No segundo experimento, os espectros de MIR foram coletados empregando o preparo de amostra citado no item 2.3.3. Para isso, a fase solúvel em água (obtida após o procedimento de extração da gordura) foi adicionada sobre o cristal de ATR e, em seguida, submetida a um processo de secagem a vácuo, durante aproximadamente 1 min. Após a eliminação da água e, conseqüentemente, a formação de um filme fino de leite, os espectros de MIR foram obtidos no modo ATR. Em ambos os procedimentos testados, os espectros de MIR foram coletados na região espectral de 4000-650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e um total de 64 varreduras, por amostra.

2.3.5. Tratamento dos dados

Os espectros de NIR e MIR foram analisados com auxílio das ferramentas quimiométricas SIMCA e PLS, mencionadas no capítulo 1. Antes de efetuar estas análises, os espectros foram normalizados, a segunda derivada (Savitzky-Golay, 25 pontos) foi aplicada e, então, os espectros foram centrados na média.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Caracterização dos espectros de infravermelho

Os espectros de MIR e NIR das amostras de leite não adulterado e adulterado, em 50% v/v, com água, soro, leite sintético, urina sintética, ureia e

peróxido de hidrogênio são apresentados nas Figuras 2.1 e 2.2. Inicialmente, foram coletados os espectros de NIR e MIR das amostras de leite sem efetuar a supressão dos sinais da água. Estes espectros são mostrados nas Figuras 2.1.

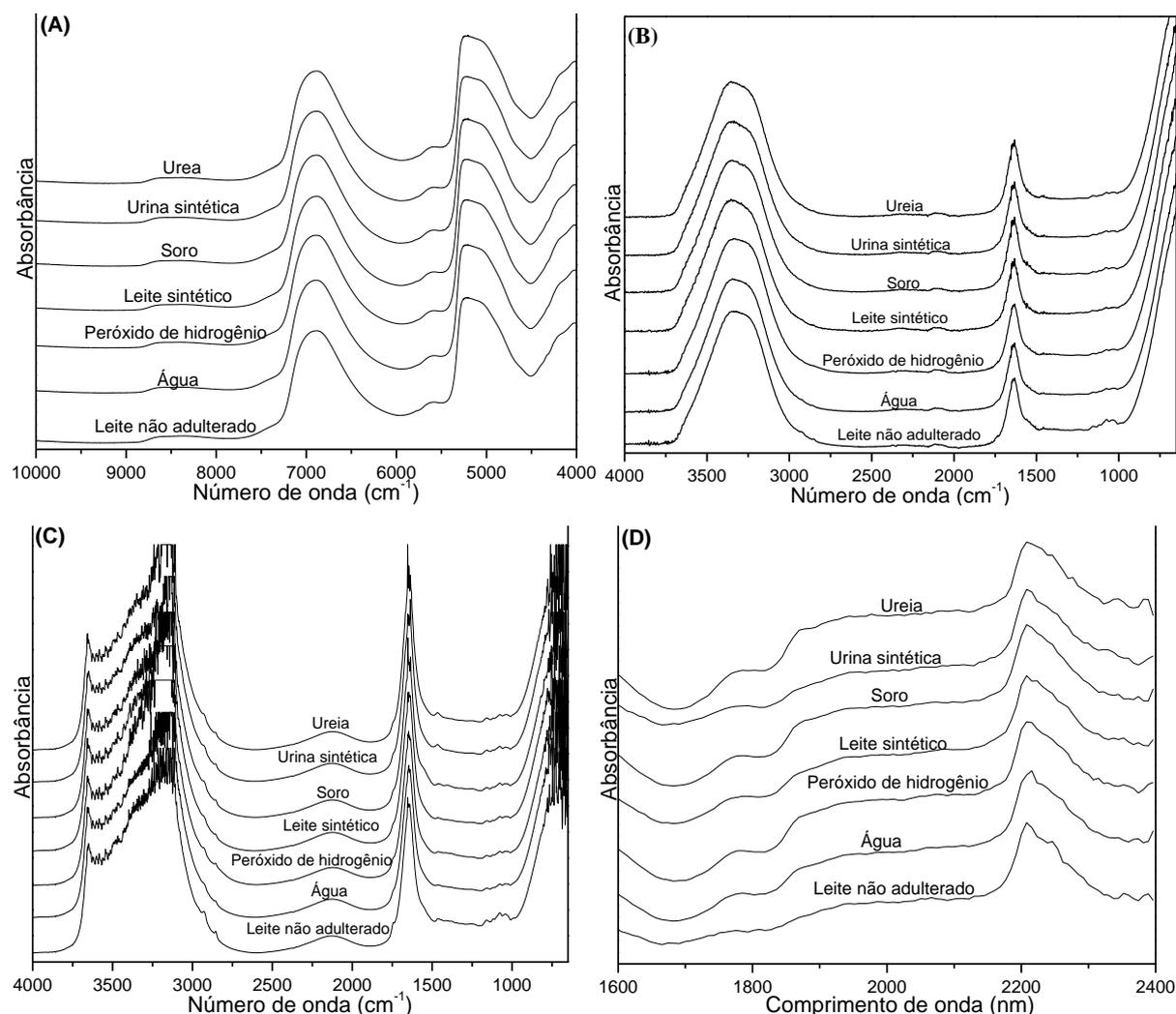


FIGURA 2.1. Espectros de MIR e NIR obtidos com amostras de leite não adulterada e adulterada obtidas nos espectrômetros: (A) NIR Excalibur 3500, (B) MIR 4200 FlexScan, (C) MIR Cary 630 e (D) NIR microPHAZIR.

Na Figura 2.1A e 2.1B tem-se os espectros de NIR e MIR obtidos com os espectrômetros Excalibur 3500 e 4200 FlexScan, respectivamente. Nestes espectros é possível observar a presença de duas bandas centradas em 3300 e 1639 cm⁻¹ (para os espectros de MIR) e 7700 e 5000 cm⁻¹ (para os

espectros de NIR). Estas bandas são provenientes aos estiramentos/deformações (MIR) e overtões/combinções (NIR) das ligações de O-H das moléculas de água^{40,41}. Na Figura 2.1C pode-se visualizar os espectros de MIR obtidos com o espectrômetro Cary 630. Nestes espectros, observa-se uma saturação nas bandas de absorção da ligação de O-H (água) na região de 3500-3200 e 1600 cm^{-1} . No entanto, a utilização do sistema DialPath proporcionou um aumento na intensidade dos sinais na região de 1600-900 cm^{-1} , onde são encontradas as bandas de absorção referentes aos sinais de proteínas, gordura, lactose e a região do *fringerprint* (1200-900 cm^{-1})⁴². Os espectros de NIR coletado no espectrômetro microPHAZIR no modo dispersivo, apresentou somente uma banda centrada em 2250 nm também atribuída ao sinal de O-H (banda de combinação).

No entanto, nestes espectros (Figura 2.1) não é possível à visualização das bandas de absorção dos demais constituintes presente nas amostras de leite devido à alta concentração de água (aproximadamente 80%). Desta forma, para tentar suprimir estas bandas de absorção, as amostras de leite foram submetidas a um procedimento de secagem a vácuo e, em seguida, os espectros foram obtidos a partir de um filme fino de leite. Estes espectros foram coletados no espectrômetro MIR modelo 4200 FlexScan. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 2.2 e observa-se que as maiores diferenças entre as amostras de leite não adulterada e adulterada com soro, leite sintético, urina sintética, ureia e peróxido de hidrogênio estão localizada na região de 1600-1200 cm^{-1} . O espectro de leite adulterado com soro apresentou duas bandas centradas em 1635 e 1530 cm^{-1} . Essas bandas são provenientes dos sinais de amida I (estiramento da ligação C=O) e amida II (deformação angular da ligação N-H e estiramento da ligação C-H), respectivamente⁴³. O soro é um subproduto na produção de queijo e apresenta uma composição rica em proteínas (beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina e albumina de soro bovino)⁴⁴. Devido a esta composição, é possível obter uma alteração significativa no perfil

dos sinais das proteínas nos espectro de MIR o que possibilita a sua distinção das demais amostras. Os espectros das amostras de leite adulterado com ureia, leite sintético e urina sintética, apresentaram bandas de absorção em 1615 cm^{-1} atribuída ao sinal de C=O da ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) e em 1454 cm^{-1} associado ao sinal de NH_4^+ ⁴⁵. Devido à baixa concentração de peróxido nas amostras de leite, não foi possível observar nenhuma diferença em relação ao espectro da amostra de leite não adulterado. Nos espectros de leite adulterado com água também não foi observado nenhuma variação quando comparado com os demais espectros. Os espectros de MIR ainda apresentaram bandas de absorção em $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ associados ao estiramento da ligação O-H da água, bandas de estiramento das ligações C-H de lipídios em $3000\text{-}2800$ e 1852 cm^{-1} , banda de absorção dos grupos fosfatos (O=P-O) provenientes da caseína em 1067 cm^{-1} e inúmeras bandas de absorção na região do *fingerprint* ($1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) atribuídos ao estiramento das ligações de C-O e C-C e deformação angular de C-O-C de carboidratos^{42,43}.

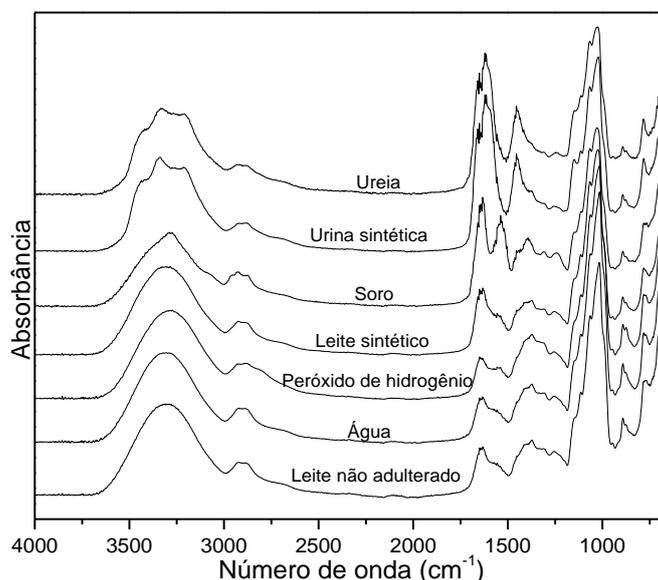


FIGURA 2.2. Espectros de MIR obtidos nos espectrômetro 4200 FlexScan com amostras de leite após serem submetidas a um processo de secagem a vácuo.

2.4.2. Desenvolvimento de modelos de classificação para discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada

Com o objetivo de desenvolver modelos de classificação, os espectros de NIR e MIR foram analisados através da ferramenta quimiométrica de reconhecimento de padrão SIMCA. Inicialmente, os modelos SIMCA foram desenvolvidos utilizando os espectros obtidos de forma direta, ou seja, sem aplicar a etapa de extração da gordura seguida da secagem a vácuo. A partir dos resultados, verificou-se que os modelos obtidos com os espectros de MIR apresentaram uma melhor habilidade de discriminação das amostras de leite não adulterado e adulterado do que os obtidos com os espectros de NIR.

Na Figura 2.3, pode-se visualizar o gráfico de projeção dos espectros das amostras de leite coletados no espectrômetro portátil NIR modelo microPHAZIR, na região de 1600-2400 nm. Este modelo foi desenvolvido utilizando as amostras de leite não adulterada e adulterada com água, soro, leite sintético, urina sintética, ureia e peróxido de hidrogênio, em diferentes porcentagens de adulteração (3,12-50 % v/v).

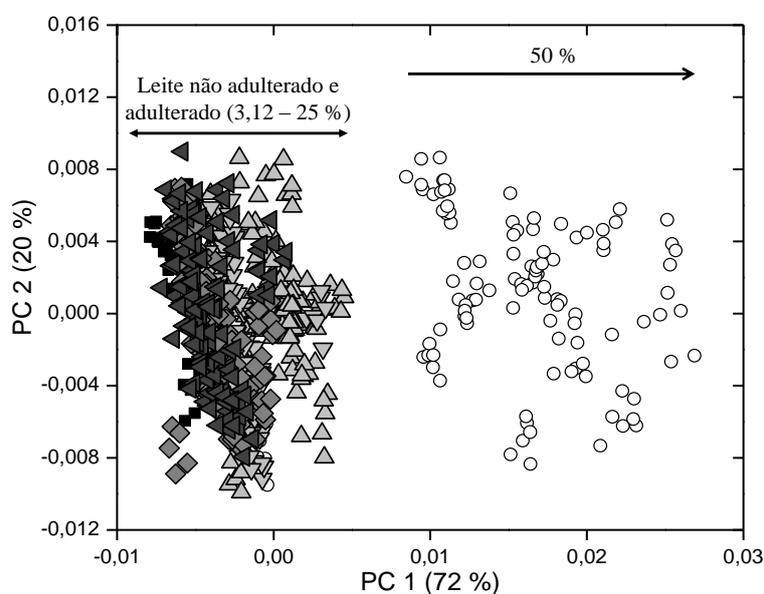


FIGURA 2.3. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de NIR coletados no espectrômetro microPHAZIR.

No gráfico apresentado na Figura 2.3, é possível observar que a utilização do espectrômetro portátil NIR modelo microPHAZIR permite a separação das amostras em dois grupos, sendo o primeiro composto pelas amostras de leite não adulterada e adulterada em 3,12, 6,25, 12,5 e 25 % v/v e, o segundo, composto pelas amostras de leite adulteradas em 50%. No gráfico de pesos (Figura 2.4) é possível observar que as principais variáveis responsáveis pela formação do agrupamento observado no gráfico de escores (Figura 2.3) são 1902 nm (5257 cm^{-1}), que esta localizada na porção negativa do gráfico, e 2200 nm (4545 cm^{-1}), na porção positiva do gráfico de pesos. Do ponto de vista químico, estes sinais são associados aos overtones/combinacões das ligações de O-H das moléculas de água.

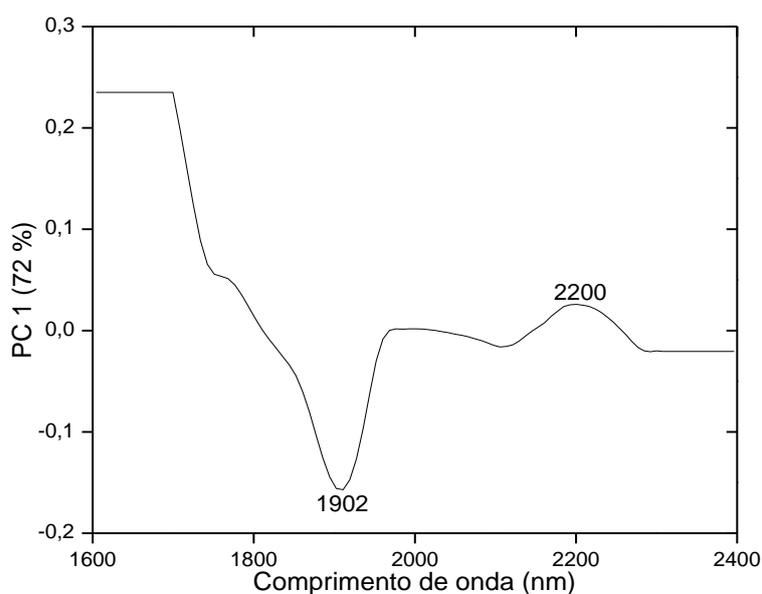


FIGURA 2.4. Gráfico de pesos da PC1 obtido com os espectros de NIR coletados no espectrômetro microPHAZIR.

Modelos de classificações SIMCA foram desenvolvidos utilizando um número de PCs de 3-5. O valor de ICD obtidos entre as amostras de leite não adulterado e adulterado foi igual a 0,7, indicando que o procedimento não é capaz de discriminar as amostras de leite não adulterada e adulterada. Também foram calculados os valores de ICD entre as amostras de leite não adulterada e

adulterada em 3,12, 6,25, 12,5, 25 e 50% v/v. Os valores obtidos confirmaram os resultados apresentados na Figura 2.3, com ICD > 3,0 somente para as amostras adulteradas em 50% v/v. A validação do modelo foi realizada a partir de um conjunto de validação externa, e a porcentagem de acerto foi de 80 (leite não adulterado) e 56 % (leite adulterado), o que significa que aproximadamente metade das amostras de leite adulterada não foram corretamente classificadas.

Em seguida, avaliou-se o desempenho do espectrômetro NIR modelo Excalibur 3500 para o desenvolvimento de modelos de classificação para discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada. A partir do gráfico de scores (resultado não apresentado), verificou-se que as amostras apresentavam uma tendência de agrupamento de acordo com o dia de análise. Este resultado pode ser justificado pela não homogeneidade do leite que causa espalhamento da radiação através das pequenas partículas de gordura e micelas de caseína presentes no mesmo. Desta forma, os dados obtidos com este espectrômetro não foram utilizados para o desenvolvimento de modelos de classificação.

Modelos de classificação obtidos com os espectros de MIR coletados nos espectrômetros 4200 FlexScan e Cary 630 apresentaram uma boa separação entre as amostras de leite não adulterada e adulterado. Na Figura 2.5 tem-se a projeção dos espectros das amostras de leite obtidos com o espectrômetro MIR modelo 4200 FlexScan. Neste gráfico é possível observar uma tendência na separação entre as amostras de leite não adulteradas e adulteradas.

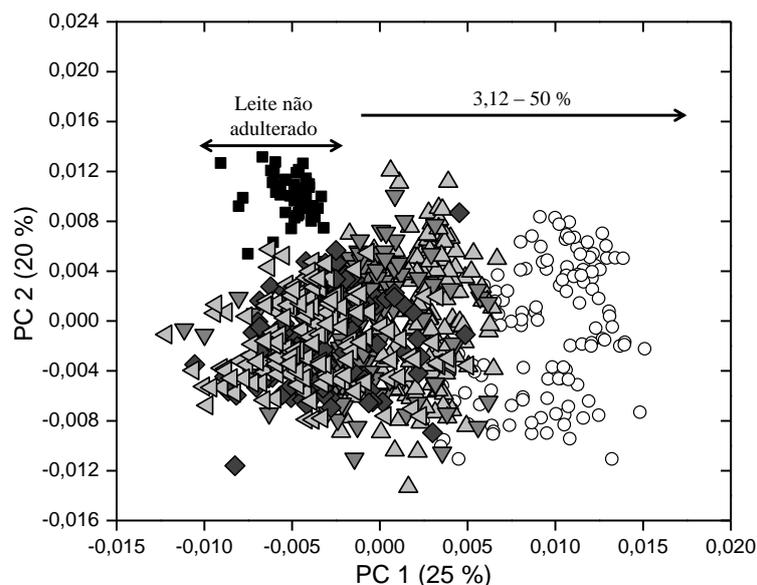


FIGURA 2.5. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan.

A partir do gráfico de pesos (Figura 2.6) verificou-se que as variáveis com número de onda próximo de 1613, 1633, 1972 e 1679 cm^{-1} são as que mais contribuem para a separação das amostras na PC2. Estas bandas de absorção são provenientes aos sinais das proteínas (estiramento da ligação de C=O e C-H e deformação angular da ligação N-H).

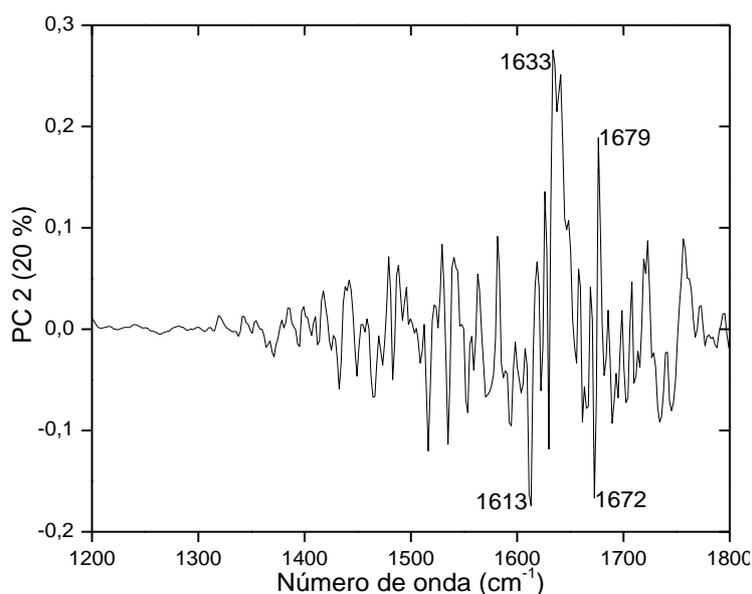


FIGURA 2.6. Gráfico de pesos da PC2 obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan.

Modelos de classificação SIMCA foram desenvolvidos utilizando um número de PCs de 2-6 e a região espectral de 900-1800 cm^{-1} . O valor de ICD obtido entre as classes das amostras não adulteradas e adulteradas foi igual a 1,47, indicando similaridades entre os espectros. Este resultado foi confirmado com a validação do modelo, obtendo-se uma porcentagem de acerto de 47 (leite não adulterado) e 95 % (leite adulterado).

Na Figura 2.7 tem a projeção dos espectros das amostras de leite obtidos com o espectrômetro MIR modelo Cary 630. Neste gráfico é possível observar a separação das amostras de acordo com a porcentagem de adulteração. No caso da adulteração em 50 % v/v, ainda foi possível observar uma tendência de separação de acordo com o adulterante utilizado no processo de adulteração. As variáveis responsáveis por esta separação são apresentadas no gráfico de pesos (Figura 2.8) e estão diretamente relacionadas aos sinais encontrados na região do *fingerprint* referentes aos estiramentos das ligações de C-O e C-C e deformação angular de C-O-C de carboidratos.

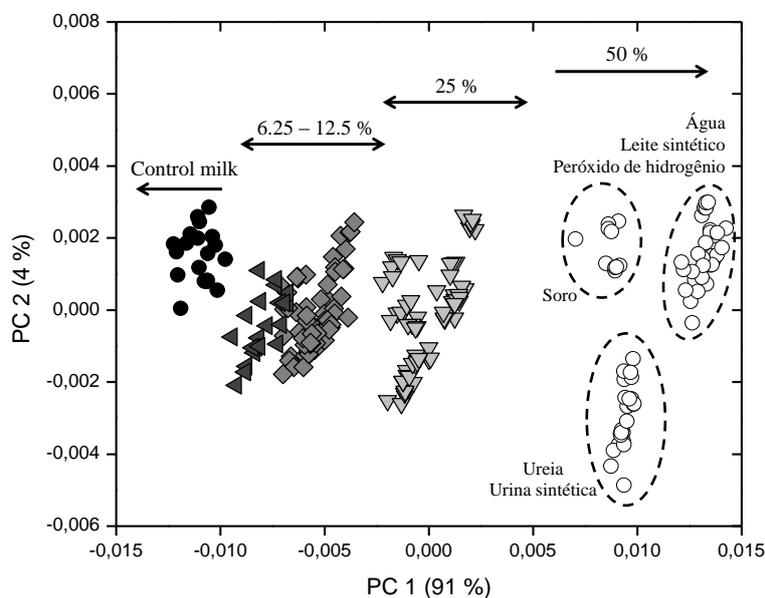


FIGURA 2.7. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro Cary 630.

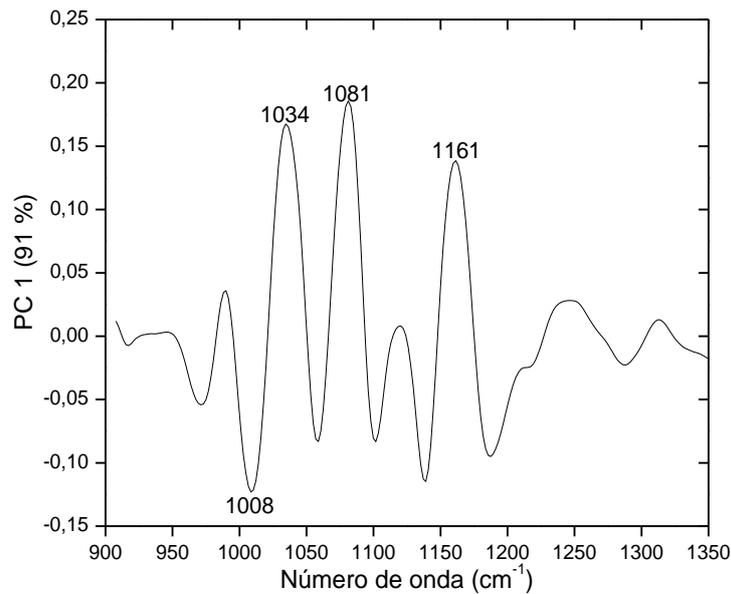


FIGURA 2.8. Gráfico de pesos da PC1 obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro Cary 630.

Modelos de classificação SIMCA foram obtidos utilizando um número de PCs de 4-5 e a região espectral de 1300-900 cm^{-1} . A partir dos resultados, verificou-se que o procedimento proposto permite classificar as amostras não apenas de acordo com a presença de adulterante, mas também de acordo com a porcentagem de adulteração. O valor de ICD entre as amostras de leite não adulterada e adulterada foi $> 4,0$, permitindo a discriminação das amostras quando a porcentagem de adulteração é maior que 6,25 %. Também foram calculados os valores de ICD entre as amostras de leite não adulterada e adulterada em 6,25, 12,5, 25 e 50% v/v e, os valores variam de 2,6 (para a menor porcentagem de adulteração) até 14,4 (para a maior porcentagem de adulteração). Este modelo foi validado a partir da validação externa e, a porcentagem de acerto foi de 100 %.

Ao comparar os resultados obtidos com os dois espectrômetros MIR, verificou-se que o sistema de DialPath apresentou um melhor desempenho para classificação de leite adulterado quando comparado com o

sistema de ATR. O modelo de classificação obtido com o espectrômetro Cary 630 também foi superior ao obtido com as imagens digitais (Capítulo 1).

Em seguida, foi desenvolvido o modelo de classificação com os espectros das amostras de leite submetidas a um processo de secagem a vácuo. Estes espectros foram coletados no modo de ATR utilizando o espectrômetro MIR modelo 4200 FlexScan. Na Figura 2.9 tem-se o gráfico de projeção das classes para as amostras de leite não adulterada e adulterada. Neste gráfico, observa-se que o procedimento desenvolvido permitiu a discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada de acordo com o adulterante utilizado no processo de adulteração. No entanto, o modelo não foi capaz de discriminar as amostras de leite adulteradas com leite sintético, ureia e urina sintética. Este comportamento pode ser justificado pela presença de ureia nas soluções de urina e leite sintético.

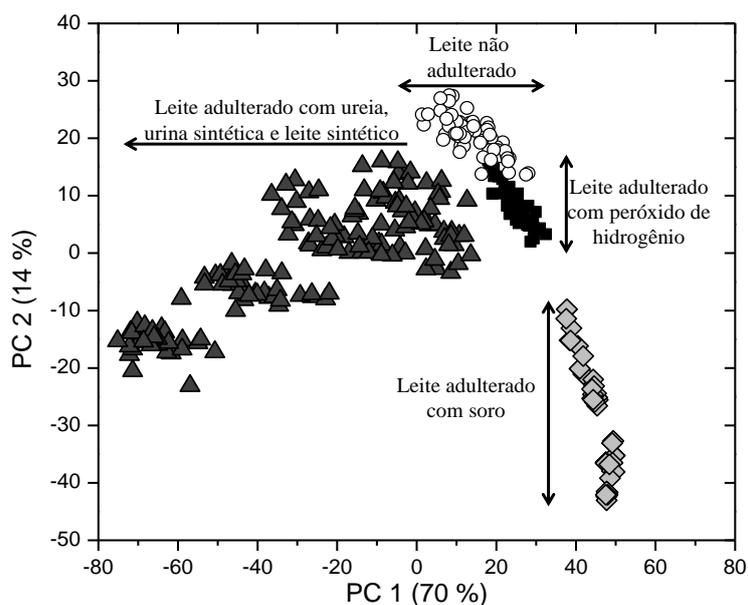


FIGURA 2.9. Gráfico de projeções das classes obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan com as amostras de leite submetidas a um processo de secagem a vácuo.

A partir do gráfico de pesos (Figura 2.10) verificou-se que as variáveis com número de onda na região de $1550\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ são as que mais

contribuem para a separação das amostras tanto na PC1 quanto na PC2. Nesta região são encontradas as bandas de absorção das proteínas (estiramento da ligação de C=O e C-H e deformação angular da ligação N-H das proteínas) e da ureia (estiramento da ligação de C=O).

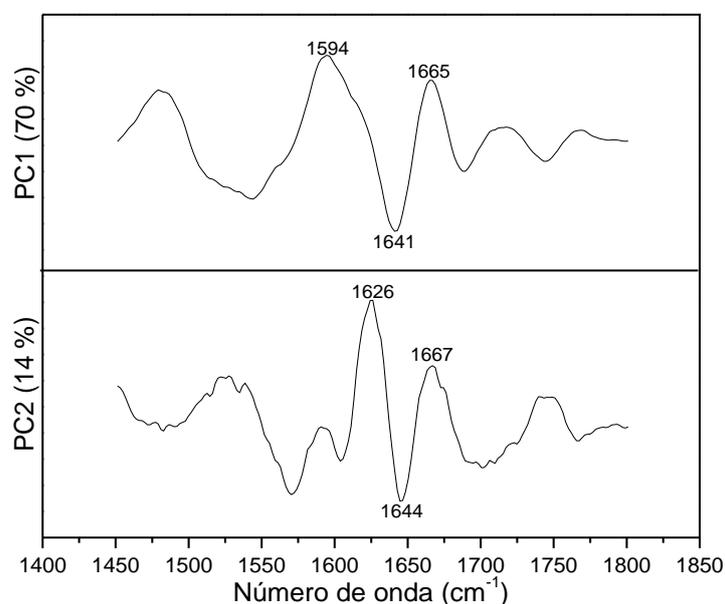


FIGURA 2.10. Gráfico de pesos da PC1 e PC2 obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro 4200 FlexScan com as amostras de leite submetidas a um processo de secagem a vácuo.

Modelos de classificação SIMCA foram desenvolvidos utilizando a região espectral de 1800-1450 cm^{-1} . O número de PCs utilizados para o desenvolvimento desses modelos variou de 3-6. Na Tabela 2.1 têm-se os valores de ICD obtidos entre as amostras de leite não adulterado e adulterado com soro, peróxido de hidrogênio e leite sintético. Estes valores variaram de 2,7 até 8,7, indicando a habilidade do procedimento desenvolvido em discriminar as amostras de leite adulterada com leite sintético, soro e peróxido de hidrogênio com concentrações superiores a 0,05 g/L (3,12 % v/v), 7,5 g/L (12,5 % v/v) e 0,018 g/L (6,25 % v/v), respectivamente. Para as amostras de leite adulteradas com ureia e urina sintética o modelo apresentou um elevado poder de discriminação, permitindo a classificação das amostras para todas as

concentrações estudadas. Ainda na Tabela 2.1, verificou-se que os valores de ICD entre as amostras de leite adulteradas com leite sintético, urina sintética e ureia eram $< 2,0$, confirmando o resultado apresentado na Figura 2.9. O procedimento desenvolvido não foi possível discriminar as amostras de leite adulteradas com água.

TABELA 2.1. Valores de ICD entre as amostras de leite não adulterada e adulterada com soro, leite sintético, urina sintética, ureia e peróxido de hidrogênio após supressão do sinal da água. Estes espectros foram coletados no espectrômetro MIR modelo 4200 FlexScan.

	Leite não adulterado	Soro	Leite sintético	Urina sintética	Ureia	Peróxido de hidrogênio
Leite não adulterado	0,00					
Soro	8,66	0,00				
Leite sintético	2,68	9,42	0,00			
Urina sintética	4,79	9,60	1,83	0,00		
Ureia	3,65	8,61	1,64	0,48	0,00	
Peróxido de hidrogênio	2,69	6,14	3,40	5,31	5,15	0,00

O modelo foi validado através da utilização de um conjunto de validação externa e os resultados obtidos apresentaram uma média na porcentagem de acerto de 98 %. Nenhuma amostra adulterada foi classificada como não adulterada. Estes resultados confirmam a habilidade do procedimento em classificar as amostras de leite não apenas em adulterada e não adulterada, mas também de acordo com o adulterante utilizado no processo de adulteração.

2.4.3. Quantificação de adulteração em leite

Modelos de quantificação foram desenvolvidos utilizando a mesma região espectral aplicada para o desenvolvimento dos modelos de classificação, empregando como variável dependente o valor da porcentagem de adulteração

(para os espectros obtidos de forma direta) e a concentração do adulterante (para os espectros obtidos a partir da supressão do sinal da água).

Na Tabela 2.2 têm-se a comparação dos valores de SEC, SECV e SEP obtidos com os modelos de PLS. De acordo com os dados apresentados, verifica-se que, de uma maneira geral, os modelos desenvolvidos com os espectros de MIR apresentaram uma melhor habilidade de predição do que os desenvolvidos com os espectros de NIR. Para os modelos desenvolvidos utilizando os espectros de MIR, obtidos a partir da análise direta, os menores valores de SECV e SEP apresentaram valores de SECV e SEP $\leq 0,83\%$ v/v. Os modelos desenvolvidos com os espectros de MIR, obtidos a partir de um filme fino de leite, apresentaram valores de SEP da ordem de 1,18 g/L (1,97 % v/v) para soro, 0,009 g/L (3,12 % v/v) para peróxido de hidrogênio, 0,028 g/L (1,74 % v/v) para leite sintético, 0,412 g/L (1,65 % v/v) para urina sintética e 0,232 g/L (0,93 % v/v) para ureia (Tabela 2.2).

TABELA 2.2. Comparação dos parâmetros estatísticos dos modelos PLS obtidos com os diferentes espectrômetros portáteis de infravermelho.

	Número de amostras	Número de fatores	SEC	SECV	SEP	rCal	rVal
NIR MicroPHAZIR* (1600 - 2400 nm)							
	744	5	4,63	4,69	4,74	0,92	0,92
MIR Cary 630* (1300-900 cm⁻¹)							
	372	4	0,74	0,76	0,83	0,98	0,98
MIR FlexScan* (1800-900 cm⁻¹)							
	837	5	4,05	4,12	4,18	0,94	0,92
MIR FlexScan* (1800-1450 cm⁻¹)							
Soro	90	5	1,73	1,93	1,97	0,98	0,98
Peróxido de hidrogênio	90	4	2,77	3,12	3,12	0,96	0,94
Leite sintético	90	5	1,47	1,68	1,74	0,98	0,98
Urina sintética	90	4	1,33	1,46	1,65	0,98	0,98
Ureia	90	5	0,70	0,84	0,93	0,98	0,98
MIR FlexScan** (1800-1450 cm⁻¹)							
Soro	90	5	1,03	1,16	1,18	0,98	0,98
Peróxido de hidrogênio	90	4	0,008	0,009	0,009	0,96	0,94
Leite sintético	90	5	0,023	0,027	0,028	0,98	0,98
Urina sintética	90	4	0,333	0,364	0,412	0,98	0,98
Ureia	90	5	0,175	0,210	0,232	0,98	0,98

* modelos obtidos utilizando como variável dependente os valores de porcentagem de adulteração (% v/v);

** modelos obtidos utilizando como variável dependente os valores de concentração do adulterante (g/L).

Na Figura 2.11 tem-se o gráfico de correlação entre os valores medidos *versus* os previstos pelo modelo PLS. Este modelo foi obtido com os espectros de MIR coletados no espectrômetro Cary 630. Neste gráfico, é possível observar uma alta correlação entre os dados, tanto para o conjunto de calibração quanto para o conjunto de validação.

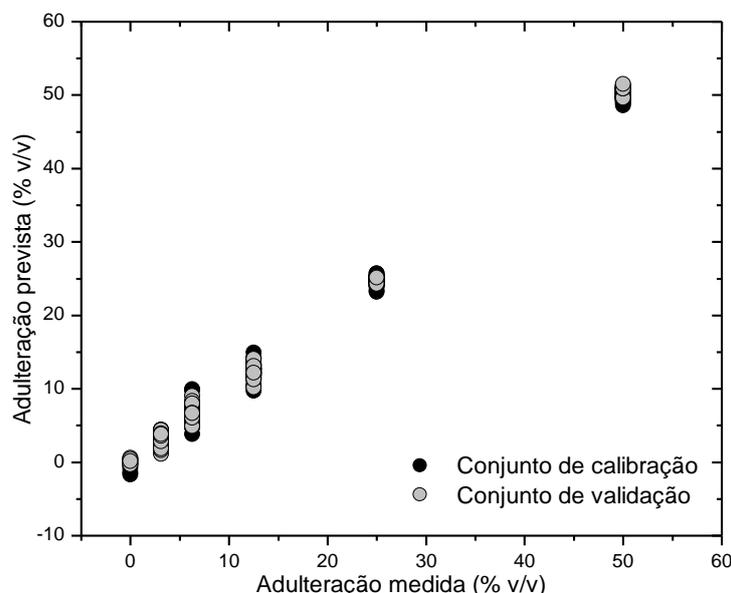


FIGURA 2.11. Gráfico de correlação entre as porcentagens de adulteração reais presentes nas amostras de leite e as previstas pelo modelo PLS. Modelo obtido espectrômetro MIR modelo Cary 630.

Na literatura foram encontradas algumas aplicações do método de NIR para verificar a autenticidade de leite bovino. Kasemsumran et al.⁴⁶ desenvolveram um procedimento para detecção de água e soro *via* PLS. Os valores de RMSEP obtidos foram iguais a 2,17 % v/v (para água) e 2,44 g/L (para soro). Jha et al.⁴⁷ aplicaram o método de NIR para detecção de ureia em leite bovino e o valor de SEP obtido foi igual a 7,8 g/L. Desta forma, verifica-se que os modelos desenvolvidos neste trabalho apresentaram uma melhor habilidade de predição do que os descritos na literatura.

2.5. Conclusão parcial

De acordo com os dados apresentados neste capítulo é possível concluir que os procedimentos desenvolvidos com o método MIR podem ser utilizados para efetuar a classificação e quantificação de adulteração em leite bovino, com elevado poder de discriminação e predição.

A aquisição de espectros de MIR com a supressão do sinal da água permitiu o desenvolvimento de um procedimento analítico capaz de classificar as amostras de leite de acordo com o adulterante utilizado no processo de adulteração. Por outro lado, os modelos obtidos a partir da análise direta do leite possibilitou a classificação das amostras de acordo com a concentração do adulterante.

Os resultados obtidos com os modelos de quantificação apresentaram uma melhor habilidade de predição quando comparado com os encontrados na literatura. Modelos de PLS obtidos a partir da análise direta de leite apresentaram valores de SECV e SEP < 1 % v/v. Para os modelos obtidos com os espectros de MIR, com a supressão do sinal da água, os valores de SEP foram da ordem de 1,18 g/L (1,97 % v/v) para soro, 0,009 g/L (3,12 % v/v) para peróxido de hidrogênio, 0,028 g/L (1,74 % v/v) para leite sintético, 0,412 g/L (1,65 % v/v) para urina sintética e 0,232 g/L (0,93 % v/v) para ureia

Estes métodos apresentam como principal vantagem a fácil implementação para análises *in-situ* e *on-line*.

Capítulo 3

Avaliação da ressonância magnética nuclear no domínio do tempo para detecção e quantificação adulteração em leite bovino

3.1 Introdução

3.1.1. Ressonância magnética nuclear no domínio do tempo

A ressonância magnética nuclear (RMN) baseia-se na medida da absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência de, aproximadamente, 4 a 900 MHz³². Diferentemente das demais técnicas espectroanalíticas (infravermelho, ultravioleta e absorção atômica), na RMN os núcleos dos átomos estão envolvidos no processo de absorção da radiação.

A base teórica da RMN foi proposta por Wolfgang Pauli, em 1924, ao constatar que certos núcleos atômicos apresentavam propriedades magnéticas, ou seja, comportavam-se como pequenos ímãs e que, conseqüentemente, a exposição destes a um campo magnético deveria levar a um desdobramento de seus níveis de energia⁴⁸. No entanto, foi apenas em 1946 que os físicos Felix Bloch e Edward Purcell demonstraram que os núcleos absorviam radiação eletromagnética quando expostos a um campo magnético intenso, como consequência do desdobramento de níveis de energia⁴⁹. Contudo, a técnica de RMN teria um grande avanço quando Packard e outros assistentes de Bloch obtiveram um espectro de hidrogênio composto por três sinais para uma amostra de etanol. Este experimento veio indicar um dos aspectos mais importantes da RMN: núcleos iguais, mas em ambientes químicos diferentes, absorvem energia em radiofrequências diferentes^{48,49}. Este efeito foi denominado de deslocamento químico. Pouco tempo após esta descoberta, já eram produzidos e comercializados os primeiros espectrômetros de RMN, e desde então, a RMN vem se desenvolvendo de forma rápida e contínua, apresentando aplicações nas mais diversas áreas^{50,51,52}.

Nas últimas décadas, os espectrômetros de baixo campo vêm sendo gradualmente inseridos nos laboratórios de desenvolvimento e controle de qualidade. Estes espectrômetros normalmente utilizam ímãs permanentes de baixo campo magnético, abaixo de 0,5 T (20 MHz para ¹H), e são aparelhos de

pequeno porte, muitas vezes de bancada, de baixo custo e fácil operação. As principais vantagens dos espectrômetros de baixo campo sobre os métodos convencionais de análise são: rapidez da análise, não destruição da amostra, fácil execução e possibilidade de se realizar análises sem preparo da amostra. No entanto, apesar destes aspectos positivos, a baixa sensibilidade destes espectrômetros restringe seu uso em análises de substâncias químicas com isótopos de alta abundância natural e grande constante magnetogírica, tais como o ^1H . Ainda neste tipo de equipamento, o deslocamento químico não é observado e os sinais são obtidos no domínio do tempo através do monitoramento dos tempos de relaxação transversal (T_2) e longitudinal (T_1). Devido a esta característica dos sinais, este método é conhecido como ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT).

3.1.1.1. Aplicações da RMN-DT

A RNM-DT vem sendo largamente aplicada em diversas análises na química analítica, especialmente na indústria alimentícia. Povlsen et al.⁵³ aplicaram a RMN-DT para determinação de propriedades sensoriais em batatas. Os parâmetros analisados foram: dureza, umidade, granulação, entre outros. Os resultados obtidos com RMN-DT apresentaram uma boa correlação com os obtidos através de análises sensoriais realizadas *via* painel de provadores. Jepsen et al.⁵⁴ empregaram a RMN-DT como um método alternativo para determinação simultânea de água e óleo em amostras de peixes. Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas amostras de salmão e bacalhau e os resultados obtidos foram comparados com o método padrão de análise.

Pereira et al.⁵⁵ desenvolveram um procedimento simples e rápido para determinação do teor de umidade em amostra de carne bovina. A partir dos resultados, verificou-se que a RMN-DT, quando combinada com ferramentas quimiométricas, pode ser aplicada para determinação direta do teor da umidade em amostras de carne bovina, sem a necessidade de efetuar qualquer

procedimento de preparo na amostra. Ainda neste estudo, verificou-se que as análises poderiam ser realizadas em amostras intactas, sem a necessidade de abrir as embalagens.

Em particular nas análises de laticínios, Hürlimann et al.⁵⁶ e Song et al.⁵⁷ desenvolveram um procedimento rápido e robusto para determinação de água e gordura em amostras de leite, iogurte e queijo. As amostras foram analisadas através da correlação dos valores de T_2 - T_1 e difusão- T_2 . De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os espectros das amostras de leite apresentavam somente um sinal de ^1H referente ao sinal da água. Por outro lado, as amostras de iogurte e queijo apresentavam dois sinais, sendo o primeiro referente ao ^1H da água e o segundo ao ^1H da gordura. Em outro trabalho, Salomonsen et al.⁵⁸ aplicaram medidas de RMN-DT para estudar a mobilidade da água em bebidas lácteas acidificadas de diferentes composições. Neste trabalho, observou-se uma variação nos valores de T_2 de acordo com a concentração de pectina e o tipo de proteína presente nas bebidas.

3.2. Objetivo específico

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a potencialidade da RMN-DT para efetuar a detecção e quantificação de adulteração em leite bovino.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Amostras utilizadas

As amostras utilizadas neste estudo foram as mesmas descritas no capítulo 1.

3.3.2. Reagente e Soluções

Os reagentes e soluções utilizados neste estudo foram os mesmos descritos no capítulo 1.

3.3.3. Preparo da amostra

As amostras de leite foram adulteradas de acordo com o procedimento descrito no capítulo 1.

3.3.4. Equipamentos e acessórios

As medidas de RMN-DT foram realizadas no espectrômetro SLK-IF-1399 (Spinlock Magnetic Resonance Solution, Cordoba, Argentina). As curvas de T_2 foram obtidas através da sequência de pulso CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) mostrada na Figura 3.1 que consiste da aplicação de um pulso de 90 graus, seguido por um tempo τ . Após esse tempo, aplica-se um pulso de 180 graus, que gera um eco a 2τ do primeiro pulso. Com as repetições desses pulsos de 180 graus a cada 2τ , gera-se um sinal de RMN cujo centro de cada eco resulta de um decaimento exponencial com constante de tempo igual a T_2 da amostra, independente da não-homogeneidade de campo.

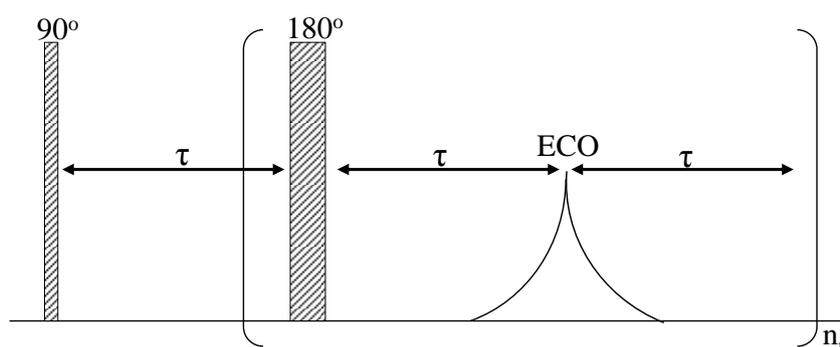


FIGURA 3.1. Ilustração da sequência de pulso CPMG.

Para aquisição das curvas de relaxamento de T_2 *via* CPMG, aplicou-se um pulso de radiofrequência de 90° de $16 \mu\text{s}$, $\tau = 400 \mu\text{s}$ e $n_t = 4$.

Antes de efetuar cada medida, esperou-se um tempo de 15 s para que toda magnetização retornasse a condição de equilíbrio térmico.

3.3.5. Tratamento dos dados

As curvas de relaxamento de T_2 foram analisadas através de métodos multivariados e univariados. As análises multivariadas foram realizadas com o auxílio das ferramentas quimiométricas listadas no capítulo 1. Antes de efetuar a análise dos dados, as curvas de relaxamento de T_2 foram normalizadas e centradas na média.

Para as análises univariadas, os valores de T_2 foram obtidos a partir de um ajuste monoexponencial nas curvas de relaxamento de T_2 utilizando o software Origin 8.1 (OriginLab, Northampton, MA, EUA). Em seguida, efetuou-se a correlação entre os valores de T_2 e a porcentagem de adulterante presente nas amostras de leite. Para validação do procedimento proposto, um teste t pareado, com 95% de confiança, foi aplicado.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Análise multivariada

As análises multivariadas foram realizadas utilizando as curvas de relaxamento de T_2 obtidas através da sequência de pulsos CPMG. Na Figura 3.2 tem-se um exemplo de uma curva de T_2 , obtida com uma amostra de leite de boa qualidade.

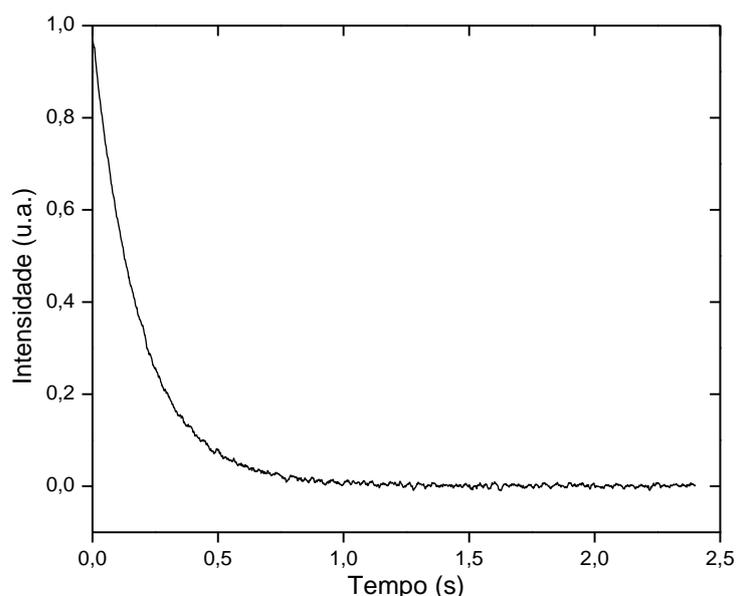


FIGURA 3.2. Curva de relaxamento de T_2 obtidas através da sequência de pulsos CPMG para uma amostra de leite bovino de boa qualidade.

Inicialmente, uma análise exploratória foi realizada com as amostras de leite não adulterada e adulterada com água, soro, leite sintético, urina sintética, ureia e peróxido de hidrogênio em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v (dados coletados nos experimentos 1-6, Tabela 1.2). Para fins ilustrativos, os resultados obtidos serão apresentados em dois gráficos de scores: (1) obtido com as amostras de leite não adulterada e adulterada com água, soro, leite sintético e urina sintética em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v (Figura 3.3) e (2) obtido com as amostras de leite não adulterada e adulterada com peróxido de hidrogênio de 5-50% v/v (Figura 3.4).

Na Figura 3.3 é possível observar o agrupamento das amostras de acordo com a porcentagem de adulteração. Nenhuma separação foi obtida entre os diferentes adulterantes utilizados no processo de adulteração. Esta mesma tendência de separação foi observada nos procedimentos desenvolvidos por análise de imagens digitais (Figura 1.5) e através do uso do espectrômetro portátil de infravermelho na região do médio (Figura 2.7).

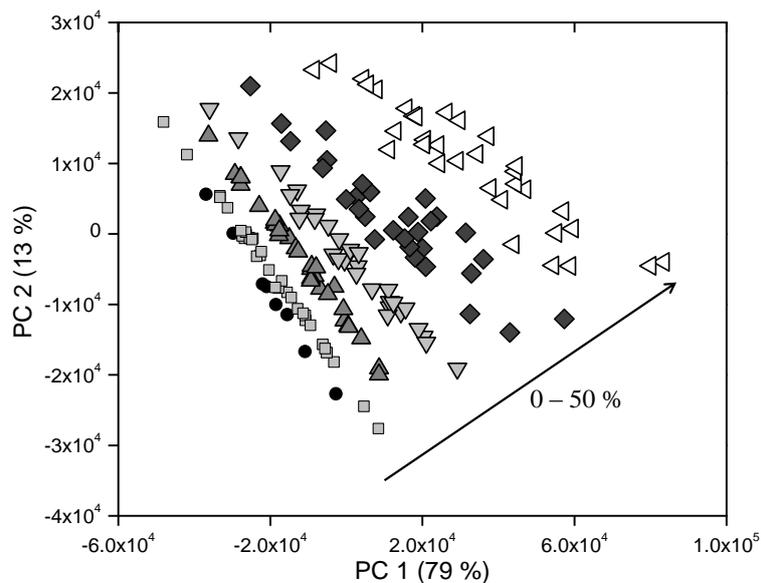


FIGURA 3.3. Gráfico de scores para amostras de leite não adulteradas e adulteradas com água, soro, urina sintético e leite sintético.

Para as amostras adulteradas com peróxido de hidrogênio, verificou-se uma variação na tendência de agrupamento, como mostra a Figura 3.4.

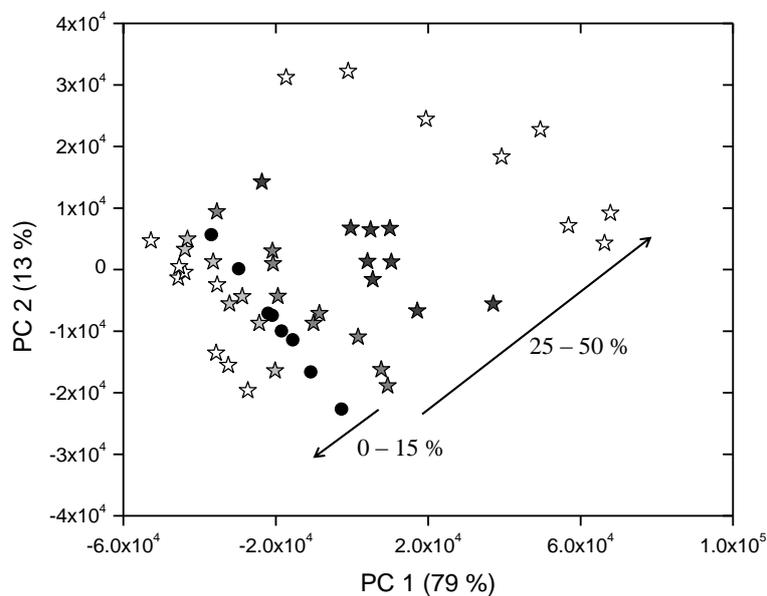


FIGURA 3.4. Gráfico de scores para amostras de leite não adulteradas e adulteradas com peróxido de hidrogênio.

Esta variação no agrupamento das amostras adulteradas com peróxido de hidrogênio pode ser justificada devido à alteração nos valores de T_2 causada pela formação/liberação de oxigênio após a adição de peróxido de hidrogênio. O oxigênio é considerado um agente paramagnético que faz com que os núcleos de ^1H relaxem mais rapidamente, ou seja, diminui o valor de T_2 .

Em seguida, uma nova análise exploratória foi realizada incluindo as amostras de leite adulteradas com dois ou mais adulterantes (experimentos 7-17, Tabela 1.2). A tendência de agrupamentos destas amostras foi a mesma obtida com o procedimento de análises por imagens digitais (capítulo 1), com o agrupamento de acordo com a porcentagem final de adulteração.

3.4.1.1. Desenvolvimento de modelos de classificação para discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada

Modelos de classificação foram desenvolvidos para verificar o potencial da RMN-DT em discriminar as amostras de leite de quanto à porcentagem de adulteração e à presença de adulterante. Para a construção destes modelos, utilizou-se o conjunto de dados obtidos nos experimentos 1-5 (Tabela 1.2). As amostras de leite adulteradas com peróxido de hidrogênio não foram utilizadas devido às variações nos valores de T_2 , observadas na Figura 3.4.

Na Tabela 3.1 têm-se os resultados obtidos com os modelos SIMCA e KNN para as amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v. Ao comparar o desempenho estatístico destes modelos, verificou-se que ambos apresentaram uma habilidade de discriminação muito semelhante, com a média do número de amostras corretamente classificadas, expressas em porcentagem de acerto, ≥ 90 e 88% para SIMCA e KNN, respectivamente. Esta mesma habilidade de classificação foi obtida com os modelos desenvolvidos para discriminar as amostras de leite quanto à presença

de adulterante (Tabela 3.2). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.2, verificou-se que o modelo SIMCA apresentou uma melhor habilidade de discriminação quando comparado com o modelo KNN, com uma média na porcentagem de amostras corretamente classificadas superior a 95%.

TABELA 3.1. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v.

	Calibração (n = 149)		Validação (n = 51)	
	SIMCA	KNN	SIMCA	KNN
Leite não adulterado	100	80	87	75
Leite adulterado em 5 %	100	100	100	100
Leite adulterado em 15 %	100	96	88	88
Leite adulterado em 25 %	100	100	88	88
Leite adulterado em 35 %	100	100	80	80
Leite adulterado em 50 %	100	100	100	100

TABELA 3.2. Porcentagem de acerto obtida com os modelos SIMCA e KNN para classificação das amostras de leite não adulterada e adulterada.

	Calibração (n = 149)		Validação (n = 51)	
	SIMCA	KNN	SIMCA	KNN
Leite não adulterado	100	83	90	70
Leite adulterado	100	96	100	91

Estes resultados confirmam o potencial da RMN-DT em discriminar as amostras de leite não apenas em adulterada e não adulterada, mas também de acordo a porcentagem de adulteração.

3.4.1.2. Quantificação de adulteração em leite

Para o desenvolvimento do modelo de quantificação foi empregada à ferramenta quimiométrica PLS, utilizando-se como variável dependente a porcentagem de adulteração. O modelo de PLS foi obtido através do uso das curvas de T_2 obtidas nos experimentos 1-5 (Tabela 1.2). Como pode ser observado na Tabela 3.3, o modelo apresentou uma boa habilidade de predição, com um baixo valor de SEP ($\leq 1,73$) e alto valor de rVal ($\geq 0,99$).

TABELA 3.3. Parâmetros estatísticos obtidos com o modelo PLS para quantificação da porcentagem de adulteração em leite bovino.

Método	Calibração (n = 149)			Validação (n = 51)		
	Número de fatores	rCal	SEC	SECV	rVal	SEP
PLS	2	0,99	1,34	1,71	0,98	1,73

Na Figura 3.5 tem-se o gráfico de correlação entre a porcentagem de adulteração medida e a prevista pelo modelo PLS. Neste gráfico, observa-se uma alta correlação entre os dados, indicando a eficiência do procedimento proposto.

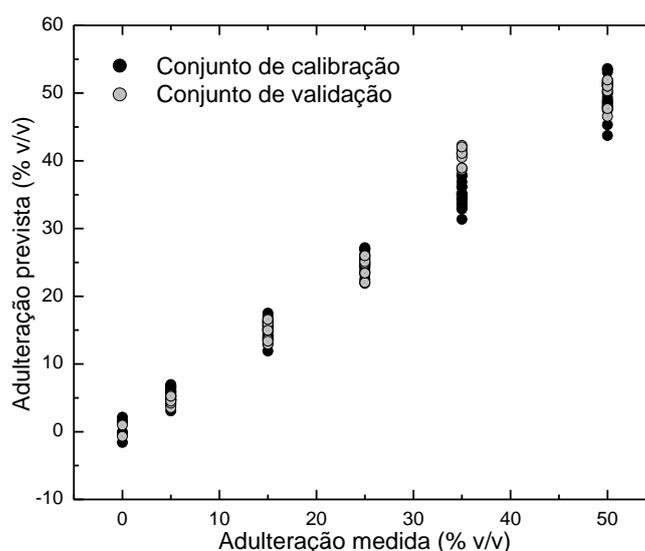


FIGURA 3.5. Correlação entre a porcentagem de adulteração medida e prevista pelo modelo PLS para o conjunto de calibração e validação.

3.4.2. Análise univariada

Dados publicados na literatura propõem que os decaimentos transversais das amostras de leite são monoexponencial^{56,57,59} com obtenção de um único valor de T_2 , referente ao sinal de ^1H da água livre. Neste contexto, um procedimento univariado foi proposto para efetuar a classificação e quantificação das amostras de leite adulterada e não adulterada.

Na Figura 3.6 têm-se as curvas de CPMG das amostras de leite não adulterada e adulterada com água em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v. Nesta figura, observa-se que o decaimento do sinal torna-se mais longo com o aumento da porcentagem de adulteração, indicando um aumento nos valores de T_2 com o aumento da taxa de adulteração.

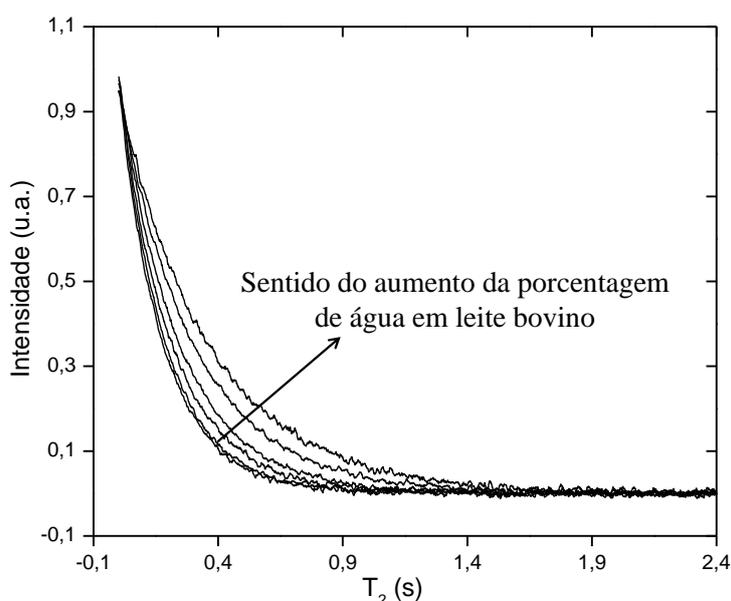


FIGURA 3.6. Curvas de CPMG das amostras de leite não adulterado e adulterado com água em 5, 15, 25, 35 e 50% v/v.

Este mesmo comportamento foi observado para os demais adulterantes estudados (soro, leite sintético, urina sintética e ureia), com exceção do peróxido de hidrogênio. No caso da adulteração com peróxido de hidrogênio, observou-se uma variação no valor de T_2 devido à formação/liberação de oxigênio, mencionada anteriormente.

Na Tabela 3.4 têm-se os valores de T_2 obtidos para as amostras adulteradas com água, soro, leite sintético, urina sintética e peróxido de hidrogênio. Nesta tabela, observa-se uma variação nos valores de T_2 de 0,171 (para amostra de leite não adulterada) até 0,307 s (amostras de leite adulterada em 50% v/v). Para as amostras de leite adulteradas com peróxido de hidrogênio em 5% v/v o valor de T_2 foi inferior ao obtido para uma amostra de leite não adulterada. O mesmo comportamento foi observado para as amostras adulteradas em 15 % v/v. Para a amostra de leite adulterada em 25 % v/v, observou-se um aumento no valor de T_2 quando comparado aos obtidos com as amostras adulteradas em 5 e 15% v/v, no entanto o valor foi inferior aos apresentados pelas demais amostras adulteradas em 25% v/v. Estes resultados apresentam concordância com os apresentados na Figura 3.4, onde as amostras de leite adulteradas em 5 e 15% v/v encontram-se no quadrante inferior esquerdo (peso negativo para PC1 e PC2).

TABELA 3.4. Valores de T_2 para as amostras de leite.

Adulterante	T_2 (s)				
	5 %	15 %	25 %	35 %	50 %
Água	0,187 ± 0,002	0,213 ± 0,003	0,243 ± 0,002	0,279 ± 0,007	0,362 ± 0,005
Soro	0,189 ± 0,002	0,207 ± 0,001	0,234 ± 0,002	0,280 ± 0,011	0,342 ± 0,007
Leite sintético	0,188 ± 0,001	0,212 ± 0,002	0,240 ± 0,002	0,282 ± 0,010	0,363 ± 0,004
Urina sintética	0,190 ± 0,001	0,210 ± 0,008	0,243 ± 0,003	0,286 ± 0,012	0,377 ± 0,006
Peróxido de hidrogênio	0,135 ± 0,006	0,161 ± 0,006	0,205 ± 0,005	0,283 ± 0,014	0,403 ± 0,017

* T_2 para amostra de leite não adulterada igual 0,171 s.

Na Figura 3.7 têm-se os gráficos de correlação entre os valores de T_2 e as porcentagens de adulteração para as amostras adulteradas com água (A), soro (B), leite sintético (C), urina sintética (D) e peróxido de hidrogênio (E).

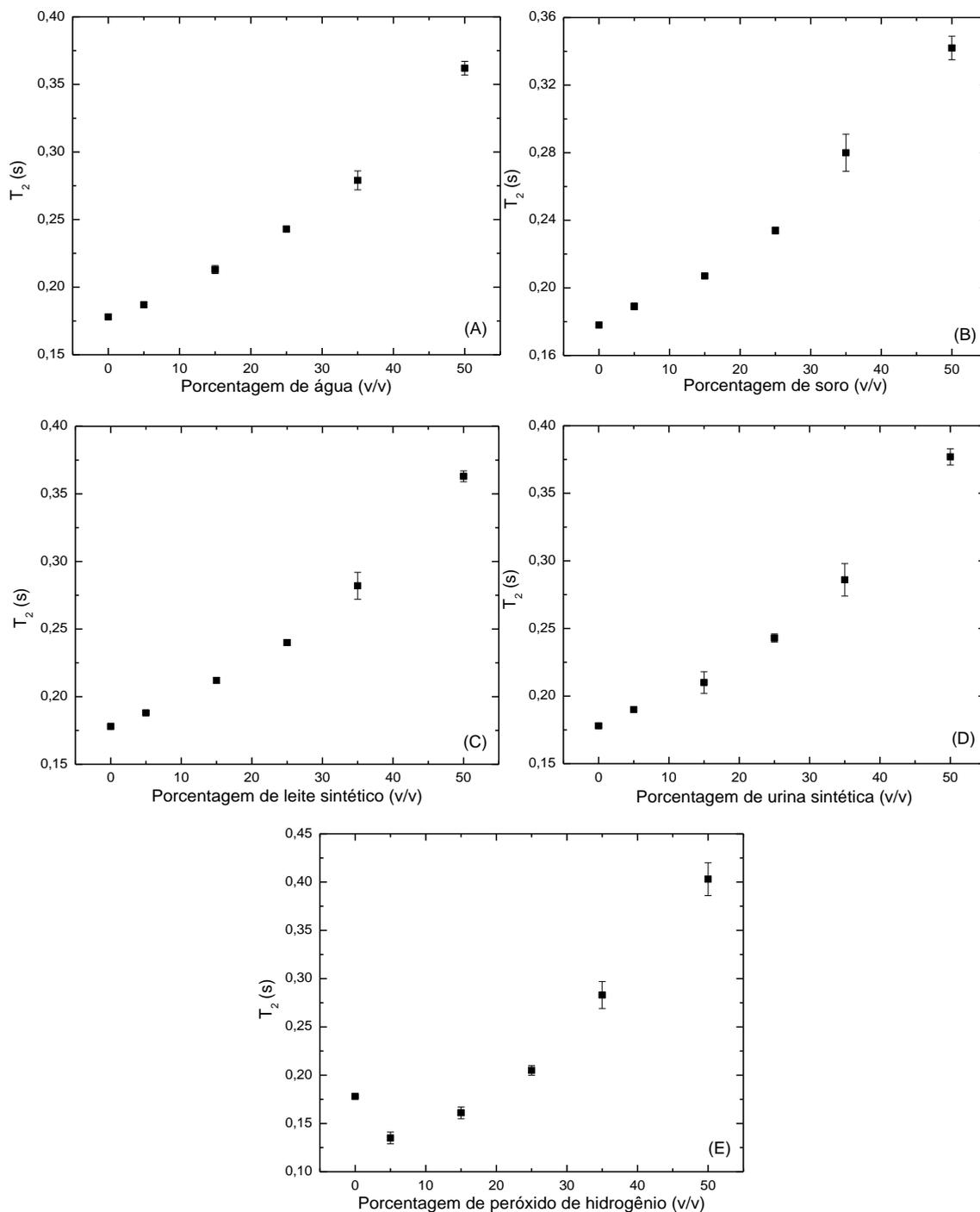


FIGURA 3.7. Correlações obtidas entre os valores de T_2 e as porcentagens de adulteração para as amostras de leite adulteradas com água (A), soro (B), leite sintético (C), urina sintética (D) e peróxido de hidrogênio (E).

Nestes gráficos (Figura 3.7) é possível observar uma variação linear entre os valores de T_2 e a porcentagem de adulteração. A partir de um teste t pareado, com 95% de confiança, verificou-se que os valores de T_2 das amostras de leite não adulterada e adulterada são estatisticamente diferentes e, desta forma, o procedimento univariado pode ser utilizado para verificar a autenticidade do leite bovino.

Modelos de quantificação foram desenvolvidos para verificar a habilidade do método univariado em quantificar a porcentagem de adulteração nas amostras de leite. Inicialmente, foram obtidos modelos individuais e os valores de SEP foram $\leq 3,61$ (para água), 15,5 (para urina sintética), 2,9 (para soro), 3,7 (para leite sintético) e 9,5% v/v (para peróxido de hidrogênio). Em seguida, um novo modelo foi construído utilizando as amostras de leite adulteradas com água, urina sintética, soro e leite sintético. As amostras adulteradas com peróxido de hidrogênio não foram incluídas no modelo devido às variações nos valores de T_2 , como mostrado na Tabela 3.4. O valor de SEP obtido com este modelo foi $\leq 3,9$ % v/v. Ao comparar o desempenho estatístico dos modelos univariados e multivariados, verificou-se um menor valor de SEP para os modelos multivariados.

3.5. Conclusão parcial

A partir destes resultados, conclui-se que a RMN-DT pode ser utilizada para verificar a autenticidade do leite bovino. Modelos de classificação SIMCA e KNN apresentaram uma alta porcentagem de acerto, permitindo a classificação das amostras quanto à porcentagem de adulteração e à presença de adulterante. Os baixos valores de SEP e SECV obtido com o modelo de quantificação PLS evidenciou a habilidade da RMN-DT em aplicações quantitativas.

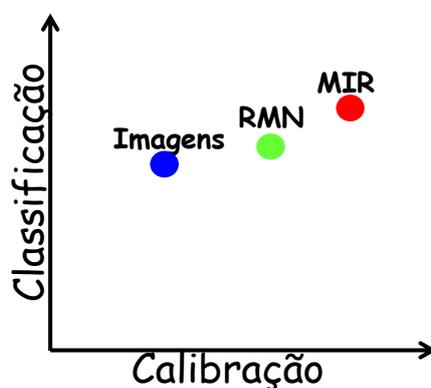
Os valores de T_2 , obtidos a partir de um ajuste monoexponencial nas curvas de T_2 , apresentaram uma alta correlação com as porcentagens de adulteração, permitindo o desenvolvimento de modelos univariados. A partir de um teste t pareado verificou-se que o valor de T_2 das amostras de leite não adulteradas é estatisticamente diferente dos T_2 das amostras de leite adulteradas.

Ao comparar o desempenho estatístico dos modelos de quantificação, verificou-se que o método multivariado apresentou um melhor desempenho estatístico, com menos valores de SEP.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos, precisos e robustos, as estratégias apresentadas neste trabalho de doutorado se mostraram viáveis para determinação e quantificação de adulteração em amostras de leite bovino. Além disso, uma das principais vantagens dos procedimentos propostos está relacionada com a possibilidade de aplicações *in-situ* e *online*.

Uma correlação entre o desempenho estatístico dos modelos de classificação e quantificação, obtidos com os três procedimentos analíticos, pode ser visualizada no gráfico a seguir:



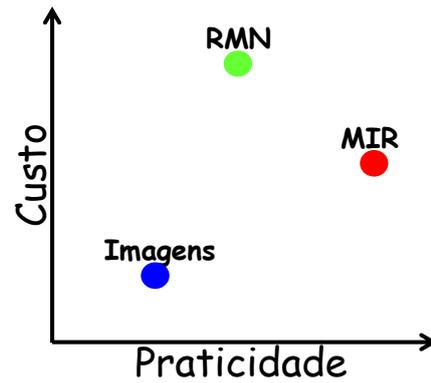
Modelos de classificação obtidos a partir do uso de imagens digitais apresentaram resultados similares aos obtidos com os espectros de MIR e com as curvas de T_2 , permitindo a discriminação das amostras de leite não adulterada e adulterada. No entanto, modelos de classificação obtidos com o espectrômetro portátil de MIR e RMN-DT também possibilitaram a classificação das amostras de acordo com a porcentagem de adulteração. Ainda com os espectrômetros de MIR, foi possível o desenvolvimento de um procedimento capaz de classificar as amostras de acordo com o tipo de adulterante utilizado no processo de adulteração.

Ao comparar o desempenho estatístico dos modelos de quantificação, verificou-se uma melhor habilidade de predição para o modelo obtido com o método de MIR (espectrômetro modelo Cary 630), com valores de

SEP \leq 1% v/v. O modelo obtido com o uso de imagens digitais foi o que apresentou o pior desempenho estatístico com valores de SEP \leq 5,85% v/v. Estes resultados podem ser visualizados na tabela abaixo.

	Número de fatores	SEC	SECV	SEP	r _{cal}	r _{val}
Imagem digital	4	5,84	5,84	5,85	0,94	0,94
NIR MicroPHAZIR* (1600 - 2400 nm)	5	4,63	4,69	4,74	0,92	0,92
MIR Cary 630* (1300-900 cm⁻¹)	4	0,74	0,76	0,83	0,98	0,98
MIR FlexScan* (1800-900 cm⁻¹)	5	4,05	4,12	4,18	0,94	0,92
RMN-DT	2	1,34	1,71	1,73	0,99	0,98

Quanto ao custo e praticidade apresentada pelos procedimentos desenvolvidos, o uso da análise por imagem digital permitiu a utilização de acessórios de baixo custo para aquisição dos dados, no entanto, o procedimento apresenta uma menor praticidade quando comparado com os métodos de MIR e RMN-DT. Os espectrômetros portáteis de MIR apresentam uma maior praticidade devido à facilidade de implementação em análises *in-situ* e por permitirem a análise direta, sem a aplicação da etapa de preparo da amostra. Já a RMN-DT, apesar de ser considerado um método de bancada, a sua utilização em análises *in-situ* ainda é limitada devido à dificuldade de transporte do equipamento. A correlação entre o custo e praticidade dos procedimentos desenvolvidos pode ser visualizada, de forma resumida, no gráfico a seguir:



Parte dos resultados apresentados nesta tese foi publicado na Food Analytical Method (DOI: 10.1007/s12161-011-9216-2), Food Chemistry (DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.024) e no Journal of Agricultural and Food Chemistry (DOI: 10.1021/jf303814g).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FARIA, V. P. *Produção de leite: conceitos básicos*. 1ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1998. p. 154.
2. BEHMER, M. L. A. *Tecnologia do leite*. 13ª ed. São Paulo, Nobel, 1984. p. 320.
3. SILVA, P. H. F. “Leite: aspectos de composição e propriedades”. *Quim. Nova na Escola*, **6**: 3, 1997.
4. JENSEN, R. G. *Handbook of milk composition*. 1ª ed. San Diego, Academic Press, 1995. p. 919.
5. FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 1ª ed. Irlanda, Blackie Academic & Professional, 1998. p. 396.
6. LAKIND, J. S.; WILKINS, A. A.; BERLIN, C.M. “Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health, and guidance for future research”. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **198**: 184, 2008.
7. Disponível em: <http://www.fao.org>, acessado em 10 de Setembro de 2012.
8. MOORE, J. C.; SPINK J.; LIPP, M. “Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010”. *J. Food Sci.*, **77**: R118-R126, 2011.
9. Disponível em: <http://noticias.terra.com.br/brasil/interna/0,,OI2020343-EI5030,00.html>, acessado em 10 de Setembro de 2012.
10. Disponível em: <http://noticias.terra.com.br/brasil/interna/0,,OI2017147-EI5030,00.html>, acessado em 10 de Setembro de 2012.
11. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,adulteracao-do-leite-eliminava-vitaminas-constata-laudo,72506,0.htm>, acessado em 10 de Setembro de 2012.
12. Disponível em: <http://g1.globo.com/Noticias/Mundo/0,,MUL778795-5602,00 CHINA+ PRENDE+ EM+ ESCANDALO+DE+LEITE+ADULTERADO.html>, acessado em 10 de Setembro de 2012.

13. SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; CELEGHINI, R. M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S. "Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach". *Food Chem.*, **124**: 692–695, 2001.
14. GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital Image Processing*. 3^a ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall, 2008. p. 954.
15. PRATT, W. K. *Digital Image Processing*. 2^a ed. New York, John Wiley, 1991. p. 698.
16. GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E.; EDDINS, S. L. *Digital Image Processing using MATLAB*. 1^a ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall, 2004. p. 609.
17. PAQUET-DURAND, O.; SOLLE, D.; SCHIRMER, M.; BECKER, T.; HITZMANN, B. "Monitoring baking processes of bread rolls by digital image analysis". *J. Food Eng.*, **111**: 425, 2012.
18. JACKMAN, P.; SUN, D. W.; ALLEN, P.; VALOUS, N. A.; MENDOZA, F.; WARD, P. "Identification of important image features for pork and turkey ham classification using colour and wavelet texture features and genetic selection". *Meat Sci.*, **84**: 711, 2010.
19. TÔRRES, A. R.; LYRA, W. S.; ANDRADE, S. I. E.; ANDRADE, R. A. N.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U.; GAIÃO, E. N. "A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator". *Talanta*, **84**: 601, 2011.
20. VIDAL, M.; AMIGO, J. M.; BRO, R.; VAN DEN BERG, F.; OSTRÁ, M.; UBIDE, C. "Image analysis for maintenance of coating quality in nickel electroplating baths – Real time control". *Anal. Chim. Acta*, **706**: 1, 2011.
21. FOCA, G.; MASINO, F.; ANTONELLI, A.; ULRICI, A. "Prediction of compositional and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques". *Anal. Chim. Acta*, **706**: 238, 2011.
22. LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; BARRETO, I. S.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U. "Digital image-based micro-flow-batch analyzer". *Microchem. J.*, 106: 238, 2013.
23. BORIN, A.; FERRÃO, M. F.; MELLO, C.; CORDI, L.; PATACA, L. C. M.; DURÁN, N.; POPPI, R. J. "Quantification of lactobacillus in fermented

- milk by multivariate image analysis with least-squares support-vector machines”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**: 1105, 2007.
24. BORAH, S.; BHUYAN, M. “A computer based system for matching colours during the monitoring of tea fermentation”. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **40**: 675, 2005.
25. ANTONELLI, A.; COCCHI, M.; FAVA, P.; FOCA, G.; FRANCHINI, G. C.; MANZINI, D.; ULRICI, A. “Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelt-based classification algorithm”. *Anal. Chim. Acta.*, **515**: 3, 2004.
26. VAN DALEN, G. “Determination of the size distribution and percentage of broken kernels of rice using flatbed scanning and image analysis”. *Food Res. Int.*, **37**: 51, 2004.
27. COURTOIS, F.; FAESSEL, M.; BONAZZI, C. “Assessing breakage and cracks of parboiled rice kernels by image analysis techniques.” *Food Control*, **21**: 567, 2010.
28. SADAT, A.; MUSTAJAB, P. & KHAN, I. “Determining the adulteration of natural milk with synthetic milk using ac conductance measurement”. *J. Food. Eng.*, **77**: 472, 2006.
29. LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. “Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines”. *J. Cryst. Growth*, **233**: 367, 2001.
30. Ferreira, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. “Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial”. *Quím. Nova*, **22**: 724, 1999.
31. KVALHEIM, O. M.; KARSTANG, T.V. *Multivariate pattern recognition in chemometrics, illustrated by case studies*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 237.
32. SKOOG, D. A. *Princípios de análise instrumental*. 5^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. p. 836.
33. PASQUINI, C. “Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 198, 2003.
34. SÁNCHEZ, M. T.; DE LA HABA, M. J.; BENÍTEZ-LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ-NOVALES, J.; GARRIDO-VARO, A.; PÉREZ-MARÍN, D.

“Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data”. *J. Food. Eng.*, **110**: 102, 2012.

35. SÁNCHEZ, M. T.; DE LA HABA, M. J.; GUERRERO, J. E.; GARRIDO-VARO, A.; PÉREZ-MARÍN, D. “Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument”. *Postharvest Biol. Tec.*, **60**: 130, 2011.

36. CAYUELA, J. A.; WEILAND, C. “Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers”. *Postharvest Biol. Tech.*, **58**: 113, 2010.

37. ZAMORA-ROJAS, E.; PÉREZ-MARÍN, D.; DE PEDRO-SANZ, E.; GUERRERO-GINEL, J. E.; GARRIDO-VARO, A. “Handheld nirs analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments”. *Chemometr. Intell. Lab.*, **114**: 30, 2012.

38. BIRKEL, E.; RODRIGUEZ-SAONA, L. “Application of a portable handheld infrared spectrometer for quantitation of trans fat in edible oils”. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **88**: 1477, 2001.

39. ALLENDORF, M.; SUBRAMANIAN, A.; RODRIGUEZ-SAONA, L. “Application of a handheld portable mid-infrared sensor for monitoring oil oxidative stability”. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **89**: 79, 2012.

40. LAPORTE, M. F.; PAQUIN, P. “Near-infrared analysis of fat, protein, and casein in cow’s milk”. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 2600, 1999.

41. RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; KOCA, N.; HARPER, W. J.; ALVAREZ, V. B. “Rapid determination of swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy”. *J. Dairy Sci.*, **89**: 1407, 2006.

42. SUBRAMANIAN, A.; PRABHAKAR, V.; RODRIGUEZ-SAONA, L. “Infrared spectroscopy in dairy analysis”. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed.; *Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Eds*; Academic Press: New York, 2011; pp. 115-124.

43. AERNOUTS, B., POLSHIN, E., SAEYS, W., & LAMMERTYN, J. “Mid-infrared spectrometry of milk for dairy metabolomics: A comparison of two sampling techniques and effect of homogenization.” *Anal. Chim. Acta*, **705**: 88, 2011.

44. ZHANG, F.; QI, X.; ZOU, M.; LI, J. “Analysis of alphasalactalbumin and betalactoglobulin from the rehydration of bovine colostrum powder using cloud point extraction and mass spectrometry”. *J. Anal. Methods in Chem.*, **2012**: 1, 2012.
45. MORTLAND, M. M. “Urea complexes with montmorillonite an infrared absorption study”. *Clay Minerals.*, **6**: 143, 1996.
46. KASEMSUMRAN, S.; THANAPASE, W.; KIATSOONTHON, A. “Feasibility of Near-Infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk”. *Anal. Sci.*, **23**: 907, 2007.
47. JHA, S. N.; MATSUOKA, T. “Detection of adulterants in milk using near infrared spectroscopy”. *J. Food Sci. Tech.*, **43**: 313, 2004.
48. TIPLER, P. A. & LLEWELLEN, R. A. *Física moderna*. 3^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. p. 515.
49. GIL, V. M. S. & GERALDES, C. F. G. C. *Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. p. 1012.
50. KLINOWSKI, J. “Applications of solid-state NMR for the study of molecular sieves”. *Anal. Chim. Acta*, **283**: 929, 1993.
51. HOLZGRABE, U.; DIEHL, B. W. K.; WAWER, I. “NMR spectroscopy in pharmacy”. *J. Pharmaceut. Biom.*, **17**: 557, 1998.
52. GIL, A. M.; BELTON, P. S.; HILLS, B. P. “Applications of NMR to Food to Food Science”. *Ann. R. NMR S.*, **32**: 1, 1996.
53. POVLSEN, V. T. RINNAN, A.; BERG, F. V.; ANDERSEN, H. J. & THYBO, A. K. “Direct decomposition of NMR relaxation profiles and prediction of sensory attributes of potato samples”. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, **36**: 423, 2003.
54. JEPSEN, S. M.; PEDERSEN, H. T. & ENGELSEN, S. B. “Application of chemometrics to low-field ¹H NMR relaxation data of intact fish flesh”. *J. Sci. Food Agric.*, **79**:1793, 1999.
55. PEREIRA, F. M. V.; COLNAGO, L. A. “Determination of the moisture content in beef without weighing using benchtop time-domain nuclear magnetic

resonance spectrometer and chemometrics”. *Food Anal. Methods*, **5**:1349, 2012.

56. HÜRLIMANN, M. D.; BURCAW, L.; SONG, Y. Q. “Quantitative characterization of food products by two-dimensional $D-T_2$ and T_1-T_2 distribution functions in a static gradient”. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **297**: 303, 2006.

57. SONG, Y. Q. “A 2D NMR method to characterize granular structure of dairy products”. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, **55**: 324, 2009.

58. SALOMONSEN, T.; SEJERSEN, M. T.; VIERECK, N.; IPSEN, R.; ENGELSEN, S. B. “Water mobility in acidified milk drinks studied by low-field 1H NMR”. *International Dairy J.*, **17**: 294, 2007.

59. TELLIER, C.; MARIETTE, F.; GUILLEMENT, J.; MARCHAL, P. “Evolution of Water Proton Nuclear Magnetic Relaxation during Milk Coagulation and Syneresis: Structural Implications”. *J. Agric. Food Chem.* 1993, **41**, 2259-2266