

Determinação do caseinomacropéptido em leite UAT por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais

[*Determination of caseinomacropéptide in uht milk using near infrared spectroscopy and pls regression*]

R.R. Oliveira¹, M.I.A. Souza², C.H. Silva³, C.S. Prado³, C.S.M. Rezende³, M.E. Lage³

¹Centro Universitário de Anápolis - Anápolis, GO

²Aluna de pós-graduação - Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO

³Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um método para a determinação de CMP em leite UAT por meio da aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo. Leites UAT de oito marcas diferentes foram utilizados para a construção dos modelos de calibração. Os resultados demonstram que, para o desenvolvimento de um modelo de calibração adequado para a determinação de CMP em leite UAT, deve-se utilizar, juntamente com o método de regressão PLS, o método de seleção de espectros máxima distância e os pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada. Além disso, pôde-se determinar que as regiões do infravermelho próximo mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos presentes no CMP foram: 1100-1310; 1400-1430; 1490-1550; 1640-1680; 1780-1970; 2020-2100 e 2310-2350nm. Conclui-se que a espectroscopia de infravermelho próximo pode ser uma alternativa para a determinação de CMP em leite UAT, desde que haja um conjunto de calibração com amostras representativas da população a ser predita no futuro.

Palavras-chave: calibração multivariada, fraude, NIRS, soro de queijo

ABSTRACT

This work's objective was to develop an UHT milk caseinomacropéptide determination method through NIR spectroscopy application. Eight UHT milk trademarks are used to produce a mathematical calibration model. The results of NIR analysis suggested that to produce a suitable calibration model, partial least-square regression (PLSR) must be used, with maximum distance in wavelength space to select spectra, pre-treatment with 2nd derivative and standard normal variant (SNV). Also, suitable near-infrared regions more correlated with CPM aminoacids vibrational movements: 1100-1310; 1400-1430; 1490-1550; 1640-1680; 1780-1970; 2020-2100; and 2310-2350nm. Therefore, NIR spectroscopy can be an alternative to caseinomacropéptide determination of UHT milk, since there was a representative calibration set with a large enough and representative sample of entire population to be predicted in the future.

Keywords: fraud, multivariate calibration, NIRS, whey

INTRODUÇÃO

A adição do soro de queijo ao leite fluido é uma das fraudes em alimentos mais praticadas no Brasil (Valente *et al.*, 2014). Esse tipo de adição ao leite pode ser detectado e quantificado pela determinação do caseinomacropéptido (CMP), em que se tolera um índice de CMP de até

30mg/L para o leite a ser destinado ao abastecimento direto (Brasil, 2006a).

Entretanto, a determinação do CMP em leite requer a utilização de análises demoradas, caras e difíceis de serem executadas (Brasil, 2006b; Brasil, 2014). Como a indústria necessita de respostas rápidas, foram objeto de estudos nos últimos anos técnicas que exijam menor

manipulação, preparo e tempo de análise reduzidos, além de bom grau de precisão. Nesse sentido, a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) apresenta-se como uma alternativa promissora (Zhang *et al.*, 2014; Botelho *et al.*, 2015).

O espectro obtido a partir do NIRS é o resultado da reflexão da luz por moléculas orgânicas. Todas as bandas de absorção/reflexão são resultantes de vibrações ou combinações de vibrações (Skoog *et al.*, 2002). Como os alimentos apresentam grande número de ligações moleculares que caracterizam diversos compostos orgânicos, mas que absorvem luz de um mesmo comprimento de onda, gerando espectros com combinações e forte sobreposição das bandas de vibração e harmônicas, os espectros NIRS não são facilmente interpretáveis, o que inviabilizou a técnica até a década de 80 (Van kempen e Jackson, 1996).

Com a popularização dos microcomputadores e o surgimento de uma nova área na química, a quimiometria, o infravermelho próximo voltou a ser objeto de estudos em química analítica (Natalino, 2006), já que a quimiometria utiliza métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal, a fim de selecionar os melhores procedimentos experimentais para a obtenção de informações químicas de natureza multivariada (Varmuza e Filzmoser, 2009).

A espectroscopia no infravermelho já foi aplicada em leite fluido para as determinações de proteína, caseína total, gordura, lactose, umidade e para a realização da classificação do leite (Klandar *et al.*, 2007; Cipolat-Gotet *et al.*, 2012; Lyndgaard *et al.*, 2012), além de detectar adulterações por adições de proteína vegetal e amido (Li e Ding, 2010).

No entanto, não foram encontrados estudos utilizando o método NIRS para a determinação de fraudes por adição de soro ao leite fluido. Dessa forma, objetivou-se, com o presente estudo, desenvolver um método com boa capacidade preditiva para a determinação do caseinomacropéptido em leite UAT, por meio da espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG). Foram utilizados no experimento leites UAT de oito marcas diferentes, todos oriundos de laticínios sob Inspeção Federal (SIF), sendo sete localizados no estado de Goiás e um em Minas Gerais. As amostras das marcas de leites UAT foram adquiridas e mantidas em temperatura ambiente e, no momento das análises, apresentavam período de fabricação inferior a um mês.

Todas as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em triplicata, para que fosse determinado o índice de CMP em cada leite UAT.

Para a determinação em mg/L do teor de CMP por CLAE em leite UAT, foi feita uma curva de calibração. Para o seu preparo, leite genuíno, colhido na fazenda da EVZ/UFG, foi adulterado com soro de queijo, nas proporções de 5%, 10%, 15% e 20%, conforme recomendado pela metodologia oficial (Brasil, 2006b). O soro de queijo utilizado na elaboração da curva padrão foi obtido após a adição do coalho em pó e subsequente coagulação da caseína em leite genuíno, colhido na fazenda da EVZ/UFG momentos antes das análises. A curva de calibração construída apresentou um valor de R^2 de 0,9947.

A determinação cromatográfica foi realizada em cromatógrafo GILSON 118, utilizando-se detector UV/VIS operando em vazão de 1mL/min, e a detecção na faixa do UV em comprimento de onda de 205nm, com a linha de base já devidamente estabilizada. A corrida cromatográfica foi realizada em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência, com sistema isocrático (GILSON 306), com injetor automático ASTED – XL da marca GILSON e looping de 20 μ L e coluna Zorbax GF-250 BIO Séries da Agilent de 9mm de diâmetro interno por 250mm de comprimento. A fase estacionária da coluna era composta por partículas esféricas de sílica, modificadas na superfície por zircônio estabilizado, enquanto a fase ligada era composta por monocamada molecular hidrofílica, com diâmetro de poro de 150Å. A solução da fase móvel usada foi um tampão fosfato com pH6 (1,74g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄))

p.a., 12,37g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a. e 21,41g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) dissolvido em 1000mL de água milli-Q ultrapurificada.

Esse procedimento foi denominado de tratamento 0, pois não houve adição de soro, as amostras foram analisadas como obtidas do mercado. Os resultados encontrados variaram de 33,64 a 398,78mg/L.

Além do tratamento 0, para cada marca foram obtidos outros sete tratamentos, com base nas adições de soro de queijo reconstituído ao leite em 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% e 10%. O soro utilizado foi obtido por meio da reconstituição de soro doce em pó, de uma marca comercial. Como o soro doce contém entre 6 e 7% de sólidos totais (Carvalho *et al.*, 2007), para a preparação do soro foram utilizados 70g de soro em pó para cada litro de água destilada.

Para melhor compreensão, os tratamentos foram denominados conforme o percentual de adição do soro de queijo ao leite, ou seja, de tratamentos

1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10, respectivamente, totalizando, dessa forma, oito tratamentos para cada marca utilizada e 64 tratamentos no total.

O soro reconstituído foi analisado por CLAE e apresentou uma concentração média de 2.540mg por litro. A partir desse valor, foram realizados cálculos para se determinar a quantidade de CMP presente em 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% e 10% do soro reconstituído, sendo, respectivamente: 25,4; 50,8; 76,2; 101,6; 152,4; 203,2; 254mg/L. Após as adições desses valores aos resultados encontrados para os tratamentos zero de cada marca, foram obtidos valores de CMP entre 33,64 e 652,78mg/L, para os 64 tratamentos que formaram o conjunto de calibração. A distribuição das concentrações de CMP das amostras do conjunto de calibração pode ser visualizada na Fig. 1.

As leituras das amostras por NIRS foram realizadas em um espectrofotômetro da Perstorp Analytical Company, modelo 6500, equipado com detector de reflectância, na faixa de 1100 a 2500nm, em intervalos de 2nm.

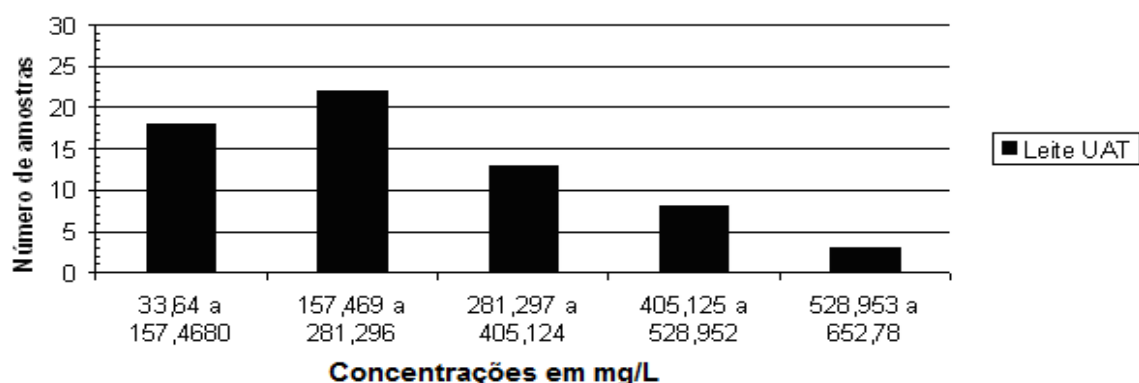


Figura 1. Distribuição de frequência das concentrações de CMP dos 64 tratamentos do conjunto de calibração.

O equipamento utilizado no presente trabalho só dispunha de células para análises de amostras sólidas. Para a utilização de amostras líquidas, foi desenvolvida uma célula em uma torneadora, em material de alumínio, com as mesmas dimensões de uma célula para sólidos, pintado com uma tinta preta fosca, para que, nas análises por NIRS, houvesse reflexões associadas apenas às amostras de leite UAT. A célula foi formada por um suporte e por uma tampa contendo o vidro de quartzo. O vidro de quartzo foi fixado à tampa com cola de silicone. Foram colocadas

borrachas entre o suporte e a tampa, para proteger o vidro e permitir a vedação da peça, por meio do ajuste suporte/tampa por quatro parafusos localizados nas extremidades da célula projetada. Foi feita uma abertura na parte superior da peça, para facilitar o uso e o descarte das amostras de leites UAT. Na célula projetada, foram necessários apenas 45mL de cada amostra.

Cada espectro foi obtido por NIRS em apenas 23 segundos. Para eliminar ruídos aleatórios, como ruídos da rede elétrica, as medidas no aparelho

Determinação do caseinomacropéptido...

foram realizadas 32 vezes para cada amostra, sendo obtido o espectro médio. A fim de garantir que variações extremas de temperatura não interferissem na coleta dos espectros, o equipamento foi mantido em uma sala com temperatura controlada de, aproximadamente, 25°C.

Em cada um dos 64 tratamentos, foram obtidos espectros em três replicatas, obtendo-se 192 espectros no total. Os espectros armazenados foram posteriormente submetidos aos tratamentos estatísticos disponíveis no *software* Vision®, em que foram desenvolvidos vários modelos para determinar o método de seleção de espectros, o(s) pré-tratamento(s) matemático(s) e as regiões do infravermelho próximo que deveriam ser utilizados para a obtenção do modelo de calibração mais adequado para a determinação de CMP em leite UAT.

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

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

Quadro 1. Métodos de seleção de espectros e pré-tratamentos matemáticos disponíveis no *software* Vision®

Métodos de seleção de espectros	Pré-tratamentos matemáticos
Distância de Mahalanobis Máxima distância	1ª derivada
	2ª derivada
	Correção da linha de base
	Eliminação de tendências
	Variável normal padronizada

Depois disso, foram desenvolvidos modelos com os pré-tratamentos 1ª e 2ª derivadas, para se

determinar qual delas proporcionaria um melhor modelo. A derivada selecionada foi, então, testada com os outros pré-tratamentos apresentados no Quadro 1, para se analisar se a utilização de mais de um pré-tratamento promovia melhoria nos modelos de calibração.

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

Os resultados desses modelos desenvolvidos com intervalos de 50nm foram associados às regiões observadas na Tab. 1.

Com base no valor de R^2 encontrado, as regiões foram classificadas e depois agrupadas, com o intuito de se aumentarem as informações moleculares relacionadas com os compostos de interesse e, assim, serem obtidos melhores modelos de calibração. Para isso, primeiramente foram desenvolvidos modelos utilizando apenas as duas melhores regiões, depois as três melhores, e assim por diante, até o agrupamento de todas as faixas espectrais. Esse procedimento visou determinar se todas as regiões associadas aos compostos de interesse são úteis para a melhoria dos modelos de calibração, ou se alguma(s) delas deveria(m) ser retirada(s) por interferir negativamente nos resultados do modelo.

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

As marcas utilizadas na etapa de validação externa foram submetidas às mesmas manipulações realizadas nas amostras do conjunto de calibração. Assim, 48 espectros formaram o conjunto de validação.

Tabela 1. Regiões e faixas espectrais associadas aos movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos (Murray e Williams, 1990)

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

As amostras da validação foram determinadas por CLAE, seguindo os procedimentos realizados na calibração. Os valores para o tratamento 0 foram de 178,28mg/L e de 237,45mg/L. Dessa forma, após as realizações das adições de soro de queijo reconstituído aos leites utilizados na validação externa em 1%, 2%, 3%, 4%, 6%, 8% e 10%, foram obtidos valores de CMP entre 178,28 e 491,45mg/L.

As mesmas amostras utilizadas na validação externa foram analisadas pelo método NIRS, por meio do modelo de calibração considerado mais adequado para a determinação do CMP em leite

UAT, por espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados com os métodos distância de Mahalanobis e máxima distância podem ser visualizados na Tab. 2.

Tabela 2. Modelos de calibração com distância de Mahalanobis e máxima distância, utilizando-se o método PLS e toda a faixa de 1100 a 2500nm

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

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

maior robustez. Assim, o método escolhido deveria ser a distância de Mahalanobis.

Contudo, quando foi empregado o método de Mahalanobis em testes utilizando regiões espectrais menores, o *software* Vision[®] apresentou uma mensagem de erro, a qual

alertava que, pelo número de amostras, deveria ser selecionada uma região com um intervalo maior. A utilização da distância de Mahalanobis só foi permitida quando foram colocadas regiões individuais com pelo menos 500nm de intervalo. Já a máxima distância aceitou em seus testes regiões de apenas 2nm de intervalo.

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

Em relação ao número de fatores, nos dois modelos foi considerado como adequado o uso de cinco fatores, pois foram associados aos mais baixos valores de PRESS. Se fosse utilizado um número de fatores maior que o recomendado, poderia ocorrer a obtenção de modelos sobreajustados (Ferrão e Davanzo, 2005), e se fosse utilizado um menor número de fatores, poderia ocorrer o efeito denominado de ajustamento inferior (Carneiro, 2008).

O modelo 2, desenvolvido sem a utilização de pré-tratamentos, foi considerado um modelo com baixa capacidade de previsão, já que, de acordo com Moncada (2006), equações de calibração possuem boa capacidade preditiva quando o coeficiente de determinação é superior a 0,69. Assim, torna-se imprescindível o uso de pré-tratamentos de dados, para que os modelos desenvolvidos apresentem maior habilidade de previsão.

Pode-se visualizar na Fig. 2(A) que, nos espectros do conjunto de calibração com a aplicação da 1ª derivada, permanece a inclinação da linha de base, apesar de o desvio da linha de base ter sido eliminado. Já nos espectros com a utilização da 2ª derivada (Fig. 2-B), observa-se tanto a eliminação do desvio da linha de base, como também da inclinação, obtendo-se espectros que permitem a visualização e interpretação de suas características com maior eficiência. Esses fatores podem justificar o desenvolvimento de um modelo de calibração mais adequado na 2ª derivada que o obtido com a 1ª derivada, já que foi encontrado, para a 2ª derivada, um valor de R^2 39,31% superior ao da 1ª derivada (Tab. 3). A 2ª derivada foi, então, testada com os pré-tratamentos variável normal padronizada, correção da linha de base e eliminação de tendências.

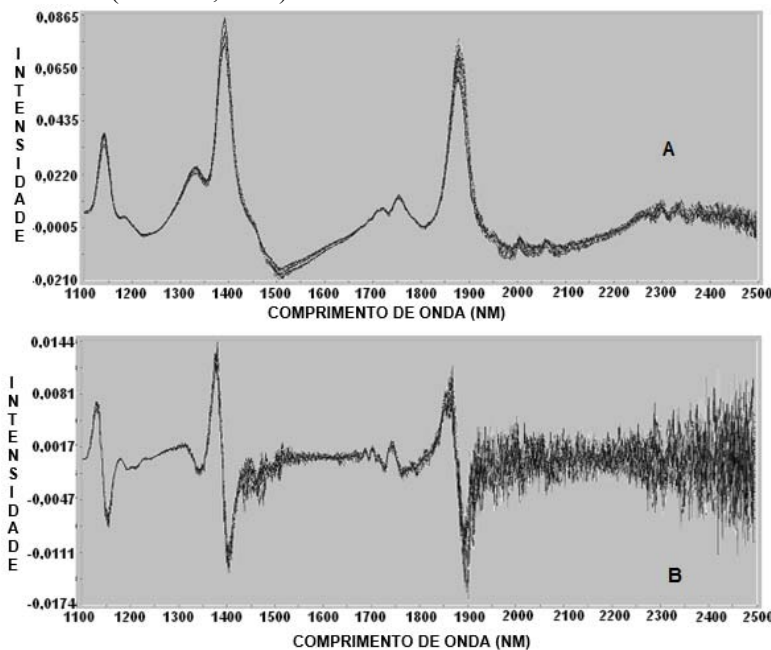


Figura 2. Espectros de leites UAT em 1ª derivada (A) e em 2ª derivada (B).

A Tab. 3 mostra que o modelo 5, com 2ª derivada e variável normal padronizada, apresentou valor de R^2 superior, além de valor de PRESS inferior aos dos outros modelos com 2ª derivada, o que mostra que a combinação dos pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada foi a mais adequada para a obtenção de bons modelos.

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

Segundo Pasquini (2003), a exclusão de algumas amostras é frequente e, geralmente, contribui

para uma melhoria da qualidade da calibração. Os resultados mostrados na Tab. 3 corroboram essa afirmativa, já que o modelo com a 2ª derivada e variável normal padronizada apresentou maior quantidade de *outliers* e melhores resultados que os demais modelos que utilizaram a 2ª derivada.

No entanto, é necessário ser prudente, pois a supressão de uma grande quantidade de amostras *outliers* resulta na diminuição da representatividade (Pasquini, 2003). Fontaneli e colaboradores (2002) mencionaram que, na rotina e calibração do NIRS, a população-alvo está bem representada quando são eliminadas menos de 10% de *outliers*, o que mostra que o número de *outliers* eliminadas pelo modelo cinco foi adequado.

Tabela 3. Pré-tratamentos utilizados com a máxima distância e método de regressão PLS, utilizando-se toda a faixa de 1100 a 2500nm

Modelo	Pré-tratamento	R^2	PRESS	Fatores	<i>Outliers</i> n° (%)
3	1ª derivada	0,5703	2062621	3	0
4	2ª derivada	0,7945	2012293,5	3	7 (3,64)
5	2ª derivada com variável normal padronizada	0,8173	1978950	3	8 (4,16)
6	2ª derivada com correção da linha de base	0,7637	2269413,5	3	2 (1,04)
7	2ª derivada com eliminação de tendências	0,7951	2009452,625	3	7 (3,64)

Quando se analisam os resultados da Tab. 4, pode-se observar que faixas espectrais da ordem de 50nm não fornecem bons modelos de calibração, uma vez que todos os valores de R^2 foram inferiores a 0,69. A média de R^2 encontrada foi de apenas 0,33. O valor de PRESS também mostra que modelos com intervalos de 50nm possuem baixa capacidade de previsão, pois a maioria dos modelos da Tab. 4 apresentou valor de PRESS maior que o obtido com o modelo 5 (Tab. 3), que utilizou a informação de toda a faixa de 1100 a 2500nm.

Segundo Bullé (2009), faixas pequenas não oferecem bons modelos, pois é necessário um número mínimo de informações moleculares, por isso os resultados nos intervalos de 50nm foram ruins. Contudo, alguns intervalos de 50nm (Tab. 4) mostraram-se mais adequados para a obtenção de modelos de previsão, com R^2 acima da média

(0,33), o que indica que a associação dessas faixas espectrais com os movimentos vibracionais específicos da estrutura dos aminoácidos presentes no CMP, de acordo com a Tab. 1, poderia melhorar a qualidade dos modelos de calibração.

Da associação dos movimentos vibracionais dos aminoácidos com os resultados da Tab. 4, mediante a utilização dos critérios descritos em material e métodos, foram selecionadas as seguintes regiões do infravermelho próximo: 1100-1310; 1400-1430; 1490-1550; 1640-1680; 1780-1970; 2020-2100 e 2310-2350nm. De acordo com os resultados apresentados pelos modelos de cada uma, elas foram classificadas em regiões espectrais mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos do CMP, como demonstrado na Tab. 5.

Determinação do caseinomacropéptido...

Tabela 4. Modelos com faixas de 50nm de intervalo, utilizando máxima distância, 2ª derivada e variável normal padronizada, e método de regressão PLS

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

Tabela 5. Classificação das regiões espectrais mais correlacionadas com os movimentos vibracionais dos aminoácidos do CMP

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

Como não foram obtidos valores de R² muito próximos, não houve dificuldades para se estabelecerem as melhores regiões, não sendo necessária a análise dos valores de PRESS. Conforme a classificação obtida, essas regiões espectrais foram agrupadas, apresentando modelos com os resultados mostrados na Tab. 6.

Os resultados da Tab. 6 demonstram que houve melhoria nos modelos à medida que foi sendo agrupado um número maior de regiões, o que mostra que toda a informação correlacionada com os movimentos vibracionais da estrutura dos aminoácidos é determinante para a obtenção do modelo com maior capacidade de previsão.

Tabela 6. Resultados dos agrupamentos realizados conforme a classificação das melhores regiões espectrais, mostrada na Tab. 5

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

Assim, o modelo 48, desenvolvido com o método de seleção máxima distância, com os pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada, com o método de regressão PLS, utilizando as regiões espectrais 1100-1310; 1400-1430; 1490-1550; 1640-1680; 1780-1970; 2020-2100 e 2310-1350nm, foi considerado o mais adequado para a determinação de CMP em leite UAT, pois, entre todos os modelos desenvolvidos, foi o que apresentou o maior valor de R² e o menor valor de PRESS.

A relação entre os valores determinados por esse modelo e os valores obtidos pela análise de referência (CLAE) é mostrada na Fig. 3. Esses resultados mostram o ajuste dos dados obtidos pelo método de calibração, com os dados do método de referência, sendo o ajuste equivalente ao R² de 0,8946, o maior valor alcançado nos modelos testados.

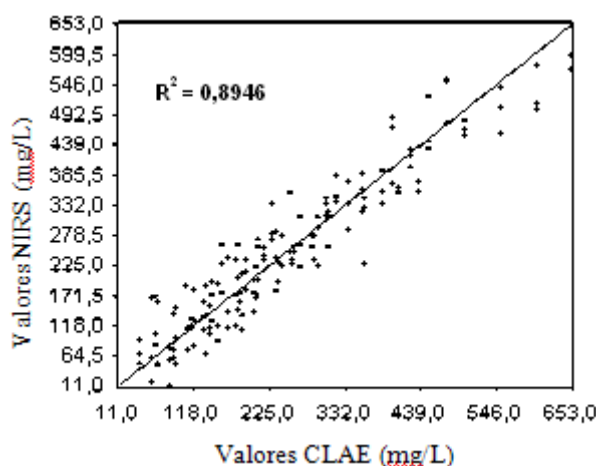


Figura 3. Relação entre os valores determinados pelo NIRS e os valores de referência obtidos por CLAE.

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

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

que o modelo apresentou boa capacidade de distinção.

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

Mesmo em leite UAT, há necessidade de se obter um conjunto de calibração mais amplo, com amostras representativas de toda a população. Ainda que haja variação entre as oito marcas

utilizadas para a calibração, só foram utilizadas amostras de um único lote e de um mesmo período de produção. Como ocorrem diferenças na composição do leite, por influência das estações, da temperatura, das condições climáticas, da alimentação, etc., é possível que seja necessária a utilização de grande quantidade de amostras, de diferentes épocas do ano, a fim de se obter variabilidade suficiente para representar toda a faixa de trabalho.

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

CONCLUSÕES

O método de seleção de espectros máxima distância e os pré-tratamentos 2ª derivada e variável normal padronizada, juntamente com o método de regressão PLS, são ferramentas quimiométricas eficientes para a obtenção de bons modelos de calibração para a determinação de CMP em leite UAT. Nem todas as regiões do infravermelho próximo apresentaram-se adequadas, sendo necessária a seleção das regiões espectrais mais correlacionadas com os movimentos vibracionais específicos da estrutura dos aminoácidos do CMP, em leite UAT. A espectroscopia de infravermelho próximo pode ser uma alternativa para a determinação de CMP em leite UAT, desde que haja um conjunto de calibração com amostras representativas da população a ser predita no futuro.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que, com recursos próprios, possibilitou a execução das análises laboratoriais realizadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

BOTELHO, B.G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L.S.; SENA, M.M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food Chem.*, v.181, p.31-37, 2015.

BRASIL. Determinação de Índice de CMP por SEC. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/Metodos%20IQA/POA/Leite%20e%20Produtos%20Lacteos/MET%20POA%2004%2003%20CMP%20POA.pdf>. Acessado em: 27 dez. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, 13 dez. 2006a. Institui critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “Índice CMP”. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?>>. Acessado em: 03 set. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, 12 dez. 2006b. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?>>. Acessado em: 03 set. 2009.

BULLÉ, D.J. *Tecnologias limpas na síntese e avaliação toxicológica de 1,2,4-oxadiazóis em Aspergillus niger*. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS.

CARNEIRO, M.E. *Classificação de lâminas de madeira de pinus spp por espectroscopia óptica*. 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; ALCÂNTRA, L.A.P.; BONOMO, R.C.F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. *Ver. Eléctron. Vet.*, v.8, n.6, 7p., 2007.

- CIPOLAT-GOTET, C.; CECCHINATO, A.; DE MARCHI, M. *et al.* Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.6806-6819, 2012.
- FERRÃO, M.F.; DAVANZO, C.U. Horizontal attenuated total reflection applied to simultaneous determination of ash and protein contents in commercial wheat flour. *Anal. Chim. Acta*, v.440, p.411-415, 2005.
- FERRÃO, M.F.; MELLO, C.; BORIN, A. *et al.* LS-SVM: uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. *Quim. Nova*, v.30, p.852-859, 2007.
- FONTANELI, R.S.; DURR, J.W.; SCHEFFER-BASSO, S.M. *et al.* Validação do método da reflectância no infravermelho proximal para análise de silagem de milho. *Rev. Bras. Zootec.*, v.31, p.594-598, 2002.
- KLANDAR, A.H.; LAGAÚDE, A.; CHEVALIER-LUCIA, D. Assessment of the rennet coagulation of skim milk: a comparison of methods. *Int. Dairy J.*, v.17, p.1151-1160, 2007.
- LI, L.; DING, W. Discriminant analysis of raw milk adulterated with botanical filling material using near infrared spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, v.30, p.1238-1242, 2010.
- LYNDGAARD, C.B.; ENGELSEN, S.B.; VAN DEN BERG, F.W.J. Real-time modeling of milk coagulation using in-line near infrared spectroscopy. *J. Food Eng.*, v.108, p.345-352, 2012.
- MONCADA, G.V.H. *Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis cuantitativo y cualitativo de carne de cordero*. 2006. 126f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Austral de Chile, Valdivia, CHI.
- NATALINO, R. *Caracterização de açúcar mascavo aplicando análise das componentes principais a dados espectrométricos*. 2006. 52f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals practical aspects and analytical applications. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.14, p.198-219, 2003.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. São Paulo: Oficial da Sociedade Brasileira de Química, 2002. 836p.
- VALENTE, G.F.S.; GUIMARÃES, D.C.; GASPARDI, A.L.A.; OLIVEIRA, L.A. Aplicação de redes neurais artificiais como teste de detecção de fraude de leite por adição de soro de queijo. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v.69, p.425-432, 2014.
- VAN KEMPEN, T.A.T.G.; JACKSON, D. NIRS may provide rapid evaluation of amino acids. *Feedstuffs*, v.68, p.12-15, 1996.
- VARMUZA, K.; FILZMOSER, P. Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics. Boca Raton: CRC Press, 2009.
- ZHANG, L.G.; ZHANG, X.; NI, L.J. *et al.* Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. *Food Chem.*, v.145, p.342-348, 2014.