



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E**  
**CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos e Ciência de Alimentos



**UTILIZAÇÃO DO FTIR ALIADO À ANÁLISE QUIOMÉTRICA**  
**COMO FERRAMENTA DE TRIAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO**  
**DE ADULTERANTES NO LEITE CRU**

Autor: Daniele Gomes Conceição

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Fevereiro de 2018

**DANIELE GOMES CONCEIÇÃO**

**UTILIZAÇÃO DO FTIR ALIADO À ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA  
COMO FERRAMENTA DE TRIAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO  
DE ADULTERANTES NO LEITE CRU**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Sibelli Passini Barbosa Ferrão  
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Santos Soares

ITAPETINGA  
BAHIA - BRASIL  
Fevereiro de 2018

637.127

C743u Conceição, Daniele Gomes

Utilização do FTIR aliado à análise quimiométrica como ferramenta de triagem para identificação de adulterantes no leite cru. / Daniele Gomes Conceição. - Itapetinga: UESB, 2018.

73p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão.

1. Produtos lácteos - Fraude. 2. Leite e derivados - Análise multivariada. 3. Leite cru - Fraude. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Ferrão, Sibelli Passini. III. Título.

CDD(21): **637.127**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Produtos lácteos - Fraude
2. Leite e derivados - Análise multivariada
3. Leite cru - Fraude



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Recredenciada pelo decreto estadual nº 16.825 de 04.07.2016  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos  
PPG-ECAL / UESB



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

### DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título: UTILIZAÇÃO DE FTIR ALIADO À ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA COMO FERRAMENTA DE TRIAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERANTES NO LEITE CRU**

**Autor (a): DANIELE GOMES CONCEIÇÃO**

**Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Sibelli Passini Barbosa Ferrão**

**Coorientador (a): Prof.º Dr. Leandro Soares Santos**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de *MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS*, pela Banca Examinadora.

  
Prof.ª Dr.ª Sibelli Passini Barbosa Ferrão (UESB)

  
Prof.ª Dr.ª Gabrielle Cardoso Reis Fontan (UESB)

  
Dr. Leonardo Milani Avelar Rodrigues (UESB)

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2018.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

*Chico Xavier*

A Deus

Ao meu pai e à minha mãe que foram o início de tudo

Ao meu irmão pelo carinho

Aos meus mestres pela confiança

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

A meu pai Edvaldo Conceição e minha mãe Angélica Conceição, pelo apoio e incentivo e a meu irmão Erick Conceição pelo exemplo de coragem. A todos os meus parentes, principalmente as minhas tias Tânia Conceição, Rosângela Conceição, Rita Gomes, minha avó Raimunda Gomes e minha madrinha Iracema Rocha.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela estrutura e aos funcionários, principalmente a Jamille e Virgínia pela dedicação no atendimento, aos funcionários da portaria do módulo de laboratório Tarcísio e Gilberto, da Bovinocultura Adenilson Lima “Pelezinho” e Genilson Silva “Tim” pela coleta do leite e incentivo, e ao professor Fabiano Silva, pela parceria com o Laboratório de Processamento de Leite e Derivados.

Às amigas do mestrado Fabíola Nogueira e Polyany Cabral e principalmente Acsa Batista, e aos amigos do laboratório Ben-Hur Ramos, Grazielly Silva, Fernanda da Hora e Josane Cardin, pelo carinho, pelos muitos momentos de descontração e pela ajuda ao longo deste trabalho, como também a Amanda Faleiro, Cristina Xavier e Marília Viana pelo apoio e amizade.

Obrigada a minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Sibelli Ferrão e ao meu co-orientador Dr. Leandro Santos pelo incentivo, ensinamentos e confiança para realizar este trabalho.

A toda equipe do Grupo de Estudos em Leite (GEL).

E aos membros da banca Dr. Leonardo Milani e a professora Dr<sup>a</sup>. Gabrielle Fontan, muito obrigada pela contribuição neste trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	ix
I – REFERENCIAL TEÓRICO .....	1
1.1 INTRODUÇÃO .....	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1.2.1 Leite: definição, composição química e propriedades físico-químicas.....	3
1.2.2 Principais adulterantes do leite.....	6
1.2.3 Métodos de detecção de adulterações no leite .....	8
1.2.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho .....	9
1.2.5 Análise Multivariada aplicada a leite e derivados.....	10
II - OBJETIVOS GERAIS .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
III - MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Coleta do leite .....	16
3.2 Adulterações das amostras de leite cru .....	16
3.3 Análise de composição e aquisição dos espectros .....	17
3.4 Análise multivariada .....	21
3.4.1 Análise de Componentes Principais .....	22
3.4.2 Análise Discriminante .....	23
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1 Espectros das amostras de leite e das amostras de leite adulterado.....	29
4.2 Análise de Componentes Principais .....	33
4.3 Análise Discriminante.....	39
4.4 Regressão Linear Múltipla.....	45
4.5 Rede Neural Artificial.....	50
4.5.1 Predição .....	50
4.5.2 Classificação.....	52
V - CONCLUSÕES .....	55
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Funcionamento de um neurônio computacional.....	14
FIGURA 2: Espectros obtidos por espectrômetro FTIR DairySpec FT das amostras de leite e leite com água .....	30
FIGURA 3: Espectros obtidos por espectrômetro FTIR DairySpec FT das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio; (b) hidróxido de sódio; (c) peróxido de hidrogênio; (d) amido; (e) sacarose; (f) uréia .....	32
FIGURA 4. Gráfico de dispersão das amostras de leite e leite com 10% de água em relação aos componentes principais CP 1 e CP 2.....	33
FIGURA 5: Escores das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio – FTIR DairySpectFT (a-1); FTIR – ATR Cary 630 (a-2); (b) hidróxido de sódio - FTIR DairySpectFT (b-1); FTIR – ATR Cary 630 (b-2) .....	35
FIGURA 6 : Escores das amostras de leite com os adulterantes (a) peróxido de hidrogênio - FTIR DairySpectFT (a-1); FTIR – ATR Cary 630 (a-2); (b) amido - DairySpectFT (b-1); FTIR – ATR Cary 630 (b-2).....	36
FIGURA 7: Escores das amostras de leite com os adulterantes (a) sacarose - DairySpectFT (a-1); FTIR – ATR Cary 630 (a-2); (b) uréia DairySpectFT (b-1); FTIR – ATR Cary 630 (b-2).....	38
FIGURA 8: Coeficiente de determinação dos valores experimentais e preditos das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio; (b) hidróxido de sódio; (c) peróxido de hidrogênio; (d) amido; (e) sacarose e (f) uréia.....	51
FIGURA 9: Gráfico do RMSE em função do número de ciclos nas etapas de treinamento e validação da rede das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio; (b) hidróxido de sódio; (c) peróxido de hidrogênio; (d) amido; (e) sacarose e (f) uréia	53

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição de níveis de adulteração das amostras de leite cru de acordo com os adulterantes .....	16
TABELA 2. Número de amostras e amplitude das variáveis.....	19
TABELA 3: Regiões espectrais dos principais grupos funcionais do leite em FTIR ....	20
TABELA 4: Regiões espectrais dos adulterantes.....	21
TABELA 5. Arquitetura das redes neurais testadas para amostras de leite e leite com adulteração.....	25

## RESUMO

CONCEIÇÃO, D. G. **Utilização do FTIR aliado à análise quimiométrica como ferramenta de triagem para identificação de adulterantes no leite cru.** Itapetinga – BA: UESB, 2018. 73 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).

Objetivou-se utilizar a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) aliada às análises quimiométricas para identificar adulterações em leite cru e posteriormente identificar adulteração em amostras de produtores. Foram usados cinco níveis de concentração dos seguintes adulterantes: bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio em leite puro e amido, sacarose e uréia em leite com 10% de água. Foram analisadas 640 amostras previamente adulteradas em equipamento DairySpec FT para obtenção dos dados de composição e os equipamentos DairySpec FT e FTIR-ATR para obtenção dos espectros dos adulterantes. Para realização das análises quimiométricas como Análise de Componentes Principais (ACP), Análise Discriminante (AD) e Regressão Linear Múltipla (RLM) foram utilizados o SAS® *Studio* e o *Java Neural Network Simulator* foi utilizado para análise de Rede Neural Artificial (RNA) dos dados do FTIR-ATR modelo Cary 360. Também foram obtidas 249 amostras de produtores de um laticínio da região de Itapetinga-BA para identificar adulteração. Os resultados revelaram que pela ACP foi possível separar as amostras de leite puro das amostras adulteradas com sacarose, amido, uréia e água através dos dados obtidos no equipamento DairySpecFT. Para o método de AD as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio (93,10%), peróxido de hidrogênio (100%), hidróxido de sódio (85,71%), amido (96,67%) e sacarose (80%) obtiveram classificação maior que 80%. Para o método de RLM as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio (91%), amido (89%), sacarose (91%), uréia (85%) e água (100%) obtiveram um coeficiente de correlação maior que 80%. As RNA's não foram capazes de predizer a quantidade de adulterante no leite, enquanto que para classificação, todas as amostras adulteradas obtiveram uma porcentagem de acerto maior que 76,6% e foi possível a identificação de adulterante a partir de 0,1%. Das amostras de produtores analisadas 2,4% estavam adulteradas com amido, uréia e hidróxido de sódio. Desse modo utilizando o FTIR aliado a análises quimiométricas foi possível obter classificação satisfatória para as amostras adulteradas neste estudo como método de triagem.

**Palavras-chave:** produtos lácteos, multivariada, fraude.

## SUMMARY

CONCEIÇÃO, D. G. **Use of FTIR combined with chemometric analysis as a screening tool to identify adulterants in raw milk.** Itapetinga – BA: UESB, 2018. 73 p. Dissertation. (Master in Food Science and Engineering, Food Science Concentration Area).

The objective of this study was to use Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) together with chemometric analyzes to identify adulterations in raw milk and to later identify adulteration in producer samples. Five concentration levels of the following adulterants were used: sodium bicarbonate, sodium hydroxide and hydrogen peroxide in pure milk and starch, sucrose and urea in 10% water milk. A total of 640 samples were analyzed in DairySpec FT equipment, Bentley Instrumente, Inc to obtain the composition data and the DairySpec FT and FTIR-ATR model Cary 360 equipment to obtain spectra of the adulterants. In order to perform the chemometric analyzes, the Principal Component Analysis (PCA), Discriminant Analysis (DA) and Multiple Linear Regression (MLR) were used in SAS® Studio, and the Java Neural Network Simulator was used for analysis of Artificial Neural Network (ANN) data from the Cary 360 FTIR-ATR model. Also, 249 samples from producers of a dairy from the Itapetinga-BA region were obtained to identify adulteration. The results showed that it was possible to separate pure milk samples from the samples adulterated with sucrose, starch, urea and water through the data obtained in the DairySpecFT equipment. For the DA method, samples adulterated with sodium bicarbonate (93.10%), hydrogen peroxide (100%), sodium hydroxide (85.71%), starch (96.67%) and sucrose obtained classification higher than 80%. For the MLR method the samples adulterated with sodium bicarbonate (91%), starch (89%), sucrose (91%), urea (85%) and water (100%) obtained a correlation coefficient greater than 80%. The ANNs were not able to predict the amount of adulterant in the milk, whereas for classification, all adulterated samples obtained a percentage of correctness greater than 76.6% and it was possible to identify adulterant from 0,1%. 2.4% of the sampled samples analyzed were adulterated. Thus, using FTIR together with chemometric analyzes, it was possible to obtain a satisfactory classification for the samples adulterated in this study as screening method.

**Key words:** dairy product, multivariate, fraud.

# I – REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 INTRODUÇÃO

O leite é um sistema trifásico, que consiste em solução, emulsão e suspensão, e sua qualidade é definida pela ausência de agentes físicos, químicos, biológicos, pois estes apresentam risco ao consumidor além de alterarem sua composição. Por razões econômicas e de saúde pública é importante a detecção de alimentos fraudulentos por misturas de produto inferior ou adição de substâncias a fim de mascarar a qualidade do produto. A adulteração do leite é uma prática ilegal realizada em todo o território nacional, que preocupa consumidores e órgãos de fiscalização.

A adição de água é a prática mais comum para adulterar o leite, usada para aumentar o volume. Entretanto, esta é uma prática de fácil identificação quando utiliza a crioscopia, em razão disto, adicionam-se solutos como açúcar e sal, para que o índice crioscópico seja restabelecido. O uso de amido e uréia como reconstituente da densidade também é uma prática comum. Outras práticas tentam mascarar as condições higiênicas sanitárias levando à utilização de conservantes como peróxido de hidrogênio e formol com o intuito de aumentar a vida útil do leite. Para equilibrar a acidez causada por bactérias os neutralizantes, o bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio são utilizados. Há também fraudes que visam aumentar o teor de proteína, com a adição de uréia agrícola e melamina, ou aumento do teor de gordura com o uso de óleo vegetal.

Por meio de análises qualitativas realizadas em laboratório é possível constatar adulteração com amido, bicarbonato de sódio, açúcar, sal, e hidróxido de sódio, entretanto, para a uréia, formol e melamina é necessário o uso de técnicas e equipamentos mais sofisticados, que muitas vezes não são encontrados nos laticínios.

Atualmente, as adulterações do leite passaram a ficar mais sofisticadas e a ser praticadas por diferentes elos da cadeia de produção, como produtores, transportadoras e indústrias. No Brasil, em 2013, a Operação Leite Compensado apreendeu leite *Ultra High Temperature* (UHT) com adição de uréia, água contaminada e hidróxido de sódio. O caso mais grave de adulteração ocorreu na China em 2008, onde o leite em pó com adição de melamina foi identificado, com a morte de seis pessoas (DOMINGO et al., 2015; ROSA et al., 2015).

Com o regulamento da produção de leite e definição de parâmetros de qualidade, as práticas de análises para verificar a qualidade do leite são rotina em laticínios. O desenvolvimento de métodos analíticos que qualificam e quantificam substâncias presentes no leite visam garantir a autenticidade desses produtos. A análise no Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é econômica, sem uso de reagentes e rápida. Em conjunto com análise multivariada permitem a determinação rápida com múltiplos componentes e misturas complexas. As principais análises multivariadas são análise de componentes principais, análise discriminante, regressão linear múltipla e rede neural artificial. A análise de componentes principais é utilizada para reconhecimento de padrões e classificação multivariada; a análise discriminante e regressão linear múltipla são utilizadas para obter equações matemáticas para classificação e predição e a rede neural artificial é capaz de estimar, classificar e otimizar dados. Assim, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a eficiência da análise no FTIR aliado à quimiometria na identificação de diferentes adulterações em amostras de leite.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Leite: definição, composição química e propriedades físico-químicas

Entende-se por leite, sem outras especificações, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017). É constituído de uma fase aquosa, composto por lactose, minerais, vitaminas hidrossolúveis e as proteínas do soro; uma fase em estado de suspensão, composta por caseínas ligadas a sais; e uma fase em estado de emulsão, composta por gordura e vitaminas lipossolúveis (WALSTRA et al., 2006; JAISWAL et al., 2015; FREITAS, 2015).

O leite é sintetizado na glândula mamária, sob regulação hormonal e alguns de seus componentes são produzidos nas células secretoras ou a partir do sangue. A composição do leite bovino é influenciada pela dieta e raça animal, sendo a gordura o componente mais variável (SILVA, 1997; FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010). O leite bovino da região do sudoeste da Bahia possui em média 4,05% de gordura, 2,92% de proteína, 4,14% de lactose, 7,97% de extrato seco desengordurado e 12,02% de extrato seco total (PIGNATA et al., 2014).

Na água estão dissolvidos os sais e vitaminas e dispersas as proteínas e emulsionadas a gordura. A maior parte da água, presente no leite, encontra-se na forma livre. A matéria gorda do leite encontra-se na forma de glóbulos esféricos, com diâmetro entre 2 e 10  $\mu\text{m}$ , cujo diâmetro diminui com o final da lactação. Os triglicérides representam cerca de 98% do total de lipídeos e ácidos graxos presentes no leite em média 60% são saturados, 35% monoinsaturados e 5% polienólicos, sendo os principais ácidos graxos palmítico e oleico (PEREDA et al., 2005; WALSTRA et al., 2006). As vitaminas lipossolúveis A, D, E e K estão associadas ao glóbulo de gordura, a vitamina K é sintetizada no sistema digestivo enquanto que as demais estão associadas à alimentação do animal. As cargas negativas do glóbulo de gordura e a presença de fosfolipídios conferem um papel fundamental para a sua estabilidade, os fosfolipídios possuem uma parte polar, que se liga à água, e uma parte apolar, que está voltada para fase lipídica (SILVA, 1997; FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010).

As proteínas do leite são classificadas como caseínas na forma micelar ( $\alpha_{s1}$  – caseína,  $\alpha_{s2}$  – caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína) e proteínas do soro ( $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -

lactoglobulina e albumina), além disso, contém lactoferrina, imunoglobulinas, glicoproteínas e enzimas. As caseínas representam 80% das proteínas do leite bovino, responsáveis pela formação do coágulo formado após a coagulação da caseína durante a produção de queijo, enquanto que 20% passam para o soro (SGARBIERI, 2005; FOX e BRODKORB, 2008; FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010). No leite bovino, a fração de nitrogênio representa cerca de 3,3%, deste 0,2% corresponde ao nitrogênio não protéico e 3,1% de proteína verdadeira, sendo 2,6% caseína e 0,5% albumina e globulinas (WATTIAUX, 2006).

Os sais do leite consistem principalmente de cálcio, fósforo, potássio, cloro, magnésio e sódio, que representam 0,6% do leite em peso úmido. Os sais podem estar na forma solúvel ou insolúvel no leite. Cerca de 30% do cálcio e 20% do fósforo estão na forma solúvel, enquanto que quando estão insolúveis o cálcio e o magnésio estão ligadas com caseinato, citrato ou fosfato. Os sais participam da estabilidade e funcionalidade das micelas de caseína (GONZÁLEZ et al., 2001).

A lactose, um dissacarídeo composto por glicose e galactose, é o carboidrato predominante no leite bovino, e sua síntese está diretamente relacionada à quantidade de leite produzido pois é o responsável por trazer água do sangue para a glândula mamária. A sua concentração é constante podendo variar de 4,7% a 5,2%. Uma alimentação com grande quantidade de silagem de milho e outros cereais aumentam a produção de leite e, conseqüentemente, o teor de lactose (PRATA, 2001; HENRICHS et al., 2014). A lactose possui poder edulcorante cerca de seis vezes menor que a sacarose, possui poder redutor, devido ao grupo aldeído livre, e com isso pode desencadear as reações de Maillard sendo considerada o componente mais susceptível à ação microbiana com formação de ácido láctico (TRONCO, 2013; FREITAS, 2015).

Algumas propriedades físico-químicas possuem importância significativa na qualidade do leite, entre elas destacam-se a acidez total, densidade relativa e crioscopia. A acidez total representa a acidez proveniente de seus componentes, tais como albumina, caseína, citratos, entre outros, por isso logo após a ordenha, o leite apresenta uma característica ácida ao teste com solução alcalina. Com o desenvolvimento excessivo de microrganismos mesófilos esses fermentam a lactose com produção de ácido láctico, o que faz aumentar a acidez do leite. A acidez natural e a acidez desenvolvida devido à contaminação são quantificadas no teste da acidez. A acidez do leite de vaca em condições

normais e de acordo com a Instrução Normativa 62 deve variar entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/100 mL (BRASIL, 2011; FREITAS, 2015).

O pH do leite pode variar entre 6,6 e 6,8 apresentando efeito tampão devido à presença de dióxido de carbono, citratos, proteínas e fosfatos. Quando o animal está com mastite, o leite apresenta pH de 7,5 enquanto que o colostro, que é a secreção após o parto, o pH é 6,25 (WALSTRA et al., 2006).

A densidade pode indicar a presença de água ou de substâncias constituintes no leite. A densidade média a 15°C pode variar de 1,028 a 1,034 g/mL, ressaltando que a densidade diminui na aguagem e aumenta no desnate ou na mistura de leite desnatado ao integral (BRASIL, 2011; FREITAS, 2015). O índice crioscópico está relacionado com a quantidade de íons de moléculas presentes no leite, variando entre  $-0,530^{\circ}\text{H}$  a  $-0,555^{\circ}\text{H}$ . É uma das constantes mais estáveis no leite, podendo-se identificar a adição de água superior a 3% (BRASIL, 2017).

Pode ocorrer variação na composição do leite devido a alguns fatores como lactação, alimentação e período do ano. Animais jovens possuem leite com maior teor de caseína e cloretos e menor quantidade de proteínas solúveis e lactose. O teor de sólidos desengordurados é alto logo após o parto, em seguida decresce após 2 a 3 meses e volta a aumentar no final da lactação. Há uma redução no teor de sólidos totais nos períodos quentes do ano, pois devido ao estresse térmico, os animais aumentam o consumo de concentrado que contribui para o aumento de ácido propiônico em comparação ao ácido acético, este é um importante precursor da gordura do leite. Vacas bem alimentada podem aumentar em até 0,11% o teor de sólidos desengordurados e em 0,28% o teor de gordura e o uso de concentrado, tamanho da partícula e quantidade de fibra usada na ração influenciam o teor de gordura no leite (PRATA, 2001; HECK et al., 2009; STOOP et al., 2009; LARSEN et al., 2010).

A composição e as propriedades físico-químicas podem ser alteradas com a adição de substâncias no leite, por isso, o teor de gordura, ponto de congelamento, densidade, acidez titulável e sólidos desengordurados são análises de rotina nos laticínios para determinar sua qualidade.

### 1.2.2 Principais adulterantes do leite

Existem três tipos possíveis de adulterações no leite, a adulteração por substituição, por adição e por remoção. A adulteração por substituição ocorre quando há uma completa ou parcial substituição de algum ingrediente ou componente do alimento; a por adição ocorre quando são adicionadas substâncias no intuito de mascarar um produto de qualidade inferior e a por remoção ocorre quando algum componente original ou caro é removido do produto. Todas essas práticas são consideradas adulterações quando não há o conhecimento do consumidor (MOORE et al., 2012).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produto de Origem Animal (RIISPOA), no Art. 543 (BRASIL, 1997), considerava leite fraudado, adulterado ou falsificado o leite que fosse adicionado de água; tivesse sofrido subtração de qualquer dos seus componentes; adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição; fosse de um tipo e se apresentasse rotulado como de outro de categoria superior; se estivesse cru e vendido como pasteurizado; e ainda exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade. No entanto, Brasil (2017) revogou o antigo RIISPOA e, atualmente, a legislação não apresenta a definição de leite adulterado, fraudado ou falsificado.

Uma das maiores apreensões de leite por adulteração ocorreu em 2013 no Estado do Rio Grande do Sul. Com a Operação “Leite Compensado” o Ministério Público do Rio Grande do Sul (MP-RS) apreendeu leite adicionado de água sem tratamento e com adição de uréia e hidróxido de sódio. Foram contaminados cerca de 100 milhões de litros de leite em um ano, seis marcas de leite UHT foram retiradas das prateleiras, sendo consideradas impróprias para o consumo, e o lucro com esta adulteração foi de R\$ 9,5 milhões (ROCKENBAR, 2014).

Um dos casos mais graves de adulteração ocorreu na China em 2008, com adição de melamina ao leite, onde mais de 300 mil pessoas adoeceram e seis pessoas morreram, acarretando prejuízos à saúde do consumidor e ao comércio internacional (DOMINGO et al., 2015; ROSA et al., 2015).

Os adulterantes considerados mais comuns no leite são a água e soro de queijo são utilizados para aumento do volume, esta prática é acompanhada da adição de ingredientes de baixo custo como sacarose e amido para reconstituir a densidade, cloretos para

restabelecer o índice de crioscópico, peróxido de hidrogênio utilizado como conservante para mascarar a falta de qualidade no leite e hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio utilizado como neutralizantes para aumentar a vida de prateleira e mascarar a elevada acidez causada pelo desenvolvimento microbiano (ABRANTES; CAMPÊLO; SILVA, 2014; NASCIMENTO et al., 2017; GONDIM et al., 2017).

Com o pagamento do leite por qualidade, o volume fornecido deixou de ser o critério para pagamento. Teores de proteína e gordura, contagem bacteriana total e contagem de células somáticas se tornaram parâmetros para o preço do leite, e em função disso outros adulterantes vêm surgindo, como por exemplo, uso de uréia e melamina, que são utilizadas para simular o aumento no teor de proteína (DOMINGO et al., 2015).

A uréia é uma substância não-proteica amplamente usada na dieta para bovinos de corte e leite, para ser transformada em proteína de alta qualidade pelos microrganismos do rúmen. Quando hidrolisada, a uréia é transformada em amônia, que para os animais não ruminantes é tóxica. O teor de uréia presente no leite bovino é de  $160 \text{ mg.L}^{-1}$ , e esta concentração pode variar devido ao teor de proteína e carboidrato da dieta, e o consumo de água dos animais. A uréia que é adicionada para adulterar o leite contém formol, que é um produto cancerígeno (DOMINGO et al., 2015).

Quando não é possível a refrigeração do leite, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) aprova o uso do peróxido de hidrogênio a uma concentração de até  $100\text{-}800 \text{ mg.L}^{-1}$ , e nos Estados Unidos é permitido a adição de até 0,05% quando o leite é utilizado para a fabricação de queijo (NASCIMENTO et al., 2017). Entretanto, no Brasil é proibida esta prática, pois é considerada como uma adulteração.

A lactoperoxidase é uma enzima presente no leite que facilita a oxidação de tiocianatos e halogenetos por peróxido de hidrogênio, produzindo compostos com função antimicrobiana. Para que esta enzima seja ativada é preciso a adição de  $8 \text{ mL.L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio. Em baixas concentrações o peróxido é rapidamente degradado em água pela enzima catalase. O excesso de peróxido de hidrogênio no leite pode trazer algumas consequências para o homem, como degradação do ácido fólico e problemas gastrointestinais (SILVA et al., 2012; YONG et al., 2017).

### 1.2.3 Métodos de detecção de adulterações no leite

Com o intuito de identificar substâncias adulterantes no leite, as indústrias utilizam métodos qualitativos com mudanças de cor, que geralmente são rápidos e fáceis. Análises para identificação de amido, sacarose, peróxido de hidrogênio, bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio geralmente são técnicas baseadas na mudança de coloração do leite com a utilização de poucos reagentes e resultados qualitativos (BRASIL, 2006; TRONCO, 2013).

Estas adulterações podem ser identificadas por análises de rotina (teor de gordura, acidez titulável, extrato seco desengordurado, densidade, índice crioscópico) como também análises mais elaboradas tais como cromatografia, eletroforese, espectroscopia de massa, enzima ligada a ensaio imunoenzimático, espectroscopia no infravermelho e outros (CARVALHO et al., 2007; SANTOS, FILHO, SOANA, 2013b; ABRANTES, CAMPÊLO, SILVA, 2014). A cromatografia é um método utilizado para separar componentes de uma amostra, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a técnica mais utilizada para detectar adulterantes no leite, pois possui maior sensibilidade, eficiência e rapidez, entretanto é uma técnica que requer custo elevado de reagentes e pessoal treinado (VELOSO et al., 2002). A eletroforese é um método bioquímico que permite a separação das bandas de proteínas e peptídeos em um gel de poliacrilamida, enquanto que a espectrometria de massa consiste na determinação precisa das massas molares das moléculas ou informações da sequência de peptídeos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; CAMERINI et al., 2016). Os métodos imunológicos utilizam enzimas para identificar e quantificar contaminantes presentes no leite (VELOSO et al., 2002). A espectroscopia infravermelha pode ser utilizada para determinar componentes químicos de leite e derivados, como também ser utilizado para detectar amostras adulteradas com soro, uréia, peróxido de hidrogênio, água e melamina (BOTELHO et al., 2015; MAZUREK, et al., 2015).

O uso da espectrometria de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que tem sido utilizada para identificar adulterantes em leite, sendo promissora por ser rápida, não precisar de pré-preparo da amostra e possuir baixo custo operacional. Em conjunto com análise multivariada permite a determinação rápida com múltiplos componentes e misturas complexas (SABIN, FERRÃO et al., 2004; SOUZA e POPPI, 2012).

### 1.2.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho

A espectroscopia estuda a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, com o objetivo de avaliar as ligações químicas, sendo muito utilizada nas determinações qualitativas e quantitativas das espécies orgânica e inorgânica, como também no controle do processo de separação e acompanhamento de reações (LOPES e FASCIO, 2004; DOMINGO et al., 2015). A técnica se baseia na incidência de energia eletromagnética na molécula que, devido à variação do movimento dipolo elétrico adquire movimento vibracional e rotacionais, e a diferença entre a radiação emitida e a radiação absorvida pela amostra origina o espectro (RUSCHEL et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

O espectro é considerado a “impressão digital” da amostra (DOMINGO et al., 2015). O espectro na região do infravermelho tem a frequência de  $3,8 \times 10^{14}$  a  $1,2 \times 10^{14}$  Hz. Ele é dividido em infravermelho próximo (NIR) com número de onda de 12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , infravermelho médio (MIR) com número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e infravermelho distante (FIR) com número de onda 200 a 10  $\text{cm}^{-1}$  (SOARES, 2006; DOMINGO et al., 2015).

Para absorver a radiação infravermelha, as moléculas precisam sofrer mudanças nos dipolos moleculares e vibrações de estiramento ou deformação. Uma vibração de estiramento é uma deformação axial com diferenças na distância inter atômicas, enquanto que em uma vibração de deformação, os átomos alteram os ângulos entre duas ligações, podendo ser de quatro tipos: tesoura, balanço, torção e sacudida (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006; SOARES, 2006).

O MIR, NIR e FIR são amplamente utilizados para classificar, identificar, quantificar ou avaliar a qualidade dos alimentos, com estudos relacionados com determinação e autenticidade de leite cru, leite em pó, iogurte e queijos. As principais vantagens do infravermelho são a rapidez na análise, não destruição das amostras, não necessita de pré-tratamento e possibilidade de acoplamento a outras técnicas como cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SANTOS; FILHO; SOANA, 2013b; CARVALHO et al., 2015; DOMINGO et al., 2015).

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) possui sensibilidade, elevada resolução, requer mínimo de preparo da amostra e é uma excelente ferramenta para quantificação, pois a intensidade de absorção das bandas no espectro é

proporcional à concentração, e sua instrumentação é facilmente encontrada em laboratório (SOUZA e POPPI, 2012; RUSCHEL et al., 2014). A espectroscopia infravermelha aplicada a produtos lácteos pode ser usada para identificar adulterações nesses produtos, sendo possível a identificação pela análise dos picos do espectro, em relação à forma e tamanho do mesmo (LIU et al., 2015).

As regiões e os picos do espectro estão relacionados com compostos e grupos funcionais da amostra analisada, no caso do leite, a água corresponde à faixa de número de onda de 3700 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ , relacionado ao grupo O-H; à lactose está relacionado à faixa de número de onda de 1150  $\text{cm}^{-1}$  a 1000  $\text{cm}^{-1}$  de absorvância, que corresponde à presença de ligações C-O/C-C/C-O-O; os lipídeos estão na faixa de 2874  $\text{cm}^{-1}$  a 1464  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas às ligações C-H. As amidas I e II estão presentes na faixa de 1650  $\text{cm}^{-1}$  e 1548  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, e estão relacionadas aos grupos funcionais C=O e N-H, a faixa 1100  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada ao grupo fosfato da caseína, que corresponde ao grupo funcional O=P-O (COATES, 2000; LEI et al., 2010; NICOLAU et al., 2010; SANTOS et al., 2013b).

O uso do FTIR combinado com análise multivariada permite analisar os dados da absorvância dos espectros associados a mais de uma frequência ao mesmo tempo, aumentando assim os tipos de amostras que podem ser analisados (SABIN, FERRÃO, FURTADO, 2004).

### **1.2.5 Análise Multivariada aplicada a leite e derivados**

A análise multivariada envolve a aplicação de métodos estatísticos, matemáticos e computacionais para interpretar, planejar ou fornecer o máximo de informações de dados de interesse. Esta análise pode ser destacada em planejamento de experimentos, que identifica as variáveis que afetam um processo, calibração multivariada, que utiliza padrões de dados para obter um modelo, e assim prever parâmetros de qualidades e reconhecimento de padrões. Quando duas variáveis são analisadas de forma simultânea é considerada, a princípio, como multivariada (HAIR et al., 2009; SOUZA e POPPI, 2012; SANTOS; FILHO; SOANA, 2013a).

Na área de alimentos, quando utilizada com métodos instrumentais ricos em informações, como a espectrometria no infravermelho, pode classificar e agrupar

amostras desconhecidas com características similares, determinar adulterantes em amostras de produtos lácteos e óleos vegetais comestíveis, e também fornecer informações de composição, propriedades físicas e sensoriais (INON et al., 2004; SOUZA et al., 2011).

Alguns autores utilizaram a análise multivariada para avaliar a qualidade de produtos lácteos. Segundo Liu et al. (2015), foi possível separar amostras de leite de leite adulterado com maltodextrina com concentração de até 1% a partir da análise de componentes principais (ACP), aplicada a dados de composição, crioscopia e contagem de células somáticas obtidos por Espectroscópio Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Em outro estudo, Jaiswal et al. (2015) utilizando dados do FTIR identificaram amostras de leite de búfala adulterado com 5% de extrato de soja usando ACP. Chen et al. (2017) identificaram melamina no leite com 89% de precisão, por meio do espectro do infravermelho próximo (NIR) utilizando regressão de mínimos quadrados parciais.

Há diversos métodos empregados em quimiometria, dentre eles a análise de componentes principais (ACP) é a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada (HAIR et al., 2009). A análise baseia-se na transformação do conjunto de dados, através da combinação linear, em um novo sistema de eixos, chamado componentes principais (CP). Cada CP é uma combinação linear de todas as variáveis originais que terá uma importância ou peso diferente, pois são ortogonais entre si. O componente principal 1 retém mais informações dos dados originais, seguido do componente principal 2 e assim sucessivamente, onde primeiros CP's são utilizados para representar a estrutura de dados podendo desprezar os demais. Assim um conjunto original que é n-dimensional é reduzido para um conjunto bidimensional ou tridimensional (MINGOTI, 2007; SOUZA e POPPI, 2012).

Os pesos indicam o quanto cada variável contribui para um determinado CP, enquanto os escores representam a semelhança entre as amostras, assim através da análise dos pesos e escores é possível identificar quais variáveis são responsáveis pela diferença entre as amostras, com isso a ACP permite excluir as variáveis de pouca relevância para o estudo (SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004; SOUZA e POPPI, 2012).

Outra técnica muito empregada na quimiometria é a análise discriminante, cujo objetivo é permitir a discriminação de amostras em dois ou mais grupos pré-definidos. Esta análise consiste em procurar características similares nas amostras e alocá-las ao

grupo. É possível obter uma função discriminante que permite classificar novas amostras nos grupos previamente definidos com base nas suas características (MINGOTI, 2005; LÓPEZ et al., 2014).

A função discriminante de regressão linear é obtida na etapa de treinamento e tem o objetivo de minimizar a probabilidade de erro de classificação. O procedimento de classificação consiste em estabelecer um valor crítico, assim se um valor situa-se abaixo deste índice a amostra é classificada em um grupo, e se maior que este índice é classificado em outro grupo. No caso de mais de dois grupos, existe um intervalo para a classificação da amostra em cada grupo. Os coeficientes das funções indicam a contribuição das variáveis para cada função. Com esses coeficientes é possível determinar quais variáveis são relevantes para cada grupo (MINGOTI, 2005).

Atualmente, a análise discriminante é muito utilizada na área de alimentos, Gutiérrez et al. (2009) detectaram gordura não láctea em leite, Manuelian et al. (2017) previram a coagulação do leite de búfala.

A Regressão Linear Múltipla (RLM) tem o objetivo de obter uma equação matemática entre as variáveis respostas (variáveis dependentes ou critérios) e as variáveis que descrevem o sistema (variáveis independentes ou preditoras). Assim, o pesquisador poderá utilizar dados conhecidos, que são as variáveis preditoras para prever as variáveis dependentes. A RLM também seleciona as variáveis significativas que contribuem para a melhor descrição do modelo. Com o intuito de avaliar a influência de uma ou mais variáveis independentes sobre uma variável dependente é utilizada a Análise de Regressão Múltipla (ARM) (HAIR et al., 2009).

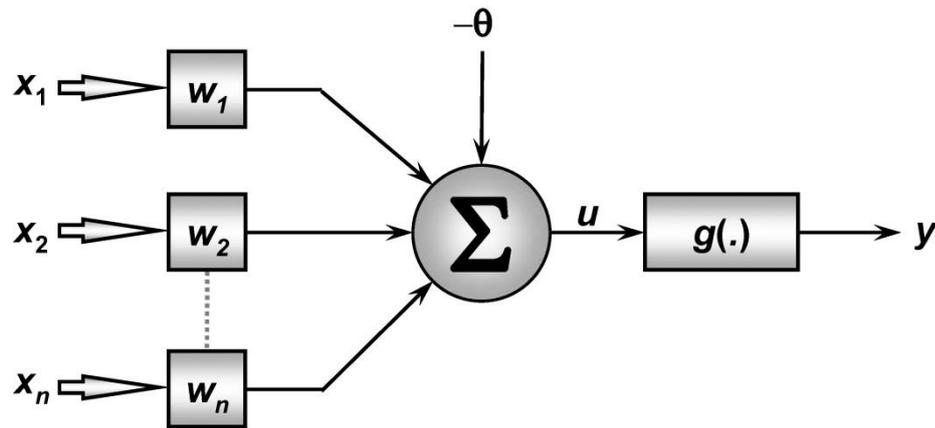
Para utilizar a RLM é necessário decidir quais variáveis são dependentes e independentes, observar se os dados são métricos, a normalidade dos valores e dos erros, independência dos erros e não deve existir multicolinearidade que ocorre quando duas variáveis medem a mesma coisa (HAIR et al., 2009).

A Análise de Regressão Múltipla pode ser utilizada para detecção de adulteração de leite com óleo ou gordura de banha através do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa (REBECHI et al., 2016). Quantificação da mistura de leite de cabra, de ovelha e de vaca através da análise da fração de caseína por eletroforese capilar (NOGALES, 2006).

A análise quimiométrica conhecida como Redes Neurais Artificiais (RNA) são técnicas que utilizam modelos matemáticos inspirados no sistema nervoso que são capazes de estimar, classificar e otimizar dados. As RNA possuem a capacidade de aprendizagem a partir de dados reais e disponibilizam esse conhecimento para posterior utilização (ZUBEN, 2003; SILVA et al., 2010).

A RNA é formada por um grupo de neurônios artificiais que são formados basicamente por três camadas (entrada, intermediária e saída) que são conectadas umas com as outras por meio de conexões matemáticas. A depender da complexidade do conjunto de dados é possível obter mais de uma camada intermediária (BAS e BOYACI, 2007). Na camada de entrada as informações (dados) são ponderadas (através dos pesos sinápticos), que são elementos de entrada para o neurônio. O neurônio é composto por função agregadora, limiar de ativação, potencial de ativação, função de ativação e saída (resposta). A função agregadora recebe todos os sinais e realiza a soma dos produtos desses sinais, o limiar de ativação é uma constante que permite ou não a passagem da informação para a função de ativação, o valor de saída da função geradora e o valor de entrada da função de ativação é chamado de potencial de ativação. A função de ativação é responsável por modificar o valor do potencial de ativação para a obtenção da resposta do neurônio (Figura 1), ou seja, valor de saída (ELMOLLA et al., 2010; KHATAEE et al., 2010; SILVA et al., 2010).

**Figura 1.** Funcionamento de um neurônio computacional



Fonte: Silva et al., 2010

Onde:

$x_1, x_2$  e  $x_n$  – dados de entrada

$w_1, w_2,$  e  $w_n$  – pesos sinápticos

$\Sigma$  - função agregadora

$-\Theta$  – limiar de ativação

$u$  – potencial de ativação

$g(\cdot)$  – função ativadora

$y$  – valor de saída (resposta)

As RNA diferem no tipo de algoritmo utilizados para aprendizagem da rede, organização dos neurônios, quantidade de neurônios e de camadas. O algoritmo de multicamada mais utilizado é o *Backpropagation*, que utiliza a aprendizagem supervisionada que se dá por um processo de retropropagação do erro, muito utilizada para reconhecimento de padrões (BRAGA et al., 2007).

A Rede Neural Artificial já foi empregada na área de alimentos, como na quantificação de soro no leite através da microscopia Raman (ROCHA et al., 2015), modelagem da dureza durante o processo de amadurecimento do queijo tipo suíço por meio dos espectros (VÁSQUEZ et al., 2018), previsão do tipo de leite e grau de amadurecimento em queijos com dados de FTIR (BARAJAS et al., 2013), e classificação de búfalos saudáveis utilizando parâmetros de rendimento e qualidade do leite (PANCHAL et al., 2016).

## II - OBJETIVOS GERAIS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar adulteração com neutralizantes, conservantes e reconstituintes em amostras de leite por meio da análise no Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e quimiometria. Como também testar essa técnica como ferramenta de triagem.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar os adulterantes bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, amido, sacarose, uréia, e água em amostras de leite cru por meio de análises no FTIR-ATR e no DairySpec FT.;
- b) Aplicar quimiometria para análise de dados obtidos, empregando análise de componentes principais (ACP), análise discriminante (AD), regressão linear múltipla (RLM) e redes neurais artificiais (RNA);
- c) Analisar amostras de produtores para possível presença de adulterantes, por meio do FTIR-ATR e quimiometria;
- d) Comparar dois equipamentos de FTIR para avaliação de adulterantes.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do leite

Amostras de leite bovino de vacas mestiças Holandês x Zebu, provenientes do setor de bovinocultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Itapetinga–BA foram obtidas em condições higiênicas sanitárias satisfatórias e por ordenha mecânica durante vinte dias, entre os meses de março a maio de 2017.

Foram obtidas 249 amostras de produtores de um laticínio localizado em Itapetinga-BA, no momento da recepção, durante o período de agosto de 2016 a junho de 2017.

#### 3.2 Adulterações das amostras de leite cru

Amostras de leite integral foram adulteradas das seguintes formas: hidróxido de sódio; leite com bicarbonato de sódio; leite com peróxido de hidrogênio; leite com 10% de água; leite com 10% de água e amido; leite com 10% de água e uréia; e leite com 10% de água e sacarose. Para cada adulteração foram utilizados 50 mL de leite, considerando-se amostras controle (sem adulteração) e com água. As concentrações para cada adulterante estão apresentadas na Tabela 1. Para cada dia de coleta de leite foram obtidos 32 tratamentos, sendo 2 amostras controle e 30 adulterações, totalizando 640 unidades experimentais.

**Tabela 1:** Distribuição de níveis de adulteração das amostras de leite cru de acordo com os adulterantes

Leite		Leite com 10% de água	
Adulterante	Concentração (%)	Adulterante	Concentração (%)
Bicarbonato de sódio	0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5	Amido	0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5
Hidróxido de sódio	0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5	Sacarose	2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0
Peróxido de hidrogênio	0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4	Uréia	2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0

Para as adulterações foram utilizados os reagentes: Amido solúvel P.A., Vetec – Química Fina; Bicarbonato de sódio P.A. Vetec – Química Fina; Sacarose P.A. Synth; Hidróxido de sódio P.A., Cromoline – Química Fina; Peróxido de hidrogênio 3%, Cap-Lab e Uréia P.A. Vetec – Química Fina.

A concentração dos adulterantes usados neste estudo foi baseado em outros trabalhos, para o bicarbonato de sódio (CASSOLI et al., 2011), uréia (SANTOS et al., 2013b), água (BOTELHO et al., 2015), sacarose e amido (GONDIM et al., 2017), para o hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio a escolha das concentrações foi do próprio autor baseado em testes preliminares. Para as amostras que foram analisadas no FTIR DairySpec FT as amostras não precisam ser liofilizadas, enquanto que para as amostras analisadas no FTIR-ATR as amostras precisaram ser liofilizadas. Após as adulterações, 1 mL de cada amostra foi transferido para Eppendorf e congelados a -20 °C até o momento da liofilização. E foram coletados 1 mL das amostras de produtores e congelados a -20 °C até o momento da liofilização.

As amostras para análise de composição foram mantidas sob refrigeração (4°C a 7°C) por 24 horas, em seguida 40 mL foram transferidos para tubos com bactericida bronopol (MARTINS et al., 2009) e mantidas no máximo 5 dias sob refrigeração até a análise das amostras.

Para a liofilização, as amostras em Eppendorf foram congeladas a -80°C em ultra freezer por 48 horas, acondicionadas em bandejas de aço inoxidável e dispostas no liofilizador da marca TERRONE FAUVEL modelo L2000 por 72 horas.

### **3.3 Análise de composição e aquisição dos espectros**

Para análise de composição as amostras foram aquecidas em banho a 40°C e analisadas no equipamento DairySpec FT, *Fourier Transform Spectrometer* – FTIR, Bentley Instrumente, Inc. Foram obtidos os teores de gordura, proteína verdadeira, proteína total, lactose, sólidos totais, sólidos desengordurados, uréia e índice crioscópico. Na Tabela 2 é apresentado o número de amostras e amplitude das variáveis.

**Tabela 2.** Número de amostras e amplitude das variáveis

Componentes	Leite n=20	Leite com água n=20	Bicarbonato n=100	Hidróxido n=100	Peróxido n=100	Amido n=100	Sacarose n=100	Uréia n=100
Gordura (%)	5,54-3,0	5,39-2,7	5,52-2,97	5,56-2,94	5,62-3,0	5,49-2,71	5,47-2,67	5,38-2,57
Proteína verdadeira (%)	4,23-2,84	3,83-2,56	4,14-2,83	4,16-2,86	4,13-2,83	3,85-2,58	3,75-2,58	3,87-2,61
Proteína total (%)	4,46-2,99	4,04-2,7	4,36-2,97	4,38-3,01	4,35-2,98	4,05-2,72	3,94-2,72	4,08-2,75
Lactose (%)	4,75-3,3	4,28-3,01	4,79-3,27	4,81-3,27	4,75-3,25	4,29-3,01	4,57-3,18	4,34-3,03
Sólidos (%)	14,21-10,55	12,82-9,59	14,31-10,42	14,31-10,47	14,26-10,42	12,94-9,56	13,25-9,74	12,95-9,55
SNG (%)	9,23-7,35	8,3-6,65	9,24-7,27	9,29-7,29	9,2-7,26	8,31-6,63	8,66-6,97	8,54-6,7
Uréia (%)	20,6-0	19,6-8,2	35,9-8,7	21,9-8,0	20,9-8,6	32,7-6,9	17,4-0	397,5-85,3
Crioscopia (°H)	-0,541 / -0,631	-0,541 / -0,578	-0,546 / -0,652	-0,546 / -0,641	-0,546 / -0,645	-0,534 / -0,599	-0,546 / -0,634	-0,546 / -0,601

SNG: sólidos não gordurosos

Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda entre 1000 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ , e os picos foram utilizados como variáveis de estudo para análise estatística. Para pesquisa dos adulterantes os espectros das amostras liofilizadas foram determinados com o uso da espectroscopia por transformada de Fourier (ATR-FTIR), na região do infravermelho médio 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  em equipamento modelo Cary 630, marca Agilent (Santa Clara - USA). Os dados foram obtidos com uso do software Microlab e o Resolution Pro, marca Agilent (Santa Clara - USA).

Foram identificados na literatura as faixas de número de onda onde apareceram os principais picos e grupos funcionais de lipídeos, proteína e lactose identificadas nas amostras estudadas utilizadas como referência para a análise espectral (Tabela 3). Para a sacarose, amido, uréia, peróxido de hidrogênio os dados foram obtidos na literatura, enquanto que para o hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio os dados foram obtidos quando analisados no equipamento FTIR-ATR modelo Cary 360, as regiões espectrais estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 3:** Regiões espectrais dos principais grupos funcionais do leite em FTIR

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional	Associação
2920	$\text{CH}_2$	Lipídeos
2850	$\text{CH}_2$	Lipídeos
2350	$\text{CH}_2$	Lipídeos
1747	$\text{C} = \text{O}$	Lipídeos
1660-1650	Amida	Proteína
1547-1541	Amida	Proteína
1241	Amida	Proteína
1160	$\text{C} - \text{O}$	Lipídeos
1150-1030	$(\text{C} - \text{O}) (\text{C} - \text{C}) (\text{C} - \text{O} - \text{C})$	Lactose

Fonte: Stuart, 2004.

**Tabela 4:** Regiões espectrais dos adulterantes

<b>Adulterante</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>	<b>Referência</b>
Sacarose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	1000-1200	(C - H) (C - O) (C = O)	Botelho et al., 2015
Amido	(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	900-1200	(C - H) (C - O - H) (C - O) (C - C)	Botelho et al., 2015
Uréia	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	1600-1680	CO, CN e NH <sub>2</sub>	Santos et al., 2013b; e Jha et al., 2015
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2000-2500	-	Santos et al., 2013b
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	1100-1250	-	Dados do autor
Hidróxido de sódio	NaOH	1100-1200	-	Dados do autor

### 3.4 Análise multivariada

A fim de discriminar as amostras em leite e leite adulterado, as amostras de cada adulterante foram organizadas em uma matriz de forma  $m \times n$  (linhas x coluna) em que  $m$  representa as amostras (leites) e  $n$  representa os valores de absorvância dos picos (variáveis). A matriz  $A1$  foi usada para as amostras de leite e leite com água, o número de amostras avaliadas foram 40 ( $m=40$ ), 20 amostras de leite e 20 amostras de leite com água. Para bicarbonato de sódio (matriz  $A2$ ), hidróxido de sódio (matriz  $A3$ ), peróxido de hidrogênio (matriz  $A4$ ), amido (matriz  $A5$ ), sacarose (matriz  $A6$ ) e uréia (matriz  $A7$ ) foram obtidas 120 amostras ( $m=120$ ), 20 dias de adulteração, 5 níveis de concentração e 20 amostras de leite. As variáveis ( $n=15$ ) corresponderam aos valores de absorvância obtidos pelo espectro na análise do FTIR.

Os *outlines* das matrizes foram identificados utilizando o método de Cooks'd, no qual as amostras que apresentaram desvio maior que 2 são retiradas da análise. Para a

análise discriminante, análise de regressão múltipla linear e rede neural artificial os dados foram aleatorizados utilizando o algoritmo de *Kennard Stone* e divididos em 70% para treinamento e 30% para validação (WICKLIN, 2010).

Os dados para análise de componentes principais, análise discriminante e análise de regressão linear múltipla foram padronizados pela Equação 1, para média igual a zero e desvio padrão igual a 1, a fim de eliminar a diferença das unidades de medidas das variáveis. Os dados foram manipulados usando o programa Microsoft Office Excel 2010®.

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

Eq. 1

Onde:

Z: variável padronizada; X: variável;  $\mu$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão

Para a análise estatística multivariada e descarte de *outlines* foi utilizado o programa estatístico *Statistical Analysis System (SAS)® Studenty*.

### 3.4.1 Análise de Componentes Principais

A partir da padronização dos dados foi obtida a matriz de variância e covariância (S), que foi fatorada numa matriz diagonal, cujos elementos são iguais a  $a_{ii} < \lambda_i$   $i = 1, 2, \dots, 15$ . A matriz foi obtida resolvendo a equação característica da matriz S, Equação 2, contendo autovalores com  $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots \lambda_{15}$ .

$$|S - \lambda I| = 0$$

Eq. 2

Onde: S: matriz de variância e covariância;  $\lambda_i$ : Autovalor e I: Matriz Identidade.

Para cada autovalor ( $\lambda_i$ ) foi determinado um autovetor  $\alpha^*_i$  a partir da solução da Equação 3:

$$|S - \lambda I| \alpha_i = \emptyset$$

Eq. 3

Onde: S: matriz de variância e covariância;  $\lambda_i$ : Autovalor; I: Matriz Identidade;  $\alpha_i$ : Autovetor e  $\emptyset$ : conjunto vazio.

Os vetores foram normalizados ( $\alpha_i$ ) através da Equação 4.

$$\alpha_i = \frac{1}{\sqrt{\alpha_{i1}^2 + \alpha_{i2}^2 + \dots + \alpha_{i15}^2}} \begin{bmatrix} \alpha_{i1} \\ \alpha_{i2} \\ \vdots \\ \alpha_{i15} \end{bmatrix} = \frac{\alpha_i^*}{\alpha_i}$$

Eq. 4

Onde:  $\alpha_i$ : Autovetor normalizado;  $\alpha_{i1}, \alpha_{i2} \dots \alpha_{i15}$ , autovetores normalizados correspondentes aos grupos estudados;  $\alpha_{i1}^*, \alpha_{i2}^* \dots, \alpha_{i15}^*$ , autovetores não normalizados correspondentes aos grupos estudados.

Tomando-se os elementos do vetor  $\alpha_i$  determinados como os coeficientes  $CP_i$ , temos que o i-ésimo CP foi obtido pela Equação 5:

$$CP_i = \alpha_{i1}z_1 + \alpha_{i2}z_2 + \dots + \alpha_{i15}z_{15}$$

Eq. 5

Onde:  $i = 1, 2, \dots, n$ , em que  $CP_i$ : i-ésimo componente principal;  $\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{in}$ , elementos do i-ésimo autovetor ( $\alpha_i$ ) do i-ésimo componente principal ( $CP_i$ ). O critério utilizado para a escolha do número de componentes principais foi autovalores maiores que um, e as que retêm juntos a proporção a partir de 60% da variância (HAIR et al., 2009).

Os gráficos de dispersão dos coeficientes de correlação entre as variáveis e CP foram realizados no programa Sigma Plot, versão 11.0, no espaço dimensional.

### 3.4.2 Análise Discriminante

Equações matemáticas foram obtidas para classificar uma amostra de leite em duas populações com seus respectivos padrões e adulterante  $\pi_i$  ( $i=1$  – leite ou 2- leite adulterado), com base na medida de quinze variáveis, que são os valores de absorvância obtidos pelo FTIR.

A partir dos dados originais foram estimadas médias e matrizes de covariâncias das populações estudadas e obtidas as funções discriminantes de Fisher (MINGOTI, 2005) para o processo de classificação, que consistiu em uma combinação linear das

variáveis originais utilizadas no estudo a fim de maximizar a razão entre as classes e minimizar a dispersão dentro de cada grupo obtido, conforme a Equação 6.

$$Y = \beta + \beta_1 * a001 + \dots + \beta_{15} * a015$$

Eq. 6

Onde: Y: Função linear discriminante;  $\beta$ : Constante da função linear discriminante;  $\beta_1 \dots \beta_{15}$ , são coeficientes das variáveis utilizadas no estudo.

A partir das equações obtidas na etapa de treinamento, os dados de validação foram aplicados a essas equações, a fim de verificar separação das amostras nos respectivos grupos.

### 3.4.3. Análise Regressão Linear Múltipla

Antes na análise de RLM, foi realizada a análise de multicolinearidade entre as variáveis explicativas utilizando o método diagnóstico, o número de condição (NC) referente à divisão do maior pelo menor autovalor da matriz de correlação X'X.

Foi realizada a regressão linear múltipla pelo método *stepwise* e testadas as três formas: *Backward*, *Forward* e *Stepwise*. Para isso foi utilizada a Equação 7.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * a001 + \dots + \beta_{15} * a015$$

Eq. 7

Onde:

Y = variável dependente;

$\beta_0$  = constante;

a001 = variável independente (preditoras)

$\beta_1$  = parâmetro, coeficiente padronizado de regressão

### 3.4.4. Rede Neural Artificial

Após coleta, os dados gerados foram normalizados e inseridos no *software Java Simulator Neural Network (Java NNS) – Java Neural Network Simulator 1.1* (Fischer et al., 2001), o qual é baseado no *SNNS – Stuttgart Neural Network Simulator*.

A rede escolhida para realização do presente trabalho foi do tipo Perceptron de Múltiplas Camadas (MLP) e o algoritmo utilizado foi o *Resilient Propagation* que possui uma taxa de aprendizado dinâmica facilitando o processo de aprendizagem. As arquiteturas das redes testadas são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Arquitetura das redes neurais testadas para amostras de leite e leite com adulteração

<b>Rede de propagação</b>	<b>Classificação</b>	<b>Predição</b>
Aprendizagem	Supervisionado	Supervisionado
Função de Ativação	Logística	Tangente hiperbólica
Nº variáveis de entrada	15	15
Nº de camadas intermediárias	2 – 3	1 - 3
Nº de variáveis de saída	2	6
Nº de neurônios nas camadas intermediárias	20 – 100	4 - 8
Sistema de Aprendizagem	<i>Resilient Propagation</i>	<i>Resilient Propagation</i>
Ciclos	200 – 600	200 - 500

As redes foram formadas por 15 neurônios de entrada, que correspondem as 15 variáveis que são os valores de absorvância obtidos pelo espectro, e uma a três camadas ocultas suficientes para aproximar qualquer função matemática. A escolha do número de neurônios em cada camada oculta foi baseada na minimização do erro quadrado médio (RMSE) associado à capacidade preditiva da rede e na maximização da taxa de classificação que é o mesmo que taxa de acertos dos grupos estudados, quanto maior a

taxa de classificação, melhor a capacidade da rede em diferenciar e separar os grupos (RAI et al., 2005).

Na primeira e na segunda camada escondida foram testados de 4 a 100 neurônios para que pudesse ser feita a escolha da melhor configuração. A taxa de aprendizagem utilizada no trabalho foi de 0,2.

Os dados para classificação, para prever se o leite é puro ou adulterado, foram normalizados para 0 a 1 (Equação 8) e os dados de predição, para prever se o leite é puro ou a concentração de adulterante usada, foram normalizados para -1 e 1 (Equação 9).

$$xi, norm = \frac{xi - xmín}{xmáx - xmín} \quad \text{Eq. 8}$$

$$xi, norm = 2 * \left( \frac{xi - xmín}{xmáx - xmín} \right) - 1 \quad \text{Eq. 9}$$

Onde:

$Xi, norm$  = dados normalizados;

$xi$  = dados experimentais;

$xmín$  = mínimo dos dados;

$xmáx$  = valor máximo dos dados.

Os desempenhos das diferentes formações da RNA foram comparados de acordo com o coeficiente de correlação (R) entre dados de saída experimentais e preditos e raiz do erro quadrado médio (RMSE), Equação 10. A correlação de aprendizagem e verificação de iterações dos RNA's criados foi calculada a partir de dados normalizados.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (xd - xp)^2} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde:

$n$  = número de ponto de dados,

$xd$  e  $xp$  = dados experimentais (dados desejados) e dados preditos, respectivamente.

Foi testada uma rede neural com leite puro e leite com todos os adulterantes, com função logística e sistema de aprendizagem *Resilient Propagation*, entretanto na etapa de validação, o leite puro foi 100% classificado como leite adulterado. Para contornar este problema foram utilizadas seis redes neurais para classificar os dados (leite puro ou leite adulterado com amido; leite puro ou leite adulterado com bicarbonato de sódio; leite puro ou leite adulterado com hidróxido de sódio; leite puro ou leite adulterado com peróxido de hidrogênio; leite puro ou leite adulterado com sacarose; leite puro ou leite adulterado com uréia). A entrada da rede foi construída pelos dados padronizados, correspondentes aos valores de absorvância obtidos no espectrofotômetro (FTIR), e a saída foi representada por um vetor multidimensional formado por uma matriz identidade, em que a dimensão corresponde à quantidade de grupos que compõem os dados utilizados, conforme a classificação a seguir:

(1. 0) = Leite puro

(0. 1) = Leite adulterado

Os conjuntos de dados, treinamento e validação, foram montados neste formato numérico, de modo que, cada amostra ao ser classificada corretamente teria o número 1 atribuído a ela e ao ser classificada erroneamente o número 0.

As amostras coletadas dos produtores foram testadas nas seis redes escolhidas na etapa de classificação, a fim de observar se entre elas havia alguma amostra adulterada com algum dos adulterantes testados no presente estudo.

Para predição foram utilizadas seis redes neurais, correspondentes a leite puro e as concentrações de cada adulterante. A entrada da rede foi constituída pelos dados padronizados, e a saída foi representada por um vetor multidimensional formado por uma matriz, em que a dimensão corresponde à quantidade de grupos que compõe os dados utilizados. Foi atribuído o valor de -0,6 para o leite com menor concentração de adulterante e assim sucessivamente até o valor 1 para o leite com maior quantidade de adulterante, conforme a seguir:

(-1. 0. 0. 0. 0. 0) = Leite puro

(0. -0,6. 0. 0. 0. 0) = Leite adulterado

(0. 0. -0,2. 0. 0. 0) = Leite adulterado

(0. 0. 0. 0,2. 0. 0) = Leite adulterado

(0. 0. 0. 0. 0,6. 0) = Leite adulterado

(0. 0. 0. 0. 0. 1) = Leite adulterado

As redes foram testadas de forma a obter a que melhor se desempenhasse em relação ao menor RMSE (raiz do erro quadrático médio) obtido por meio da equação 10 e conseqüentemente a melhor taxa de classificação.

Os gráficos de coeficiente de determinação dos valores experimentais e preditos e o gráfico do erro quadrado médio e número de ciclos foram realizados no programa Sigma Plot, versão 11.0.

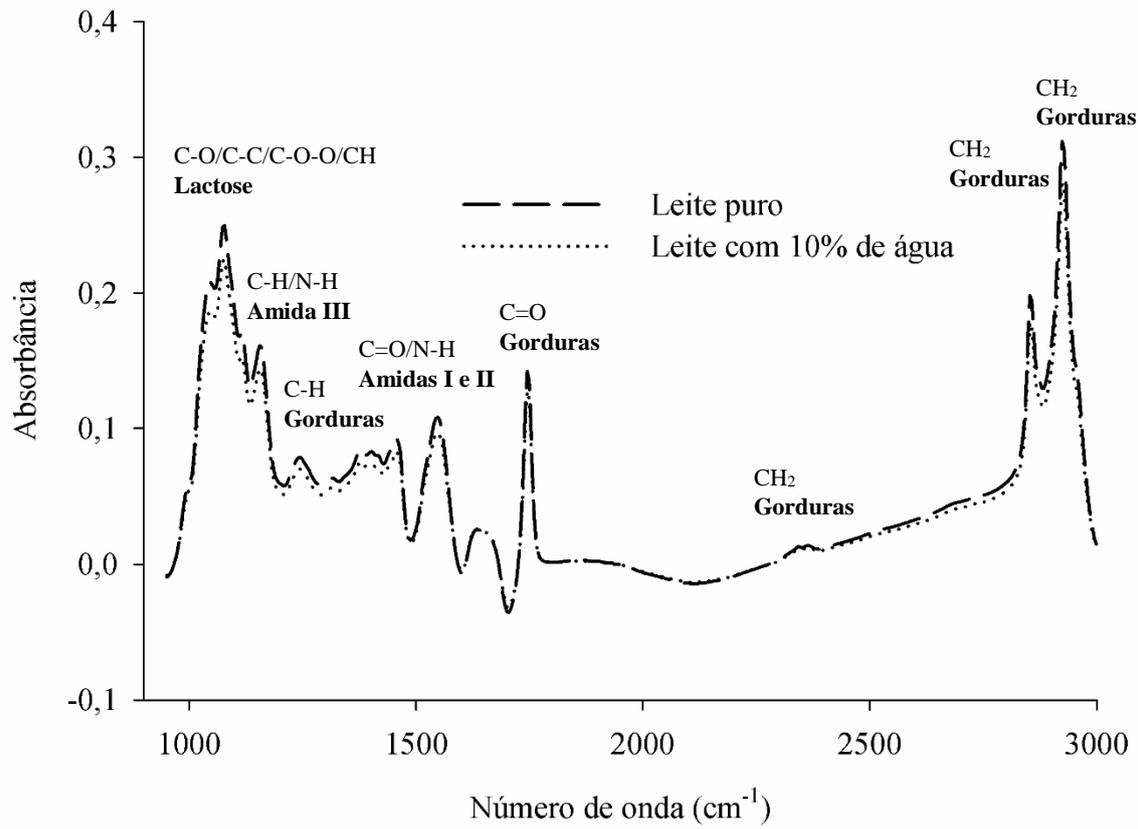
## IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Espectros das amostras de leite e das amostras de leite adulterado

A Espectroscopia no Infravermelho FTIR DairySpec FT foi utilizada no intuito de realizar comparações entre os perfis do leite e do leite adulterado. Foram observadas as características dos espectros do leite e a sobreposição de leite com água (Figura 2). Na região do infravermelho ( $1000 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ) observou-se 15 picos nos espectros com bandas características de gordura, proteína e lactose. De acordo com Grelet (2015) e Aemouts (2011) as bandas que caracterizam a gordura ocorreram em função das vibrações de ácidos graxos nos picos de absorção em  $2919$ ,  $2851$  e  $1742 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O) e em  $1458$  e  $1376 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H). A lactose originou picos de absorção em  $1148$  e em  $1023 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O-C). A presença de proteína está nas regiões  $1647 \text{ cm}^{-1}$  (Amida I – estiramento C-O), em  $1541 \text{ cm}^{-1}$  (Amida III – estiramento C-N, deformação angular N-H, estiramento C=O e vibrações de deformação angular em O=C=N).

Os espectros do leite e leite com água foram semelhantes, com diferença na menor absorbância na região de proteínas, gorduras e lactose para leite com água, isso porque a água é o maior e principal componente do leite, então a adição de água vai reduzir a quantidade daqueles componentes, o que provavelmente impossibilitou reconhecer uma amostra de leite com água apenas pelo espectro nas condições testadas.

**Figura 2:** Espectros obtidos por espectrômetro FTIR DairySpec FT das amostras de leite e leite com água

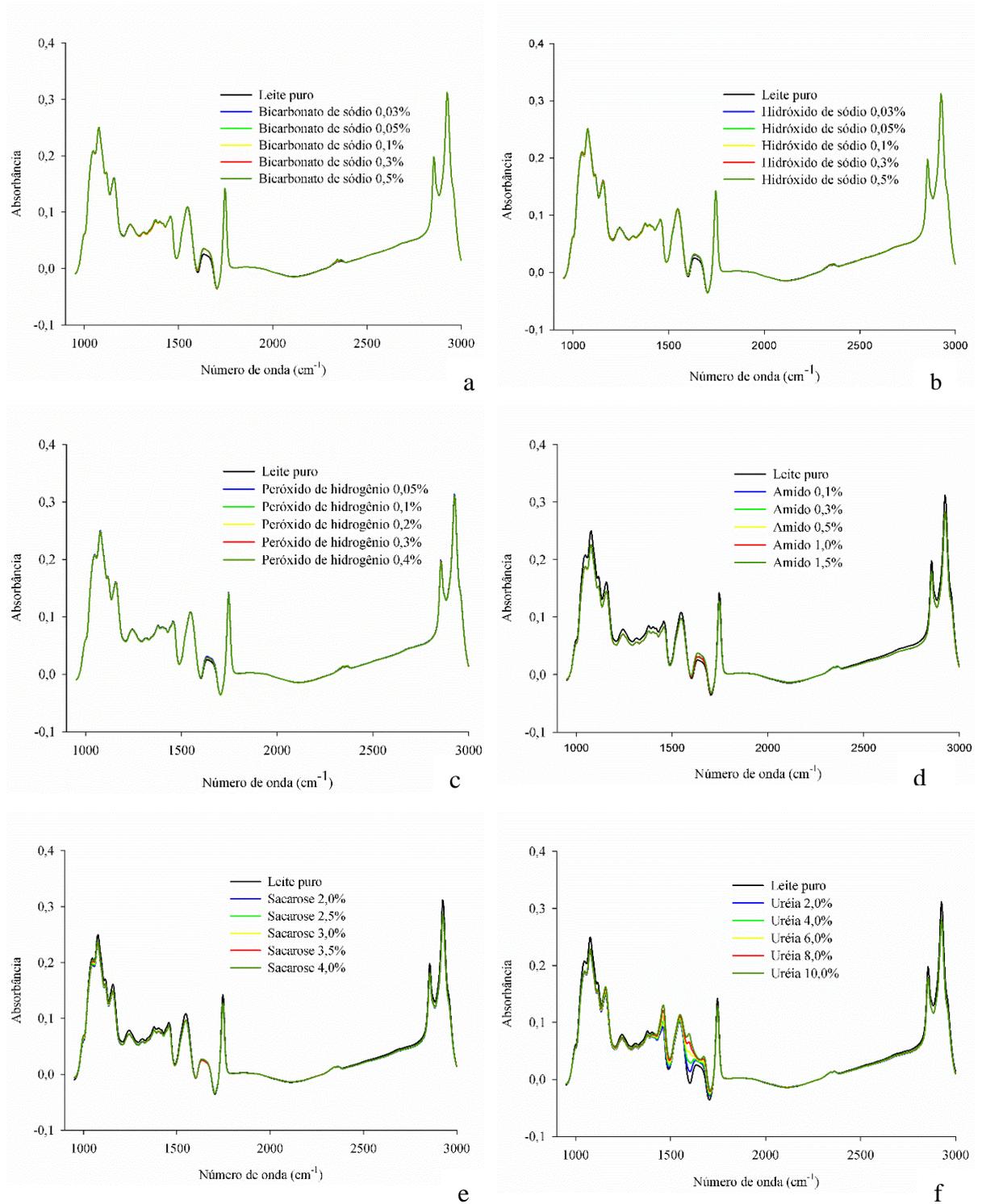


Foram observadas as características dos espectros do leite e a sobreposição dos cinco níveis de concentração dos adulterantes bicarbonato de sódio (Figura 3-a), hidróxido de sódio (Figura 3-b), peróxido de hidrogênio (Figura 3-c), amido (Figura 3-d), sacarose (Figura 3-e) e uréia (Figura 3-f), sendo possível observar que não existiu diferença visual entre os espectros de leite e leite adulterado com hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio e peróxido de hidrogênio. Os espectros de sacarose e amido estão associados à adição de água, por isso a menor absorvância para o leite adulterado quando comparado com leite puro.

De acordo com Tewari et al. (2007), a presença de picos entre os comprimentos de onda 1200 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  está relacionado ao grupo C-H e C-O (alongamento) e C-O (alongamento e flexão), grupos que estão associados à presença de sacarose na amostra. O amido está associado a picos na região entre 1200 e 900  $\text{cm}^{-1}$ , que está associada com vibrações glicosídicas  $\alpha$  1-4, C-H (dobra), C-O-H (dobra) e C-O e C-C (estiramento) (KIZIL, IRUDAYARAJ, SEETHRAMN, 2002). Enquanto que a presença de picos na região 2000 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  está associada à presença de peróxido de hidrogênio, picos na região 1100 a 1250  $\text{cm}^{-1}$  e na região 1100 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  estão associados à presença de bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio, respectivamente (SANTOS et al., 2013b). Para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, amido e sacarose (Figura 3 – a, b, c, d, e) não houve a presença do pico característicos desses adulterantes. Este resultado pode estar relacionado à quantidade de adulterante usado no leite.

É possível observar na figura 3-f as principais frequências de absorção da uréia que estão relacionadas aos picos presentes no número de onda em 1600 e 1680  $\text{cm}^{-1}$ . Assim, pela análise do espectro é possível confirmar que houve adição de uréia no leite, à medida que aumenta o teor de uréia a absorvância também aumentou principalmente a região 1600  $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{NH}_2$ ) (JHA et al., 2015).

**Figura 3:** Espectros obtidos por espectrômetro FTIR DairySpec FT das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio; (b) hidróxido de sódio; (c) peróxido de hidrogênio; (d) amido; (e) sacarose; (f) uréia

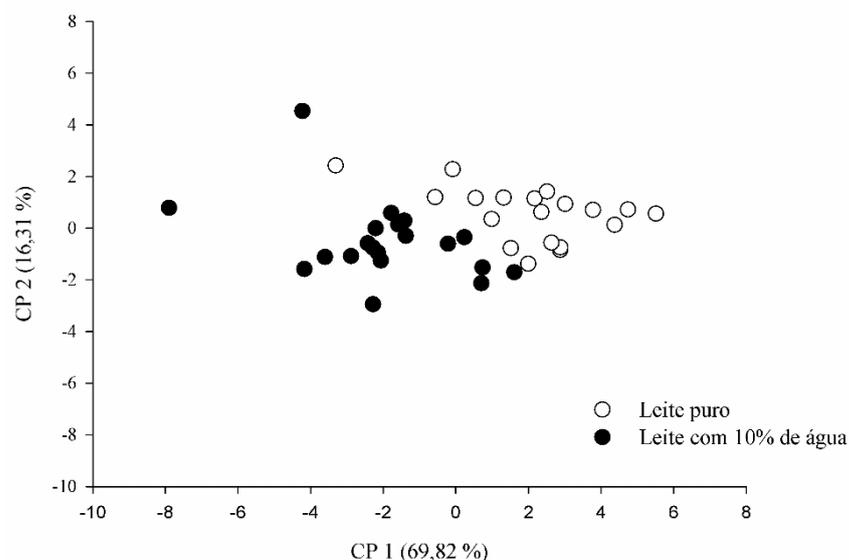


Botelho et al. (2015) adulteraram amostras de leite com peróxido de hidrogênio, amido e sacarose variando a concentração de 0,5% a 10% identificaram pelo espectro esses adulterantes com uma concentração de 10%, concentração maior que a utilizada neste estudo.

## 4.2 Análise de Componentes Principais

Para as absorvâncias obtidas pelo FTIR DairySpecFT das amostras de leite e leite com 10% de água (Figura 4), dois componentes explicaram 86,13% da variância, o primeiro componente principal (CP 1 – 69,82%) apresentou alta correlação com às variáveis relacionados à lactose ( $1045\text{ cm}^{-1}$ ,  $1077\text{ cm}^{-1}$  e  $1115\text{ cm}^{-1}$ ), proteína ( $1245\text{ cm}^{-1}$ ) e gordura ( $1156\text{ cm}^{-1}$ ,  $1404\text{ cm}^{-1}$  e  $1455\text{ cm}^{-1}$ ). O segundo componente principal (CP 2 – 16,31%) apresentou correlação com a variável associada ao número de onda  $1544\text{ cm}^{-1}$  atribuído à proteína. As amostras de leite apresentaram correlação positiva com CP 1 enquanto que as amostras de leite com 10% de água apresentaram correlação negativa com CP 1, comprovando assim a capacidade do primeiro componente separar as amostras.

**Figura 4.** Gráfico de dispersão das amostras de leite e leite com 10% de água em relação aos componentes principais CP 1 e CP 2



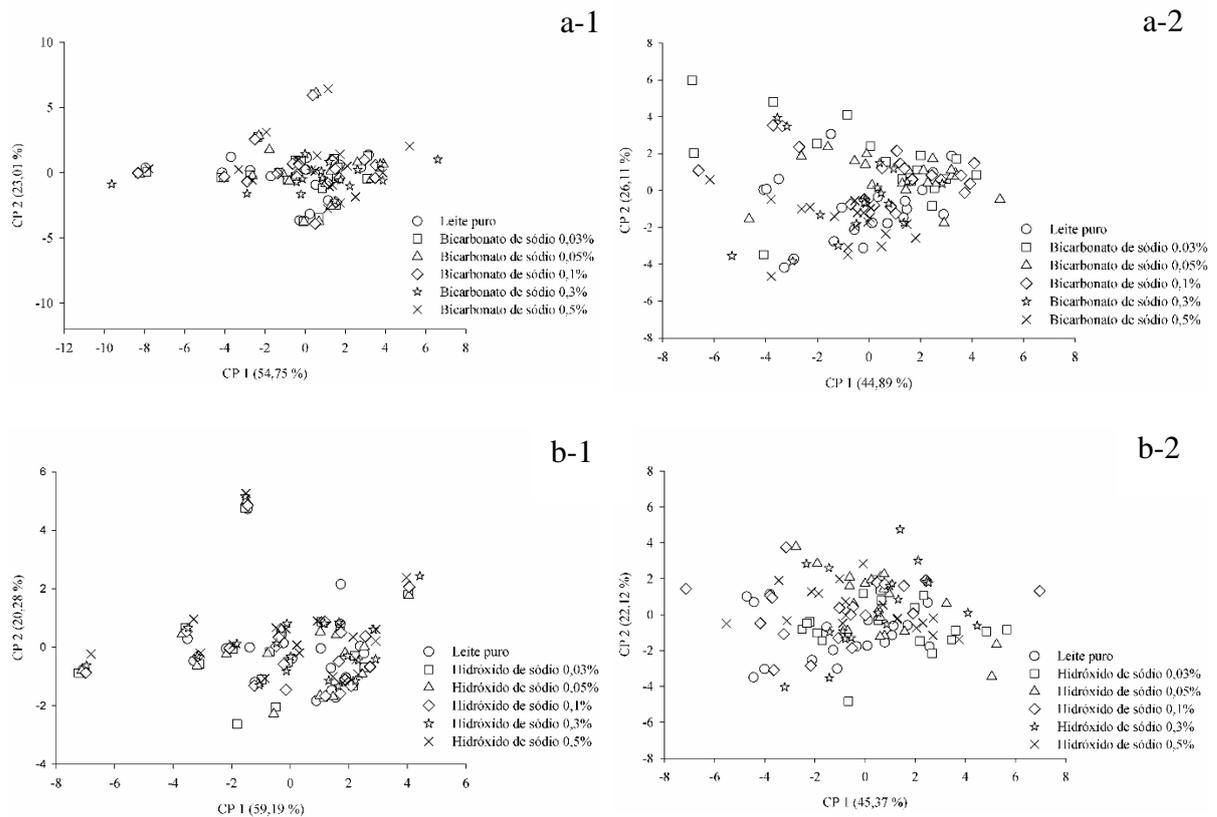
Comparando os resultados da análise de componentes principais obtidos pelo FTIR - ATR DairySpecFT e pelo FTIR - ATR Cary 630 (Figura 5) é possível observar que não houve formação de grupos por níveis de concentração de adulterante, devido as baixas concentrações utilizadas no estudo. Essas baixas concentrações foram utilizadas pois, geralmente, não são adicionadas altas concentrações de substâncias para adulteração do leite. Entretanto, para o FTIR-ATR DairySpecFT quando leite sem adulterante é comparado com as amostras adulteradas com amido (Figura 5 d-1), sacarose (Figura 5 e-1) e uréia (Figura 5 f-1) observa-se a formação do grupo de leite puro e grupo de amostras adulteradas, devido a necessidade da utilização de água na adulteração com esses produtos, a água foi a responsável pela discriminação dos grupos. Essa separação ocorreu devido ao valor de absorbância (picos) associados o CP 1, enquanto que em relação o CP 2 não diferem entre si. Para o FTIR - ATR Cary 360 não houve separação, pois, as amostras foram liofilizadas.

Para amostras de leite e de leite adulterados com bicarbonato de sódio (Figura 5 a-1) para a absorção obtida pelo FTIR-ATR DairySpecFT os dois componentes explicaram 77,76% da variância, sendo CP 1 - 54,75% e CP 2 - 23,01%. O CP 1 apresentou alta correlação com as variáveis associadas ao número de onda  $1045\text{ cm}^{-1}$ ,  $1074\text{ cm}^{-1}$  e  $1115\text{ cm}^{-1}$  (lactose) e ao número de onda  $1153\text{ cm}^{-1}$  (gordura), enquanto que o segundo componente está associado ao número de onda  $1401\text{ cm}^{-1}$  (gordura) e  $1544\text{ cm}^{-1}$  (proteína). Para as absorções obtidas pelo FTIR - ATR Cary 630 (Figura 5 a-2) os dois componentes explicaram 71% da variância, sendo CP 1 - 44,89% e CP 2 - 26,11%. O CP 1 possui correlação com os picos de leite referentes à faixa de  $777\text{ cm}^{-1}$ ,  $882\text{ cm}^{-1}$ ,  $1021\text{ cm}^{-1}$ ,  $1232\text{ cm}^{-1}$ ,  $1306\text{ cm}^{-1}$ ,  $1460\text{ cm}^{-1}$  e a  $1634\text{ cm}^{-1}$  que estão associadas a compostos como gordura, lactose, proteína. E CP 2 possui correlação apenas com número de onda associado à gordura ( $1739\text{ cm}^{-1}$ ,  $2845\text{ cm}^{-1}$  e  $2914\text{ cm}^{-1}$ ). Para os dois FTIR-ATR o primeiro componente principal está associado também à faixa de absorção do bicarbonato de sódio ( $1100\text{ cm}^{-1}$  a  $1250\text{ cm}^{-1}$ ).

Para o leite sem adulteração e leite adulterado com hidróxido de sódio (Figura 5 b-1) os componentes explicaram 79,47% da variância, CP 1 explicou 59,19% da variância dos dados e possui alta correlação com as variáveis  $1045\text{ cm}^{-1}$ ,  $1074\text{ cm}^{-1}$ ,  $1112\text{ cm}^{-1}$  (lactose) e  $1156\text{ cm}^{-1}$  (gordura), enquanto que CP 2 explicou apenas 20,28% e está associada a banda característica da gordura  $1401\text{ cm}^{-1}$ . Para o FTIR-ATR Cary 360 (Figura 5 b-2) os componentes explicaram 67,49% da variância, CP 1 - 45,37% e CP 2 - 22,12%. Picos associados ao número de onda  $772\text{ cm}^{-1}$ ,  $883\text{ cm}^{-1}$ ,  $1010\text{ cm}^{-1}$  e  $1232\text{ cm}^{-1}$ , referentes à lactose, gordura e proteína, possuem correlação com CP 1, enquanto que uma variável associado ao número de onda  $2851\text{ cm}^{-1}$  e

2915  $\text{cm}^{-1}$  (gordura) apresentou correlação com CP 2. A faixa de absorção do hidróxido de sódio (1100  $\text{cm}^{-1}$  a 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) possui correlação com CP 1 para os dois modelos de FTIR-ATR.

**Figura 5:** Escores das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio – FTIR DairySpecFT (a-1); FTIR – ATR Cary 630 (a-2); (b) hidróxido de sódio - FTIR DairySpecFT (b-1); FTIR – ATR Cary 630 (b-2)

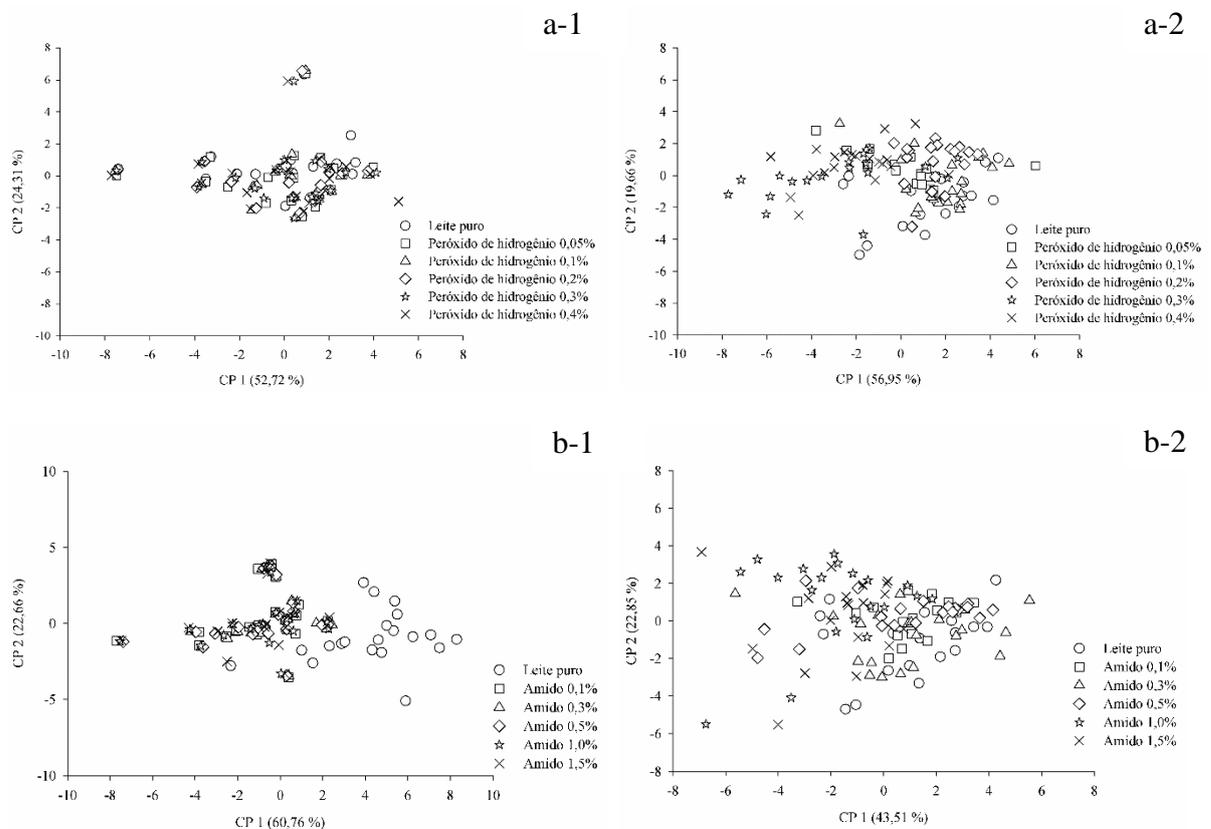


Considerando as análises realizadas no FTIR-ATR DairySpecFT para as amostras de leite e leite adulterado com peróxido de hidrogênio (Figura 6 a-1) os componentes explicaram 77,03% da variância (CP 1 – 52,72% e CP 2 – 24,31%). O CP 1 apresentou correlação com os picos referentes às vibrações nas regiões 1045  $\text{cm}^{-1}$ , 1074  $\text{cm}^{-1}$  e 1112  $\text{cm}^{-1}$  (lactose) e 1156  $\text{cm}^{-1}$  1376  $\text{cm}^{-1}$  (gordura), enquanto que CP 2 está referente a 1401  $\text{cm}^{-1}$  (gordura) e 1544  $\text{cm}^{-1}$  (proteína). Quando utilizado o modelo FTIR – ATR Cary 360 (Figura 6 a-2) os componentes explicaram 76,61% da variância (CP 1 – 56,95% e CP 2 – 19,66%). O CP 1 apresentou correlação com as faixas relacionados à gordura (777  $\text{cm}^{-1}$ , 1364  $\text{cm}^{-1}$  e 1454  $\text{cm}^{-1}$ ), lactose (1026  $\text{cm}^{-1}$ ) e proteína (1237  $\text{cm}^{-1}$ ) enquanto que CP 2 correlação com as faixas 1729  $\text{cm}^{-1}$  e

2914  $\text{cm}^{-1}$  (gordura), que corresponde ao número de onda do peróxido de hidrogênio (2000  $\text{cm}^{-1}$  a 2500  $\text{cm}^{-1}$ ).

No estudo das amostras com amido e leite puro (Figura 6 b-1) os componentes explicaram 83,42% da variância (CP 1 – 60,76% e CP 2 – 22,66%). O CP 1 apresentou alta correlação com lactose (1112  $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde ao mesmo local de absorção do amido, como também alta correlação com gordura (1153  $\text{cm}^{-1}$ , 1379  $\text{cm}^{-1}$ ) e proteína (1242  $\text{cm}^{-1}$ ). O CP 2 alta correlação com 1547  $\text{cm}^{-1}$  (proteína) e 2366  $\text{cm}^{-1}$  (gordura). Para o FTIR – ATR Cary 360 (Figura 6 b-2) os componentes explicaram 66,36% da variância (CP 1 – 43,51% e CP 2 – 22,85%). Às faixas relacionadas a 767  $\text{cm}^{-1}$  e 1306  $\text{cm}^{-1}$  (gordura e lactose) estão correlacionadas com CP 1. Às faixas 1148  $\text{cm}^{-1}$  (lactose), 1734  $\text{cm}^{-1}$ , 2851  $\text{cm}^{-1}$  e 2914  $\text{cm}^{-1}$  (gordura) com CP 2.

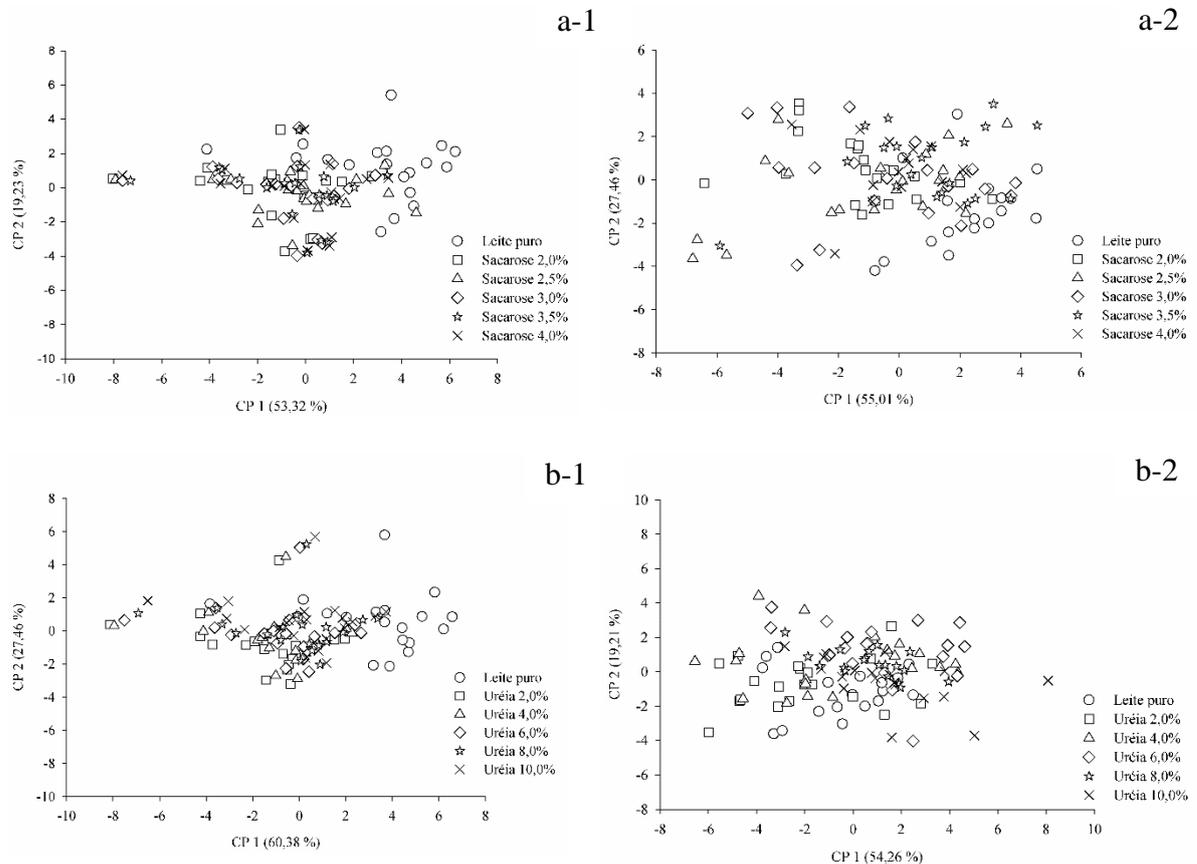
**Figura 6** : Escores das amostras de leite com os adulterantes (a) peróxido de hidrogênio - FTIR DairySpectFT (a-1); FTIR – ATR Cary 630 (a-2); (b) amido - DairySpectFT (b-1); FTIR – ATR Cary 630 (b-2)



Amostras adulteradas com sacarose e leite sem adulterante (Figura 7 a-1) os componentes explicam 72,55% da variância, CP 1 – 53,32% e CP 2 – 19,23%. O CP 1 apresentou alta correlação com os picos associados à absorção da lactose ( $1052\text{ cm}^{-1}$ ,  $1077\text{ cm}^{-1}$ ,  $1118\text{ cm}^{-1}$ ), proteína ( $1239\text{ cm}^{-1}$ ) e gordura ( $1372\text{ cm}^{-1}$  e  $2922\text{ cm}^{-1}$ ) (ZALESKA et al., 2002; PAPPAS et al, 2008). CP 1 também possui alta correlação com a mesma faixa de número de onda de absorção da sacarose e do amido ( $1115,12\text{ cm}^{-1}$  a  $1248,63\text{ cm}^{-1}$ ), pois possuem o mesmo grupo funcional (LEI et al., 2010; AERNOUTS, 2011). O CP 2 está associada ao número de onda  $1547\text{ cm}^{-1}$  (proteína) e  $2359\text{ cm}^{-1}$  (gordura). Enquanto que para o modelo FTIR – ATR Cary 360 (Figura 7 a-2) os componentes explicam 82,47% da variância, cinco variáveis  $772\text{ cm}^{-1}$ ,  $1015\text{ cm}^{-1}$ ,  $1232\text{ cm}^{-1}$ ,  $1465,15\text{ cm}^{-1}$  e  $1639,64\text{ cm}^{-1}$  atribuídos à lactose, proteína e gordura possuem correlação com CP 1 (55,01%), e às faixas  $1740\text{ cm}^{-1}$  e  $2904\text{ cm}^{-1}$  (gordura) possuem correlação com CP 2 (27,46%).

Amostras de leite puro e leite com uréia, para o modelo FTIR-ATR DairySpecFT (Figura 7 b-1) os dois componentes explicam 81,08% da variância, CP 1 – 60,38% e CP 2 – 20,70%. O CP 1 apresentou alta correlação com os picos relacionados à faixa de número de onda entre  $1045\text{ cm}^{-1}$  a  $1112\text{ cm}^{-1}$  (lactose),  $1160\text{ cm}^{-1}$  e  $1376\text{ cm}^{-1}$  (gordura) e  $1245\text{ cm}^{-1}$  (proteína). E o CP 2 a  $1601\text{ cm}^{-1}$  (proteína) (NICOLAU et al., 2010; SANTOS et al., 2013b; JHA et al., 2015). Para o FTIR-ATR modelo Cary 360 (Figura 7 b-2) os dois componentes explicam 73,09% da variância, CP 1 – 56,15% e CP 2 – 16,94%. Às faixas de  $776\text{ cm}^{-1}$ ,  $882\text{ cm}^{-1}$ ,  $1236\text{ cm}^{-1}$ ,  $1300\text{ cm}^{-1}$ ,  $1437\text{ cm}^{-1}$  e  $1617\text{ cm}^{-1}$  possuem correlação com CP 1 e estão associadas à lactose, gordura e proteína, enquanto que CP 2 apresentou correlação com  $1739\text{ cm}^{-1}$  e  $3263\text{ cm}^{-1}$  (gordura).

**Figura 7:** Escores das amostras de leite com os adulterantes (a) sacarose - DairySpectFT (a-1); FTIR – ATR Cary 630 (a-2); (b) uréia DairySpectFT (b-1); FTIR – ATR Cary 630 (b-2)



Jaiswal et al. (2015) utilizaram a análise de componentes principais para identificar a adulteração de leite com extrato de soja com oito níveis de concentrações variando de 2% a 40% utilizando espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier, e agruparam as amostras devido à concentração utilizada, à diferença de absorção do leite e do extrato de soja na região do número de onda de  $1680\text{ cm}^{-1}$  e  $1058\text{ cm}^{-1}$  e pela diferença de compostos diferentes como a lactose que contribuiu para a separação das amostras.

Santos et al. (2013b) utilizando a análise de componentes principais e espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier identificaram adulterantes no leite com peróxido de hidrogênio com concentração variando de  $0,009 - 0,15\text{ g/L}$ , soro de leite com concentração variando de  $1,87 - 30\text{ g/L}$ , leite sintético com concentração variando de  $0,05 - 0,8\text{ g/L}$  e uréia com concentração variando de  $0,78 - 12,5\text{ g/L}$ , sendo possível a separação dos grupos de leite e dos leites adulterados e Santana et al. (2017a) a separação de leite de vaca e leite adulterado com  $2-20\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  de ivermectina utilizando FTIR-ATR.

Mabood et al. (2017) estudaram a detecção e quantificação de misturas de leite de vaca e leite de camela usando análise espectroscópica do infravermelho próximo e Silva et al. (2016) a diferença entre o leite de vaca e leite de búfala, ambos utilizando FTIR-ATR com a separação das amostras utilizando análise de componentes principais.

### 4.3 Análise Discriminante

Foram obtidos 14 funções lineares para o FTIR DairySpectFT para as amostras de leite (Equação 11) e leite adulterados com água (Equação 12), leite (Equação 13) e leite adulterado com bicarbonato de sódio (Equação 14), leite (Equação 15) e leite adulterado com hidróxido de sódio (Equação 16), leite (Equação 17) e leite adulterado com peróxido de hidrogênio (Equação 18), leite (Equação 19) e leite adulterado com amido (Equação 20), leite (Equação 21) e leite adulterado com sacarose (Equação 22), leite (Equação 23) e leite adulterado com uréia (Equação 24) e 12 funções lineares para o FTIR-ATR modelo Cary 360 para as amostras de leite (Equação 25) e leite adulterado com bicarbonato de sódio (Equação 26), leite (Equação 27) e leite adulterado com hidróxido de sódio (Equação 28), leite (Equação 29) e leite adulterado com peróxido de hidrogênio (Equação 30), leite (Equação 31) e leite adulterado com amido (Equação 32), leite (Equação 33) e leite adulterado com sacarose (Equação 34), leite (Equação 35) e leite adulterado com uréia (Equação 36). Nestas funções foram atribuídos pesos que foram multiplicados por cada variável (número de onda) a fim de maximizar a razão entre as classes e minimizar a dispersão dentro de cada grupo.

Abaixo as equações obtidas pelos espectros do FTIR DairySpectFT:

a) Leite e leite com 10% de água

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{leite}} = & - 3,720 - 21,002 * Y_{1048} + 3,498 * Y_{1077} + 24,836 * Y_{1112} - 6,799 * Y_{1153} - 7,176 \\
 & * Y_{1242} - 5,880 * Y_{1315} + 6,214 * Y_{1376} - 17,711 * Y_{1401} + 17,005 * Y_{1452} - 1,140 * Y_{1544} - 12,772 \\
 & * Y_{1747} + 2,932 * Y_{2341} - 5,313 * Y_{2385} + 27,461 * Y_{2855} - 21,171 * Y_{2922}
 \end{aligned}$$

Eq. 11

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{leiteeágua}} = & - 4,315 + 22,618 * Y_{1045} - 3,767 * Y_{1077} - 26,747 * Y_{1115} + 7,323 * Y_{1156} \\
 & + 7,728 * Y_{1245} + 6,332 * Y_{1312} - 6,692 * Y_{1369} + 19,073 * Y_{1404} - 18,313 * Y_{1455} + 1,228 * Y_{1544} \\
 & + 13,754 * Y_{1744} - 3,157 * Y_{2341} + 5,721 * Y_{2379} - 29,573 * Y_{2848} + 22,7999 * Y_{2925}
 \end{aligned}$$

Eq. 12

b) Leite e leite com bicarbonato de sódio

$$Y_{\text{leite}} = -0,870 + 5,691 * Y_{1048} - 6,281 * Y_{1077} - 5,489 * Y_{1112} + 6,917 * Y_{1153} - 0,484 * Y_{1242} + 1,153 * Y_{1315} - 0,423 * Y_{1376} + 0,549 * Y_{1401} + 0,362 * Y_{1452} - 2,288 * Y_{1544} - 3,805 * Y_{1747} - 3,3252 * Y_{2341} + 3,176 * Y_{2385} - 4,277 * Y_{2855} + 5,270 * Y_{2922}$$

Eq. 13

$$Y_{\text{bicarbonato}} = -0,0307 - 1,057 * Y_{1045} + 1,166 * Y_{1074} + 1,019 * Y_{1115} - 1,284 * Y_{1153} + 0,089 * Y_{1242} - 0,214 * Y_{1318} + 0,078 * Y_{1376} - 0,102 * Y_{1401} - 0,067 * Y_{1455} + 0,425 * Y_{1544} + 0,706 * Y_{1741} + 0,617 * Y_{2334} - 0,589 * Y_{2366} + 0,794 * Y_{2855} - 0,978 * Y_{2922}$$

Eq. 14

c) Leite e leite com hidróxido de sódio

$$Y_{\text{leite}} = -0,783 + 1,039 * Y_{1048} - 7,570 * Y_{1077} - 0,991 * Y_{1112} + 8,060 * Y_{1153} + 0,469 * Y_{1242} + 0,176 * Y_{1315} + 1,536 * Y_{1376} - 0,608 * Y_{1401} + 0,576 * Y_{1452} - 2,276 * Y_{1544} - 4,755 * Y_{1747} - 3,118 * Y_{2341} + 3,338 * Y_{2385} + 1,738 * Y_{2855} - 1,765 * Y_{2922}$$

Eq. 15

$$Y_{\text{hidróxido}} = -0,027 - 0,193 * Y_{1045} + 1,405 * Y_{1074} + 0,184 * Y_{1112} - 1,496 * Y_{1156} - 0,087 * Y_{1239} - 0,032 * Y_{1315} - 0,285 * Y_{1372} + 0,113 * Y_{1401} - 0,107 * Y_{1452} + 0,422 * Y_{1544} + 0,883 * Y_{1747} + 0,579 * Y_{2344} - 0,620 * Y_{2369} - 0,322 * Y_{2852} + 0,327 * Y_{2922}$$

Eq. 16

d) Leite e leite com peróxido de hidrogênio

$$Y_{\text{leite}} = -1,249 + 5,462 * Y_{1048} - 10,359 * Y_{1077} + 0,454 * Y_{1112} + 1,663 * Y_{1153} + 0,066 * Y_{1242} + 2,724 * Y_{1315} - 0,640 * Y_{1376} + 4,651 * Y_{1401} - 5,145 * Y_{1452} - 1,312 * Y_{1544} + 0,859 * Y_{1747} - 3,302 * Y_{2341} + 3,913 * Y_{2385} - 4,267 * Y_{2855} + 5,830 * Y_{2922}$$

Eq. 17

$$Y_{\text{peróxido}} = -0,036 - 0,936 * Y_{1045} + 1,775 * Y_{1074} - 0,077 * Y_{1112} - 0,285 * Y_{1156} - 0,011 * Y_{1242} - 0,467 * Y_{1312} + 0,109 * Y_{1376} - 0,797 * Y_{1401} + 0,882 * Y_{1452} + 0,224 * Y_{1544} - 0,147 * Y_{1744} - 0,566 * Y_{2338} - 0,670 * Y_{2379} + 0,731 * Y_{2852} - 0,999 * Y_{2925}$$

Eq. 18

## e) Leite e leite com amido

$$Y_{leite} = - 8,209 - 5,128 * Y_{1048} - 2,459 * Y_{1077} + 7,644 * Y_{1112} - 5,482 * Y_{1153} - 1,645 * Y_{1242} + 3,610 * Y_{1315} + 9,551 * Y_{1376} + 7,976 * Y_{1401} - 14,207 * Y_{1452} + 5,513 * Y_{1544} + 18,505 * Y_{1747} - 3,532 * Y_{2341} + 5,322 * Y_{2385} + 4,023 * Y_{2855} - 13,457 * Y_{2922}$$

Eq. 19

$$Y_{amido} = -0,177 + 0,754 * Y_{1045} + 0,361 * Y_{1077} - 1,124 * Y_{1112} + 0,806 * Y_{1153} + 0,241 * Y_{1242} - 0,530 * Y_{1315} - 1,404 * Y_{1379} - 1,173 * Y_{1401} + 2,089 * Y_{1455} - 0,810 * Y_{1547} - 2,721 * Y_{1747} + 0,519 * Y_{2338} - 0,782 * Y_{2366} - 0,591 * Y_{2848} + 1,979 * Y_{2922}$$

Eq. 20

## f) Leite e leite com sacarose

$$Y_{leite} = - 10,587 - 26,252 * Y_{1048} + 0,904 * Y_{1077} + 17,494 * Y_{1112} + 21,632 * Y_{1153} - 0,700 * Y_{1242} + 2,419 * Y_{1315} + 6,101 * Y_{1376} + 1,927 * Y_{1401} - 13,882 * Y_{1452} + 9,731 * Y_{1544} + 1,440 * Y_{1747} - 3,399 * Y_{2341} + 7,962 * Y_{2385} + 2,724 * Y_{2855} - 12,867 * Y_{2922}$$

Eq. 21

$$Y_{sacarose} = - 0,375 + 4,946 * Y_{1052} - 0,170 * Y_{1077} - 3,296 * Y_{1118} - 4,075 * Y_{1156} + 0,131 * Y_{1239} - 0,455 * Y_{1315} - 1,149 * Y_{1372} - 0,363 * Y_{1401} + 2,615 * Y_{1452} - 1,833 * Y_{1547} - 0,271 * Y_{1744} + 0,640 * Y_{2341} - 1,500 * Y_{2359} - 0,513 * Y_{2852} + 2,424 * Y_{2922}$$

Eq. 22

## g) Leite e leite com uréia

$$Y_{leite} = - 7,461 + 0,200 * Y_{1048} - 11,145 * Y_{1077} + 0,543 * Y_{1112} + 8,466 * Y_{1153} - 1,694 * Y_{1242} + 3,551 * Y_{1315} + 8,413 * Y_{1376} - 1,754 * Y_{1401} - 10,554 * Y_{1452} + 2,288 * Y_{1544} - 0,807 * Y_{1747} - 8,791 * Y_{2341} + 10,415 * Y_{2385} + 9,985 * Y_{2855} - 10,841 * Y_{2922}$$

Eq. 23

$$Y_{uréia} = - 0,257 - 0,037 * Y_{1045} + 2,069 * Y_{1074} - 0,100 * Y_{1112} - 1,572 * Y_{1160} + 0,314 * Y_{1245} - 0,659 * Y_{1318} - 1,562 * Y_{1376} + 0,325 * Y_{1458} + 1,960 * Y_{1553} - 0,425 * Y_{1601} + 0,149 * Y_{1744} + 1,632 * Y_{2341} - 1,934 * Y_{2359} - 1,854 * Y_{2848} + 2,013 * Y_{2922}$$

Eq. 24

Onde:  $Y_{xxxx}$  significa número de onda.

Quando utilizado o FTIR DairySpecFT a capacidade de treinamento para o leite e para o leite com água foi de 100%, enquanto que na etapa de validação houve 33,33% para leite e 66,67% para leite com água, ou seja 66,67% das amostras de leite foram classificadas erroneamente como leite com água.

A capacidade de treinamento para leite com bicarbonato de sódio foi de 80% e de 70% na etapa de validação. O leite sem adulteração na etapa de treinamento obteve 92,31% de classificação e apenas 33,33% para a etapa de validação. Para amostras com hidróxido de sódio obtiveram 70% na etapa de treinamento e 53,33% na etapa de validação, enquanto que para o leite houve 84,62% e 50% na etapa de treinamento e validação, respectivamente. Para as amostras com peróxido de hidrogênio a capacidade de classificação na etapa de treinamento foi de 84,29% e 80% na etapa de validação, enquanto que para as amostras de leite 100% e 20% nas etapas de treinamento e validação, respectivamente.

A taxa de classificação na etapa de treinamento para o leite e leite com amido foi de 100%, enquanto que na etapa de validação a taxa de acerto foi de 80% para leite e 96,67% para leite com amido. A sacarose e o leite obtiveram 100% de classificação na etapa de treinamento e 80% na etapa de validação. Para as amostras com uréia houve 100% de classificação na etapa de treinamento e 56,67% na etapa de validação, e para o leite a taxa foi de 100% e 16,67% na etapa de treinamento e validação, respectivamente.

Equações obtidas pelos espectros do FTIR-ATR modelo Cary 360:

a) Leite e leite com bicarbonato de sódio

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{leite}} = & - 9,635 + 3,996 * Y_{772} - 9,676 * Y_{888} + 6,950 * Y_{1031} - 2,875 * Y_{1147} + 17,700 \\
 & * Y_{1242} - 12,071 * Y_{1311} + 4,162 * Y_{1374} - 5,587 * Y_{1534} - 3,536 * Y_{1634} + 3,547 * Y_{1740} + 5,018 \\
 & * Y_{2327} - 0,106 * Y_{2390} + 36,880 * Y_{2840} - 56,001 * Y_{2920} - 0,064 * Y_{3264}
 \end{aligned}$$

Eq. 25

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{bicarbonato}} = & -0,252 - 0,646 * Y_{777} + 1,565 * Y_{882} - 1,124 * Y_{1021} + 0,465 * Y_{1136} - \\
 & 2,863 * Y_{1232} + 1,952 * Y_{1306} - 0,673 * Y_{1460} + 0,903 * Y_{1534} + 0,572 * Y_{1634} - 0,573 * Y_{1739} - \\
 & 0,811 * Y_{2305} + 0,017 * Y_{2379} - 5,966 * Y_{2845} + 9,059 * Y_{2914} + 0,010 * Y_{3268}
 \end{aligned}$$

Eq. 26

b) Leite e leite com hidróxido de sódio

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{leite}} = & -18,058 + 11,433 * Y_{772} - 9,955 * Y_{888} + 5,727 * Y_{1031} + 6,171 * Y_{1147} + 6,826 \\
 & * Y_{1242} - 5,822 * Y_{1311} - 12,262 * Y_{1374} - 6,933 * Y_{1534} + 8,660 * Y_{1634} - 10,632 * Y_{1740} - 16,902 \\
 & * Y_{2327} + 9,246 * Y_{2390} + 45,500 * Y_{2840} - 53,511 * Y_{2920} - 10,720 * Y_{3264}
 \end{aligned}$$

Eq. 27

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{hidróxido}} = & -0,445 - 1,796 * Y_{772} + 1,564 * Y_{883} - 0,899 * Y_{1010} - 0,969 * Y_{1148} - 1,072 \\
 & * Y_{1232} + 0,915 * Y_{1306} + 1,927 * Y_{1380} + 1,089 * Y_{1534} - 1,360 * Y_{1634} + 1,670 * Y_{1740} + 2,656 * \\
 & Y_{2321} - 1,452 * Y_{2374} - 7,150 * Y_{2851} + 8,408 * Y_{2915} + 1,684 * Y_{3274}
 \end{aligned}$$

Eq. 28

c) Leite e leite com peróxido de hidrogênio

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{leite}} = & -14,148 + 7,061 * Y_{772} - 9,891 * Y_{888} + 8,410 * Y_{1031} + 6,675 * Y_{1147} - 1,388 * \\
 & Y_{1242} - 13,468 * Y_{1311} - 5,405 * Y_{1374} - 3,721 * Y_{1534} + 11,583 * Y_{1634} - 7,193 * Y_{1740} + 7,001 * \\
 & Y_{2327} - 0,408 * Y_{2390} + 55,852 * Y_{2840} - 54,676 * Y_{2920} - 7,352 * Y_{3264}
 \end{aligned}$$

Eq. 29

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{peróxido}} = & -0,297 - 1,023 * Y_{777} + 1,433 * Y_{883} - 1,218 * Y_{1026} - 0,967 * Y_{1153} + 0,201 \\
 & * Y_{1237} + 1,951 * Y_{1364} + 0,783 * Y_{1454} + 0,539 * Y_{1533} - 1,678 * Y_{1655} + 1,042 * Y_{1729} - 1,014 * \\
 & Y_{2321} + 0,059 * Y_{2364} - 8,094 * Y_{2851} + 7,924 * Y_{2914} + 1,065 * Y_{3274}
 \end{aligned}$$

Eq. 30

d) Leite e leite com amido

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{leite}} = & -5,388 + 4,266 * Y_{772} - 6,556 * Y_{888} + 3,785 * Y_{1031} - 7,807 * Y_{1147} + 9,260 * \\
 & Y_{1242} - 4,829 * Y_{1311} - 1,189 * Y_{1374} + 3,540 * Y_{1534} - 5,625 * Y_{1634} + 6,803 * Y_{1740} - 1,796 * \\
 & Y_{2327} + 0,845 * Y_{2390} + 7,569 * Y_{2840} - 14,157 * Y_{2920} + 6,592 * Y_{3264}
 \end{aligned}$$

Eq. 31

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{amido}} = & -0,141 - 0,690 * Y_{767} + 1,060 * Y_{882} - 0,612 * Y_{1021} + 1,262 * Y_{1148} - 1,498 \\
 & * Y_{1232} + 0,781 * Y_{1306} + 0,192 * Y_{1460} - 0,572 * Y_{1539} + 0,909 * Y_{1650} - 1,100 * Y_{1734} + 0,290 * \\
 & Y_{2321} - 0,136 * Y_{2364} - 1,224 * Y_{2851} + 2,290 * Y_{2914} - 1,066 * Y_{3274}
 \end{aligned}$$

Eq. 32

e) Leite e leite com sacarose

$$Y_{\text{leite}} = -6,501 - 1,237 * Y_{772} - 1,825 * Y_{888} + 1,804 * Y_{1031} - 3,300 * Y_{1147} - 2,165 * Y_{1242} - 8,452 * Y_{1311} + 19,018 * Y_{1374} + 7,054 * Y_{1534} - 6,768 * Y_{1634} + 0,817 * Y_{1740} + 2,872 * Y_{2327} - 3,875 * Y_{2390} + 0,524 * Y_{2840} - 0,143 * Y_{2920} - 2,949 * Y_{3264}$$

Eq. 33

$$Y_{\text{sacarose}} = -0,140 + 0,181 * Y_{772} + 0,268 * Y_{877} - 0,265 * Y_{1015} + 0,485 * Y_{1158} + 0,318 * Y_{1232} + 1,243 * Y_{1369} - 2,796 * Y_{1465} - 1,037 * Y_{1544} + 0,995 * Y_{1639} - 0,120 * Y_{1740} - 0,422 * Y_{2322} + 0,569 * Y_{2354} - 0,077 * Y_{2840} + 0,021 * Y_{2904} + 0,433 * Y_{3269}$$

Eq. 34

f) Leite e leite com uréia

$$Y_{\text{leite}} = -13,475 + 5,534 * Y_{772} - 15,415 * Y_{888} + 11,865 * Y_{1031} - 6,764 * Y_{1147} + 26,297 * Y_{1242} - 20,160 * Y_{1311} + 10,582 * Y_{1374} - 1,904 * Y_{1534} - 9,776 * Y_{1634} + 1,912 * Y_{1740} + 3,290 * Y_{2327} + 2,166 * Y_{2390} + 54,950 * Y_{2840} - 67,398 * Y_{2920} - 2,050 * Y_{3264}$$

Eq. 35

$$Y_{\text{uréia}} = -0,352 - 0,895 * Y_{776} + 2,493 * Y_{882} - 1,919 * Y_{1009} + 1,094 * Y_{1147} - 4,254 * Y_{1236} + 3,261 * Y_{1300} - 1,711 * Y_{1437} + 0,308 * Y_{1538} + 1,581 * Y_{1617} - 0,309 * Y_{1739} - 0,532 * Y_{2316} - 0,350 * Y_{2369} - 8,889 * Y_{2851} + 10,902 * Y_{2915} + 0,331 * Y_{3263}$$

Eq. 36

Onde:  $Y_{xxxx}$  significa número de onda.

Utilizando os espectros obtidos pelo FTIR-ATR modelo Cary 360 as amostras de leite e amostras com bicarbonato de sódio obtiveram na etapa de treinamento uma classificação de 100%, e na etapa de validação 100% para amostras de leite e 93,10% para as amostras com bicarbonato de sódio. Na etapa de treinamento o leite e leite com hidróxido de sódio obtiveram 100% de acerto, enquanto que 50% e 85,71% de classificação na etapa de validação para leite e amostras com hidróxido de sódio, respectivamente. As amostras com peróxido de hidrogênio e amostras de leite na etapa de treinamento obtiveram 98,46% e 90,91% de classificação, respectivamente, enquanto que na etapa de validação as duas amostras obtiveram 100% de acerto.

Para amostras adulteradas com amido a taxa de classificação na etapa de treinamento foi de 97,06% e para o leite 100%, enquanto que para a etapa de validação 93,33% e 100% para

amostras de amido e leite, respectivamente. Para o leite adulterado com sacarose a etapa de treinamento obteve 98,53% de classificação e 90% para o leite, e a etapa de validação 70% para amostras de sacarose e 100% para leite. Na etapa de treinamento, as amostras leite e adulteradas com uréia apresentaram o percentual de acerto de 100%, enquanto que a etapa de validação 100% e 46,67%, respectivamente.

As equações discriminantes obtidas na etapa de treinamento apresentaram taxa de classificação acima de 70% para todas as concentrações de amostras com bicarbonato de sódio, peróxido de hidrogênio, amido e sacarose quando utilizado os dados do FTIR Dairy SpectFT. O mesmo resultado foi alcançado (70% de classificação para todas as concentrações) com os dados obtidos no equipamento FTIR-ATR Cary 360 das amostras adulteradas com bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, amido e sacarose. Sendo assim, a Análise Discriminante apresentou melhores resultados de separação de todas amostras estudadas quando comparados com os obtidos na Análise de Componente Principal utilizando os dados do FTIR – ATR Cary 360.

Outros estudos demonstraram que a análise discriminante não foi capaz de discriminar amostras de leite cru quando adulteradas. Silva (2017) estudou a mistura de leite bovino com leite bubalino nas concentrações que variaram de 10% a 90%, e os resultados mostraram que a análise discriminante apresentou uma classificação de apenas 44,4% na etapa de validação, enquanto que Santana (2017b) utilizou a análise discriminante para detectar a presença de 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Ivermectina no leite cru bovino e obteve na etapa de validação uma classificação de 46,67%.

#### **4.4 Regressão Linear Múltipla**

Para a análise de regressão linear múltipla (RLM) foram testadas as técnicas *Backward*, *Forward* e *Stepwise* e escolhida a que obteve menor número de observações, menor RMSE e maior R, para a obtenção da equação. A técnica *Backward* ocorre quando todos os preditores são incluídos de uma só vez na equação, e depois são retirados, um a um, até que se identifiquem os melhores preditores; *Forward* quando a equação começa vazia e cada preditor entra, um por um, na equação; e *Stepwise* quando os preditores são incluídos na equação em bloco para a escolha da melhor técnica para ajuste do modelo (KEPPEL, 1991; TABACHNICK e FIDELL, 1996).

Para todos os adulterantes testados no FTIR-ATR modelo Cary 360 e no FTIR DairySpecFT a multicolinearidade foi baixa. Multicolinearidade fraca é quando o número de condição (NC) é menor que 100; multicolinearidade moderada a severa quando NC está entre 100 e 1000 e; multicolinearidade severa quando NC é maior que 1000 (MONTGOMERY e PECK, 1982).

Quando utilizado o FTIR-ATR modelo Cary 360, *Backward* foi o melhor modelo que pode ser utilizado para detectar adulteração em leite com amido, com bicarbonato de sódio, com uréia e com sacarose, enquanto que *Forward* foi a melhor técnica para os adulterantes hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio. Seis equações foram obtidas para a estimativa das amostras de leite e amostras adulteradas com bicarbonato de sódio (Equação 37), hidróxido de sódio (Equação 38), peróxido de hidrogênio (Equação 39), amido (Equação 40), sacarose (Equação 41) e uréia (Equação 42). A escolha da melhor técnica para predizer a adulteração das amostras depende do conjunto de dados que está sendo analisado (RAGNO et al., 2004).

$$\begin{aligned} \text{a) } Y_{\text{bicarbonato}} = & 1,860 + 0,197 * Y_{882} - 0,221 * Y_{1021} - 0,428 * Y_{1232} + 0,390 * Y_{1306} \\ & + 0,113 * Y_{1534} - 0,170 * Y_{2305} - 1,111 * Y_{2845} + 1,589 * Y_{2914} \end{aligned}$$

Eq. 37

$$\begin{aligned} \text{b) } Y_{\text{hidróxido}} = & 1,864 - 0,240 * Y_{772} + 0,228 * Y_{883} - 0,114 * Y_{1010} - 0,179 * Y_{1148} + \\ & 0,269 * Y_{1380} + 0,145 * Y_{1534} - 0,199 * Y_{1634} + 0,222 * Y_{1740} + 0,342 * Y_{2321} - 0,184 \\ & * Y_{2374} - 1,008 * Y_{2851} + 1,137 * Y_{2915} + 0,256 * Y_{3274} \end{aligned}$$

Eq. 38

$$\begin{aligned} \text{c) } Y_{\text{peróxido}} = & 1,873 - 0,158 * Y_{777} + 0,239 * Y_{883} - 0,226 * Y_{1026} - 0,159 * Y_{1153} + \\ & 0,360 * Y_{1364} + 0,152 * Y_{1454} - 0,196 * Y_{1655} + 0,175 * Y_{1729} - 0,160 * Y_{2321} - 1,385 \\ & * Y_{2851} + 1,360 * Y_{2914} + 0,154 * Y_{3274} \end{aligned}$$

Eq. 39

$$\begin{aligned} \text{d) } Y_{\text{amido}} = & 1,860 - 0,230 * Y_{767} + 0,477 * Y_{882} - 0,267 * Y_{1021} + 0,433 * Y_{1148} - 0,328 \\ & * Y_{1232} + 0,188 * Y_{1650} - 0,399 * Y_{1734} - 0,368 * Y_{2851} + 0,720 * Y_{2914} - 0,246 * Y_{3274} \end{aligned}$$

Eq. 40

$$\text{e) } Y_{\text{sacarose}} = 1,871 + 0,179 * Y_{1158} + 0,529 * Y_{1369} - 0,956 * Y_{1465} + 0,227 * Y_{3269}$$

Eq. 41

$$f) \text{ Yuréia} = 1,860 + 0,234 * Y_{882} - 0,228 * Y_{1009} + 0,115 * Y_{1147} - 0,599 * Y_{1236} + 0,521 * Y_{1300} - 0,313 * Y_{1437} + 0,255 * Y_{1617} - 1,558 * Y_{2851} + 1,791 * Y_{2915}$$

Eq. 42

Onde:  $Y_{xxxx}$  significa número de onda.

Para o leite adulterado com bicarbonato de sódio oito parâmetros (variáveis) foram testados na etapa de treinamento e validação. Na etapa de treinamento o RMSE = 0,18 e R = 0,73, enquanto que na etapa de validação RMSE = 0,16, R = 0,84 e coeficiente de correlação igual a 0,91. Treze parâmetros foram testados para amostras adulteradas com hidróxido de sódio nas etapas de treinamento e validação. Foi obtido um RMSE de 0,14 e R de 0,85 na etapa de treinamento e RMSE = 0,29, R = 0,64 e  $R^2 = 0,74$  na etapa de validação.

Doze parâmetros foram testados na etapa de treinamento e oito testados na etapa de validação para amostras adulteradas com peróxido de hidrogênio. Na primeira etapa foi obtido um coeficiente de determinação múltipla (R) de 0,80 e um erro (RMSE) de 0,15, enquanto que na etapa de validação o RMSE = 0,29, R = 0,48 e coeficiente de correlação 0,60. Para amostras adulteradas com amido na etapa de treinamento foram testados dez parâmetros com erro igual a 0,22 e coeficiente de determinação múltipla igual a 0,62. Na etapa de validação foram testados oito parâmetros com RMSE = 0,27, R = 0,53 e coeficiente de correlação igual a 0,73.

Apenas quatro parâmetros foram necessários para amostras adulteradas com sacarose, com erro igual a 0,21 e coeficiente de determinação múltipla igual a 0,62. Na etapa de validação foram testados seis parâmetros com RMSE = 0,25, R = 0,58 e coeficiente de correlação 0,76. Enquanto que para leite adulterado com uréia foram testados nove parâmetros para as duas etapas, na primeira foi obtido um RMSE = 0,16 e R = 0,80, enquanto que na segunda etapa o RMSE foi de 0,21, R = 0,72 e coeficiente de correlação de 0,85.

Para amostras analisadas no FTIR DairySpecFT a *Backward* foi melhor técnica para amostras adulteradas com amido, hidróxido de sódio, uréia e sacarose, *Forward* para leite adulterado com bicarbonato de sódio e peróxido de hidrogênio e *Stepwise* para amostras de leite adulteradas com água. Sete equações foram obtidas para estimativa das amostras de leite e amostras adulteradas com água (Equação 43), bicarbonato de sódio (Equação 44), hidróxido de sódio (Equação 45), peróxido de hidrogênio (Equação 46), amido (Equação 47), sacarose (Equação 48) e uréia (Equação 49).

$$a) \text{ Yleiteeágua} = 1,481 + 0,428 * Y_{1369}$$

Eq. 43

$$b) Y_{\text{bicarbonato}} = 1,843 + 0,095 * Y_{1544} + 0,427 * Y_{2334} - 0,381 * Y_{2366} + 0,042 * Y_{2855}$$

Eq. 44

$$c) Y_{\text{hidróxido}} = 1,843 + 0,587 * Y_{1074} - 0,876 * Y_{1156} + 0,138 * Y_{1544} + 0,467 * Y_{1747}$$

Eq. 45

$$d) Y_{\text{peróxido}} = 1,853 - 0,700 * Y_{1045} + 0,994 * Y_{1074} - 0,262 * Y_{1312} - 0,425 * Y_{1401} + 0,596 * Y_{1452} - 0,265 * Y_{1744} + 0,346 * Y_{2338} - 0,416 * Y_{2379} + 0,561 * Y_{2852} - 0,685 * Y_{2925}$$

Eq. 46

$$e) Y_{\text{amido}} = 1,871 - 0,314 * Y_{1379} - 0,288 * Y_{1401} + 0,451 * Y_{1455} - 0,236 * Y_{1547} - 0,738 * Y_{1747} + 0,527 * Y_{2922}$$

Eq. 47

$$f) Y_{\text{sacarose}} = 1,841 + 0,886 * Y_{1052} - 0,620 * Y_{1118} - 0,792 * Y_{1156} - 0,273 * Y_{1372} + 0,417 * Y_{1452} - 0,340 * Y_{1547} - 0,144 * Y_{2359} + 0,384 * Y_{2922}$$

Eq. 48

$$g) Y_{\text{uréia}} = 1,843 + 0,191 * Y_{1074} - 0,386 * Y_{1376} + 0,232 * Y_{1553} + 0,331 * Y_{2341} - 0,372 * Y_{2359}$$

Eq. 49

Onde:  $Y_{xxxx}$  significa número de onda.

Apenas uma variável foi necessária para estimar a adição de água no leite, com erro de 0,28 e coeficiente de determinação múltipla de 0,70, enquanto que a etapa de validação foram necessários cinco parâmetros com erro de 0,09, coeficiente de determinação de 0,98 e coeficiente de correlação igual a 1. Rebechi et al (2016) estudaram a adulteração de leite com gorduras de outras espécies e foi necessário uma variável para prever a adulteração quando utilizado o método *Stepwise*.

Para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio quatro e sete parâmetros foram testados na etapa de treinamento e validação, respectivamente, um RMSE = 0,34 e R = 0,14 na

etapa de treinamento e  $RMSE = 0,33$ ,  $R = 0,35$  e  $R^2 = 0,31$  na etapa de validação. Quatro parâmetros foram testados para leite adulterado com hidróxido de sódio com erro de 0,33 e  $R = 0,18$ , cinco parâmetros foram testados na etapa de validação com  $RMSE = 0,27$ ,  $R = 0,53$  e coeficiente de correlação igual a 0,72.

Para amostras com peróxido de hidrogênio dez parâmetros foram testados na etapa de treinamento e sete testados na etapa de validação, com  $RMSE = 0,31$  e  $R = 0,29$  na primeira etapa e  $RMSE = 0,26$ ,  $R = 0,56$  e  $R^2 = 0,72$  na etapa de validação. Para as amostras adulteradas com amido, seis parâmetros foram testados na etapa de treinamento e sete na etapa de validação. Na primeira etapa foi obtido um erro de 0,19 e coeficiente de determinação de 0,69, enquanto que na segunda etapa foi obtido um erro de 0,17, coeficiente de determinação de 0,80 e coeficiente de correlação igual a 0,89.

Na primeira etapa foram testados oito parâmetros e na segunda etapa sete parâmetros para as amostras adulteradas com sacarose, com erro de 0,17, coeficiente de determinação múltipla de 0,79 na etapa de treinamento e  $RMSE = 0,16$ ,  $R = 0,83$  e  $R^2 = 0,91$  para validação. Enquanto que para as amostras com uréia cinco e seis parâmetros foram testados nas etapas de treinamento e validação respectivamente, um  $RMSE = 0,20$  e  $R = 0,71$  na etapa de treinamento e  $RMSE = 0,21$ ,  $R = 0,72$  e  $R^2 = 0,84$  na etapa de validação.

De acordo com os dados obtidos no equipamento FTIR DairySpecFT, as amostras que obtiveram coeficiente de correlação ( $R^2$ ) maior que 80% foram as adulteradas com 10% de água, amido, sacarose e uréia. Enquanto que essa alta correlação (80%) foi alcançada apenas para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio e uréia quando utilizado os dados obtidos no equipamento FTIR-ATR modelo Cary 360. Esses resultados mostram que os equipamentos utilizados neste estudo fornecem informações necessárias para discriminação das amostras adulteradas, sendo que os dados fornecidos pelo equipamento FTIR DairySpecFT foram capazes de proporcionar maior discriminação dos grupos.

Apesar de não ter sido satisfatório o resultado de predição com os dados do FTIR-ATR modelo Cary 360 para análise RLM, esse equipamento forneceu informações necessárias para discriminar cinco de seis grupos de adulterantes na análise discriminante.

Com a análise de regressão múltipla Rebechi et al. (2016) estudaram na Argentina a adulteração com do leite com gordura animais (sebo e banha de porco) com concentrações de 2%, 5%, 10% e 15% de adulteração, por meio da cromatografia gasosa, os modelos foram capazes de detectar adulteração superior a 10% de sedo e 5% de banha de porco, *Backward* foi o melhor modelo para as duas adulterações com coeficiente de correlação superior a 90%.

## 4.5 Rede Neural Artificial

### 4.5.1 Predição

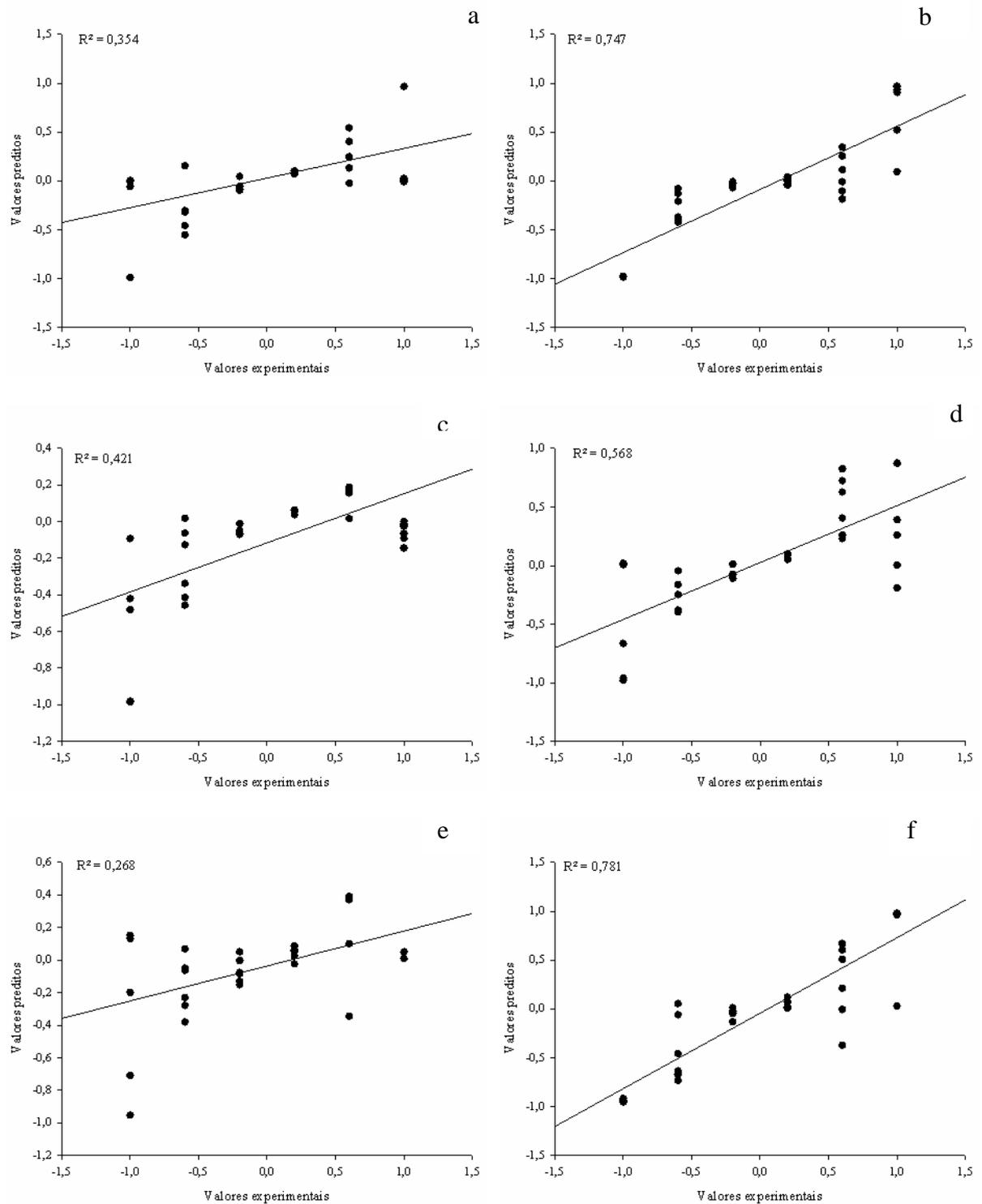
Para a predição, todas as redes testadas apresentaram quinze neurônios na camada de entrada, referente à absorvância obtida no espectro e seis neurônios na camada de saída, referentes a leite sem adulteração e aos cinco níveis de adulterações usadas no estudo. O critério de escolha da arquitetura da rede neural foi a que obteve menor erro na etapa de validação e maior porcentagem de predição correta. Para todas as amostras estudadas, houve discrepância dos pontos em torno da linha de tendência linear (Figura 8) e as redes neurais testadas não foram capazes de prever a quantidade de adulterante nas amostras.

A rede que obteve menor erro para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio foi construída com duas camadas escondidas com quatro neurônios cada camada, e o valor do coeficiente de determinação mostrou-se baixo com o valor de  $R^2 = 0,354$  (Figura 8-a). A rede neural com menor erro para as amostras adulteradas com hidróxido de sódio foi construída com duas camadas escondidas compostas por quatro neurônios em cada camada, e valor do coeficiente de correlação foi de  $R^2 = 0,747$  (Figura 8-b).

Em amostras adulteradas com peróxido de hidrogênio a rede neural que obteve menor erro foi construída com cinco neurônios na primeira camada escondida e três neurônios na segunda camada escondida com o valor de  $R^2 = 0,421$  (Figura 8-c). Em amostras adulteradas com amido, a rede neural que apresentou menor erro foi construída por duas camadas escondidas, com oito e cinco neurônios, com um  $R^2 = 0,568$  (Figura 8-d).

Amostras adulteradas com sacarose a rede neural foi constituída com duas camadas escondidas, a primeira com quatro neurônios e a segunda com três neurônios. Com um valor de  $R^2 = 0,268$  (Figura 8-e), não houve capacidade de predição para as amostras adulteradas com sacarose. O leite adulterado com uréia apresentou melhor coeficiente de correlação das amostras estudadas, com  $R^2 = 0,781$  (Figura 8- f) a rede foi construída com duas camadas escondidas e com cinco neurônios em cada camada.

**Figura 8:** Coeficiente de determinação dos valores experimentais e preditos das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio; (b) hidróxido de sódio; (c) peróxido de hidrogênio; (d) amido; (e) sacarose e (f) uréia



#### 4.5.2 Classificação

Para a classificação, todas as redes neurais artificiais (RNA) testadas obtiveram quinze neurônios na camada de entrada, referente às absorvâncias obtidas nos espectros e dois neurônios na camada de saída referentes às opções de saída (leite e leite adulterado). O critério de escolha da arquitetura da rede neural foi a que obteve menor erro na etapa de validação e maior porcentagem de classificação correta.

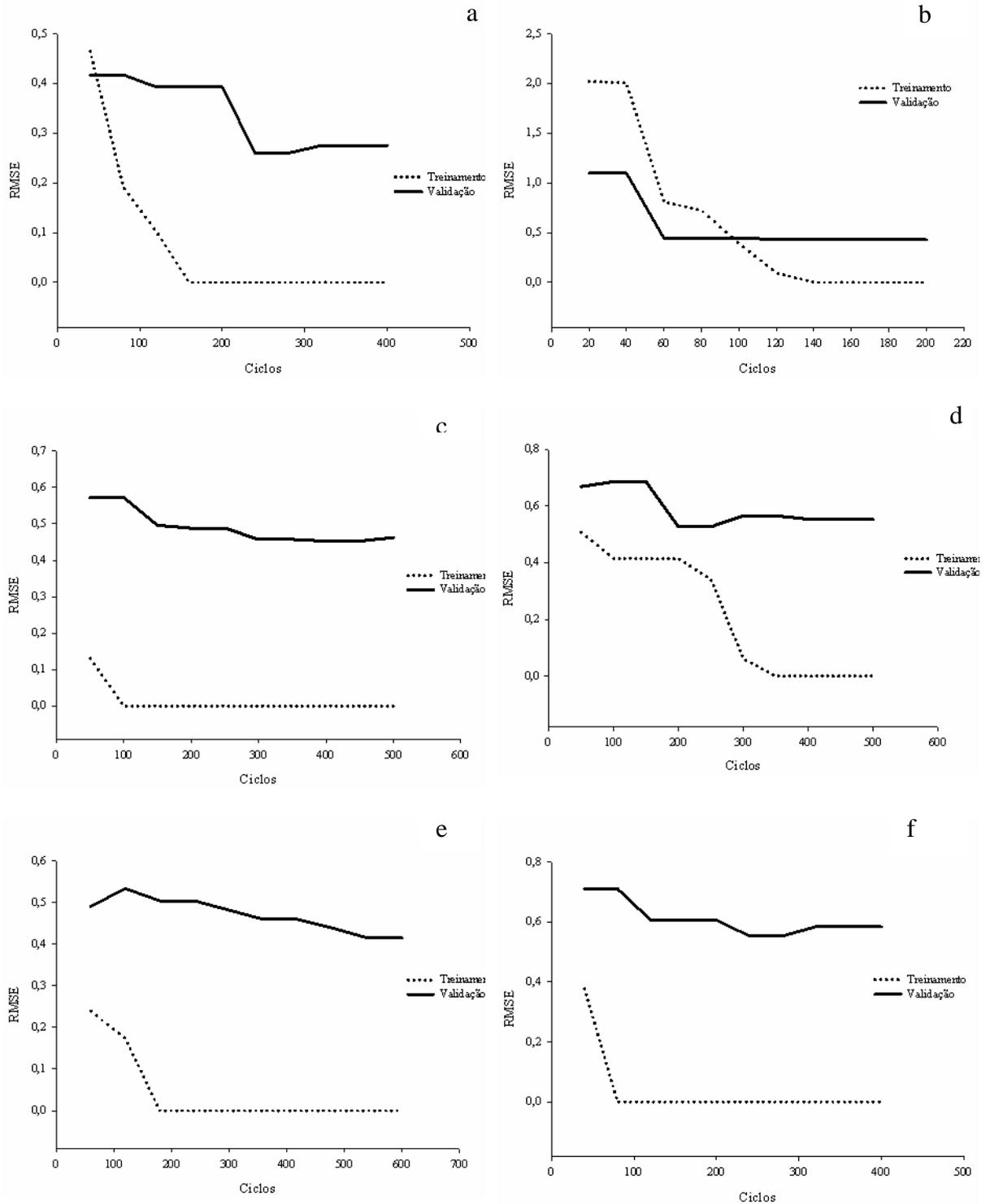
Para leite adulterado com bicarbonato de sódio a rede com duas camadas intermediárias e cinquenta neurônios em cada camada, obteve uma classificação de 80% para leite e 93,2% para leite adulterado, com um RMSE de 0,27. As amostras adulteradas com hidróxido de sódio apresentaram RMSE de 0,42, com rede construída com duas camadas intermediárias e cem neurônios em cada camada, onde apenas 40% das amostras de leite foram classificadas corretamente enquanto que as adulteradas obtiveram 96,6% de classificação correta.

O leite adulterado com peróxido de hidrogênio obteve 80% de classificação para as amostras sem adulteração e amostras adulteradas, com RMSE de 0,46, e uma rede construída com duas camadas intermediárias, a primeira composta por oitenta neurônios e a segunda composta por cinquenta neurônios. A rede que apresentou menor RMSE para leite adulterado com amido foi construída por três camadas intermediárias com cinquenta neurônios. O RMSE encontrado foi 0,55 e uma taxa de classificação de 100% para amostras sem adulteração e 86,6% para as amostras adulteradas com amido.

Para o leite adulterado com sacarose uma rede construída com três camadas intermediárias compostas por cem, cinquenta e vinte neurônios obteve um RMSE de 0,41. Houve 100% das amostras classificadas como leite adulterado e apenas 40% das amostras classificadas como leite sem adulteração. Para as amostras adulteradas com uréia, a rede com duas camadas intermediárias e vinte neurônios em cada obteve um RMSE de 0,58, com 100% de classificação de leite sem adulteração e 76,6% das amostras de leite adulterado.

Para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio, peróxido de hidrogênio, amido, sacarose e uréia o erro de validação foi maior que o erro de treinamento (Figura 9). Na curva de treinamento houve diminuição acentuada do erro para todos os adulterantes, esse comportamento já era o esperado, pois no treinamento o erro sempre tende a diminuir. Já na curva de validação das amostras adulteradas com bicarbonato de sódio (Figura 9-a), peróxido de hidrogênio (Figura 9- c), amido (Figura 9-d) e uréia (Figura 9- f) ocorreram um aumento do erro, e isto é devido à rede neural estar decorando os resultados que foram treinados e perdendo a capacidade de generalização por meio da absorção dos ruídos.

**Figura 9:** Gráfico do RMSE em função do número de ciclos nas etapas de treinamento e validação da rede das amostras de leite com os adulterantes (a) bicarbonato de sódio; (b) hidróxido de sódio; (c) peróxido de hidrogênio; (d) amido; (e) sacarose e (f) uréia



No presente estudo a capacidade de classificação da rede neural artificial foi de 93,2% para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio, 96,6% para amostras com hidróxido de sódio, 80% para amostras com peróxido de hidrogênio, 86,6% para amostras com amido, 100% para amostras com sacarose e 76,6% para amostras com uréia. Com a RNA foi possível identificar amostras adulteradas com bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio com concentração a partir de 0,1%, amostras com amido com concentração a partir de 0,5%, amostras com sacarose com concentração a partir de 2,0% e amostras com uréia com concentração a partir de 6,0%.

É possível afirmar que as RNA's escolhidas obtiveram boas taxas de classificação para todos os adulterantes, fato que não ocorreu nas análises de componentes principais, análise discriminante e análise de regressão linear múltipla, como também identificar a presença de adulterantes quando utilizado em baixas concentrações.

Para a identificação de adulterantes nas amostras obtidas dos produtores de Itapetinga – BA foram utilizadas as redes neurais artificiais, pois esta análise abrange todos os adulterantes usados no estudo com resultados satisfatórios. Para isso foi utilizado o programa *Neural Works* com os dados de treinamento de cada adulterante e as amostras dos produtores como dados de validação. As amostras foram consideradas adulteradas quando a possibilidade foi maior que 78%. Das 249 amostras obtidas de produtores as redes neurais artificiais foram capazes de identificar três leites adulterados com hidróxido de sódio, dois adulterados com amido e um adulterado com uréia.

Rocha et al. (2015) usaram a rede neural artificial para identificar soro de leite em leite fluido com concentrações variando de 0% a 100%, diferentes configurações de rede foram testadas e a melhor configuração obteve 99,99% de acerto usando análises com Raman. Silva (2017) obteve 95,55% de classificação total para amostras de leite de búfala adulterado com 10% a 90% de leite de vaca usando FTIR-ATR.

## V - CONCLUSÕES

Utilizando a Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier foi possível por meio dos espectros a identificação da uréia no leite. Associada às técnicas quimiométricas (Análise de Componentes Principais, Análise Discriminante, Regressão Linear Múltipla e Rede Neural Artificial) foi possível identificar a adulteração no leite cru.

A análise de componentes principais possibilitou a identificação das amostras de leite adulteradas com 10% de água, amido, sacarose e uréia quando utilizado os dados obtidos no FTIR DairySpectFT.

A análise discriminante apresentou na validação uma porcentagem maior que 70% para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio (70%), peróxido de hidrogênio (80%), sacarose (80%) e amido (96,67%) quando utilizado o equipamento FTIR DairySpectFT, e para as amostras adulteradas com bicarbonato de sódio (93,10%), hidróxido de sódio (85,71%), peróxido de hidrogênio (100%), amido (93,33%) e sacarose (70%) quando utilizado o equipamento FTIR-ATR Cary 360.

Com a análise de regressão linear múltipla foi possível obter funções para predição de leite adulterado com amido (89%), sacarose (91%), uréia (84%) e com 10% de água (100%) quando utilizado os dados fornecidos pelo equipamento FTIR DairySpectFT e apenas para adulterações realizadas com bicarbonato de sódio (91%) e uréia (85%) quando utilizado o FTIR-ATR Cary 360.

As RNA's apresentaram melhores taxas de classificação para todos os adulterantes utilizados no estudo quando comparado com as outras técnicas quimiométricas empregadas, com taxa de classificação maior que 76,6% e identificar os adulterantes a partir de baixas concentrações e quando aplicada a amostras obtidas de produtores foi possível identificar que 2,4% das amostras estavam adulteradas.

Desse modo utilizando o FTIR aliado a análises quimiométricas foi possível obter classificação satisfatória para as amostras adulteradas a partir de 0,1% neste estudo.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C. da S.; SILVA, J. B. A. da. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 244-51, 2014.
- AERNOUTS, B; POLSHIN, E.; SAEYS, W.; LAMMERTIN, J. Mid-infrared spectrometry of milk for dairy metabolomics: A comparison of two sampling techniques and effect of homogenization. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, p. 88-97, 2011.
- BARAJAS, M. C. S.; MATIN, M. G.; ESTEBAN, J. S.; HIERRO, J. M. H.; RODILLA, V. M.; QUINTANA, A. M. V.; REVILLA, I.; ORTEGA, I. L.; SANCHO, R. M.; DIEGO, B. C. Prediction of the type of milk and degree of ripening in cheeses by means of artificial neural networks with data concerning fatty acids and near infrared spectroscopy. **Talanta**. v. 116, p. 50-55, 2013.
- BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n.3 p. 846-854. 2007.
- 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 Chemistry**. v. 181, p. 31-37, 2015.
- BRAGA, A. P.; CARVALHO APLE, LUDEMIR TB. **Redes neurais artificiais: teoria e aplicações**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Livro Técnico e Científico; 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017. 42 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 29 de dezembro de 2011. 24 p.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.
- CAMERINI, S.; MONTEPELOSO, E.; CASELLA, M.; CRESCENZI, M.; MARIANELLA, R. M.; FUSELLI, F. Mass spectrometry detection of fraudulent use of cow whey in water buffalo, sheep or goat Italian ricotta cheese. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1240-1248, 2016.
- CARVALHO, B. M. A. de; CARVALHO, L. M. de; ALCÂNTARA, L. A. P.; BONOMO, R. C. F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista Eletrônica de Veterinária**. v. 8, n. 6, p. 1695-7504, 2007.
- CARVALHO, B. M. A. de; CARVALHO, L. M. de; COIMBRA, J. S. dos R.; MINIM, L. A.; BARCELLOS, E. de S.; JÚNIOR, W. F. da S.; DETMANN, E.; CARVALHO, G. G. P. de. Rapid detection of whey in milk powder samples by spectrophotometric and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 174, p. 1-7, 2015.

- CASSOLI, L. D.; SARTORI, B.; MACHADO, P. F. The use of the Fourier Transform Infrared spectroscopy to determine adulterants in raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**. v. 40, n. 11, p. 2591-2596, 2011.
- CHEN, H.; TAN, C.; LIN, Z.; WU, T. Detection of melamine adulteration in milk by near-infrared spectroscopy and one-class partial least squares. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 832-836, 2017.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos, **Revista Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
- COATES, J. P. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Ed. R. A. Meyers, J. Wiley & Sons, Ltda., Chichester, UK, p. 10815-10837, 2000.
- DOMINGO, E. do C.; TIRELI, A.A.; NUNES, C.A.; BATISTA, A.V.; GUERREIRA, M.C.; PINTO, S.A. Rapid extraction of melamine in powdered milk for direct electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 132, p. 535-540, 2015.
- ELMOLLA, E. S.; CHAUDHURI, M.; ELTOUKHY, M. M. The use of artificial neural network (ANN) for modeling of COD removal from antibiotic aqueous solution by the Fenton process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1-3, p. 127-134, 2010.
- FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**, 4. ed, Porto Alegre: Artmed, p. 689-718, 2010.
- FISCHER, I.; HENECKE, F.; BANNES, C.; ZELL, A. **Java Neural Network Simulator – JavaNNS, Version 1.1**. Wilhelm-Schickarad-Institute for Computer Science – Department of Computer Architecture, University of Tübingen, Alemanha, 2001.
- FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 677-684, 2008.
- FREITAS, J. de A. **Introdução à Higiene e Conservação das Matérias-primas de Origem Animal**, São Paulo: Artmed, p. 79-83, 2015.
- GONDIM, C. de S., JUNQUEIRA, R. G., SOUZA, S. V. C. de., RUISÁNCHEZ, I.; CALLAO, M. P. Detection of several common adulterants in raw milk by MID-infrared spectroscopy and one-class and multi-class multivariate strategies. **Food Chemistry**. n. 230. p. 68-75, 2017.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELLI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: UFRGS, p. 44-57, 2001.
- GRELET, C.; FERNÁNDES PIERNA, J. A.; DARDENNE, P.; BAETEN, V.; DEHARENG, F. Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. **J. Dairy Sci**, v. 98, p. 1-11, 2015.
- GUTIÉRRES, R.; VEJA, S.; DÍAZ, G.; SÁNCHEZ, J.; CORONADO, M.; RAMÍREZ, A.; PÉREZ, J.; GONZÁLEZ, M.; SCHETTINO, B. Detection of non-milkfat in milk fat by gas chromatography and linear discriminant analysis. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p. 1846-1855, 2009.
- HAIR JR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E. **Análise Multivariada de Dados**. 6.ed. Bookman, 2009.

HECK, J. M. L.; VAN VALENBERG, H. J. F.; DIKSTRA, J.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**. v. 92, n. 10, 2009.

HENRICHES, S. C.; MACEDO, R. E. F. de; KARAM, L. B. Influência de indicadores de qualidade sobre a composição química do leite e influência das estações do ano sobre esses parâmetros. **Revista Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 12, n. 3, p. 199-208, 2014.

INON, F. A.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Nutritional parameters of commercially liable milk samples by FTIR and Chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 2, p. 401-412, 2004.

JAISWAL, P.; JHA, S. N.; BORAH, A.; GAUTAM, A.; GREWAL, M. K.; JINDAL, G. Detection and quantification of soy milk in cow-buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). **Food Chemistry**. v. 168, p. 41-47, 2015.

JHA, S. N.; JAISWAL, P.; BORAH, A.; GAUTAM, A. K.; SRIVASTAVA, N. Detection and Quantification of urea in milk using Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Food Bioprocess Technology**. v.8, p. 926-933, 2015.

KEPPEL, G. **Design and analysis: A researcher's handbook**, 3<sup>a</sup> ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1991.

KHATAEE, A. R.; ZAREI, M.; POURHASSAN, M. Bioremediation of malachite green from contaminated water by three microalgae: Neural network modeling. **Clean-Soil, Air, Water**, v. 38, n. 1, p. 96-103, 2010.

KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHRAMAN, K. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 3912-3918, 2002.

LARSEN, M. K.; NIELSEN, J. H.; BUTLER, G.; LEIFERT, C.; SLOTS, T.; KRISTIANSEN, G. H.; GUSTAFSSON, A. H. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 7, 2010.

LEI, Y.; QUN, Z.; ZHANG, Y. L.; CHEN, J. B.; SUN, S. Q.; NODA, I. Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 974, n. 1-3, p. 88-93. 2010.

LIU, J.; REN, J.; LIU, Z. M.; GUO, B. H. A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. **Food Chemistry**. n. 172, p. 251-256, 2015.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Revista Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LÓPEZ, M. I.; TRULLOLS, E.; CALLAO, M. P.; RUISÁNCHEZ, I. Multivariate screening in food adulteration: Untargeted versus targeted modeling. **Food Chemistry**. v. 147, p. 177-181, 2014.

LUI, J.; REN, J.; LIU, Z.; GUO, B. A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. **Food Chemistry**. n. 172, p. 251-256, 2015.

- MABOOD, F.; JABEEN, F.; HUSSAIN, J.; AL-HARRASI, A.; HAMED, A.; AL MASHAYKHI, S. A. A.; RUBAIEY, Z. M. A.; MANZOOR, S.; KHAN, A.; IMRANUL, Q. M.; GULANI, H. S. A.; KHAN, A. FT-NIRS coupled with chemometric methods as a rapid alternative tool for the detection & quantification of cow milk adulteration in camel milk sample. **Vibrational Spectroscopy**. n. 92, p. 245-250, 2017.
- MAZUREK, S.; SZOSTAK, R.; CZAJA, T.; ZACHWIEJA, A. Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, n. 138, p. 285-289, 2015.
- MANUELIAN, C. L.; VISENTIN, G.; BOSELLI, C.; GIANGOLINI, G.; CASSANDRO, M.; MARCHI, M. de. Prediction of milk coagulation and acid it ytraits in Mediterranean buffalo milk using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy. **Journal of Dairy Science**. v 100, p. 1-5, 2017.
- MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; OLIVEIRA, J. P. Conservantes bronopol e alizarol: influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do leite cru. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 627-633, 2009.
- MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.
- MONTGOMERY, D. C., PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: John Wiley e Sons, 1982.
- MOORE, J. C., SPINK, J., LIPP, M., Development an application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 4, p. 118-126. 2012.
- MORAES, F. S.; COSTA, M. P. da; SILVA, V. L. de; MOREIRA, R. V. de B. P.; BARROS, R. F. de; MÁRSICO, E. T.; CONTE-JUNIOR, C. A.; SILVA, A. C. de O. Development of HPLC-ELSD method for determination of maltodextrin in raw milk. **Food Chemistry**, n. 230, p. 346-351, 2017.
- NASCIMENTO, C. F.; SANTOS, P. M.; PEREIRA FILHO, E. R.; ROCHA, F. R. P. Recent advances on determination of milk adulterants. **Food Chemistry**. n. 221, p. 1232-1244, 2017.
- NICOLAU, N.; XU, Y.; GOODACRE, R. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of diferente milk species. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 12, p. 5651-5660, 2010.
- NOGALES, J. M. R. Approach to the quantification of milk mixtures by partial least-squares, principal componente and multiple linear regression techniques. **Food Chemistry**. n. 98, p. 782-789, 2006.
- PANCHAL, I.; SAWHNEY, I. K.; SHARMA, A. K.; DANG, A. K. Classification of healthy and mastitis Murrah buffaloes by application of neural network models using yield and milk quality parameters. **Computers and Electronics in Agriculture**. v. 127, p. 242-248, 2016.
- PAPPAS, C. S.; TARANTILIS, P. A.; MOSCHOPOULOU, E.; MOATSOU, G.; KANDARAKIS, I.; POLISSIOU, M. G. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 106, n.3, p. 1271-1277, 2008.
- PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. de F.; PERALES, L. de la H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos - Alimentos de Oríem Animal**, v. 2, Porto Alegre: Artmed, p. 13-37, 2005.

PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. de A.; FERRÃO, S. P.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 226-233, 2014.

PRATA, L. F. **Fundamentos de Ciência do Leite**. Ed. 2, Funesp, 2001.

RAGNO, G.; IOELE, G.; RISOLI, A. Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of eno-to-four component systems. **Analytica Chimica Acta**, n. 512, p. 173-180, 2004.

RAI, P.; MAJUMDAR, G. C.; DASGUPTA, S.; de S. Prediction of the viscosity of clarified fruit juice using artificial neural network: a combined effect of concentration and temperature. **Journal of Food Engineering**. V. 68, n. 4, p. 527-533, 2005.

REBECHI, S. R. VÉLEZ, M. A.; VAIRA, S.; PEROTTI, M. C.; Adulteration of Argentinean milk fats with animal fats: Detection by fatty acids analysis and multivariate regression techniques. **Food Chemistry**. n. 192, p. 1025-1032, 2016.

ROCHA, R. A. da. PAIVA, I. M. ANJOS, V. FURTADO, M. A. M. BELL, M. J. V. Quantification of whey in fluid milk using confocal Raman microscopy and artificial neural network. **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 6, 2015.

ROCKENBAR, M. Consumidor volta a acreditar no leite gaúcho. **Revista Leite**, v. 19, n. 5, p. 7-14, 2014.

ROSA, L. S.; GARBIN, C. M.; ZAMBONI, L.; BONACINA, M. S. Avaliação da qualidade físico-química do leite ultra pasteurizado comercializado no município de Erechim – RS. **Revista Visa em Debate, Sociedade, Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 3, p. 99-107, 2015.

RUSCHEL, C. F. C.; HUANG, C. T.; SAMIOS, D. FERRÃO, M. F. Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) de blendas de biodiesel/diesel. **Revista Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 810-815, 2014.

SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, 2004.

SANTANA, V. R. **Validação de metodologia para detecção e quantificação de Ivermectina em leite de vaca com uso de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)**. 75p. Dissertação Programa de pós-graduação em engenharia e ciência de alimento. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2017a.

SANTANA, V. R.; BATISTA, A. S.; GONÇALVES, B. R. F.; VIEIRA, R. R.; SANTOS, C. M. B.; SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B.; FERNANDES, S. A. de A. Uso da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) como teste de triagem de ivermectina em leite. XXVII Congresso de Zootecnia, Santos-SP, 2017b.

SANTOS, P. M.; FILHO, E. R. P.; SAONA, L. E. R. Application of hand-held and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p. 1205-1211, 2013a.

- SANTOS, P. M.; FILHO, E. R. P.; SOANA, L. E. R. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared micro spectroscopy and chemometrics analysis, **Food Chemistry**, v. 138, p. 19-24, 2013b.
- SGARBIERI, V. C. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 43-56, 2005.
- SILVA, P. H. F. da. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Revista Química Nova**, n. 6, 1997.
- SILVA, I. N.; SPATTI, D. H.; FLAUZINO, R. A. **Redes Neurais Artificiais: para engenharia e ciências aplicadas**. São Paulo: Editora Artliber Ltda, p. 399, 2010.
- SILVA, R. A. B.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A.A. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. **Food Chemistry**, v. 133, p. 200-204, 2012.
- SILVA, L. K. R.; GONÇALVES, B. R. F.; HORA, F. F.; SILVA, G. J.; CONCEIÇÃO, D. G. SANTOS, L. S.; FERRÃO, S. P. B. Detection of buffalo milk tampering with cow milk using the ATR-FTIR method and principal component analysis. VI Congresso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (Cicytac 2016), Córdoba, 2016.
- SILVA, L. K. R. **Detecção da adição do leite de vaca ao leite de búfala por meio da técnica espectroscópica FTIR-ATR e quimiometria**. 88p. (Dissertação) Programa de pós-graduação em engenharia e ciência de alimento. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2017.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, 5 edição, 2006.
- SOARES, L. V. **Curso Básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos**. Manole, Barueri, 2006.
- 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 Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 692-695, 2011.
- SOUZA, A. M. de; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte 1. **Revista Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.
- STOOP, W. M.; BOVENHUIS, H.; HECK, J. M. L.; VAN ARENDONK, J. A. M. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, 2009.
- STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, 2004.
- TABACHNICK, B., FIDELL, L. S. **Using multivariate statistics**. 3ª ed. New York: Harper Collins, 1996.
- TEWARI, J. C.; MALIK, K. In situ laboratory analysis of sucrose in sugarcane bagasse using attenuated total reflectance spectroscopy and chemometrics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 200-207, 2007.

- TOLEDO, P. R. A. B. de; MELO, M. M. R. de; PEZZA, H. R.; TOCI, A. T.; PEZZA, L.; SILVA, C. M. Discriminant analysis for unveiling the origin of roasted coffee samples: A toll for quality control of coffee related products. **Food Control**. v. 73, p. 164-174, 2017.
- TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da qualidade do leite**. 5ª ed. Santa Maria: UFSM, p. 207, 2013.
- VÁSQUEZ, N.; MAGÁN, C.; OBLITAS, J.; CHUQUIZUTA, T.; AVILA-GEORGE, H.; CASTRO, W. Comparison between artificial neural network and partial least squares regression models for hardness modeling during the ripening process of Swiss-type cheese using spectral profiles. **Journal of Food Engineering**. v. 219, p. 8-15, 2018.
- VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2 ed. p. 782, 2006
- WATTIAUX, M. Dairy Essentials Madison: **Babcock Institute for International Dairy Research and Development**. 2006.
- WICKLIN, R. **Statistical Programming with SAS/IML® Software**. NC:SAS Institute Inc. 2010.
- YONG, L.; WANG, Y.; YANG, D.; LIU, Z.; ABERNETHY, G.; LI, J. Investigation of concentration of thiocyanate ion in raw cow's milk from China, New Zealand and the Netherlands. **Food Chemistry**, v. 215, p. 61–66, 2017.
- ZALESKA, H.; TOMASIK, P.; LII, C. Y. Formation of carboxymethyl cellulose-casein complexes by electrosynthesis. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 215-224. 2002.
- ZUBEN, F. J. V. Uma caricatura funcional de redes neurais artificiais. **Revista SBRN**. v. 1, n. 2, p. 66-76, 2003.