

BRUNA MARA APARECIDA DE CARVALHO

**DETECÇÃO DE SORO DE QUEIJO EM LEITE POR
ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

BRUNA MARA APARECIDA DE CARVALHO

**DETECÇÃO DE SORO DE QUEIJO EM LEITE POR
ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2007.

Prof.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof.^a Valéria Paula Rodrigues Minim

Prof. Edilton de Souza Barcellos

Prof. Edenio Detmann

Prof. Luis Antonio Minim
(Orientador)

*“E ainda se vier noites traiçoeiras
Se a cruz pesada for, Cristo estará contigo
O mundo pode até
Fazer você chorar
Mas Deus te quer sorrindo.”*

Carlos Papae

À Deus e à nossa senhora Aparecida, pelas bênçãos que realizam todos os dias na minha vida

OFEREÇO

Aos meus irmãos, Gleidson Giordano e Lorendane Millena, por nossa união e amizade

AGRADEÇO

Aos meus pais, Firmino e Eliene;

Ao meu paizinho que, aos 10 anos já ajudava seu pai no campo, por ter ganhado a vida no suor do seu corpo e por nunca ter medido esforços para educar seus filhos, acreditando que a educação é única forma de garantir o futuro deles.

À minha mãezinha, tão guerreira e tão dócil, por tudo que me ensina como pessoa, por ser esse referencial para mim

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua presença sempre tão real em minha vida, me dando força para seguir em frente. A nossa senhora por ser fiel em todos os momentos.

Aos meus amados pais, Firmino e Eliene, que sempre rezaram, torceram e me ajudaram nas fases difíceis e pela alegria que me proporcionam todos os dias. Feliz eu realmente serei se conseguir passar aos meus filhos tudo que me foi passado por vocês!

À minha avozinha Maria Conceição, pelo carinho, pelo grande exemplo de ser humano, que, apesar de já não se encontrar mais entre nós, se faz presença viva em meu coração, em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao prof. Luis Antonio Minim, pela amizade, paciência e dedicada orientação. Obrigada pelo exemplo de profissionalismo!

À prof.^a e amiga Jane, pela alegria que sempre me recebe e pela serenidade e competência, que a tornam um grande exemplo de mulher.

Ao prof. Edilton pela amizade, humanidade e preciosa ajuda no aperfeiçoamento deste trabalho, agradeço-lhe pelo apoio e experiência transmitida.

Ao prof. Luiz Henrique disponível em todos os momentos, grande incentivador, não mediu esforço para a execução deste trabalho.

Ao inesquecível professor e amigo, Adair Regazzi, por ser um mestre exemplar e por me incentivar para que eu não fraquejasse. Muito grata.

Ao prof. Edenio Detmann pelas valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do DTA, em especial à Geralda pela amizade e profissionalismo, ao Sr. Zé e Sr. Luiz pela torcida, ao Adão e ao Juarez, por nunca terem medido esforços no atendimento.

Ao técnico Márcio Alvarenga, pela amizade e grande colaboração na confecção dos espectros.

Aos meus tios, Aureliano e Ennia Débora, que mesmo de longe tanto me ajudam com seus conselhos, dando-me força para terminar este estudo.

À minha família amada, Braga Carvalho, pelo apoio incondicional, união e por serem motivos de tanta felicidade em minha vida.

À minha irmãzinha, Lorendane Millena, tão nova e tão guerreira, por tudo que me ensinastes. Mais que por mim eu vivo por ela!

Ao meu irmão, Gleidson Giordano, pelo apoio em todos os momentos, por ser meu porto seguro.

Às minhas amigas, Roberta e Maíra Campeche, pela paciência, incentivo e torcida.

Aos amigos Manoel, Clarice, Flávia, Eden, Sebastião e Maura pelo convívio e pelos bons momentos partilhados.

Às minhas novas e boas amigas, Aline Arruda, Flavinha, Rita, Ju, Pati, Lanna pelo agradável convívio.

Ao amigo Omar, pela companhia, pelo positivismo, atenção e bom humor.

Aos companheiros do laboratório, Fabíola, Rafael, Rosana, Bruno, César, pelas alegrias partilhadas.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

BRUNA MARA APARECIDA DE CARVALHO, filha de Firmino de Carvalho Filho e Eliene Braga de Carvalho, nasceu em Pirapora, Estado de Minas Gerais, em 13 de julho de 1983.

Em fevereiro de 2006, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Em Maio de 2006 ingressou no Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2007.

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS.....	x
LISTAS DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Leite.....	5
3.1.1. Leite em Pó.....	6
3.1.2. Panorama do Leite no Brasil e no Mundo.....	8
3.2. Soro.....	12
3.2.1. Volume de Produção de Soro de Leite.....	17
3.3. A Fraude em Leite por Adição de Soro.....	18
3.4. Métodos de Detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo....	19
3.4.1. Métodos Analíticos.....	20
3.4.2. Métodos Baseados na Quantificação do Glicomacropéptido	20
3.4.2.1. Origem do Glicomacropéptido.....	21
3.4.2.2. Estrutura do Glicomacropéptido.....	24
3.4.2.3. Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) para a avaliação do glicomacropéptido.....	24
3.5. Espectroscopia no Infravermelho.....	26
3.5.1. O Espectro Infravermelho e Vibrações Moleculares.....	28
3.5.2. Princípio do Método.....	29

3.5.2.1. Espectroscopia na região do Infravermelho.....	29
3.5.2.2. Fundamentos Teóricos.....	30
3.5.2.3. Espectroscopia no infravermelho baseada na transformada de Fourier (FT-IR).....	35
3.5.2.4. Aplicações espectroscopia no infravermelho em alimentos.....	38
3.6. Quimiometria – Tratamento dos Dados.....	39
3.6.1. Calibração Multivariada.....	40
3.6.1.1. Análise Exploratória.....	41
3.6.1.1.1. Análise de Componentes Principais (ACP).....	41
3.6.1.1.2. Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	45
3.6.1.1.2.1. Critério de Seleção do Número de LV's.....	50
3.6.1.2. Classificação.....	52
3.6.1.2.1. Análise Discriminante.....	52
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1 Amostras.....	56
4.2. Alteração com o Glicomacropéptídeo.....	56
4.3. Alteração com Soro de Queijo.....	57
4.4. Instrumentação (FT-IR) e condições de análise.....	57
4.5. Pré-processamento dos dados espectrais.....	58
4.5.1. Dados centrados na média.....	58
4.6. Análise Quimiométrica.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 Análises Exploratórias.....	63
5.1.1. Análise por Componentes Principais (ACP).....	63
5.1.1.1. A Interferência do GMP no Espectro do Leite e do Soro.....	63

5.1.1.2. A Detecção e Quantificação da adição de soro.....	69
5.2. Análise de Discriminante (AD).....	75
5.3. Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	82
6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8. APENDICE.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais países produtores de leite, 2004.....	9
Figura 2 - Produção de leite nacional e por regiões, 1990-2004 (milhões de litros).....	11
Figura 3 - Produção de soro no Brasil.....	18
Figura 4 - Estrutura primária da κ -caseína (variante B) mostrando os pontos de mutação para a variante A e o ponto de clivagem da renina, no processo de coagulação.....	21
Figura 5 - Curva de energia para o oscilador anarmônico.....	34
Figura 6 - Esquema simplificado de um equipamento de FTIR.....	35
Figura 7 - Diagrama esquemático do FTIR Spectrum 1000, utilizado no presente trabalho.....	36
Figura 8 - Interferograma ilustrativo obtido com o equipamento Perkin Elmer Spectrum 1000.....	37
Figura 9 - Representação gráfica da ACP.....	45
Figura 10 - Distribuição dos scores discriminantes dos grupos A e B. (a) representa uma separação boa dos grupos. (b) representa uma separação ruim dos grupos (Fonte: Hair, et al., 1998).....	53
Figura 11 - Análise discriminante entre dois grupos A e B. A' e B' são as contribuições dos grupos, V1 e V2 são as medidas e Z é o eixo dos scores discriminantes (Fonte: Hair et al, 1998).....	55
Figura 12 - Espectro de Absorção no Infravermelho.....	58
Figura 13 - Espectros médios das amostras de Leite adicionadas em onze proporções de GMP.....	61

Figura 14 - Espectros médios das amostras de Leite adicionadas em doze proporções de Soro.....	61
Figura 15 - Faixa de comprimento de onda explorada no trabalho.....	62
Figura 16 - Gráfico de Escores (<i>scores</i>) da PCA com as variáveis 109 variáveis de comprimento de onda, expressas pela $CP1+CP2=97,03\%$	67
Figura 17 - Gráfico de Escores (<i>scores</i>) da PCA com as 98 variáveis expressas pela $CP1+CP2=95,28\%$	72
Figura 18 - Espectros totais e médios utilizados na calibração do modelo.....	83
Figura 19 - Espectros totais e médios utilizados na validação/predição externa do modelo.....	84
Figura 20 - Região selecionada para estudo nos conjuntos de calibração e validação/predição.....	85
Figura 21 - Conjuntos dos dados de calibração e validação/predição centrados na média.....	85
Figura 22 - PRESS em função do número de componentes principais (ou variáveis latentes).....	87
Figura 23 - Curva de regressão obtida na etapa de calibração para o modelo.....	89
Figura 24 - Gráfico de Resíduos de Student (corrigidos pela leverage) <i>versus</i> Leverage para amostras do conjunto do modelo construído.....	90
Figura 25 - Coeficientes do modelo calibrado para a detecção de soro de leite em amostras de leite.....	91
Figura 26 - Estatística T^2 de Hotelling para os vetores de médias das amostras utilizadas no conjunto de calibração.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição quantitativa do leite.....	6
Tabela 2 - Consumo Per Capita Mundial de Leite em Pó Integral – 2000/2006.....	8
Tabela 3 - Comparação da composição do soro doce e soro ácido.....	13
Tabela 4 - Composição de vitaminas do soro de leite.....	14
Tabela5 - Composição dos principais minerais do soro doce e soro ácido.....	14
Tabela 6 - Composição do extrato seco do soro de queijo.....	15
Tabela 7 - Composição de aminoácidos do soro de queijo cheddar.....	16
Tabela 8 - Principais características físico-químicas das caseínas do leite	22
Tabela 9 - Composição centesimal do leite utilizado no trabalho.....	56
Tabela 10 - Estimativas dos autovalores associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de GMP.....	64
Tabela 11 - Coeficientes de ponderação (autovetores) associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de GMP.....	65
Tabela 12 - Escores dos dois primeiros componentes principais (CP ₁ , CP ₂) em relação as 11 amostras de leite adulteradas com GMP.....	66
Tabela 13 - Estimativas das cargas associadas às variáveis nos dois componentes principais.....	68
Tabela 14 - Estimativas dos autovalores associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de Soro.....	70
Tabela 15 - Estimativas dos autovalores associados as variáveis estudadas (após descarte das variáveis de menor importância) nas amostras de leite adicionadas de Soro.....	71

Tabela 16 - Coeficientes de ponderação (autovetores) associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de soro.....	73
Tabela 17 - Descrição dos grupos utilizados na análise discriminante de Anderson.....	76
Tabela 18 - Classificação obtida na análise discriminante de Anderson para os quatro grupos de amostras de leite adulterado com soro.....	77
Tabela 19 - Classificação obtida na análise discriminante de Anderson com validação externa para os quatro grupos de amostras de leite adicionado com soro.....	79
Tabela 20 - Resultado da validação cruzada dos modelos de calibração.....	86
Tabela 21 - Variância explicada para os blocos X e Y.....	88
Tabela 22 - Resultado da validação externa dos modelos para a determinação do teor de soro, em %.....	91

RESUMO

CARVALHO, Bruna Mara Aparecida de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Detecção de soro de queijo em leite por espectrofotometria no infravermelho.** Orientador: Luis Antonio Minim. Co-Orientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Luis Henrique Mendes da Silva.

A detecção de soro de queijo no leite em tempo real é um problema particularmente complexo, porque as análises usuais da composição do leite não podem ser realizadas rapidamente. Neste trabalho desenvolveu-se uma metodologia para detecção de soro adicionado em leite em pó por meio da técnica do infravermelho médio (MIR). Inicialmente foram avaliados, através da análise de componentes principais (ACP), espectros de amostras de leite adicionadas de glicomacropéptido (GMP) em diferentes proporções, a fim de selecionar a faixa de comprimento de onda em que o esse composto aparece no espectro. Após a seleção, foram avaliados espectros de amostras de leite adicionadas de soro lácteo em diferentes proporções e, com o intuito de detectar essa adição, empregaram-se técnicas de estatística multivariada tais como: análise de componentes principais (ACP), geralmente utilizada como método de análise exploratória; análise discriminante (AD) muito utilizada para a classificação de amostras e mínimos quadrados parciais (PLS) mais utilizada em problemas de calibração. As técnicas estatísticas empregaram-se bem na seleção de faixas de comprimento de onda onde o GMP aparece no espectro e na detecção do soro nas amostras de leite, sendo calibrado modelos para a detecção e quantificação de soro em amostras desconhecidas.

ABSTRACT

CARVALHO, Bruna Mara Aparecida de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007. **Detection of the addition of whey to milk by mid-infrared spectroscopy (MIR)**. Adviser: Luis Antonio Minim. Co-Advisers: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Luis Henrique Mendes da Silva.

The detection in real time of whey in milk is a particularly complex problem, because the usual analysis for determination of milk chemical composition cannot be accomplished quickly. In this work, a method for detection of whey added in powder milk was developed through the technique of the mid-infrared spectroscopy (MIR). Initially, spectral data of milk samples added with glycomacropeptide (GMP) in different proportions were appraised by principal component analysis (ACP), with the purpose of selecting the range of wavelength which this composition appears in a spectrum. After the wavelength selection, specters of milk sample added with whey in different proportions were determined. In order to detect this adulteration, multivariate analysis techniques were used, such as principal component analysis (ACP), usually used as method of exploratory analysis; discriminant analysis (AD), which is used for the classification of samples and partial least squares (PLS), the most used in calibration problems. The statistical techniques evaluated in the present work were successfully used in the selection of the wavelength range, which the GMP appears in the spectrum, and for detection of whey in milk samples. In this way, statistical models were calibrated for detection and quantification of whey in unknown samples.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais nutritivos e completos encontrados na natureza. Em decorrência do conhecido valor nutricional e do acesso relativamente fácil por parte da população, o leite possui importante participação dentro da dieta e da cultura alimentar brasileira. Sendo assim, a qualidade do leite consumido no país constitui constante preocupação de técnicos e autoridades competentes ligadas à área de saúde e laticínios.

A legislação brasileira estabelece que o leite pasteurizado, esterilizado e em pó não podem ser adicionados de soro de queijo. A adição não é totalmente proibida e, caso seja feita, o produto final deverá ser comercializado como “Bebida Láctea” (produto de valor mais acessível). Entretanto, devido à disponibilidade e ao baixo custo do soro, torna-se economicamente atrativa a adição, sem especificação, desse derivado ao leite, prejudicando assim o consumidor e as empresas concorrentes que seguem a legislação (ALVIN, 1992).

As análises convencionais para a avaliação da qualidade de alimentos se baseiam em testes físicos e químicos que dependem tempo excessivo, consomem muitos reagentes químicos e necessitam de equipamentos e mão-de-obra especializada. Para contornar estes problemas, os métodos por espectroscopia na região do infravermelho associados às técnicas estatísticas de análise dos resultados têm tido grandes avanços com diversas aplicações nas análises de alimentos e são considerados alternativos às análises físico-químicas convencionais de controle de qualidade de alimentos.

A aplicação da espectroscopia no infravermelho apresentou um crescimento rápido com o aumento da eficácia da instrumentação em combinação com o desenvolvimento de métodos quimiométricos. Os métodos quimiométricos são considerados poderosas ferramentas para processar a vasta quantidade de informações geradas pelas técnicas instrumentais modernas (MORGANO et al., 1999; FERREIRA et al., 2000). Assim, com a junção de técnicas de espectroscopia na região do infravermelho e métodos multivariados de análise, tempo, custo, reagentes e mão-de-obra podem ser poupados.

A aplicação de métodos multivariados tem possibilitado análises quantitativas no infravermelho de diferentes propriedades dos alimentos como, por exemplo, o teor de carboidratos, de cinzas, de açúcares (MORGANO et al., 2003), de lipídios, de cafeína (MORGANO et al., 2001) e taninos (FERRÃO et al., 2003), entre outras, em diferentes matrizes de alimentos. Os modelos de regressão por mínimos quadrados parciais estão entre os mais utilizados em calibração multivariada.

Neste trabalho foram realizadas análises espectrofotométricas em matrizes de leite adicionado de glicomacropéptido (GMP) e de soro lácteo com o objetivo de estudar as modificações causadas pela influência do GMP no espectro de infravermelho do leite e, desse modo, detectar a adição do soro nas amostras de leite em pó. Dentre as técnicas estatísticas multivariadas, foram empregadas a análise por componentes principais (ACP), análise discriminante (AD) e mínimos quadrados parciais (PLS), para a interpretação

dos resultados encontrados referentes ao GMP e ao soro presentes nas diferentes amostras de leite em pó.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram:

Estudar a interferência do glicomacropéptido no espectro de infravermelho, por meio da análise de componentes principais (ACP), a fim de determinar a faixa de comprimento de onda em que esse composto aparece.

Desenvolver modelos de classificação, por meio da análise discriminante (AD), para amostras de leite adicionadas de soro lácteo em diferentes proporções.

Calibrar modelos para a determinação quantitativa de soro de queijo em amostras de leite em pó usando a espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier combinada com o método PLS de regressão.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leite

O leite, devido à sua riqueza de nutrientes, é considerado alimento quase completo para o homem e, portanto, amplamente comercializado e consumido pela população mundial. Na literatura, o termo leite é usado para indicar leite cru (*in natura*) produzido por vacas em lactação. Para especificar outra origem do leite, o nome do animal produtor é adicionado. O leite constitui alimento que possui perfeito balanço de nutrientes, fornecendo ao homem macro e micro nutrientes indispensáveis ao crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde.

O leite apresenta-se como emulsão composta, basicamente, por 87,5% de água e 12,5% de sólidos totais que estão suspensos ou dissolvidos na água (Tabela 1). Constitui matéria prima de extrema versatilidade tecnológica, advinda de sua própria composição, cujos constituintes, isoladamente ou em conjunto, proporcionam a obtenção de imensa gama de derivados. Dentre os mais de 100 componentes diferentes identificados no leite, são encontradas presenças importantes como proteínas, cálcio, fósforo, vitamina A e várias vitaminas do complexo B, especialmente riboflavina e vitamina B12.

Tabela 1 - Composição quantitativa do leite

Componente	Limites de variação (%)	Valor médio (%)
Água	85,5 – 89,5	87,5
Sólidos totais	10,5 – 14,5	12,5
Gordura	2,5 – 6,0	3,9
Proteínas	2,9 – 5,0	3,4
Lactose	3,6 – 5,5	4,8
Minerais	0,6 – 0,9	0,8

Fonte: Alfa Laval (1990)

3.1.1. O leite em pó

A idéia de desidratar o leite e transformá-lo em produto em pó é atribuída ao americano Gail Borden. O objetivo era facilitar o transporte e armazenamento. Quando sua descoberta foi patenteada, em 1856, a invenção não despertou interesse, até a guerra civil dos Estados Unidos.

A secagem do leite para obtenção do produto em pó está configurada entre as diversas tecnologias para o seu aproveitamento, além de promover o aumento da vida de prateleira em decorrência da redução da atividade de água (a_w) do produto. Neste tipo de processo, os nutrientes são conservados quase que completamente. Outras vantagens desta tecnologia é que o produto em pó possibilita um transporte mais econômico, planejamento de produção, distribuição e a fabricação de diversos derivados.

A produção de leite no Brasil é elevada; porém, com relação ao leite em pó, a produção industrial ainda não abastece as necessidades do país. As indústrias brasileiras têm investido na produção de leite em pó, não só para

suprir as necessidades do mercado interno, mas também visando a conquista do mercado externo.

O consumo mundial de leite em pó integral está apresentado na tabela 2. O leite em pó, além do lugar de destaque na alimentação da população, possui grande importância sob o ponto de vista econômico. Em 1997, o Brasil importou mais de US\$ 400 milhões em produtos lácteos, dos quais, aproximadamente, o leite em pó representou 60%, demonstrando o potencial deste mercado consumidor.

Tabela 2 - Consumo Per Capita Mundial de Leite em Pó Integral – 2000/2006

Países	kg / pessoa / ano						
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006*
AMÉRICA DO NORTE	0,4	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4
Estados Unidos	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
México	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
AMÉRICA DO SUL	12,9	13,9	12,9	12,2	12,5	12,6	7,9
Argentina	2,4	2,4	2,5	2,2	2,2	2,3	2,2
Brasil	2,2	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Chile	4,1	4,0	3,5	3,3	3,3	3,3	3,3
Venezuela	4,2	5,1	4,5	4,3	4,6	4,6	n.d.
UNIÃO EUROPÉIA**	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
EX – URSS	0,7	1,0	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0
Rússia	0,6	0,8	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8
Ucrânia	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
ÁFRICA	3,6	3,5	3,8	3,7	4,4	4,9	4,9
Argélia	3,6	3,5	3,8	3,7	4,4	4,9	4,9
ÁSIA	4,0	6,5	5,8	6,1	6,3	6,2	2,7
China	0,4	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	0,8
Filipinas	0,6	0,6	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
Indonésia	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
Malásia	0,8	3,6	3,1	3,5	3,5	3,6	n.d.
Taiwan	2,0	1,5	1,6	1,5	1,6	1,4	1,4
OCEANIA	1,3	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5
Austrália	1,0	1,3	1,2	1,3	1,2	1,2	1,3
Nova Zelândia	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2

* Previsto

** União Européia é composta por 25 países

Fonte: USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

Atualizado em junho/ 2006.

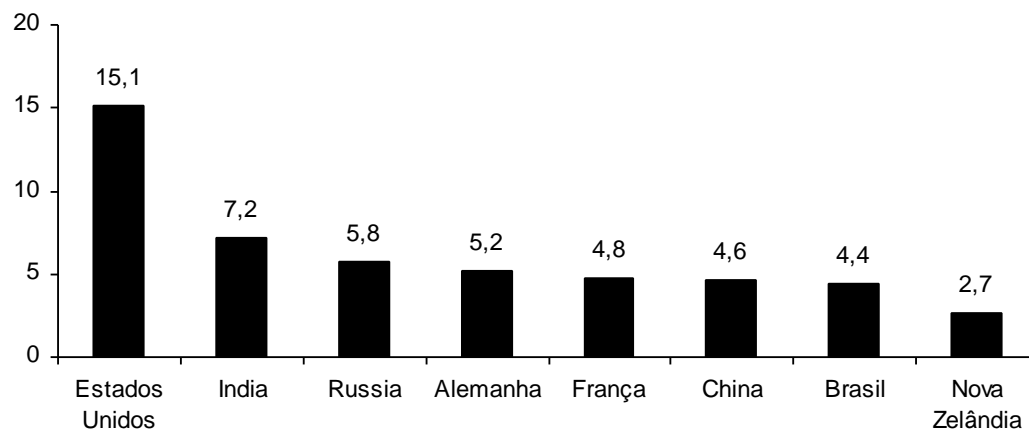
3.1.2. Panorama do leite no Brasil e no mundo

A produção mundial de leite está concentrada em alguns poucos países.

No ano de 2004, a produção mundial de leite foi de 515,8 bilhões de litros, sendo 70% desse volume produzido na Europa e na América. Os quinze

maiores produtores foram, em 2005, responsáveis por 63,4% da produção mundial. Na Figura 1 demonstra-se que somente seis países responderam por 42,9% de todo o volume produzido. Os Estados Unidos da América (EUA) é o maior produtor de leite do mundo, detendo 15,1% da produção mundial.

FIGURA 1 - Principais países produtores de leite, 2004.



Fonte: Zoccal (2004), adaptado pelo autor.

Naquele ano, o Brasil produziu 23,32 bilhões de litros de leite, representando 4,4% da produção mundial e ocupando a sexta posição no *ranking* dos maiores produtores. A produção brasileira, entretanto, vem crescendo e a participação do país na produção mundial de leite vem se tornando mais significativa. Registra-se que, em 1997, a participação do Brasil era de 3,5% e o país era o oitavo maior produtor (BRANDÃO & LEITE, 2002).

A produção de leite no Brasil foi incrementada nas últimas décadas a taxas superiores às do incremento da população, o que significa que a produção *per capita* tem aumentado nos últimos anos. No período de 1970 a

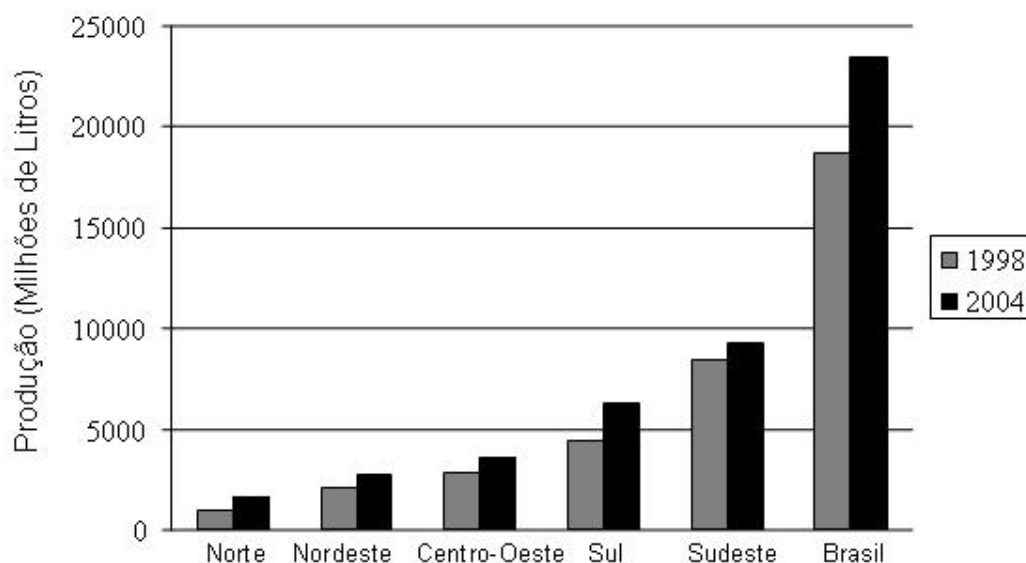
1999, a produção brasileira cresceu, em média, 3,8% ao ano, valor superior, portanto, à taxa anual de crescimento da população, que foi de 1,9% (YAMAGUCHI et al., 2003).

Em virtude da forte concentração no segmento de industrialização do leite, causada pela entrada de novas indústrias de processamento e pelas ocorrências de fusões e aquisições, as estratégias de produção e comercialização adotadas pela indústria de processamento levaram à intensa competição por matéria-prima, resultando no deslocamento geográfico da indústria de lácteos em função de condições mais favoráveis para aquisição de leite “*in natura*”. Em consequência deste deslocamento, o segmento industrial tem provocado incrementos de produção e produtividade para além das bacias leiteiras tradicionais (JANK, 1999). As facilidades no armazenamento e transporte, causadas principalmente pela implantação do tanque de resfriamento e da coleta a granel, pelo lado da unidade de produção, e pela popularização do leite longa vida, pelo lado do consumidor, também viabilizaram a expansão da produção em áreas distantes dos grandes centros consumidores, notadamente no estado de Goiás (MEIRELES, 2001).

Em 2004, as regiões Centro-Oeste e Sul aumentaram a produção em 113,2% e 91,5%, respectivamente, a região Sudeste, principal produtora no país, registrou crescimento de apenas 33,5%. Também merece destaque a região Norte. Embora com pequena participação na produção nacional, esta aumentou a sua produção em 199,6%. O pior desempenho foi obtido pela região Nordeste, cujo crescimento atingiu apenas 32,3%.

De acordo com os dados da Figura 2, observa-se que a produção está se expandindo de forma mais acelerada em estados do Norte e Centro-Oeste, notadamente Goiás, Rondônia e Pará. As áreas de maior concentração da produção de leite não são distribuídas de forma homogênea no país. No ano de 2004, cerca de 73% do volume produzido concentraram-se nos estados de Minas Gerais, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina. Contudo, percebe-se que os maiores produtores de leite ainda são os estados de Minas Gerais, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo que, juntos, totalizam 66,7% da produção nacional. Dessa maneira, ainda é latente a importância destes Estados como referência no sistema agroindustrial do leite.

FIGURA 2 - Produção de leite nacional e por regiões, 1990-2004.



Fonte: Brasil/MAPA (2006), adaptado pelo autor.

Do volume produzido de leite, cerca de 63% destinam-se para o mercado de derivados do leite e, desses, 9% são direcionados para a produção de leite em pó.

3.2. Soro

Subproduto do processamento de queijo, o soro apresenta importância relevante, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional. Segundo KOSIKOWSKI (1979), o soro de leite é a porção aquosa do leite que se separa da massa durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína, e que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite representados por proteínas, sais minerais, vitaminas e, principalmente, lactose (MELLO, 1989). Cerca de 85 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo resultam em soro.

Na Idade Média, o soro era utilizado em drogas farmacêuticas como componente de unguentos para queimaduras, como bálsamo para a pele ou como neutralizante para cabelos, mas, raramente, era usado na alimentação humana (KOSIKOWSKL, 1979). O uso de soro apresentou grande evidência em meados do século XIX, na Europa Ocidental, como a criação de mais de 400 “casas de soro”, onde era realizada a comercialização do soro “*in natura*”. Por volta de 1940, na Europa Central, foi usado no tratamento de dispepsia, uremia, gota, anemia, artrite, doenças hepáticas e até tuberculose, quando se recomendava a ingestão de cerca de 1.500 g/dia de soro de leite (HOLSINGER et al., 1974).

Basicamente, há dois tipos de soro lácteo, (HOMEM, 2004):

a) Soro doce ($6 < \text{pH} < 7$) – obtido a partir da fabricação de queijos tipo “cheddar”, prato, minas e similares; e

b) Soro ácido ($\text{pH} < 5$) – obtido a partir da fabricação de queijos tipo “cottage”, ricota ou de caseína.

Tanto o soro doce como o soro ácido, são compostos, primordialmente, por água e nesta estão presentes solutos, como lactose, proteínas solúveis, sais minerais e traços de gordura. (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da composição do soro doce e soro ácido.

Componente	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Água	93 - 94	94 - 95
Sólidos totais	6 - 7	5 - 6
Lactose	4,5 - 5	3,8 - 4,2
Proteína (N x 6,38)	0,8 - 1	0,6 - 1
Nitrogênio não-protéico (% do N Total)	22	27
Ácido láctico	0,1 - 0,2	0,7 - 0,8
Cinzas	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8

Fonte: Harper & Seiberling (1976)

O soro de leite é rico em vitaminas, cálcio e fósforo, como mostrado nas Tabelas 4 e 5. A concentração dos minerais varia notavelmente em função do pH em que está sendo elaborado o queijo, podendo variar de 0,5% a 0,8% dos sólidos totais do soro (LUQUET, 1993).

Tabela 4 – Composição de vitaminas do soro de leite.

Vitaminas	mg/100mL
Tiamina	40,0
Ácido pantotênico	80,0
Vitamina B ₆	350,0
Biotina	20,0
Vitamina B ₁₂	1,5
Riboflavina	0,15
Ácido nicotínico	70,0

Fonte: FAO (1974)

Tabela 5 – Composição dos principais minerais do soro doce e soro ácido.

Minerais	Soro doce (mg/100g)	Soro ácido (mg/100g)
Cálcio	36,5	92,8
Magnésio	6,5	9,0
Sódio	45,5	39,8
Potássio	123	153,0
Fósforo	43,0	58,0

Fonte: Wong, (1988)

O extrato seco soro representa, em média, 6-7% do seu peso total. Sua composição média está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição do extrato seco do soro de queijo.

Composição	Porcentagem
Lactose	70 a 80%
Compostos nitrogenados	10 a 14%
Matérias minerais	1,5 a 4%
Lipídeos	0,05 a 0,6%

As proteínas do soro constituem cerca de 20% da proteína total do leite. Na maioria, são proteínas globulares desnaturáveis pelo calor, tais como - lactoglobulina, -lactoalbumina, glicomacropeptídeo, entre outras (ZADOW, 1986).

A qualidade do soro de leite está associada à quantidade de lactose e à qualidade de suas proteínas que, apesar de não estarem presentes em quantidades significativas, apresentam qualidade nutricional relevante.

A qualidade nutricional de uma proteína depende do padrão e concentração de aminoácidos essenciais (HARPER, 1991). As proteínas de origem animal são relativamente caras e seu suprimento para população constitui um dos maiores problemas mundiais. As proteínas do leite e proteínas do soro contêm, em quantidades variadas, todos os aminoácidos necessários aos seres humanos e possuem um excedente de aminoácidos essenciais que as tornam valiosas na suplementação de proteínas vegetais (CHEFTEL et al., 1986). Como exemplo, a composição de aminoácidos do soro de queijo cheddar encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição de aminoácidos do soro de queijo cheddar.

Aminoácido	Soro (%)
Lisina	1,12
Histidina	0,24
Arginina	0,29
Treonina	0,63
Valina	0,67
Metionina	0,23
Isoleucina	0,60
Leucina	1,32
Fenilalanina	0,42
Triptofano	0,24
Ácido aspártico	1,24
Serina	0,59
Ácido glutâmico	2,16
Prolina	0,64
Glicina	0,25
Alanina	0,56
Cistina	0,24
Tirosina	0,36

Fonte: WONG et al. (1978)

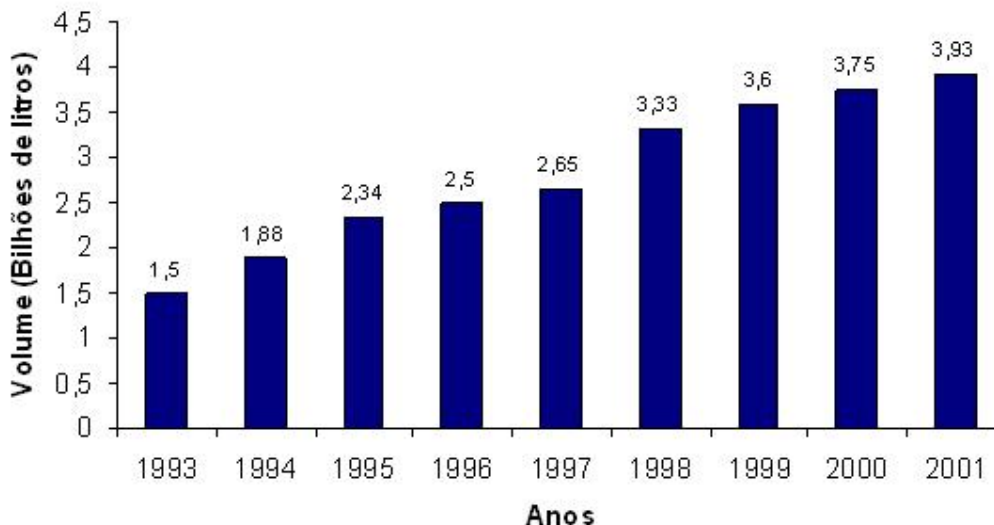
A caseína, pelo seu valor nutricional, é usada rotineiramente como proteína de referência para avaliar a qualidade protéica em alimentos. As proteínas do soro apresentam quociente de eficiência protéica (PER) de 3,4, superando o da caseína, que é de 2,9, em razão do seu maior teor de aminoácidos sulfurados. Além disso, a α -lactoalbumina contém quantidades significativas de triptofano.

3.2.1. Volume de Produção do Soro de Leite

Segundo SCHELHAAS (1991), dos produtos lácteos, o queijo apresentou o maior crescimento na década de 1990. A quantidade de leite usada na fabricação deste produto, no ano de 1997, foi de 31% do total de leite processado.

No Brasil, a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, provindo da fabricação de queijos por coagulação enzimática (mussarela, prato, minas frescal, meia-cura e outros), que são os mais comercializados no país. Já o soro ácido, originário da manufatura de queijos de coagulação ácida, de consumo mais reduzido (ricota e requeijão) e da fabricação de caseína, praticamente inexistente no Brasil, pouco contribui no cômputo geral. De acordo com o Ministério da Agricultura (1989), a produção de soro vem aumentando anualmente como resultado do crescimento da indústria queijeira. Na figura 3 mostra-se a produção de soro no Brasil entre 1993 e 2000.

Figura 3 - Produção de soro no Brasil.



Fonte: Associação Brasileira das Indústrias de Queijo

3.3. A fraude em Leite por Adição do Soro

Inicialmente, a fraude do leite no Brasil restringia-se da adição de água, urina, formol e outras substâncias com o objetivo de alcançar maiores lucros. Com o passar do tempo, surgiram outros tipos de fraudes. Uma delas consiste em aquecer o leite com o objetivo de “aumentar” o teor de caseína e, com isto, conseguir melhor remuneração pelo litro de leite. Atualmente a maior preocupação das autoridades competentes é a adulteração por adição de soro de leite.

Na tentativa de reduzir ações fraudulentas, a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) estabeleceu padrões de Identidade e Qualidade para alimentos e produtos industrializados. Métodos de avaliação de amostras de alimentos foram desenvolvidos para comparação com tais padrões. Estes

métodos, agora aceitos como oficiais ou padrões podem ser divididos em métodos analíticos físicos, químicos, instrumentais, nutricionais, microbiológicos e sensoriais (ADHIKARI, 1992).

Com relação à adulteração do leite, a legislação brasileira é clara e objetiva, quando define que somente são considerados leite fluido (pasteurizado ou UHT) e leite em pó aqueles produtos que não sofreram a adição de produtos não permitidos. Desta forma, percebe-se que a adição de quaisquer outros produtos, tal como o soro, é considerada fraude.

Entretanto, devido ao baixo custo e ao grande volume de produção, torna-se economicamente atrativa a adição desse derivado ao leite. A Legislação Federal prevê, além de outras penalidades, o confisco do produto (BRASIL, 1952).

Devido ao crescimento na produção de leite no Brasil, a prática desse tipo de fraude, financeiramente atrativa, ainda é difícil de ser controlada pelos órgãos de fiscalização, justamente pelo fato da inexistência de métodos de análises rápidos capazes de detecção quantitativa da fraude (HEMMATI e KEENEY, 1979).

3.4. Métodos de Detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo

Vários são os métodos de detecção da fraude em leite por adição de soro. Estes podem ser divididos em métodos analíticos e métodos baseados na detecção e quantificação do glicomacropéptido (GMP). A maioria desses

métodos requer reagentes poluentes, longo tempo de análise e mão-de-obra especializada.

3.4.1. Métodos Analíticos

Diversos métodos analíticos têm sido propostos para a detecção da adulteração de leite com soro de queijo, podendo-se citar, entre outros:

- a quantificação de ácido siálico livre;
- o teor total de sulfidril;
- a proporção cisteína/cistina;
- eletroforese em gel de poliacrilamida,
- método criscópico; e
- número de caseína.

Porém, esses métodos além de demandarem trabalho laboratorial excessivo, são demorados e apresentam limites mínimos de detecção quantitativa muito elevados.

3.4.2. Métodos baseados na quantificação do glicomacropéptido

O soro de queijo obtido por via enzimática (coalho) contém glicomacropéptido (GMP), única fração da caseína contendo glicídeos em sua estrutura, resultante da ação específica da renina sobre κ -caseína (Figura 4) (ALAIS, 1984; DALGLEISH, 1985). A renina é específica para a ligação 105-106 (Phe-Met) da κ -caseína (FOURNET et al., 1979; TOURAINÉ et al., 1987). Como resultado de sua ação sobre a fração protéica, há a liberação do

glicomacropéptido (GMP), que constitui, aproximadamente, um terço dessa fração, e contém a porção C-terminal (aminoácidos 106 a 169) e um resíduo de baixa solubilidade, o para- -caseinato, constituído pela porção N-terminal (aminoácidos 1 a 105).

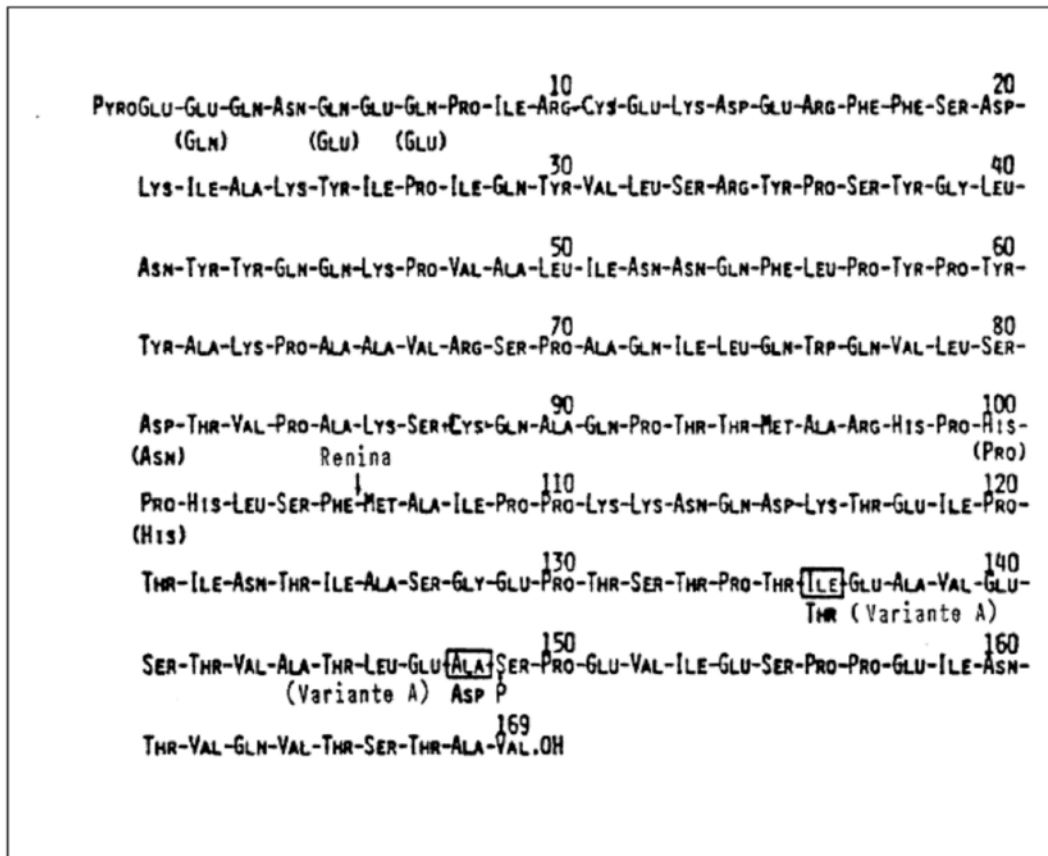


Figura 4 – Estrutura primária da k-caseína (variante B) mostrando os pontos de mutação para a variante A e o ponto de clivagem da renina, no processo de coagulação.

Fonte: SGARBIERI, 1996.

3.4.2.1. Origem do glicomacropéptido

A caseína constitui a principal fração protéica do leite, tanto pela sua concentração como por se tratar de uma proteína de alta qualidade biológica.

As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas α , β e γ , sendo que as caseínas α formam uma família de proteínas com características diferentes (s_0 a s_5). Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas, como ilustrado na Tabela 8 (SGARBIERI, 1996).

Tabela 8 - Principais características físico-químicas das caseínas do leite.

Fração protéica	Porcentagem no leite desnatado	pl	Sedimentação (S_{20})	Massa molar	Variantes genéticas*
Caseína s_1 (s_0, s_2, s_3, s_4, s_5)	45 - 55	4,1	3,99	23.613	A, B, C, D
Caseína	25 - 35	4,5	1,57	24.000	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B, C, D
Caseína	8 - 15	4,1	1,4	19.000	A, B
Caseína – 1	3 - 7	5,8	1,55	21.000	A ₁ , A ₂ , A ₃ , B
2				20.500	A ₁ ou A ₂ , A ₃ , B
3				11.800	A ₁ ou A ₂ ou A ₃ , B
				11.500	B

*Possui pelo menos um resíduo de aminoácido na cadeia polipeptídica; pl = pH no ponto isoelétrico; (S_{20}) = coeficiente de sedimentação a 20°C; peso molecular em Daltons

A κ -caseína encontra-se na forma de uma mistura de polímeros de aminoácidos unidos por ligações dissulfídicas intermoleculares, com massa molar de 19.000Da e 169 resíduos de aminoácidos (CHEFTEL et al., 1989). Esta constitui uma fosfoproteína contendo aproximadamente 6-10% de carboidratos, consistindo de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico ou NANA),

galactose (GAL) e N-acetilgalactosamina (GALNAC). Os carboidratos estão na forma de tri ou tetrassacarídeos localizados na parte C-terminal da molécula, unido pela ligação O-treonil principalmente à Treonina – 131 da κ -caseína. O número de oligossacarídeos por molécula de κ -caseína varia de 0 a 4. A variação da glicosilação resulta no mínimo em 9, e provavelmente em 10, formas moleculares de κ -caseína. (FOX e MsSWEENEY, 1998). Segundo SAITO e ITOH (1992), essa seqüência de açúcares pode ser:

NANA 2-3 – GAL 1-3 GALNAC 1 – Tirosina/Serina
 GAL 1-3 (NANA 2-6) GALNAC 1 – Tirosina Serina
 NANA 2-3 GAL 1-3 (NANA 2-6) GALNAC 1 – Tirosina/Serina

A κ -caseína é a fração das caseínas insensível ao cálcio (Ca^{2+}) e, em condições normais, desempenha importante papel na estabilidade da micela, impedindo a precipitação da α e β -caseína, em presença do íon (SHAMMET et al., 1992). Essa propriedade estabilizadora é perdida durante a coagulação enzimática pela renina. Somente a κ -caseína é hidrolisada durante a fase primária da ação da renina ou quimosina (EC 3.4.23.4), especificamente no sítio de clivagem entre os aminoácidos Phe₁₀₅ – Met₁₀₆. Esta ligação é muitas vezes mais suscetível à hidrólise por proteinases ácidas, como as reninas comerciais, do que por aquelas do sistema protéico do leite (FOX, 1989).

A κ -caseína é heterogênea e apresenta 2 variantes genéticas A e B. Essas variantes genéticas constituem massa molar equivalente, (aproximadamente, 19.000 Da). A variante A apresenta mais carga do que a B, respectivamente -4,3 e -3,3 no pH 6,6, devido à substituição da isoleucina (a.a

136) e da alanina (a.a 148) da variante A, por treonina e asparagina, respectivamente (SWAISGOOD, 1996)

3.4.2.2. Estrutura do Glicomacropéptídeo

O glicomacropéptídeo possui caráter hidrofílico devido à polaridade conferida por seus constituintes básicos – um quarto de seus aminoácidos são ácidos, regularmente distribuídos na porção mediana. Dezesete de seus aminoácidos contêm radicais álcool, e, ligada ao aminoácido 133 (treonina), há porção glicídica característica (1,3% galactose; 1,4% galactosamina e 2% de ácido siálico). Todos os demais glicídios estão distribuídos nas posições 124 (ter) e 155 (ser) (GOURSAUD, 1985). O GMP apresenta massa molar correspondente a, aproximadamente, 6.800 Da.

3.4.2.3 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) para a avaliação do glicomacropéptídeo

Entre os métodos de análise, a cromatografia ocupa lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. A cromatografia constitui método físico-químico de separação de componentes, realizada por meio da distribuição destes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as

duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes conjuntos (COLLINS et al., 1997).

VAN HOOYDONK e OLIEMAN (1982) descreveram o uso da cromatografia líquida de alta eficiência, para estimar a quantidade de GMP liberado pela ação da quimosina no leite, apresentando cromatogramas de amostras de leite genuíno e intencionalmente adicionado de soro de leite, nos quais se identificavam 4 picos seqüenciais: (1) pico "background" não identificado, (2) GMP, (3) pico indicativo de excessiva atividade de proteases bacterianas e (4) TCA.

MEHRENS e REIMERDES (1986), utilizando os cromatogramas da CLAE para estimar o GMP liberado da k-caseína e separado do filtrado de TCA de leite em pó desnatado, sem e com adição de soro em pó, obtiveram 0,7% como limite de detecção de soro adicionado

Em 1986, VREEMAM et al., ao trabalhar com fracionamento de k-caseína em pH 8,0 em DEAE-Sephafore com gradiente de NaCl, seguido de cromatografia de permeação em gel de alta eficiência (HPGPC), usando gradiente decrescente de pH 6,0 a 4,5, identificou, no mínimo, 10 componentes que poderiam ser identificados pela diferença do teor de ácido siálico e/ou teor de fósforo.

Segundo FOX (1989), a CLAE tem sido aplicada por diversos autores para o estudo de fracionamento de peptídeos em queijo e tem-se mostrado eficiente e com resultados bastante promissores. VILDER et al. (1988) também

usaram a técnica de CLAE para determinar soro, obtido por coagulação pela renina, em creme e leite ácido.

A quantificação de GMP (presente no soro e ausente no leite não submetido à ação da renina) parece, portanto, ser um dos métodos mais recomendáveis para se quantificar a presença de soro de queijo em leite.

3.5. Espectroscopia no Infravermelho

A radiação infravermelha foi observada pela primeira vez por Sir Issac Newton em 1672 que demonstrou que a luz solar pode ser decomposta em diferentes cores através de um prisma. Posteriormente, HERSCHEL (1800), citado por CIENFUEGOS (2003), idealizou experimento usando prisma, papelão e termômetros com bulbos negros para medir as temperaturas das diferentes cores. Herschel observou aumento da temperatura à medida que movia o termômetro do violeta para o vermelho no espectro criado pela luz do sol atravessando o prisma. Descobriu que a maior temperatura ocorria, de fato, além da luz vermelha e que a radiação que causou esse aquecimento não era visível; denominando esta radiação invisível como “raios caloríficos”, conhecidos atualmente como radiação infravermelha.

Em 1892, Julius (JULIUS, 1892, citado por PASQUINI, 2003) foi o primeiro a demonstrar que a presença do grupo metil em uma molécula origina absorções no infravermelho (IR) diferentes em comparação a molécula em si, observando também a mesma dependência para diferentes grupos funcionais.

Em 1903, Coblenz (COBLENTZ, 1903, citado por PASQUINI, 2003) pesquisou espectros de centenas de substâncias, orgânicas e inorgânicas, e grande parte dos espectros obtidos por ele são utilizados atualmente, devido principalmente à forma criteriosa com que obteve tais espectros.

Devido às limitações instrumentais da época, a obtenção de um espectro constituía trabalho difícil e tedioso que requeria de 3 a 4 horas ou mais, de forma que cada ponto do espectro tinha que ser medido em separado.

Os primeiros equipamentos comerciais surgiram apenas em meados do século XX, impulsionados pelo seu desenvolvimento durante a Segunda Guerra Mundial, quando a espectroscopia de infravermelho foi utilizada para o controle da concentração e grau de pureza do butadieno utilizado na síntese de borrachas sintéticas. Outros trabalhos foram considerados de grande relevância como, por exemplo, ELLIS et al. (1938), citado por PASQUINI (2003), que utilizaram as técnicas espectroscópicas para quantificar a concentração de água na gelatina, e BARCHEWITZ (1943), citado por PASQUINI (2003), que avaliou a concentração de óleos (combustíveis). Ambos trabalhos foram baseados na Lei de Beer. De acordo com PASQUINI (2003), as primeiras contribuições do Brasil para o campo de aplicação analítica do infravermelho foram as publicações de NISHIYAMA et al. (1991).

3.5.1. O Espectro Infravermelho e Vibrações Moleculares

Na faixa de radiação do infravermelho distinguem-se três regiões: infravermelho próximo (12800 a 4000 cm^{-1}), médio (4000 a 200 cm^{-1}) e distante (200 a 10 cm^{-1}). As absorções moleculares ou sobretons ocorrem com freqüências de 12000 a 9000 cm^{-1} e as bandas de combinação ocorrem de 5500 a 3500 cm^{-1} . O espectro é formado por bandas de absorções para cada substância e pode ser determinado devido ao fato das ligações entre átomos vibrarem com freqüências que podem ser descritas por leis físicas, sejam moléculas diatômicas simples ou moléculas poliatômicas (MILLER, 2000).

O espectro infravermelho é originário das vibrações dos átomos de uma molécula. As freqüências das vibrações observadas no espectro podem ser, de forma aproximada, relacionadas com grupos funcionais presentes na molécula (principalmente na região do infravermelho médio, onde as atribuições são mais fáceis) tornando a técnica bastante útil na identificação de substâncias. Além disso, em grande parte dos casos, a absorção de radiação obedece à lei de Lambert-Beer, tornando a técnica também útil em análise quantitativa.

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento dipolo elétrico da molécula como consequência do movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e distância entre os centros de carga). Somente nestas circunstâncias, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros de absorção. Expresso de outra maneira, isto significa que o espectro de absorção no

infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem um componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais.

Uma molécula contendo n átomos tem um total de $3n$ graus de liberdade, correspondendo à coordenadas cartesianas de cada átomo na molécula. Em uma molécula não-linear, três dos graus de liberdade são rotacionais e três são translacionais, sendo que os demais são vibracionais. Em uma molécula linear têm-se dois graus de liberdade rotacionais e três translacionais. Desta forma, o número total de vibrações previstas é $3n-6$ para moléculas não lineares e $3n-5$ para moléculas lineares.

Em relação à vibrações moleculares, é importante lembrar que:

- Todos os átomos da molécula se movem periodicamente e em fase.
- O centro de massa da molécula permanece inalterado.
- A molécula não muda de orientação ou posição com a vibração.

3.5.2. Princípio do Método

3.5.2.1. Espectroscopia na região do Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho possui a tradição de ser uma análise que apresenta a impressão digital de algumas substâncias químicas. A absorvância em uma frequência particular é característica de um grupo funcional presente no composto químico. A espectroscopia no infravermelho oferece oportunidades analíticas quase que ilimitadas para muitas áreas de produção e controle de qualidade. Dessa forma, esta vem ganhando espaço

nos laboratórios analíticos e no controle de qualidade dos processos industriais, tais como indústrias de alimentos, farmacêuticas, têxteis, etc. Isso ocorre devido ao baixo custo relativo da instrumentação, à velocidade, à facilidade, à não necessidade de tratamento da amostra (portanto, não há gasto com reagentes), à baixa quantidade de amostra utilizada, além de não ser uma técnica destrutiva e de possuir alta seletividade. Esta também cobre ampla faixa de aplicações químicas e pode ser usada para avaliações qualitativas e quantitativas.

3.5.2.2. Fundamentos Teóricos

Basicamente, o termo espectroscopia tem sido utilizado para designar métodos físicos em que se estuda a interação de radiações eletromagnéticas com a matéria.

Os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho de espécies moleculares podem ser explicados como o resultado de diferentes mudanças energéticas produzidas nas transições das moléculas em termos de estado de energia vibracional e rotacional e outros, (SKOOG et al., 1998).

A energia necessária para provocar mudança no estado rotacional é muito pequena e corresponde a radiações de 100 cm^{-1} ou menores ($>100\text{ }\mu\text{m}$). Dado que os níveis rotacionais são quantizados, a absorção para os gases na região no infravermelho distante caracteriza-se por linhas discretas bem definidas.

Deste modo, se um feixe de fótons com intensidade I_0 incide sobre uma amostra com moléculas que apresentam energia de vibração, cuja diferença energética, E , é distinta da energia dos fótons, $h\nu$, nenhuma energia será absorvida e todos os fótons passarão pela amostra, isto é, o feixe I , que emerge da amostra, tem a mesma intensidade que o feixe I_0 ($I_0 = I$). Por outro lado, se $E=h\nu$, isto é, quando a energia dos fótons for compatível com a energia vibracional, cada molécula absorverá um fóton, aumentando sua energia vibracional. Como consequência, a intensidade dos fótons que deixa a amostra será menor do que a intensidade incidente ($I_0 > I$), pois parte dos fótons foi absorvida. Depreende-se que, quanto maior for o número de moléculas presente na amostra, menor será a intensidade final, pois maior será a chance dos fótons serem absorvidos (SKOOG, 1998).

Seguindo as revisões de CIENFUEGOS (2001) e PASQUINI (2003), vários modelos são propostos para explicar o comportamento vibracional das moléculas; porém, nenhum desses é tão eficiente quanto o da esfera-mola. De acordo com este modelo, os átomos são representados por esferas de tamanho variável, ao passo que as ligações são descritas como molas com diferentes constantes de força. Em qualquer temperatura diferente, existe o movimento vibracional, representado por vários estágios de estiramento da “mola”, entre os limites de estiramentos máximo e mínimo. Estas vibrações e seus respectivos estados de estiramento dependem fundamentalmente dos tipos de átomos envolvidos (“tamanho das esferas”) e da força de ligação (“constante da mola”). Dependendo dos fatores citados, cada vibração apresenta uma energia característica, denominada energia vibracional.

Em associação à abordagem baseada no movimento de alongação da “mola”, o fenômeno pode ser estudado como um modelo de oscilador harmônico, baseado no modelo clássico para uma molécula diatômica, onde a Lei de estado de Hook estabelece uma energia (E) para o sistema através da equação:

$$E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

onde h é a constante de Planck, k , é uma constante de força e μ é a massa reduzida das duas massas esféricas (das moléculas), apresentado pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

A vibração molecular pode ser descrita, supondo-a equivalente a um oscilador harmônico em que a energia potencial (V), como uma função dos deslocamentos dos átomos (x), é fornecido pela equação:

$$V(x) = \frac{1}{2} kx^2$$

Este modelo possui algumas restrições, como por exemplo, pode ter alguns níveis discretos de energia (E) definido pela seguinte equação da mecânica quântica:

$$E_v = (v + \frac{1}{2})h\nu$$

onde v é o número quântico vibracional, E_0 é a energia associada com o nível quântico v , e ν é a frequência vibracional fundamental. No modelo clássico, esta frequência é definida pela equação seguinte:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Existem diversos tipos de vibrações, cada um deles com energia própria e, portanto, aptos a absorver fótons com números de onda diferentes.

Em se tratando de moléculas reais, o comportamento das moléculas é melhor representado pelo modelo do oscilador anarmônico. A expressão de energia potencial para este modelo inclui termos de ordem superior:

$$V = \frac{1}{2} kx^2 + k'x^3 + \dots \quad \text{sendo que } k' < k$$

A função de Morse é a equação empírica mais utilizada para descrever a energia potencial da molécula:

$$V = D_e (1 - e^{-x})^2$$

Onde D_e é a energia de dissociação da ligação, e é uma constante e x é o deslocamento dos átomos envolvidos

Aplicando a teoria quântica à equação de Morse, a energia vibracional pode ser descrita pela seguinte equação:

$$E = h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right) - x_m h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right)^2$$

A curva de energia para este modelo é mostrada na Figura 5, representando um oscilador anarmônico.

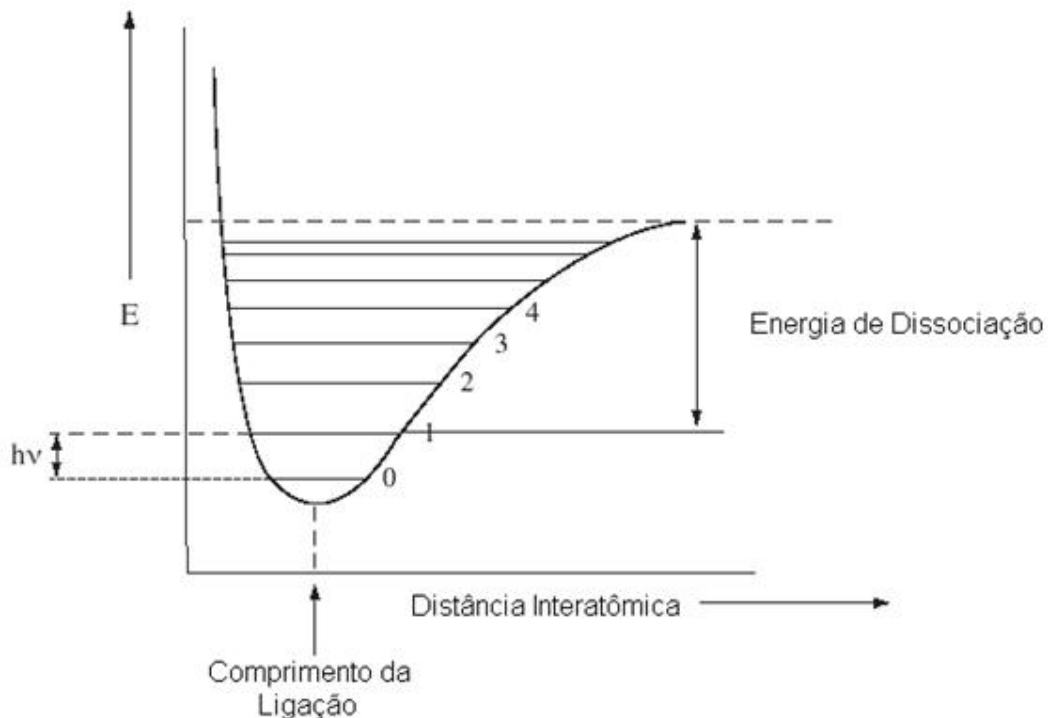


Figura 5 - Curva de energia para o oscilador anarmônico.

Como apresentado na figura 5, conforme a distância interatômica aumenta, a energia chega a um máximo, quando então a ligação se rompe.

O modelo do oscilador anarmônico também prevê a presença de sobretons e bandas de combinação nos espectros. Sobretons (*overtones*) são bandas com valores de frequência correspondentes a múltiplos inteiros das vibrações fundamentais. Bandas de combinação são combinações lineares das bandas fundamentais ou múltiplos inteiros das mesmas.

3.5.2.3. Espectroscopia no infravermelho baseada na transformada de Fourier (FT-IR)

Os equipamentos atuais de FT-IR podem ser basicamente esquematizados conforme a Figura 6.



Figura 6 - Esquema simplificado de um equipamento de FT-IR.

A fonte é formada por uma cerâmica condutora ou por um metal revestido por cerâmica. Quando a cerâmica é aquecida, a emissão de radiação ocorre em todos os comprimentos de onda e a mesma aumenta com a temperatura (por isso o controle rigoroso da temperatura é essencial para a obtenção de espectros reprodutíveis).

O interferômetro é o coração do instrumento. O interferômetro clássico de Michelson envolve um divisor de feixe (Figura 8), que é um componente que reflete metade da radiação incidente e transmite o resto. A parte da radiação que é transmitida encontra um espelho móvel (Figura 7) e é novamente refletida de forma a ser recombinada com a radiação anterior (inicialmente refletida pelo divisor de feixe).

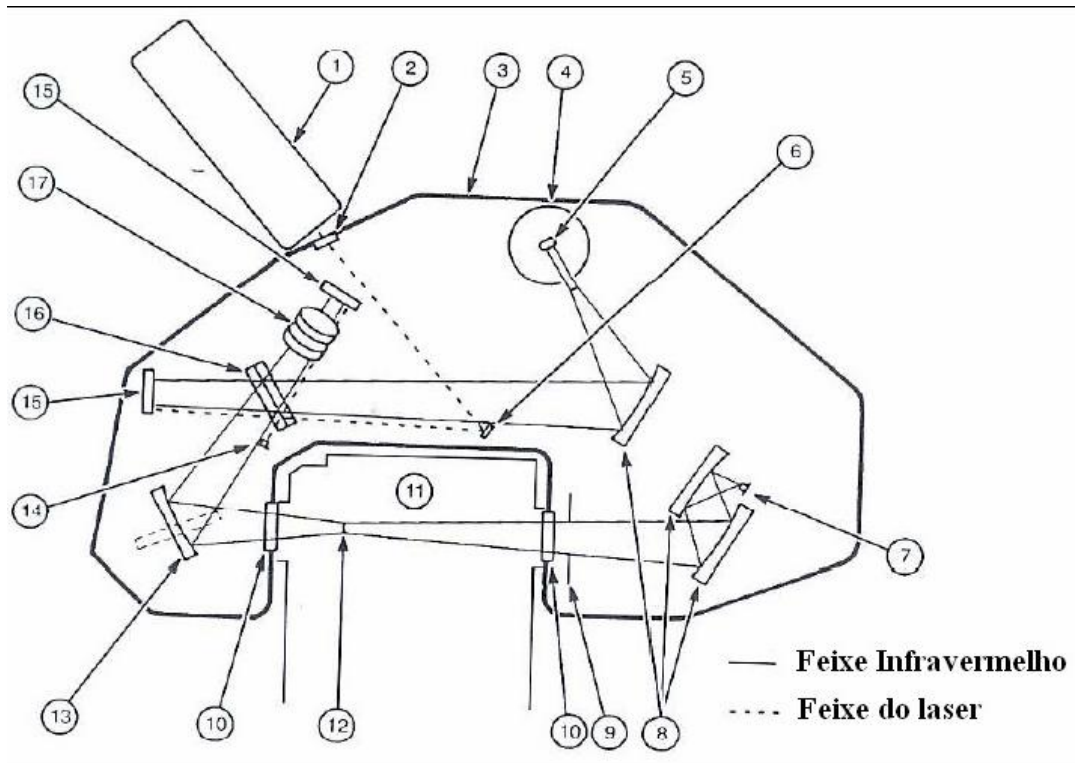


Figura 7 - Diagrama esquemático do FTIR Spectrum 1000, utilizado no presente trabalho. Descrição: 1) Laser HeNe, 2) Janela, 3) Envoltório de Proteção, 4) Blindagem, 5) Fonte, 6) Espelho ajustável para o Laser, 7) Detector, 8) Espelhos Côncavos, 9) Janela, 10) Janela, 11) Compartimento da Amostra, 12) Foco da radiação Infravermelha, 13) Espelho côncavo ajustável, 14) Detector para o laser, 15) Espelho plano do interferômetro, 16) Divisor de feixe, 17) Espelho móvel do interferômetro.

À medida que o espelho móvel se desloca, o feixe de radiação refletido no mesmo interage com a radiação que foi refletida pelo divisor de feixe, gerando interferências construtivas e destrutivas, descritas pela função coseno. Se a radiação for composta por diversos comprimentos de onda, tem-se como

resultado a soma de várias funções co-seno, típicas de todos os comprimentos de onda incidentes. O resultado final é chamado de interferograma (Figura 8).

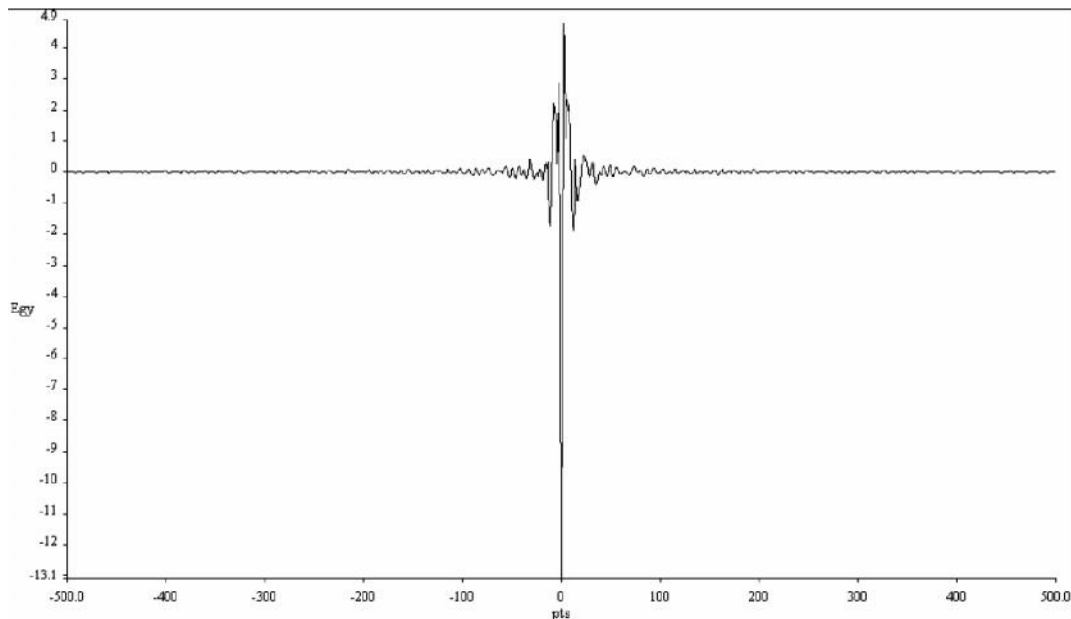


Figura 8 - Interferograma ilustrativo obtido com o equipamento Perkin Elmer Spectrum 1000.

A conversão da função co-seno versus a diferença de caminho óptico em espectro (transmitância versus número de onda) é efetuada por um algoritmo denominado transformada de Fourier. Matematicamente, a transformada de Fourier requer uma integração com limites infinitos. Como o deslocamento do espelho móvel é finito, é necessário um tratamento matemático adicional denominado apodização.

O sinal de saída do detector é amplificado e convertido em sinal de tensão que varia com o tempo e depois convertido de analógico para digital. Um laser de He/Ne de 316,4 nm é normalmente utilizado para controlar a

freqüência de conversão do sinal, medir a diferença de caminho ótico entre o divisor de feixe e o espelho móvel e ainda ajudar a corrigir variações de temperatura na fonte.

Uma das características dos equipamentos FTIR é que a medida é extremamente rápida, já que ocorre em todos os comprimentos de onda simultaneamente e o cálculo da transformada é realizado por modernos e velozes processadores. Esta agilidade permite a obtenção de diversos espectros da mesma amostra (*scans*) em questão de segundos e a média dos *scans* possibilita a melhoria da relação sinal-ruído, proporcional à raiz quadrada do número de *scans*.

3.5.2.4. Aplicações da espectroscopia no infravermelho em alimentos

A espectroscopia no infravermelho e os métodos quimiométricos podem ser aplicados na quantificação da composição de alimentos com misturas de variedades de produtos diferentes. BRIANTET et al., (1996), descreveram método em café para a quantificação do conteúdo da espécie Robusta em misturas das espécies Arábica e Robusta entre 0 e 60 %. Usando um modelo de regressão PLS e o acessório ATR obtiveram um erro padrão de previsão de 1,2 % (m/m). Em um trabalho similar (BRIANTED et al., 1996) foi usado o mesmo princípio para a quantificação de adições de xilose, glicose e frutose em amostras de café.

Como método de análise quantitativa para os açúcares glicose, frutose e maltose a espectroscopia de reflectância total atenuada foi usada por COSTA

FILHO e POPPI (2002). Outra aplicação de estudos usando ATR/FT-IR foi para os compostos limoneno e terpineno presentes em óleo essencial de citrus (SCHULZ et al., 2002).

FERRÃO e DAVANZO (2005) determinaram simultaneamente proteínas e cinzas em amostras de farinha de trigo usando a espectroscopia no infravermelho médio com o acessório de reflectância total atenuada e regressão PLS. Os melhores modelos foram obtidos quando os espectros sofreram pré-tratamentos usando a correção multiplicativa de sinal (MSC).

3.6. Quimiometria – Tratamento dos Dados

O termo quimiometria (do inglês *chemometrics*) foi proposto no final dos anos 1970 para descrever o conjunto de técnicas e operações associadas com o tratamento matemático e interpretação de dados químicos. Com a evolução dos computadores e sistemas de análise de processamento de dados e a facilidade de sua aquisição e uso, muitos pesquisadores passaram a ter como objeto de estudo e pesquisa o desenvolvimento e utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas para extrair maiores informações dos dados. Como conseqüências, surgiram diversos métodos de análise multivariada, que viabilizaram o tratamento rápido de extensos conjuntos de dados de um processo ou sistema qualquer.

3.6.1. Calibração Multivariada

Neste contexto, o objetivo da análise química é investigar propriedades físicas das amostras. Contudo os instrumentos de laboratório não produzem estas propriedades como resposta. Um espectrofotômetro de infravermelho, por exemplo, registra espectros de absorvância que dependem das propriedades associadas. Desta forma, é necessário algum procedimento para encontrar um algoritmo matemático que analise estas propriedades a partir dos resultados registrados pelo instrumento (FERREIRA, et al., 1999). A construção de um modelo que relacione as concentrações de diversas espécies absorventes ao espectro de absorvância deste composto, em diversos comprimentos de onda é chamada de calibração multivariada (BEEBE et al., 1998; SKOOG et al., 1998).

O intuito é que o modelo construído seja usado para prever as propriedades de interesse em amostras desconhecidas, usando como base a resposta instrumental das mesmas. Uma das formas de se representar a relação existente entre a resposta instrumental e a propriedade de interesse é através de um modelo linear, descrito como

$$\mathbf{Y}_{[n \times p]} = \mathbf{X}_{[n \times J]} \mathbf{b}_{[J \times p]} + \mathbf{E}_{[n \times p]}$$

em que a matriz \mathbf{Y} contém os valores das p propriedades de interesse das n amostras em análise, \mathbf{X} contém os valores de absorvância medidos ao longo dos J comprimentos de onda, \mathbf{b} é uma matriz que contém os coeficientes do

modelo e \mathbf{E} é o resíduo não explicado pelo modelo. Com isto, o problema se resume à determinação da matriz \mathbf{b} .

Regressão linear múltipla (MLR), regressão por componentes principais (PCR), análise por componentes principais (PCA), e mínimos quadrados parciais (PLS) constituem as principais técnicas de análise multivariada dos dados utilizados na elaboração desses modelos.

3.6.1.1. Análise exploratória

3.6.1.1.1. Análise de Componentes Principais (ACP)

Usualmente, quando se trata de dados de dimensão elevada, a primeira etapa na análise dos dados é a redução da sua dimensionalidade. Há diferentes razões para isto, como a dificuldade na interpretação e a visualização direta de suas estruturas.

A análise de componentes principais (ACP) é uma técnica de análise multivariada que consiste em transformar um conjunto original de variáveis em outro conjunto, os componentes principais, de dimensões equivalentes, porém com propriedades importantes.

Cada componente principal constitui uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação em termos de variação total contida nos dados iniciais.

A análise de componentes principais é associada à idéia de redução da massa de dados. Procura-se redistribuir a variação observada nas variáveis

(eixos originais) de forma a obter um conjunto ortogonal de eixos não correlacionados. Esta técnica de análise tem como principal objetivo a redução da dimensionalidade do conjunto original de variáveis, com menor perda de informação possível, além de permitir o agrupamento de indivíduos (tratamentos, genótipos, etc.) similares, mediante exames visuais em dispersões gráficas no espaço bi ou tridimensional de fácil interpretação geométrica (REGAZZI, 2004).

Para uma dada matriz \mathbf{X} com n linhas e m colunas, com cada variável iniciando uma coluna e cada amostra uma linha, a matriz de covariância \mathbf{X} é definida como:

$$\text{cov}(\mathbf{X}) = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{X}}{n-1}$$

As colunas de \mathbf{X} foram normalizadas, sendo centradas na média, cada coluna é ajustada para média zero pela subtração da média original de cada coluna. A ACP decompõe os dados da matriz \mathbf{X} como a soma do produto externo de vetores \mathbf{t}_i e \mathbf{p}_i mais uma matriz residual \mathbf{E} (PLS_Toolbox, 2002).

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_k \mathbf{p}_k^T + \mathbf{E}$$

onde \mathbf{k} é menor ou igual à menor dimensão de \mathbf{X} , por exemplo, $\mathbf{k} = \min \{n, m\}$.

Outra forma, análoga a esta, apresentada por OTTO (1999) diz que a ACP aproxima a matriz \mathbf{X} pelo produto de duas matrizes pequenas:

$${}_n \mathbf{X}^m = {}_n \mathbf{T}^d {}_d \mathbf{P}^m$$

em que \mathbf{X} é a matriz original com n linhas (amostras) e m colunas (variáveis); \mathbf{T} é a matriz *scores* com n linhas e d colunas (números de componentes principais) e \mathbf{P}' é a matriz *loading* (transposta) com d colunas e m linhas. Os componentes principais (*scores* \mathbf{T}) podem ser considerados como projeções dos dados da matriz original, \mathbf{X} . Para isto os *scores* são convertidos para o lado esquerdo da equação conforme descrito a seguir:

$${}_n\mathbf{T}^d = {}_n\mathbf{X}^m {}_m\mathbf{P}^d$$

Na decomposição do ACP, os vetores \mathbf{p}_i são autovetores da matriz de covariância, então para cada \mathbf{p}_i temos:

$$\text{cov}(\mathbf{X})\mathbf{p}_i = \lambda_i\mathbf{p}_i$$

onde, λ_i é o autovalor associado com o autovetor \mathbf{p}_i

O vetor \mathbf{t}_i forma um conjunto ortogonal ($\mathbf{t}_i^T\mathbf{t}_j=0$ para $i \neq j$), enquanto que \mathbf{p}_i é ortonormal ($\mathbf{p}_i^T\mathbf{p}_j=0$ para $i \neq j$, $\mathbf{p}_i^T\mathbf{p}_i=1$ para $i=j$). Para \mathbf{X} e algum par de \mathbf{t}_i , \mathbf{p}_i tem-se:

$$\mathbf{X}\mathbf{p}_i = \mathbf{t}_i$$

As novas coordenadas são combinações lineares das variáveis originais.

Desta forma a determinação dos componentes principais é descrito a seguir:

$$\begin{aligned} t_{11} &= x_{11}p_{11} + x_{12}p_{21} + \dots + x_{1m}p_{m1} \\ t_{21} &= x_{21}p_{11} + x_{22}p_{21} + \dots + x_{2m}p_{m1} \\ &\vdots \\ t_{n1} &= x_{n1}p_{11} + x_{n2}p_{21} + \dots + x_{nm}p_{m1} \end{aligned}$$

Os vetores \mathbf{t}_i são conhecidos como *scores* e contém informações de como as *amostras* se relacionam com os componentes principais. Os vetores \mathbf{p}_i são conhecidos como *loadings* (ou componentes principais) e contém informações de como as *variáveis* se relacionam entre si (SHARMA, 1996). Os vetores \mathbf{t}_i (*scores*) são combinações lineares das variáveis da matriz original \mathbf{X} , com coeficientes definidos por \mathbf{p}_i . Outra maneira de interpretar a ACP é imaginar que \mathbf{t}_i é a projeção de \mathbf{X} em \mathbf{p}_i . Os pares de \mathbf{t}_i , \mathbf{p}_i são arranjados em ordem decrescente de acordo com o autovalor associado. O autovalor (λ_i) é uma medida da quantidade de variância descrita pelo par \mathbf{t}_i , \mathbf{p}_i . Neste contexto pode-se pensar na variância como informação. Por causa do par \mathbf{t}_i , \mathbf{p}_i estarem em ordem decrescente de λ_i , o primeiro par captura a maior quantidade de informação em relação a qualquer outro par da decomposição (PLS_Toolbox, 2002).

A interpretação dos resultados da análise dos componentes principais é usualmente realizada pela visualização dos *scores* e *loadings* (OTTO, 1999, KHATTREE et al., 2000, JOHNSON et al., 1998, SHARMA, 1996, MARTENS, et al., 1989). Um exemplo de interpretação geométrica, chamada de *biplot*, é ilustrada na Figura 9. Quando apresentadas em três dimensões (três variáveis), é fácil de notar que todas as amostras formam um plano e podem ser fechadas por uma elipse. É aparente também, que as amostras variem mais ao longo de um eixo da elipse do que de outro.

O primeiro componente principal (CP) descreve a direção da maior variação do conjunto de dados, o qual é o maior eixo da elipse. O segundo CP descreve a segunda maior variação (menor eixo da elipse). Neste caso, um

modelo ACP (scores, vetores *loadings* e autovalores associados) com dois componentes principais descreve adequadamente todas as variações na medição.

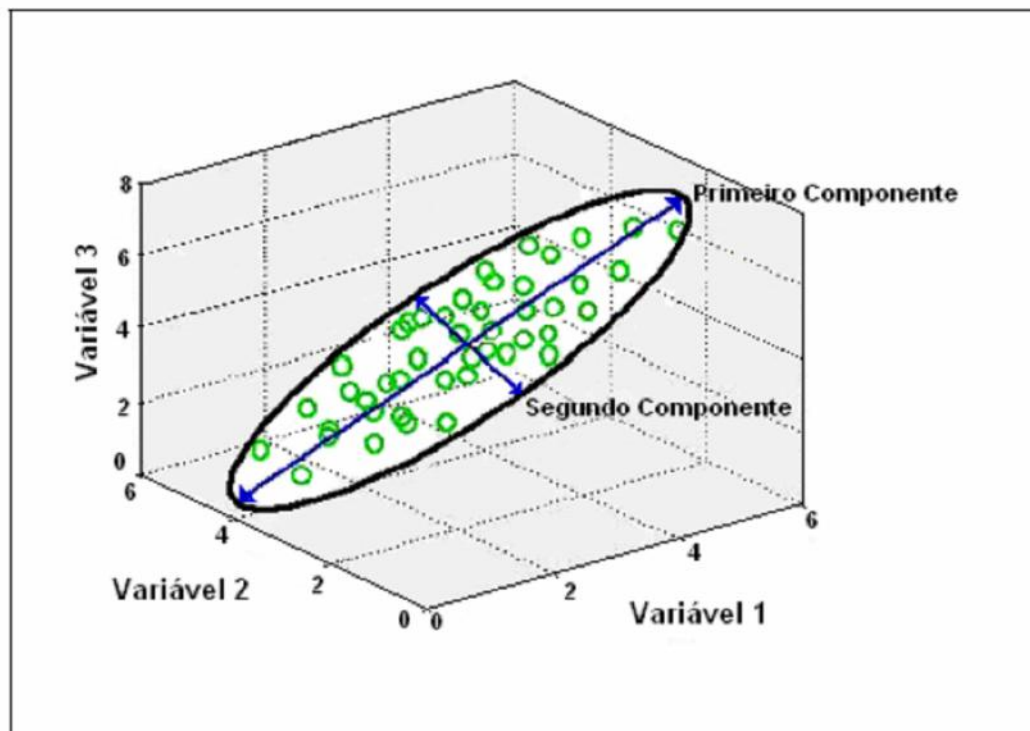


Figura 9 – Representação gráfica da ACP.

3.6.1.1.2. Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Uma forma de regressão mais robusta e eficiente para lidar com ruídos experimentais e colinearidades é o método dos Mínimos-Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS) (WOLD, 1975). O princípio fundamental desse método é a construção de uma nova base ortogonal para o espaço gerado pelas amostras. No PLS, cada novo eixo coordenado, chamado de fator ou variável latente (LV), tenta descrever a maior variação possível de \mathbf{X} em

relação a Y (FERREIRA et al., 1999). As coordenadas das amostras nessa nova base são denominadas de *scores* e os cosenos dos ângulos dessa nova base com os antigos eixos são denotados de *loadings* (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

O PLS tem sido utilizado em trabalhos relacionados a espectroscopia no Infravermelho (TRYGG; WOLD, 1997; WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001). Vale ressaltar que o modelo PLS pode ser aplicado para todos os parâmetros em conjunto ou separadamente para cada um. A modelagem com apenas um parâmetro tem sido adotada em trabalhos recentes (VALVERDE et al., 2006; LI et al., 2006).

O algoritmo do PLS é realizado iterativamente até que se atinja um número adequado de LV's. Para a modelagem com um único parâmetro (Y vetor), seja $X_1 = X$ e $Y_1 = Y$. A primeira variável latente $t_1 = X_1 w_1$ é determinada visando maximizar a covariância entre ela e o espaço formado por Y_1 . Para isso, o vetor de pesos w_1 é definido como

$$w_1 = \frac{X_1^T Y_1}{\|X_1^T Y_1\|}$$

Concluída esta etapa, as colunas de X_1 e Y_1 são regredidas na primeira LV, para gerar os vetores de pesos de projeção

$$p_1 = \frac{X_1^T t_1}{(t_1^T t_1)} \quad \text{e} \quad q_1 = \frac{Y_1^T t_1}{(t_1^T t_1)}$$

Consecutivamente, X_1 e Y_1 são atualizadas para a próxima iteração fazendo-se

$$X_2 = X_1 - t_1 p_1^T$$

e

$$Y_2 = Y_1 - t_1 q_1^T$$

O processo é repetido até um número de LVs pré-determinado. Ao fim do algoritmo obtém-se o vetor de regressão através da fórmula

$$b = W(P^T W)^{-1} Q^T$$

em que as matrizes W , P e Q são obtidas da concatenação dos vetores determinados pelo algoritmo: w_i , p_i e q_i , respectivamente (WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001).

Uma dificuldade comum no PLS é determinar o número ideal de LVs, que devem ser agregadas ao modelo. Como o resíduo E tende a diminuir com o aumento do número de fatores, corre-se o risco de que o modelo criado esteja “sobre ajustado” para descrever aquele conjunto de dados específico. Essa dificuldade é contornada separando-se o conjunto de amostras de calibração do modelo em dois subconjuntos, um para calibração e outro para validação do modelo. Contudo, não é simples estabelecer um critério automático para a seleção do número de LV's de um modelo.

Etapa de Validação

Uma vez construído o modelo, é necessário que ele seja testado, ou validado para garantir que os valores estimados das variáveis dependentes sejam iguais, ou muito próximos dos valores obtidos experimentalmente. Isto pode ser feito utilizando um *conjunto de validação externo* ou o *método de validação cruzada*.

a) Conjunto de Validação Externo

Neste caso, um grupo de amostras de propriedades conhecidas (*conjunto de validação*) é separado do restante do conjunto e o modelo é construído com as amostras restantes (*conjunto de modelagem*). Este modelo é então utilizado para prever as propriedades das amostras deste conjunto de validação.

As propriedades previstas são então comparadas com as propriedades obtidas experimentalmente e o *erro de previsão* é calculado. A eficiência do modelo, ou seja, sua capacidade preditiva, é avaliada de acordo com a dimensão deste erro. Se o erro for pequeno, o modelo pode ser utilizado com confiança para prever as propriedades desconhecidas de outras amostras. Se este erro for grande, significa que o modelo não é eficaz.

$$erro = (\hat{y}_i - y_i)$$

Em que \hat{y}_i é o valor previsto para a amostra i utilizando o modelo e y_i é o valor medido para a amostra

b) *Validação Cruzada*

Este método é muito similar ao método de validação externo. Primeiramente, se retira um pequeno conjunto de amostras, constrói-se o modelo com as amostras restantes e faz-se a previsão para estas amostras. A seguir, estas amostras são incluídas novamente *no conjunto de modelagem*, outras são retiradas e se repete o processo até que todas as amostras do *conjunto de modelagem* sejam testadas (FERREIRA et al., 1999).

A validação cruzada pode ser feita retirando-se uma amostra de cada vez, ou duas amostras de cada vez, ou até mais, dependendo do conjunto de dados que está sendo estudado, da quantidade de amostras, do número de amostras de cada subconjunto, etc.

Os valores previstos são então comparados com os valores obtidos experimentalmente e o *erro de previsão* é calculado, como descrito anteriormente. Calcula-se a seguir a soma dos quadrados dos erros de previsão (PRESS), ou a raiz quadrada dos erros de previsão (RMSEP), que nada mais é do que o desvio padrão.

$$PRESS = \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$$

Em que \hat{y}_i é o valor previsto para a amostra i utilizando o modelo; y_i é o valor medido para a amostra i e n é número de amostras do conjunto de calibração.

A validação do modelo permite testar sua eficiência, ou seja, se é realmente capaz de prever as propriedades (variáveis dependentes) descritas pelas variáveis independentes, de forma confiável. Uma vez validado o modelo, este poderá ser utilizado para fazer a previsão de propriedades (ou concentrações) em amostras desconhecidas.

3.6.1.1.2.1. Critério de Seleção do Número de LV's

1) Critério R de Wold: Um critério foi proposto por WOLD (1978) e posteriormente denominado critério R de Wold, em que o número ótimo de LV's do modelo é escolhido quando ocorre o primeiro mínimo na curva do PRESSV, em função do número de LV's. Em uma variante desse critério, chamado critério R de Wold ajustado, a próxima LV só será acrescentada se a diminuição no PRESSV em relação ao modelo for significativa.

2) Critério Krzanowski: Este método foi proposto por KRZANOWSKI (1987), no qual considera a diminuição percentual do PRESSV em função do número de LV's, porém ponderado pelo número de amostras, variáveis e quantidade de LV's já acrescentadas.

3) Critério de Haaland e Thomas: Este critério foi sugerido por HALAAND e THOMAS (1988), e tem sido adotado em trabalhos recentes (LI et al., 2005; MOROS et al., 2005). Para tal, o valor de $PRESS V(h)$ deve ser calculado para h variando de 1 até um máximo de n , onde h é o número de fatores da k -ésima amostra de previsão. O modelo com o menor PRESS é usado como referência e o número de LV deste modelo é denotado por h^* . Todos os modelos com menos fatores ($h < h^*$) são comparados a essa referência, até se encontrar o modelo com menor número de fatores tal que o PRESS não seja significativamente maior que o PRESS do modelo de referência. O teste de significância é feito com base na estatística F de Snedecor (PAPOULIS, 1991). Para a aplicação do critério, calcula-se

$$F(h) = \frac{PRESS(\text{modelo com } h \text{ LV})}{PRESS(\text{modelo com } h^* \text{ LV})}, \quad \text{para } h = 1, 2, \dots, h^*$$

e escolhe-se o número ótimo de LV como sendo o menor h tal que $F(h) < F_{\alpha;n}$ em que $F_{\alpha;n}$ é o $(1 - \alpha)$ percentil da distribuição F de Snedecor com n graus de liberdade.

A aplicação da quimiometria apresentou avanço significativo com a utilização do método PLS. Com a utilização deste método, muitos problemas de cálculo puderam ser superados e variadas aplicações analíticas começaram a surgir.

3.6.1.2. Classificação

3.6.1.2.1. Análise Discriminante (AD)

A análise discriminante é a técnica estatística apropriada para classificar variáveis dependentes de categorias nominais e variáveis independentes métricas. Em muitos casos a variável dependente consiste de dois grupos ou classificações, por exemplo, masculino e feminino ou alto e baixo. Quando dois grupos de classificação estão envolvidos na análise, o problema de classificação é comumente chamado de análise discriminante de dois grupos (binária). Quando três ou mais grupos de classificação estão envolvidos a técnica é conhecida como análise discriminante múltipla (MDA – *multiple discriminant analysis*) (HAIR et al., 1998).

A análise discriminante é uma técnica estatística cuja finalidade é testar a hipótese de que a média de um grupo de variáveis independentes é igual à de dois ou mais grupos. Basicamente esta consiste em multiplicar cada variável independente por pesos (*scores*) e em somá-las. A média do grupo é calculada pelos *scores* discriminantes individuais.

A significância estatística da função discriminante depende da distância entre as médias dos grupos discriminados. A comparação é realizada pela distribuição dos *scores* discriminantes nos grupos. Se a sobreposição da distribuição entre os grupos é pequena, a função discriminante separa bem os grupos (Figura 10a). Se a sobreposição é grande na distribuição dos *scores* discriminantes, então a função discriminante não separa bem os grupos (Figura 10b).

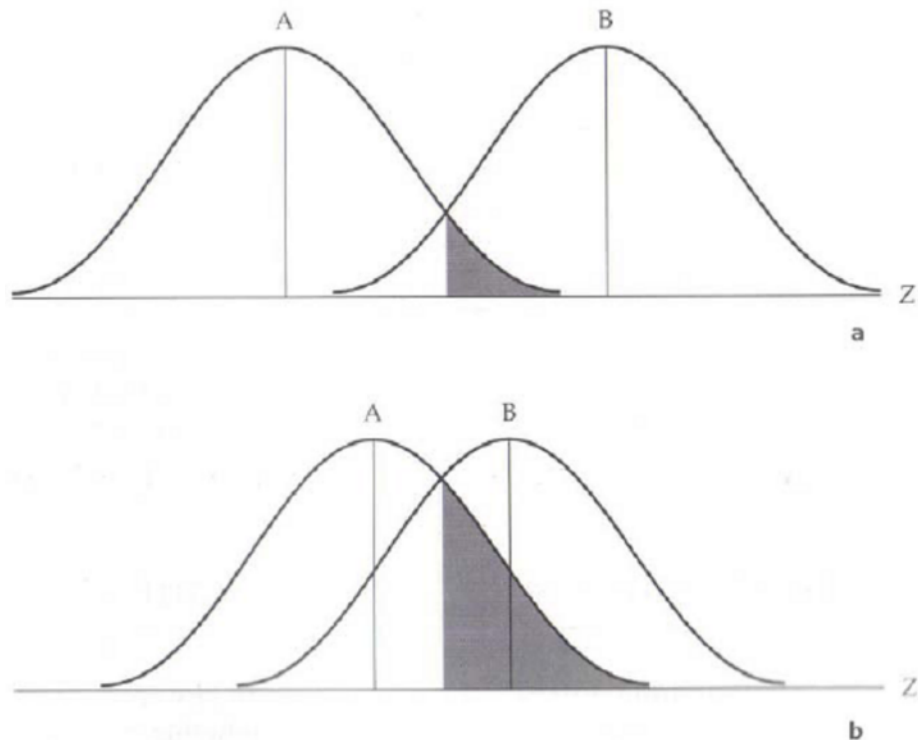


Figura 10 – Distribuição dos scores discriminantes dos grupos A e B. (a) representa uma separação boa dos grupos. (b) representa uma separação ruim dos grupos (Fonte: HAIR, et al., 1998).

Na Figura 11 apresenta-se graficamente a análise discriminante entre dois grupos A e B, e duas medidas V1 e V2. As elipses ao redor dos pontos menores (grupo B) e pontos maiores (grupo A) representam a proporção de objetos (normalmente 95% de intervalo de confiança) dentro de cada grupo. As distribuições A' e B' no eixo Z representa a informação condensada sobre diferentes grupos dentro de um conjunto de pontos (Z scores).

Resumindo, na análise discriminante, uma combinação linear de variáveis independentes é obtida, resultando numa série de scores

discriminantes para cada objeto em cada grupo. Estes scores (ou limites entre classes) são calculados de acordo com uma regra estatística de maximização de variância entre grupos e minimização de variância dentro deles (HAIR, et al., 1998; OTTO, 1999; e SHARMA, 1996). Se a variância entre grupos é relativamente grande em comparação com a variância dentro dos grupos, então a função discriminante separa bem os grupos. A performance de um processo de discriminação ou análise discriminante para a identificação de características de adulteração utilizando espectros MIR depende da combinação de dois fatores: das características da extração de informação dos espectros e do método de classificação.

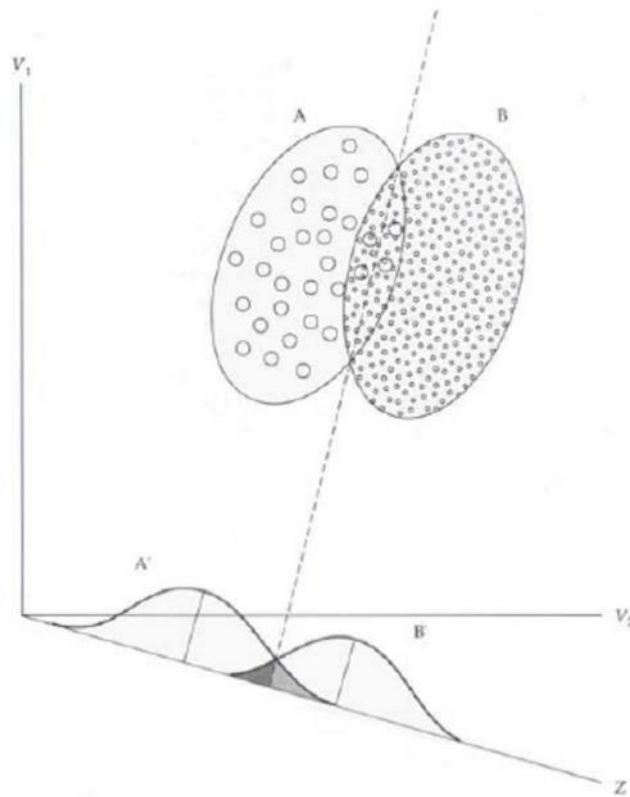


Figura 11 – Análise discriminante entre dois grupos A e B. A' e B' são as contribuições dos grupos, V1 e V2 são as medidas e Z é o eixo dos scores discriminantes (Fonte: HAIR et al., 1998).

Na classificação de objetos desconhecidos (ou uma amostra nova) suas características são inseridas no modelo de função discriminante e transformadas em coordenadas da mesma forma que foi feito para o conjunto de dados originais. Então o objeto é classificado no grupo ao qual o centróide (centro de uma determinada classe) tem a menor distância (OTTO, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Amostras fluidas de leite integral e soro integral (obtido da produção de queijo Minas), provindas de vacas sadias, foram obtidas junto ao laticínio da FURNABE-UFV e secas em spray dryer. O preparo do volume das amostras foi feito no laboratório de Processos de Separação do Departamento de Tecnologia de Alimentos e o ensaio de espectroscopia pelo princípio no infravermelho médio (MIR) foi realizado no Laboratório do Infravermelho (LI) do Departamento de Química, ambos na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

A composição centesimal das amostras de leite encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição centesimal do leite utilizado no trabalho.

Componente	Média (%)
Carboidrato	38
Proteínas	24
Gordura	26
Umidade	3,7
Cinzas	5

4.2. Alteração com o Glicomacropéptídeo

Com o intuito de estudar a influência GMP na alteração do espectro de Infravermelho, preparou-se 4 repetições de 11 amostras de leite em pó

adicionadas nas seguintes proporções 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0% de GMP, totalizando conjunto com 44 amostras.

4.3. Alteração com Soro de Queijo

O conjunto de dados empregado no estudo da detecção e quantificação de soro em leite foi composto de 6 repetições de 12 amostras de leite em pó adicionado nas seguintes proporções 0; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20% de soro, totalizando conjunto com 72 amostras.

4.4. Instrumentação (FT-IR) e condições de análise

Os espectros foram registrados em espectrômetro FT-IR Perkin Elmer Spectrum 1000. O registro foi realizado em sala com temperatura de 22°C, empregando 16 *scans*, com uma resolução espectral de 12 cm⁻¹ no intervalo de 4000 - 460cm⁻¹.

As amostras foram preparadas misturando-se 2mg da amostra com 200mg de brometo de potássio (Merck, Uvasol). Essa mistura foi triturada e prensada a fim de se formar uma pastilha pela qual a luz pudesse passar. As pastilhas precisaram ser prensadas a altas pressões de modo a garantir de que elas ficassem translúcida, usando-se prensa hidráulica. O brometo de potássio não absorve radiação infravermelha, então as únicas linhas espectrais detectadas foram oriundas do analito.

Antes de se iniciar a obtenção do espectro da amostra foi necessário fazer um “espectro de fundo” ou “*background*”, ou seja, adquiriu-se um

espectro sem nenhuma amostra no compartimento apenas com o Brometo de Potássio (KBr). Este *background* buscou fornecer respaldos devido a absorções características de qualquer umidade ou gás carbônico que estejam no caminho óptico, bem como qualquer outro tipo de perda em virtude das respostas características do equipamento (detector/fonte/divisor de feixe). Quando se adquire um espectro, o *background* é subtraído de forma que o resultado final é somente o espectro da amostra, sem as interferências citadas anteriormente.

4.5. Pré-processamento dos dados espectrais

Os dados foram pré-processamentos antes da fase de calibração para melhorar a eficiência do método, produzindo um modelo de regressão com a melhor capacidade de previsão de novas amostras.

4.5.1. Dados centrados na média

Consiste em usar pré-processamento de modo a dar cada variável média zero. Isto é feito, obtendo-se para cada coluna o valor médio e, em seguida, subtraindo-se este valor de cada variável dessa mesma coluna. Desta forma, ocorre a mudança do sistema de coordenadas para o centro dos dados. Esta operação geralmente reduz a dimensão do modelo (THOMAS, 1994). A equação abaixo é utilizada para centrar os dados na média.

$$x_{(i,k)} = X_{(i,k)} - \bar{X}_i$$

onde \bar{x}_i é o valor médio correspondente a i -ésima coluna.

4.6. Análise Quimiométrica

O teor dos analitos quantificados nas amostras constitui conjunto de dados multivariados que foram interpretados utilizando-se ACP (Análise de Componentes Principais), PLS (Mínimos Quadrados Parciais) e AD (Análise Discriminante). Com os valores obtidos experimentalmente, construiu-se duas matrizes de dados. A primeira referente ao estudo do GMP no espectro (44 x 109), e a segunda referente a detecção e quantificação da fraude por adição de soro (72 x 109) na qual as amostras foram dispostas em linhas e as variáveis (comprimento de onda) em colunas.

As análises quimiométricas foram processadas utilizando os programas MATLAB(5.1) e SAS(9.1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 116 amostras de leite analisadas por espectroscopia MIR (72 adicionadas com soro e 44 adicionadas com GMP), 80 delas foram utilizadas para a construção dos modelos calibração dos dois conjuntos de dados, (48 para o conjunto de amostras de leite com soro e 32 para o conjunto de amostras leite com GMP); e 36 amostras para a validação dos modelos; (24 para o conjunto de amostras de leite com soro e 12 para o conjunto amostras leite com GMP).

Foram realizadas dezesseis varreduras de espectro MIR para cada amostra, sendo as suas médias calculadas e utilizadas no trabalho. Inicialmente os espectros foram obtidos em toda a região do infravermelho médio (4000 cm^{-1} a 460 cm^{-1}), em seguida foi construído um gráfico das transmitâncias em função do número de onda (cm^{-1}), onde, a partir deste foi possível delimitar a região espectral que possivelmente representaria a presença do GMP nas amostras de leite adicionadas de GMP e de soro.

Os espectros obtidos dos dois conjuntos de amostras (leite com GMP e leite com soro) encontram-se nas Figuras 13 e 14.

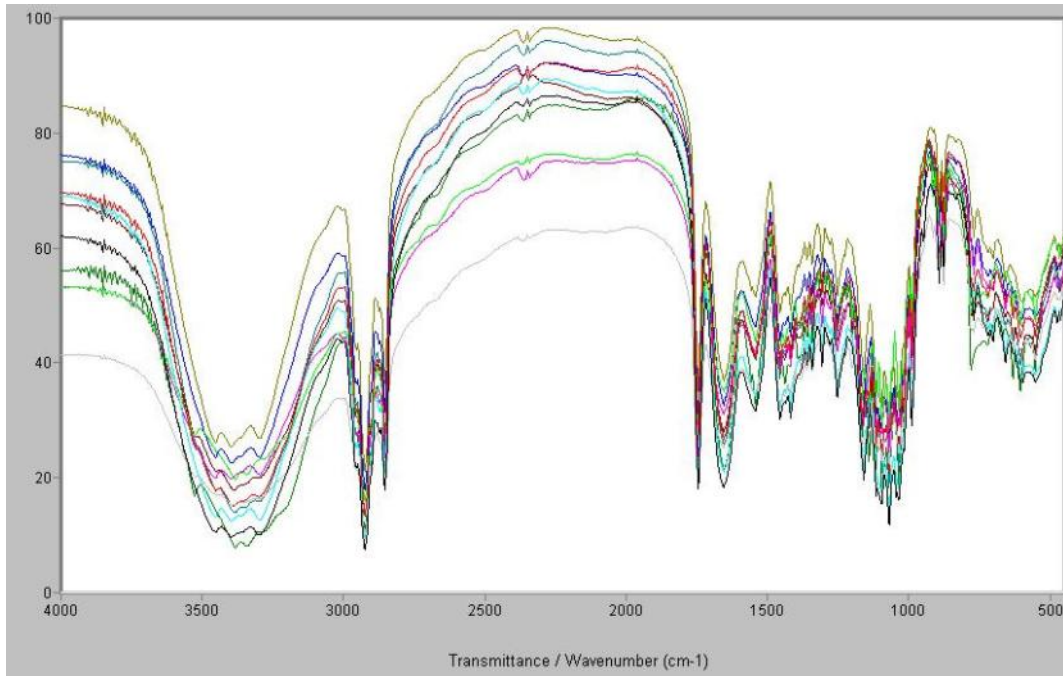


Figura 13 – Espectros médios das amostras de Leite adicionadas em onze proporções de GMP.

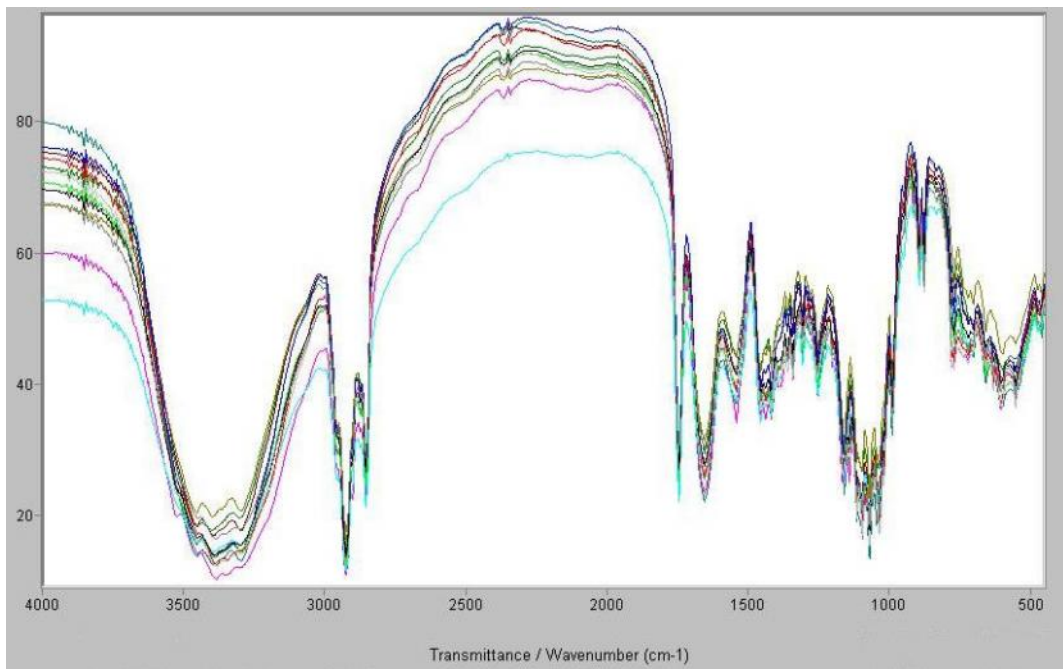


Figura 14 - Espectros médios das amostras de Leite adicionadas em doze proporções de Soro.

Apesar da pequena mudança no comportamento dos espectros nos comprimentos de onda 4000 a 1700 cm^{-1} , essa faixa não foi explorada no trabalho, devido ao fato de que nesta estão presentes principalmente compostos tais como a água e o gás carbônico dentre outros não contribuindo assim para a detecção do GMP.

Neste contexto, a faixa de comprimento de onda estudada foi de 1756 a 460 cm^{-1} , por ter sido a faixa com maior alteração entre os espectros de acordo com as amostras, como demonstrado na Figura 15.

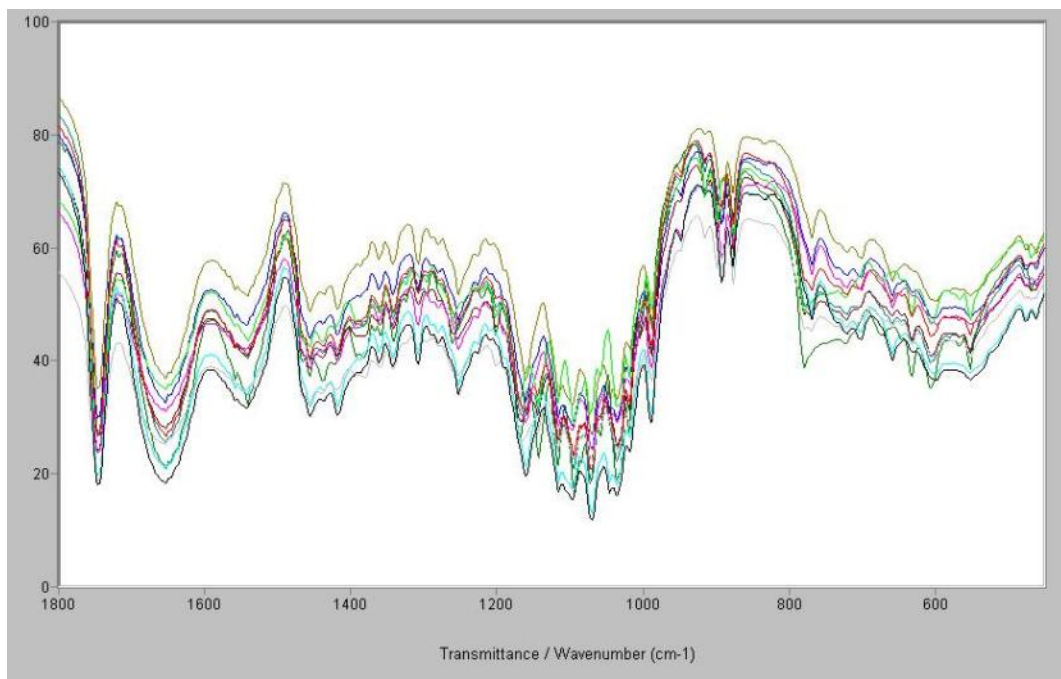


Figura 15 – Faixa de comprimento de onda explorada no trabalho.

5.1. Análises Exploratórias

Os métodos exploratórios enfatizam visualizações gráficas dos dados, realçando feições características e permitindo ao analista detectar padrões, relações, entre outras particularidades. Portanto, no contexto de análise espacial de dados, os resultados são apresentados em forma de mapas ou gráficos.

5.1.1. Análise por Componentes Principais (ACP)

O objetivo principal da análise de componentes principais é a obtenção de um número pequeno de novos eixos, os Componentes Principais (CP). Estes na verdade são combinações lineares dos eixos originais e que retêm o máximo possível da informação original. Desta forma, um pequeno número de componentes pode ser usado em lugar das variáveis originais e, assim, espera-se que eventuais padrões nos dados possam ser melhor visualizados. Para isso as matrizes de dados originais são aproximadas para duas matrizes menores: as de escores (*scores*) e de pesos (*loading*). O método de PCA está baseado na correlação entre variáveis e, na realidade, agrupa aquelas que estão altamente correlacionadas.

5.1.1.1. A Interferência do GMP no Espectro do Leite e do Soro

O glicomacropéptido (GMP) é um dos peptídeos bioativos do soro, derivado da caseína e resultante da produção de queijos pela via da renina com concentração estimada de 1,2 a 1,5 g/L. Este valor corresponde a cerca

de 15 a 25% do total das proteínas presentes no soro de queijo doce (DZIUBA e MINKIEWICZ, 1996). Mesmo sendo parte razoável do total das proteínas do soro, o GMP representa pequena quantidade dos sólidos totais do soro lácteo. Assim, sua detecção e quantificação no espectro de Infravermelho requerem trabalho minucioso.

Na Tabela 10, estão apresentadas as estimativas dos autovalores da matriz de covariância (S), a proporção da variância retida por componente principal e a proporção acumulada usados na obtenção dos escores dos componentes principais. Foram considerados, para a comparação entre as amostras, os dois primeiros componentes principais. Estes dois primeiros componentes principais retiveram juntos, 97,05% da variância dos dados.

Tabela 10 – Estimativas dos autovalores associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de GMP.

i	Componentes principais (CP _i)	Autovalores _i de S	Proporção da variância (%)	Proporção acumulada (%)
1	CP₁	2.62351E15	92,97	92,97
2	CP₂	1.15251E14	4,08	97,05
3	CP ₃	6.95636E13	2,47	99,52
4	CP ₄	8.51165E12	0,30	99,82
5	CP ₅	2.72639E12	0,10	99,92
6	CP ₆	9.90179E11	0,04	99,95
7	CP ₇	6.77473E11	0,02	99,98
8	CP ₈	4.39986E11	0,02	99,99
9	CP ₉	1.10703E11	0,00	100,00
10	CP ₁₀	5.04829E10	0,00	100,00
11	CP ₁₁	0	0,00	100,00

Os coeficientes de ponderação usados na obtenção dos escores dos componentes principais encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Coeficientes de ponderação (autovetores) associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de GMP.

Componentes principais (CP ₁)	Coeficientes de ponderação (autovetores)			
	1	2	...	109
CP₁	0,133798	0,107947	...	0,047627
CP₂	-0,189052	-0,079520	...	0,087576
CP ₃	-0,071249	-0,021890	...	0,153751
CP ₄	0,019026	-0,000795	...	0,149366
CP ₅	-0,214955	-0,245057	...	-0,013125
CP ₆	-0,038178	-0,124051	...	-0,010424
CP ₇	0,172799	0,437722	...	0,123925
CP ₈	0,015115	0,200035	...	0,149494
CP ₉	-0,231582	-0,063966	...	0,052400
CP ₁₀	-0,151062	-0,55376	...	-0,118396
.
.
.
CP ₁₀₉	0,496931	-0,376772	...	0,000000

$$CP_1 = 0,133798 * x_1 + 0,107947 * x_2 + \dots + 0,047627 * x_{109}$$

$$CP_2 = -0,189052 * x_1 + -0,079520 * x_2 + \dots + 0,087576 * x_{109}$$

...

$$CP_{109} = 0,496931 * x_1 + (-0,376772 * x_2) + \dots + 0,000000 * x_{109}$$

Os escores para os dois primeiros componentes principais estão apresentados na Tabela 12 e na Figura 16. O posicionamento relativo das 11 amostras na Figura 17 permitiu a diferenciação das mesmas de acordo com o

teor de GMP. O Glicomacropéptido foi discriminante para análise no Infravermelho.

O primeiro componente principal (CP₁), eixo horizontal da Figura 16, discriminou as amostras entre si. As amostras posicionadas mais à direita apresentaram maiores escores em relação a tal componente.

Tabela 12 – Escores dos dois primeiros componentes principais (CP₁, CP₂) em relação às 11 amostras de leite adulteradas com GMP.

Amostras	CP₁	CP₂
A(0%)	44285399,92	-14673575,44
B(0,1%)	51326395,83	-13104578,3
C(0,2%)	-978974,07	-12763706,92
D(0,3%)	-16115180,69	-6436405,78
E(0,4%)	19017967,01	11424037,51
F(0,5%)	19004315,56	14444756,94
G(0,6%)	-4678419,6	1339487,78
H(0,7%)	81556540,82	11652351,5
I(0,8%)	-39388022,69	6416428,47
J(0,9%)	-60153568,74	5421147,16
L(1,0%)	-93876453,34	-3719942,9

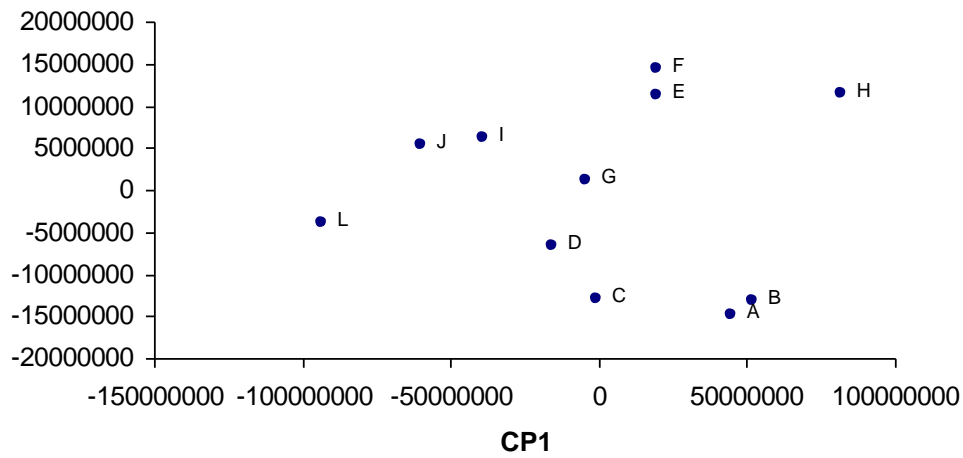


Figura 16 – Gráfico de Escores (scores) da ACP com as 109 variáveis de comprimento de onda, expressas pela CP1+CP2= 97,03%.

A amostra L, adulterada com 1% de GMP, apresentou o menor escore em relação ao primeiro componente principal. Componente este, que foi responsável pela discriminação entre a referida amostra e as demais (eixo horizontal da Figura 16).

Os pesos apresentados na Tabela 13 permitiram a interpretação dos componentes, ou seja, permitiu verificar a importância relativa das variáveis (comprimentos de onda) ou a influência de cada uma delas sobre os componentes. A partir daí foi adotado o critério para descartes de variáveis. As variáveis que estão altamente relacionadas com a componente que retém uma pequena parte da variância dos dados são consideradas como variáveis de menor importância relativa.

Tabela 13 – Estimativas das cargas associadas às variáveis nos dois componentes principais.

Componentes principais	Variáveis (Comprimentos de Onda)							
	1756	1744	1732	1720	1708	1696	..	460
CP ₁	0,95408	0,98263	0,95858	0,94294	0,94981	0,97589	...	0,82748
CP ₂	-0,2825	-0,1517	-0,2618	-0,3012	-0,2872	-0,1983	...	0,31189

Vale ressaltar que quando um maior coeficiente de ponderação está associado a um componente principal de menor variância, a variável referente a esse coeficiente é previamente descartada e, tem-se optado por não fazer nenhum outro descarte com base nos coeficientes daquele componente, mas prosseguir a identificação da importância relativa das variáveis no outro componente de variância imediatamente superior (CRUZ e REGAZZI, 1997).

As variáveis de menor importância relativa apresentaram baixa variabilidade e/ou correlacionaram-se com outras que fazem parte do estudo. A baixa variabilidade de algumas variáveis indica que elas contribuíram pouco para a discriminação das amostras. Portanto, as variáveis de menor importância relativa são passíveis de descarte em experimentos futuros de mesma natureza e foram desconsideradas na etapa seguinte deste estudo no qual foram analisados espectros de amostras de leite adicionadas de soro de queijo.

As variáveis descartadas no estudo foram referentes aos comprimentos de onda 1756, 1744, 1720, 1660, 1540, 1144, 1048, 988, 940, 808 e 664, pois

estas obtiveram coeficientes de ponderação diferentes de zero no último componente principal 109, respectivamente: 0,496931, -0,376772, -0,405197, 0,345175, 0,106547, -0,039134, 0,215045, -0,307714, 0,182407, 0,168827 e -0,334935, enquanto os coeficientes de ponderação das demais variáveis foi nulo.

5.1.1.2. A Detecção e Quantificação da adição de soro

Na Tabela 14, estão apresentadas as estimativas dos autovalores da matriz de covariância (S), a proporção da variância retida por componente principal e a proporção acumulada usadas na obtenção dos escores dos componentes principais.

Tabela 14 – Estimativas dos autovalores associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de soro.

i	Componentes principais (CP _i)	Autovalores _i de S	Proporção da variância (%)	Proporção acumulada (%)
1	CP₁	7,5962E+19	85,27	85,27
2	CP₂	8,5361E+18	9,58	94,86
3	CP ₃	2,5428E+18	2,85	97,71
4	CP ₄	1,1972E+18	1,34	99,05
5	CP ₅	6,6657E+17	0,75	99,8
6	CP ₆	9,1880E+16	0,1	99,9
7	CP ₇	2,8584E+16	0,03	99,94
8	CP ₈	2,7456E+16	0,03	99,97
9	CP ₉	1,8486E+16	0,02	99,99
10	CP ₁₀	6,0570E+15	0,01	100
11	CP ₁₁	4,2066E+15	0	100

Porém, após o descarte das variáveis (citadas nos 4.1.1.1) foi feita uma nova análise de componentes principais com as amostras de leite adicionadas com soro. A Tabela 15 apresenta as novas estimativas dos autovalores da matriz de covariância (S), a proporção da variância retida por cada componente principal e a proporção acumulada usados na obtenção dos escores dos componentes principais depois do descarte.

Tabela 15 – Estimativas dos autovalores associados as variáveis estudadas (após descarte das variáveis de menor importância) nas amostras de leite adicionadas de soro.

i	Componentes principais (CP _i)	Autovalores _i de S	Proporção da variância (%)	Proporção acumulada (%)
1	CP₁	6,86414E+19	86,32	86,32
2	CP₂	7,12225E+18	8,96	95,28
3	CP ₃	2,15030E+17	2,7	97,98
4	CP ₄	9,63723E+17	1,21	99,19
5	CP ₅	4,90889E+17	0,62	99,81
6	CP ₆	8,42049E+16	0,11	99,92
7	CP ₇	2,31326E+16	0,03	99,94
8	CP ₈	2,05176E+16	0,03	99,97
9	CP ₉	1,52261E+16	0,02	99,99
10	CP ₁₀	4,66794E+15	0,01	100
11	CP ₁₁	3,44200E+13	0	100

Nota-se que a proporção da variância acumulada explicada pelas duas primeiras componentes aumentou em relação ao tratamento dos dados sem descarte de variáveis, confirmando assim a não interferência das variáveis descartadas na quantificação do soro nas amostras.

Na Figura 17 apresentam-se os escores das variáveis a partir dos dados analíticos das amostras de leite adicionadas de soro de queijo. Foram considerados, para a comparação entre as amostras, os dois primeiros componentes principais. Estas explicam juntas 95,28% da variância dos dados na análise das 12 amostras de leite adulterado com soro.

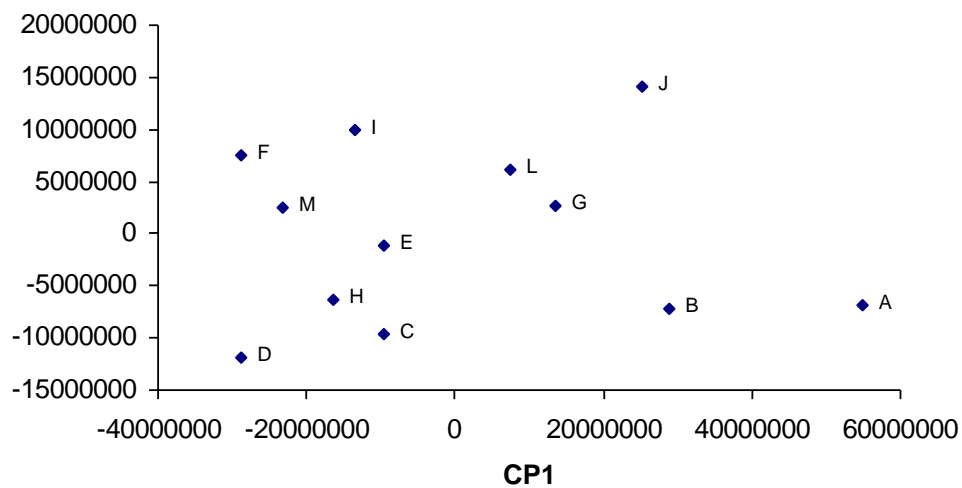


Figura 17 - Gráfico de Escores (scores) da PCA com as 98 variáveis expressas pela CP1+CP2= 95,28%.

O gráfico de escores mostra que há correlação entre as amostras, sugerindo uma possível separação entre elas. As amostras que se agruparam do lado esquerdo superior do gráfico são referentes a amostras de leite com maior teor de soro e as amostras agrupadas do lado direito inferior são referentes a amostras de leite com menor adição de soro. O soro foi assim, o discriminante de maior peso para a separação das amostras.

Os coeficientes de ponderação usados na obtenção dos escores dos componentes principais encontram-se na Tabela 16:

Tabela 16 – Coeficientes de ponderação (autovetores) associados as variáveis estudadas nas amostras de leite adulteradas de soro.

Componentes principais (CP ₁)	Coeficientes de ponderação (autovetores)			
	1	2	...	98
CP₁	0,087066	0,089893	...	0,052925
CP₂	0,116932	0,095651	...	0,155303
CP ₃	0,074465	0,13085	...	0,059841
CP ₄	0,087464	-0,00772	...	0,174917
CP ₅	-0,27948	-0,25362	...	0,159184
CP ₆	-0,00027	-0,04723	...	0,024287
CP ₇	-0,15311	-0,12896	...	-0,17263
CP ₈	-0,2518	-0,07265	...	-0,11998
CP ₉	0,166138	0,101038	...	-0,08066
CP ₁₀	0,175807	0,102266	...	0,200603
.
.
.
CP₉₈	-0,438568	0,186178	...	0,00000

$$CP_1 = 0,087066 * 1 + 0,089893 * 2 + \dots + 0,052925 * 98$$

$$CP_2 = 0,116932 * 1 + 0,095651 * 2 + \dots + 0,155303 * 98$$

...

$$CP_{98} = -0,438568 * 1 + 0,186178 * 2 + \dots + 0,00000 * 98$$

A Tabela 16 apresenta-se o peso que cada variável tem na construção do modelo. Na primeira componente principal (CP₁) as variáveis com maior peso atribuído foram as referentes aos comprimentos de onda 1684, 1564, 1228 e 976, e a maioria apresentou menor peso na segunda componente principal (PC2). Isso faz com que variáveis com esses números de onda contribuam com um valor cumulativo alto nas duas primeiras componentes.

Pela análise exploratória é possível observar uma ligeira tendência à separação. Contudo, as amostras com valor baixo de adulteração tiveram comportamento semelhante às amostras sem adulteração e isso pode ser atribuído aos pequenos intervalos de composição da adulteração das porções. O GMP encontra-se em quantidade muito baixa no soro (1,2 a 1,5 g/L) tal que amostras de leite adicionadas com baixo teor de soro sugerem uma quantidade muito pequena de GMP para a detecção pelo aparelho.

As variáveis correspondentes aos números de onda 1684, 1564 e 1228 apresentaram-se como discriminantes nessa separação. Isso deve ao fato de que, nessa faixa, estão presentes grupos funcionais tais como o grupo amina (R-NH-) e o grupo carboxilo (R-CO-), derivados dos aminoácidos e que estabelecem as ligações peptídicas das proteínas, neste caso o GMP.

O tratamento dos dados por ACP para distinção das amostras de leite permitiu identificar a tendência de formar dois grupos homogêneos. Apenas 1 amostra apresentou comportamento atípico, sugerindo ser este um modelo robusto para o propósito desejado. Essa amostra (*outliers*) foi a de número 56. Tal comportamento pode ser atribuído ao fato de os valores de concentração de GMP na amostra terem sido tão baixos que o aparelho não conseguiu detectar o sinal da adulteração.

O novo conjunto de dados obtidos, após o descarte das variáveis, foi fixado para as outras análises que seguem análise discriminante e mínimos quadrados parciais.

5.2. Análise de Discriminante (AD)

Análises de classificação são métodos estatísticos destinados a dividir em subconjuntos (classes) um conjunto de dados observados. A Análise Discriminante de Anderson foi aplicada na separação das amostras de leite adicionado de soro, em quatro grupos de acordo com a quantidade de soro contido nas mesmas.

Na análise discriminante é de fundamental importância, depois de criado o modelo a partir da matriz de dados original, avaliá-lo para verificar se o mesmo é confiável. Com o modelo avaliado, o mesmo é testado com amostras desconhecidas para confirmar se este responde ou não de acordo ao esperado.

Para realização dessa análise, primeiramente efetuou-se uma divisão no banco de dados. Das 71 amostras de trabalho, 12 foram retiradas aleatoriamente (uma em cada tratamento) para integrarem o conjunto de amostras testes para o modelo calibrado com o restante do conjunto de dados (59 amostras).

Na análise de discriminante a matriz foi composta de 60 linhas (amostras) distribuídas em 4 Grupos (Tabela 17) e 98 colunas (variáveis). Para se testar o modelo, os discriminantes utilizados na classificação, foram os mesmos utilizados para testar as amostras desconhecidas acrescidas ao modelo gerado.

Tabela 17 – Descrição dos grupos utilizados na análise discriminante de Anderson.

Populações (Grupos)	Número de amostras	Faixa da adulteração
1 - Sem Adulteração	5	0% de soro
2 - Adulteração “Fraca”	15	>0% e 4% de soro
3 - Adulteração “Média”	15	>4% e 10% de soro
4 - Adulteração “Forte”	25	>10% e 20% de soro

Na classificação de amostras desconhecidas (amostras novas não incluídas no modelo), suas características são inseridas ao modelo de análise discriminante e transformadas em coordenadas em procedimento análogo ao realizado com o conjunto de dados originais. Assim as amostras desconhecidas são classificadas no grupo ao qual obteve maior valor dentre as 4 funções geradas, neste caso.

A análise discriminante, AD, classifica um objeto da amostra em categorias baseadas em determinadas propriedades do objeto. A AD testa se os atributos do objeto medidos em uma experiência predizem a categoria dos objetos.

A AD considera as matrizes de covariância de cada classe iguais entre si. A análise discriminante permite uma previsão direta do grupo que a variável pertence. Neste trabalho isso corresponde a classificar as amostras como sendo adicionadas com soro ou não e, em que faixa encontra-se essa adição.

Na Tabela 18 descrevem-se os valores de erro e acerto das amostras de leite agrupadas em 4 faixas de adulteração sem utilizar a validação externa. O

grau de previsibilidade do modelo é testado através da validação externa. A validação externa consiste em utilizar amostras não utilizadas na calibração do modelo para calcular o valor do objeto não utilizado, obtendo o desvio entre o valor observado e o valor previsto para esse objeto. Os coeficientes dos modelos calibrados encontram-se no Apêndice

Tabela 18 – Classificação obtida na análise discriminante para os quatro grupos de amostras de leite adicionadas com soro.

	Grupo verdadeiro			
	Grupo1 (sem adulteração)	Grupo2 (Adulteração "Fraca")	Grupo3 (Adulteração "Média")	Grupo4 (Adulteração "Forte")
Grupo1 (sem adulteração)	5	0	0	0
Grupo2 (Adulteração "Fraca")	0	15	0	0
Grupo3 (Adulteração "Média")	0	0	15	0
Grupo4 (Adulteração "Forte")	0	0	0	24
Total	5	15	15	24
Total Correto	5	15	15	24
Porcentagem (%)	8,47%	25,42%	25,42%	40,68%
Total de Amostras	59			
Total Corretas	59			
(%) Correta	100%			

Os 98 discriminantes utilizados nessa classificação foram os comprimentos de onda contidos na faixa analisada do espectro.

A Tabela 18 indica que a LDA contribui com um percentual total de acerto para uma classificação de 100%, isso mostra um percentual de erro de 0%, ou seja, todas as amostras foram classificadas de acordo. Assim é possível observar que das 59 amostras presentes no modelo todas foram classificadas corretamente indicando 100% de acerto para amostras de leite nas quatro faixas de adulteração estudada.

As amostras adulteradas na faixa >4% e 10% de soro (grupo “adulteração média”) das 15 amostras todas foram classificadas corretamente, indicando um percentual de 100%. Em relação a amostras adulteradas na faixa de 10% e 20% de soro (grupo “adulteração forte”) das 25 amostras analisadas todas apresentaram classificação correta, indicando assim um percentual de 100%.

Essa classificação permite separar amostras de leite em quatro grupos. Baseando-se na exploração realizada pelo ACP, pode-se comprovar a real disposição que as amostras têm em se agrupar em quatro grupos separados por sua similaridade e divergências.

Como o percentual de acerto foi máximo para todas as populações, isto sugere que os modelos contêm uma boa resposta para todos os grupos analisados. Assim todas as amostras foram classificadas corretamente.

Na Tabela 19, com base nos mesmos descritores utilizados na separação por LDA, aplicou-se a validação externa para descrever o modelo. A análise discriminante com validação externa em comparação com a não

validada teve o mesmo percentual de acerto. O que indica que o modelo validado é promissor.

Tabela 19 – Classificação obtida na análise discriminante com validação externa para os quatro grupos de amostras de leite adicionado com soro.

	Grupo verdadeiro			
	Grupo1 (sem adulteração)	Grupo2 (Adulteração "Fraca")	Grupo3 (Adulteração "Média")	Grupo4 (Adulteração "Forte")
Grupo1 (sem adulteração)	1	0	0	0
Grupo2 (Adulteração "Fraca")	0	3	0	0
Grupo3 (Adulteração "Média")	0	0	3	0
Grupo4 (Adulteração "Forte")	0	0	0	5
Total	1	3	3	5
Total Correto	1	3	3	5
Porcentagem (%)	8,34%	25,42%	25,42%	40,68%
Total de Amostras	12			
Total Corretas	12			
(%) Correta	100%			

De acordo com a Tabela 19, todas as amostras foram classificadas sem erro, mostrando assim um percentual máximo de acerto para todas as populações. Os modelos validados contêm uma boa resposta para todos os grupos analisados. Assim do total de 60 amostras todas foram corretamente classificadas.

A porcentagem de acerto para a série avaliação foi o mesmo obtido com a AD utilizando a validação externa. A porcentagem de 100 % para foi comum para os quatro grupos.

A análise discriminante, AD, apresentou-se eficiente para a classificação das amostras analisadas em quatro grupos bem definidos, grupo: sem adulteração (0% soro), grupo: adulteração “fraca” (>0% e 4% de soro), grupo adulteração “média” (>4% e 10% de soro) e grupo adulteração “forte” (>10% e 20% de soro). As 98 variáveis utilizadas na matriz de dados original foram significativas para elaborar esta classificação tornando o modelo robusto para separação e agrupamento dos quatro grupos de amostras de leite adicionadas de soro.

Os resultados são semelhantes aos encontrados Suárez et al., 2007 quando estudaram, por análise discriminante (DA), a composição química (umidade, cinza, fibra total, proteína, glicose e frutose), o índice de gosto e maturidade de 5 cultivares de tomates. A composição química foi semelhante à maior parte dos dados encontrados na literatura. Houve diferenças significativas nos valores médios entre os parâmetros analisados, de acordo com a cultivar, método de cultivo, região de cultivo e período de colheita das amostras. As concentrações de glicose e frutose foram fortemente e

positivamente correlacionadas, sugerindo a origem comum de ambos os açúcares. A umidade correlacionada inversamente com o resto dos parâmetros analisados. A classificação correta das amostras de tomate melhorou quando a DA foi aplicada para diferenciar os tomates de acordo com o período de amostragem.

Califano & Bevilacqua, 2000, analisaram ácidos orgânicos de queijos tipo Gouda submetidos a diferentes tipos de amadurecimento e estocagem, através de análises por componentes principais e análise discriminante. As primeiras 3 componentes principais interpretaram 87% da variação total das amostras e análise de discriminante classificou queijos de acordo com o grau de maturidade.

5.3. Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A análise de PLS foi explorada neste trabalho como discriminante, para separar em grupos distintos as amostras de leite adicionadas de soro de queijo, com base na presença do Glicomacropéptido contido no soro.

Esta análise foi realizada com as 98 variáveis que correspondem a faixa do espectro obtida após do descarte de variáveis (item 4.1.1.1). O banco de dados gerado forneceu uma matriz 12x98, para análise de detecção do soro de queijo no leite, como descrita anteriormente.

Particionamento das Amostras

O particionamento em conjuntos de calibração e validação/previsão das amostras para utilização da técnica *PLS* foi feito de forma aleatória. Em tal análise, a amostra 56 foi identificada como um *outlier*, sendo, portanto descartada do estudo. Com base nos espectros resultantes das 71 amostras restantes, o conjunto de dados foi dividido em 47 amostras (8 tratamentos) para calibração e, 24 amostras (4 tratamentos) para validação/previsão externa, como segue abaixo:

Conjunto de Calibração – amostras:

[7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 67, 68, 69, 70, 71, 72]

Conjunto de Validação/Predição externa - amostras:

[1, 2, 3, 4, 5, 6, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 61, 62, 63, 64, 65 e 66]

De acordo com o apresentado nas Figuras 18 e 19, foram utilizados para a construção do modelo, espectros médios aleatórios das 4 e 2 replicatas dos conjuntos de calibração e validação/Predição externa, respectivamente.

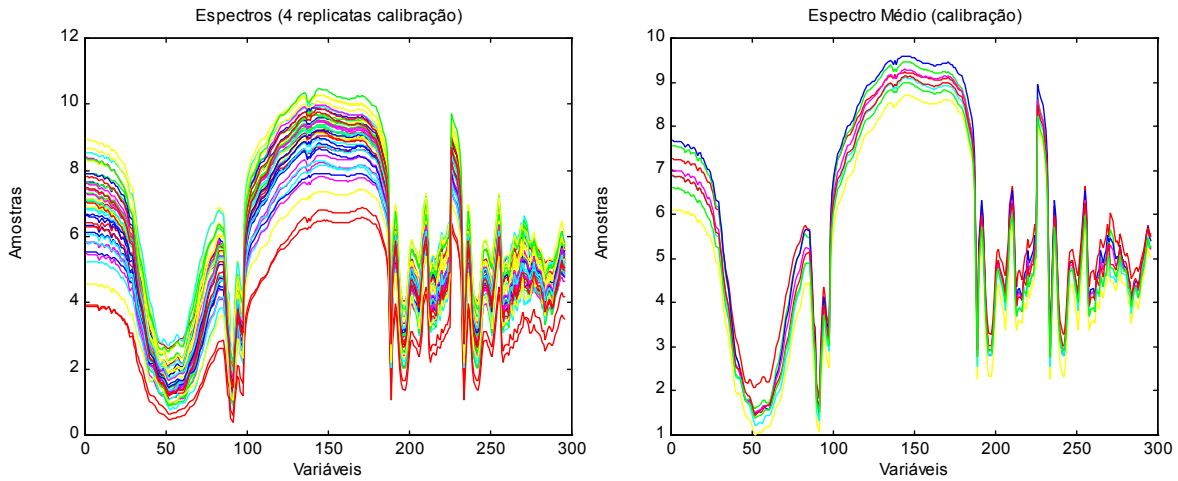


Figura 18 - Espectros totais e médios utilizados na calibração do modelo.

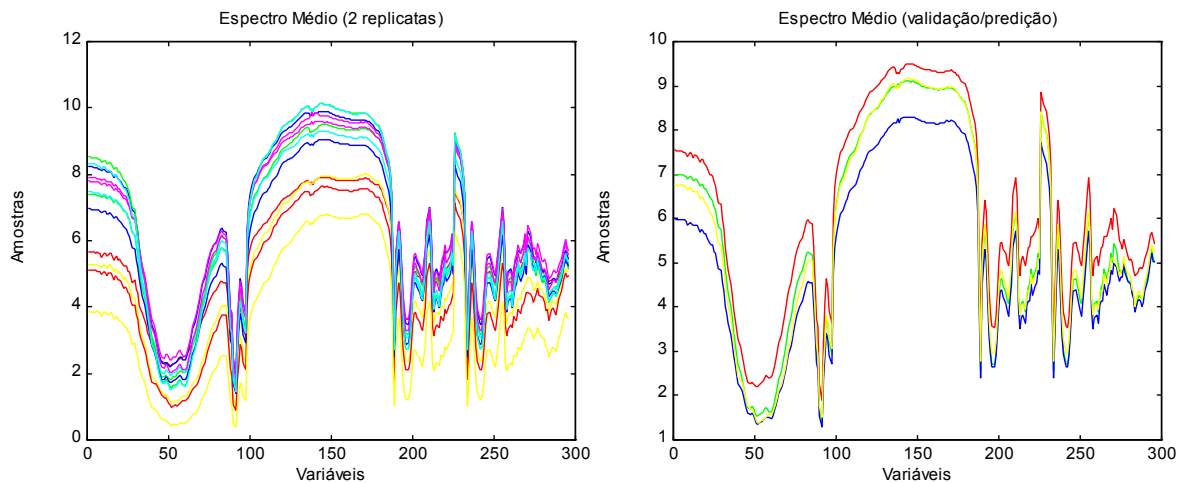


Figura 19 - Espectros totais e médios utilizados na validação/predição externa do modelo.

Na Figura 20 estão apresentados os espectros das amostras de leite usadas nos conjuntos de calibração e validação/predição externa após a definição das regiões. Inicialmente a quantidade de variáveis (comprimentos de ondas) contida no espectro era de aproximadamente 296 e após a seleção da região este valor foi reduzido para 98.

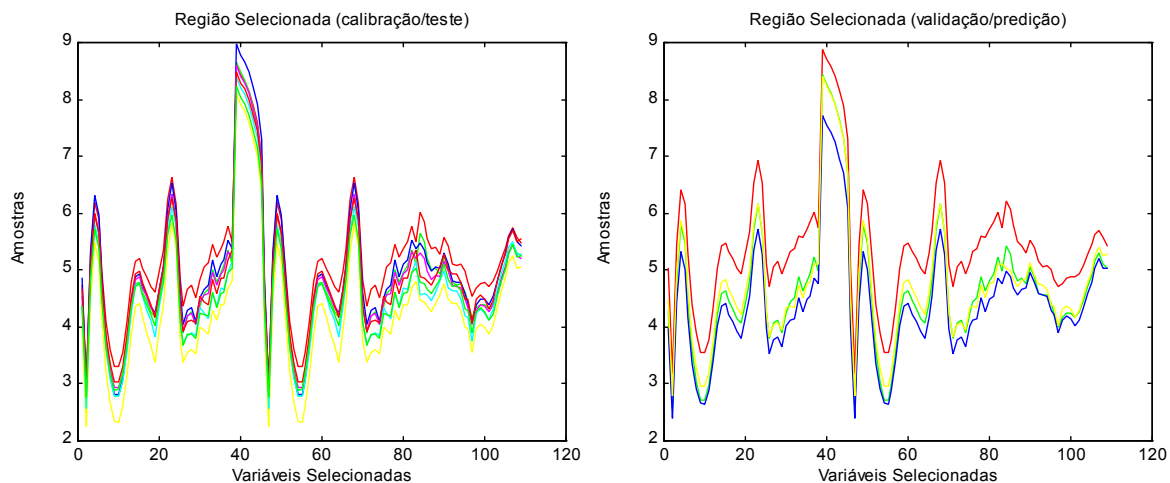


Figura 20 – Região selecionada para estudo nos conjuntos de calibração e validação/predição.

Primeiramente foi aplicado um pré-tratamento aos dados, centralizando-os na média. O resultado é apresentado na Figura 21.

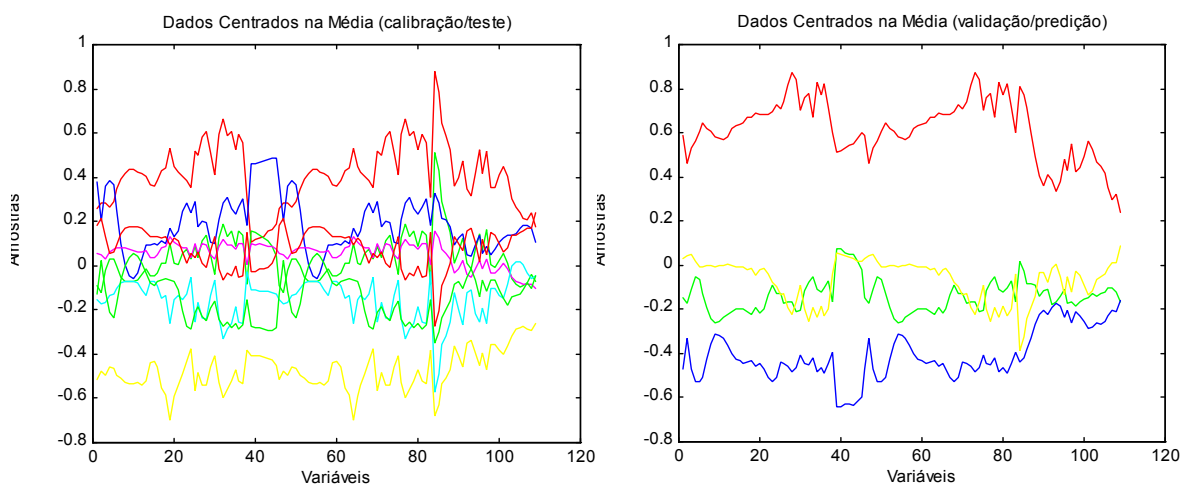


Figura 21 – Conjuntos dos dados de calibração e validação/predição centrados na média.

Os algoritmos para a análise do PLS foram implementados no programa MATLAB (versão 5.1), utilizando-se o Toolbox_PLS. A utilização do PLS justifica-se, pois este método propõe uma decomposição espectral da matriz de dados em que se leva em conta a informação sobre variáveis dependentes (Y).

Nos cálculos envolvendo PLS, um procedimento de validação cruzada (validação interna), com *leave-one-out* foi adotado no conjunto de calibração para encontrar o melhor número de variáveis latentes (fatores) a serem usados na regressão. Nesse procedimento uma amostra do conjunto de calibração é excluída, o modelo é construído e, então, estimado o seu teor de soro. O processo é repetido até que todas as amostras sejam previstas para 1, 2,... variáveis latentes. A Tabela 20 apresenta os resultados da validação cruzada dos modelos calibrados, testados para oito amostras internas.

Tabela 20 - Resultado da validação cruzada dos modelos de calibração.

Valor Real (% de soro)	Valor previsto de validação (%soro)	Erro absoluto
1	0,9331	-0,0669
2	1,9780	-0,0220
6	5,9223	-0,0777
8	8,1971	0,1971
10	10,1741	0,1741
14	13,5738	-0,4262
16	16,4219	0,4219
20	19,7999	-0,2001

Na Figura 22 está apresentado o gráfico que determina o número de componentes principais necessários para estabelecer o modelo. A partir deste gráfico foi verificado que o valor mínimo da soma dos quadrados dos erros de predição foi obtido com cinco componentes principais.

Para o sistema usando cinco componentes principais o valor de PRESS é mínimo. O uso de um número maior de componentes principais não é conveniente, pois a capacidade de predição do modelo cai, uma vez que os valores de PRESS aumentam como pode ser visto na Figura 22.

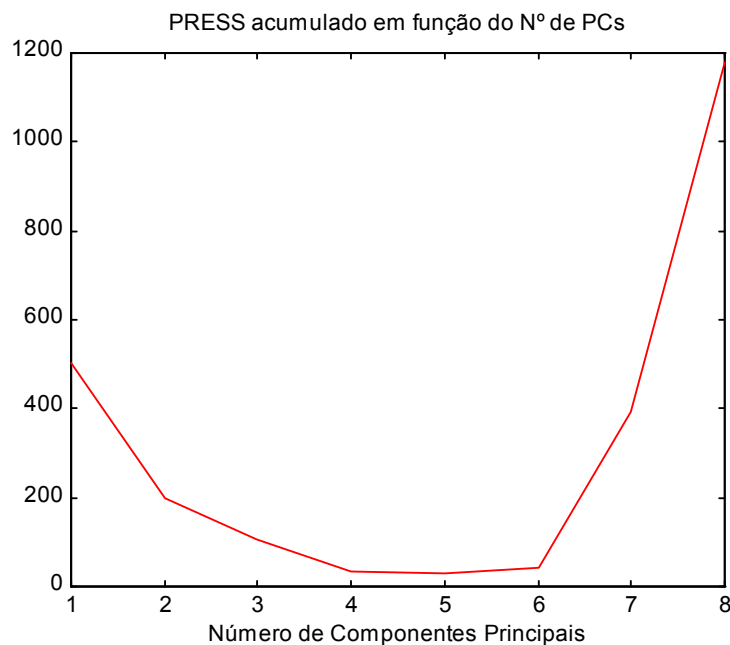


Figura 22 - PRESS em função do número de componentes principais (ou variáveis latentes).

Na Tabela 21 estão os resultados da variância explicada para os blocos X (espectros de amostras de leite adicionado de soro em diferentes

proporções) e Y (valores das proporções), utilizando-se de 1 até 5 componentes principais (variáveis latentes) necessários para estabelecer o modelo de calibração.

Tabela 21 - Variância explicada para os blocos X e Y.

Variável Latente	Bloco-X		Bloco-Y	
	Variância (%)	Variância Acumulada (%)	Variância (%)	Variância Acumulada (%)
1	89,00	89,00	30,35	30,35
2	6,14	95,14	58,73	89,08
3	3,13	98,27	5,98	95,06
4	1,20	99,48	4,64	99,70
5	0,16	99,64	0,15	99,85
6	0,30	99,94	0,06	99,90
7	0,06	100,00	0,10	100,00
8	0,00	100,00	0,00	100,00

A partir destes resultados, foram escolhidos 5 componentes principais, pois eles produzem o menor erro de predição e descrevem praticamente toda a variância dos dados nos blocos X e Y.

A Figura 23 ilustra a curva de regressão obtida a partir dos dados espectrais das amostras de leite adicionadas de soro de queijo, nas etapas de calibração e validação/predição. Foi verificado que os pontos apresentaram-se bem próximos à reta do gráfico com um coeficiente de correlação de 0,9885.

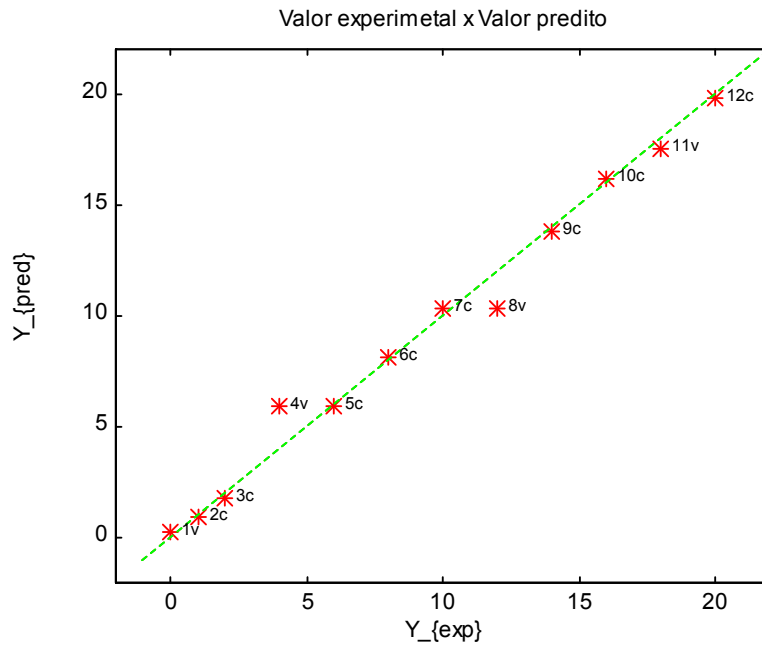


Figura 23 - Curva de regressão obtida na etapa de calibração para o modelo.

Na Figura 24, podem ser verificados os resíduos de Student (corrigidos pela leverage) da calibração para o mesmo modelo. O modelo de calibração apresentou baixos valores de resíduos (dentro de $\pm 2,5$), e com a leverage ficando abaixo do valor crítico (h_{crit}), comprovando a validade do modelo desenvolvido.

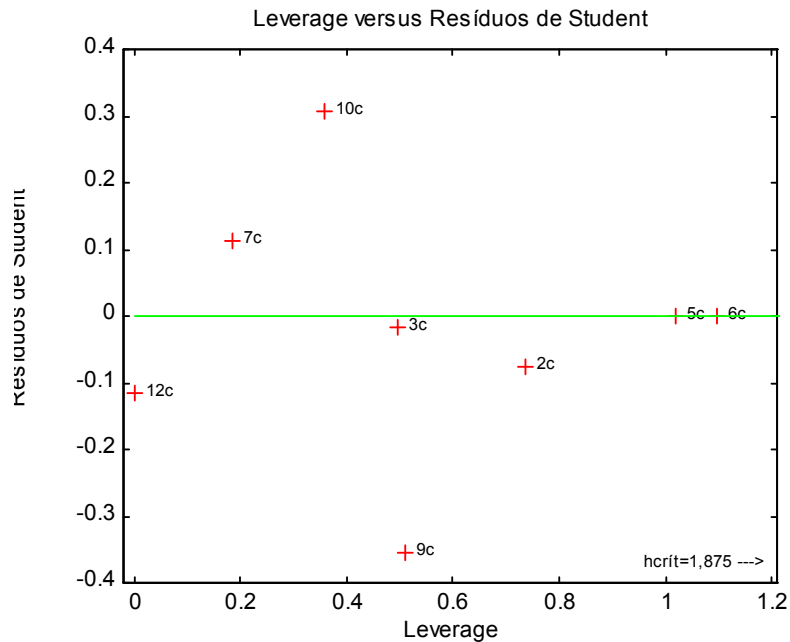


Figura 24 - Resíduos de Student (corrigidos pela leverage) em função da Leverage para amostras do conjunto do modelo construído.

Validação do modelo: O modelo de calibração para a predição do teor de soro em amostras de leite em pó foi validado por meio da técnica de validação externa, utilizando um conjunto 24 espectros, relativos a 12 amostras tomadas em duplicata. A Tabela 22 apresenta os valores médios preditos pelo modelo, o resíduo e o erro percentual relativo para as amostras do conjunto de validação externa.

Tabela 22 - Resultado da validação externa dos modelos para a determinação do teor de soro, em %.

Valor Real (% de soro)	Valor previsto de validação (%soro)	Erro absoluto
0	0,0306	0,0306
4	5,7884	1,7884
12	10,5065	-1,4935
18	17,6746	-0,3254

A Figura 25 mostra os coeficientes do modelo calibrado para as 98 variáveis, correspondentes à faixa de comprimento de onda seleccionada.

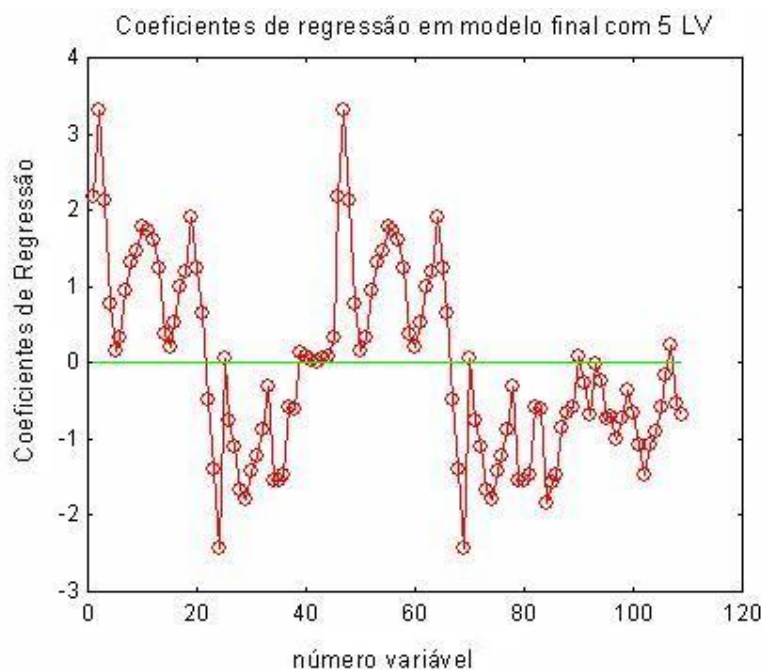


Figura 25 – Coeficientes do modelo calibrado para a detecção de soro de leite em amostras de leite.

Foi aplicado a estatística T^2 de Hotelling, com o objetivo de testar a igualdade de vetores de médias das populações do Bloco Y. Os resultados encontram-se na Figura 26.

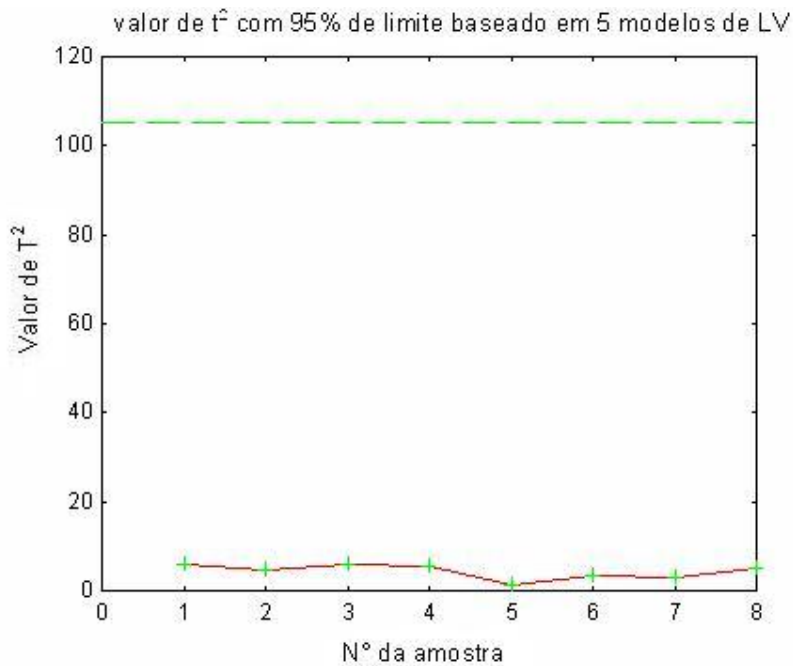


Figura 26 – Estatística T^2 de Hotelling para os vetores de médias das amostras utilizadas no conjunto de calibração.

Obteve-se um resultado significativo para o teste para todas as amostras. Os vetores de médias para as amostras utilizadas no conjunto de calibração diferem entre si pelo teste T^2 de Hotelling.

A aplicação da PLS como ferramenta na diferenciação de amostras de leite adulteradas com soro de queijo foi a mais eficaz, supondo que a análise realizada obteve um resultado robusto sendo capaz de agrupar separadamente

com boa margem de acerto as amostras de leite de acordo com a quantidade de soro contida.

Barthus et al., 2005, utilizaram o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) na análise de dados obtidos por voltametria de onda quadrada para a determinação simultânea de ácido ascórbico (AA) e do co-fator b-nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) em misturas sintéticas. As curvas voltamétricas foram obtidas em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 8,0). Foi verificado por eles que o método PLS permite a determinação destes compostos simultaneamente nas condições escolhidas. Os resultados mostraram um erro relativo máximo de 1,7% para o NADH e 2,1 % para o AA. Os autores concluíram que a metodologia proposta é simples e desenvolvimentos posteriores podem torná-la útil para análises *in vivo*.

Dados de espectrofotométricos seguidos por um tratamento quimiométricos empregando-se modelos de PLS foram utilizados por Acebal et al., 2007, na determinação simultânea de glutamato de monossódico (MSG), guanosina 5'-monofosfato (GMP) e inosina 5'-monofosfato (IMP) em amostras de enhancers de sabor, sem qualquer passo de extração prévio. Resultados satisfatórios (92-110%) foram obtidos pelos autores, comprovando assim a exatidão do método proposto em estudo sobre a recuperação de amostras reais.

A exploração dos resultados por PLS foi de fundamental importância para uma classificação das amostras. Através dela, pode-se concluir que uma distinção entre as amostras de leite adicionadas de diferentes proporções de soro é factível.

6. CONCLUSÕES

A técnica de espectroscopia no infravermelho médio, empregada para determinar o teor de soro de queijo contido em amostras de leite em pó, apresenta algumas vantagens sobre os métodos de referência (CLAE), considerando o tempo de análise, a não geração de resíduos, além do custo inferior justificando sua utilização em análises de rotina no controle de qualidade.

A ACP contribuiu na determinação, através da análise em amostras de leite adicionadas com GMP em diferentes proporções, da faixa de comprimento de onda em que esse composto aparece no espectro. Além de fornecer informações sobre o comportamento do soro lácteo adicionado nas amostras de leite em pó, em espectros de infravermelho.

No presente trabalho, a análise discriminante para classificação das amostras em 4 grupos (leite sem adulteração, leite com adulteração “fraca” (>0% e 4% de soro), leite com adulteração “media” (>4% e 10% de soro) e leite com adulteração “forte” (>10% e 20% de soro), foi efetuada com sucesso.

O uso da técnica de espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) associada ao método PLS de regressão forneceu resultados erro relativo baixos na determinação do teor de soro lácteo em amostras de leite em pó.

Baseando-se nos estudos pode-se concluir que a combinação entre calibração multivariada e a espectroscopia MIR é uma maneira apropriada para análises quantitativas rápidas, além de estimular o desenvolvimento de métodos que não agridem o meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo**. São Paulo.
Disponível em : <http://www.abiq.com.br/>

ACEBAL, C. C., LISTA, A. G., BAND, B S. F Simultaneous determination of flavor enhancers in stock cube samples by using spectrophotometric data and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 106, p.811-815, June, 2007.

ADHIKARI, A.K.; SIGHAL, O.P. Effect of heat resistant micro-organisms on the fatty acid profile and the organoleptic quality of UHT milk during storage. **Journal of Dairy Science**, Indian, v.45, n.5, p.272-277, May, 1992

AGRIANUAL 2007 – **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, pp. 194-204, 2007.

ALAIS, C. **Science du lait (Principles dês Techniques Laitieres)**. 4. ed., Edition Sepaic, paris, 1984. 423 p.

ALFA-LAVAL, 1990. **Manual de industrias lácteas**. Segunda Edición. AMV Ediciones Mundi Prensa.

ALVIN, T.C. **Efeito da qualidade do leite na detecção do soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho filtração gélica (GF-HPLC)**. Viçosa, MG, UFV, 1992. 63 p. (Tese M.S.).

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, B. **Chemometrics - A Pratical Guide**. New York: John Wiley, 1998.

BRANDÃO, A. S. P. e LEITE, 1.L.B. Características principais do comércio internacional de leite. **O Agronegócio do leite no Brasil**. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora. 2002. 167- 180.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária**. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Aprovado pelo Decreto 30.691 de 29 de março de 1952 e alterado pelo Decreto 1.255 de 25 de junho de 1962. Rio de Janeiro. 1952.

BRIANTED, R.; KEMSLEY, E.K.; WILSON, R.H.; Discrimination of Arabica and Robusta in instant coffee by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 170-174, 1996.

CALIFANO, A. N., BEVILACQUA, A. E. Multivariate Analysis of the Organic Acids Content of Gouda type Cheese during Ripening. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 949-960, 2000.

CARNEIRO, J. C. S. **Análise estatística multivariada aplicada à avaliação sensorial de alimentos**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 103pg. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L., LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza : Acibia, 1986. 346p.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propriedades funcionais, valor nutricional, modificaciones química**. Zaragoza: Ed. Acibia, 1989, p. 179-216.

- COBLENTZ, W. **Über die Behandlung der Kinderkrankheiten**. Briefe einen jungen Arzt. u. erw. Aufl. Berlin.: 711r452 S, 1946:40,1903.
- COLLINS, CH.; BRAGA, G.; BONATO, P.B.; **Introdução a métodos cromatográficos**, 7.ed., Campinas: Ed. Da Unicamp, 1997.
- COSTA FILHO, P.A; POPPI, R.J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, frutose e maltose. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 46-52, 2002.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v. 1, 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 1997. 309p.
- DALGLEISH, D.G. Glycosilated k-caseins and the sizes of bovine casein micelles. Analysis of the different forms of k-casein. **Bioch. Biophys. Acta**, 830:213-215, 1985.
- DRACZ, S. **Desenvolvimento de um novo método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. **Int. Dairy J.**, 6, 1017-1044, 1996
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Estatística da Produção de leite em Minas Gerais**. EMBRAPA DE LEITE, Juiz de Fora, 2003.

FAO. Suero - una fuente de proteínas con gran Poteñcial. **Boletín Mensual de Economía y Estadística Agrícolas**, v.23, n. 4, 1974.

FERRÃO, M. F.; FURTADO, J.C.; NEUMANN, L.G.; KONZEN, P.H.A.; MORGANO, M.A.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Técnica não destrutiva de análise de tanino em café empregando espectroscopia no infravermelho e algoritmo genético. **Tecno Lógica**, v. 7, n. 1, p. 9-26, 2003.

FERRÃO, M.F.; DAVANZO, C.U. Horizontal attenuated reflection applied to simultaneous determination of ash and protein contents in commercial wheat flour. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, p. 411-415, 2005.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, pp. 724-731, 1999.

FERREIRA, M.M.C.; MORGANO, M.A.; QUEIROZ, S.C.N.; MANTOVANI, D.M.B. Relationships of the Mineral and Fatty Acid Contents in Processed Turkey Meat. **Food Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 259-265, 2000.

FOURNET, B.; FIAT, A.M.; ALAIS, C.; JOLLES, P. Cow k-casein: structure of the carbohydrate portion. **Bioch. Biophys. Acta (Protein Structure)**, 576:339-346, 1979.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1.ed. London: Blackie Academic e Professional, 1998. cap. 4 e5, p. 146-264.

FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1370-1400, 1989.

GOURSAUD, J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: LUQUET, F. M. **O leite: do úbere à fábrica de laticínios**. Portugal: Publicações Europa-America Lda, 1985, v.1, parte 1, cap. 1, p. 31-56.

HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 11931202, 1988.

HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 11931202, 1988.

HAIR, J.F.; et al., **Multivariate data analysis with readings**. 5th edition, Upper Saddle River, N.J., *Prentice Hall*, 1998.

HARPER, W. J. Functional properties of whey protein concentrates and their relationship to ultrafiltration. In: **New applications of membrane processes**. IDF special Issue 9021, Belgium, p. 77-107, 1991

HEMMATI, P.F., P.G. KEENEY. Detection and Quantification of Whey Ingredients in Milk Chocolate Using SDS-Gel Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography. **J. Food Sci.** 44(5):1353-1357. (1979).

HERSCHEL, W. **Experiments on the Refrangibility of the Invisible Rays of the Sun** William Herschel *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, Vol. 90, 1800 (1800), pp. 284-292 This article consists of 10 page(s).

- HOLSINGER, V.H., POSATI, L.P., DEVILBISS, E.D. Whey beverages: A review. **Journal of Dairy Science**, v.57, p.849-859, 1974.
- HOMEM, G. R. **Avaliação técnico-econômica e análise locacional de unidade processadora de soro de queijo em Minas Gerais**. Viçosa. MG, 2004, 230p. Tese de Doutorado, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.
- HONORATO, F. A.; GALVÃO, R. K. H.; PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B.; ARAÚJO, M. C. U.; CARVALHO, F. R. Robust modeling for multivariate calibration transfer by the successive projections algorithm. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 76, p. 6572, 2005.
- JANK, Marcos Sawaia e GALAN, Valter Bertini – “**Competitividade do Sistema Agroindustrial do Leite**”, PENSA/USP, nov. de 1998, (Versão Final, Divulgação Restrita).
- KHATTREE, R.; NAIK, D.N., **Multivariate data reduction and discrimination with SAS software**, *Wiley Inter-Science*, 2000.
- KONZEN, P.H.A.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C.; MORGANO, M. A.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação não destrutiva de proteína por DRIFTS/PLS/AG. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre, 04 a 07 de agosto de 2002, 2310-2313. 1 CD-ROM.
- KOSIKOWSKI, F.V. **Cheese and fermented milk foods**. 3. ed. Ann Arbor, MI: Westport Brothers, 1979. 2v.
- KRZANOWSKI, W. J. Cross-validation in principal component analysis. **Biometrics**, v. 43, p. 575-584, 1987.

LI, B. X.; WANG, D. M.; XU, C. L.; ZHANG, Z. J. Flow-injection simultaneous chemiluminescence determination of ascorbic acid and l-cysteine with partial least squares calibration. **Microchimica Acta**, v. 149, p. 205212, 2005.

LI, B.; WANG, D.; LV, J.; ZHANG, Z. Flow-injection chemiluminescence simultaneous determination of cobalt(II) and copper(II) using partial least squares calibration. **Talanta**, v. 69, p. 160165, 2006.

LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos (vaca-oveja-cabra): transformación y tecnologías**. Zaragoza: Acribia, 1993. vol.2.

MAPA – **Ministério da Agricultura, Plano Nacional de Qualidade do Leite**. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em 12/02/2007.

MARTENS, H.; NAES, T., **Multivariate Calibration**, *John Wiley & Sons*, 1989.

MATLAB – The Language of Technical Computing. **MATLAB User's guide**, Ver.5.1. The MathWorks Inc.,1997.

MATLAB[®] for Windows, versão 5.0, *MathWorks Inc.*, 1995

MEHRENS, H.A.; REIMERDES, C.H.; **Detection of whey in foods using the k-caseinmacropeptide**. *Git-Fachzeitschrift-fur-das-Laboratorium*, v.30, n.5, p.406-409, 1986.

MEIRELES, A.J. **Setor lácteo – história recente e construção de um novo tempo**. Novembro/2001. Disponível em: www.terraviva.com.br/PHPNovo/EstudoPopUp.php?v_CO_ESTUDO=24
Acesso em 25 fev. 2007.

- MEIRELES, A. J. - “Desafios da Qualidade do Leite Cru no Brasil e Posição do País no MERCOSUL”, palestra proferida no ENCONTRO SOBRE QUALIDADE DO LEITE LONGA VIDA, S. Paulo, dez. 1997.
- MELLO, E. M. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de queijo, por ultrafiltração.** Campinas: UNICAMP, 1989. P. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, 1989.
- MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry.** Chinchester: Prentice Hall, 4nd, 2000.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Brasília, D.F., 1989
- MORGANO, M. A.; CAMARGO, C.; PAGEL, A.P.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação simultânea dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru por análise multivariada (PLS) em dados de espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho próximo. In: **II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Vitória, 24 a 27 de setembro de 2001, 1502-1510. 1 CD-ROM.
- MORGANO, M.A.; FARIAS, C.G.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e Regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.
- MORGANO, M.A.; MORIYA, C.; FERREIRA, M.M.C. Determinação quantitativa do teor de sacarose em açúcar por espectroscopia FT-IR/ATR e regressão PLS. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 77-83, 2003.
- MORGANO, M.A.; QUEIROZ, S.C.N.; FERREIRA, M.M.C. Aplicação da Análise exploratória na diferenciação de vegetais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1/2, p. 73-79, 1999.

MOROS, J.; INON, F. A.; GARRIGUES, S.; de la Guardia, M. Determination of the energetic value of fruit and milk-based beverages through partial-least-squares attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, p. 181193, 2005.

NISHIYAMA, H.; KONDO, M.; NAKAMURA, T.; ITOH, K.; **Organometallics** 1991, 10, 500

OTTO, M., **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**, Wiley-VCH, 1999.

PAPOULIS, A. **Probability, Random Variables and Stochastic Processes**. 3rd. ed. New York: McGraw Hill, 1991.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 14 (2):198-219,2003

Perkin Elmer; Spectrum 1000 User's Guide.

PLS_Toolbox version 3, *Eigenvector Research*, Inc., 2002

REGAZZI, A. J. EST 640 - Análise Multivariada (notas manuscritas). DPI - UFV. Viçosa – MG, 2004.

SAITO, T.; ITOH, T. Variations and distributions of O-glycosidally linked sugar chains in bovine k-casein. **Journal Dairy Science**, v.75, p. 1768-1774, 1992.

SAS/STAT users' guide. Version 9.1. Cary, NC: **SAS Institute Inc.**, 2006.

- SCHULZ, H.; SCHRADER, B.; QUILITZSCH, R.; TEUER, B. Quantitative analysis of various citrus oils by ATR/FT-IR and NIR-FT Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 56, n. 1, p. 117-124, 2002.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.
- SHAMMET, K. M.; BROWN, R. J.; MAHON, D. J. Mc. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on k-casein. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1373-70. 1992.
- SHARMA, S., Applied multivariate techniques, *Jonh Wiley & Sons, INC.*, 1996.
- SISO, M.I.G. The biological utilization of chesse whey: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.57, n.1, p.1-11, 1996.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5th. ed. South Melbourne: Thomson Learning, 1998
- SUÁREZ, M. H., RODRÍGUEZ, E.M. R., ROMERO, C. D. Chemical composition of tomato (*Lycopersicon esculentum*) from Tenerife, the Canary Islands. **Food Chemistry**. v. 106, p. 1046-1056, 2007.
- SWAISGOOD, R. The benefits of dietary whey protein concentrate on the immune response and health. **S. Afr. J. Dairy Sci.**, **24**: No 24, 1996
- TERUIYA, R.K. **Análise exploratória de dados sócio-econômicos do município do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/cursos/ser301/trabalhos/rosely_gam.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2007.

- THOMAS, E.V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 15, p. A795-A804, 1994.
- TOURAINÉ, F.; BRULÉ, G.; MAUBOIS, J.L. **Separation chromatographique de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique de protéines de lactosérum et de caséines**. *Lê Lait*, 67(4):419-436, 1987.
- TRYGG, J.; WOLD, D. L. S. PLS regression on wavelet compressed NIR spectra. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, pp. 209-220, 1997
- VALVERDE, R. S.; GARCIA, M. D. G.; GALERA, M. M.; GOICOECHEA, H. C. Determination of tetracyclines in surface water by partial least squares using multivariate calibration transfer to correct the effect of solid phase preconcentration in photochemically induced fluorescence signals. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 8593, 2006.
- VAN HOOYDONK, A. C. M.; OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v.36, p.153-158, 1982.
- VICENTE, AM; CENZANO, I.; VICENTE, JM. **Manual de indústrias de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1996.
- VILDER, J.; RENTERGHEM, R. van; WAES, G. **Determination of rennet whey in sour cream and buttermilk**. *Milchwissenschaft*, v.43, n.7, p.426-429, 1988.
- VREEMAN, H.J.; VISSER, S.; SLANGER, C.J.; VAN RIEL, J.A.M.; Characterization of bovine k-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-

containing fractions determined by high-performance gel-permeations chromatography. **Biochemistry Journal**, v.240, p.87-97, 1986.

WOLD, H. Modelling in Complex Situations with Soft Information. **Third World Congress of Econometric Society**, August, Toronto, 1975.

WOLD, S. Cross-validation estimation of the number of components in factor and principal component analysis. **Technometrics**, v. 24, p. 397-405, 1978.

WOLD, S.; SJOSTROM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, p. 109-130, 2001.

WONG, N.P.; **Chemistry of Processing. In: Fundamentals of dairy chemistry**, 3.ed. Van Nostrand Reinhold, N.Y., 1988. cap. 14, p.739-766.

YAMAGUCHI, L.C.T.; MARTINS, P.C.; CARNEIRO, A.V. Eficiência técnica e econômica da atividade leiteira: região sul do Brasil. In: **CONGRESSO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL**, 51., 2003, Juiz de Fora. Anais... Brasília: SOBER, 2003. 1 CD-ROM.

ZADOW, J. G. Utilization of Milk Components: Whey. **Advances in Milk Processing**. V.1. 1986.

ZADOW, J.G., **Modern dairy technology: advances in milk processing**. London: Elsevier 1997. V. 2.

ZOCCAL, R.. **O agronegócio do leite no Brasil**. Juiz de Fora: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, junho 2004, 5pp.

APENDICE

Coeficientes das funções discriminantes calibradas para a detecção da adição de soro de queijo em leite em pó

Modelo	1	2	3	4
Constante	-6715241	-6146653	-6043019	-6084472
A1	-0,27669	-0,23726	-0,22023	-0,2083
A2	-0,05347	-0,04426	-0,06107	-0,06931
A3	0,20436	0,25612	0,24157	0,26899
A4	-0,70978	-0,70277	-0,71136	-0,72467
A5	0,44868	0,36435	0,37265	0,35989
A6	-0,23016	-0,21482	-0,22218	-0,20942
A7	0,78572	0,7628	0,75086	0,73926
A8	0,26281	0,27766	0,25961	0,26908
A9	0,44156	0,47693	0,4759	0,48504
A10	-0,79906	-0,78854	-0,79002	-0,80149
A11	0,02314	0,03772	0,04605	0,04376
A12	0,35778	0,33763	0,33645	0,37085
A13	-0,2645	-0,29234	-0,27184	-0,28116
A14	-0,05139	-0,02938	-0,02277	-0,04292
A15	-0,18883	-0,1755	-0,1679	-0,19998
A16	-0,14627	-0,15336	-0,15053	-0,11903
A17	-0,53534	-0,55038	-0,5653	-0,55746
A18	-0,06643	-0,02675	-0,03466	-0,02744
A19	-0,52646	-0,48648	-0,48553	-0,51557
A20	0,36188	0,27898	0,27757	0,28661
A21	0,44288	0,31791	0,31505	0,32033
A22	0,45064	0,42401	0,41463	0,38943
A23	-0,46235	-0,43383	-0,44408	-0,43185
A24	1,07008	1,09525	1,09793	1,11654
A25	-0,56648	-0,49586	-0,46034	-0,47862
A26	0,0311	0,14843	0,17113	0,20933
A27	-0,18669	-0,2422	-0,21002	-0,24815
A28	-0,22653	-0,27757	-0,26939	-0,27333
A29	-0,5015	-0,47289	-0,46436	-0,45894
A30	-0,13221	-0,12868	-0,12063	-0,10746
A31	0,19242	0,28875	0,28791	0,32291
A32	0,46785	0,45912	0,46364	0,47649
A33	0,19972	0,16555	0,13489	0,13675
A34	-0,32999	-0,28359	-0,28437	-0,29942
A35	-0,73719	-0,74395	-0,73694	-0,73847
A36	0,00403	-0,04075	-0,05841	-0,06209
A37	0,37351	0,23693	0,25002	0,21787
A38	0,00531	-0,08453	-0,08877	-0,09335
A39	0,11104	0,13251	0,15213	0,14403
A40	0,44316	0,4289	0,44327	0,42157
A41	0,31175	0,33845	0,33701	0,33866
A42	0,3429	0,47648	0,47368	0,48435
A43	-0,29488	-0,29208	-0,30135	-0,27908
A44	-0,12244	-0,15349	-0,14419	-0,17351
A45	-0,06803	-0,07944	-0,08726	-0,10404
A46	-0,10474	-0,02941	-0,02728	-0,02291

A47	0,00521	0,04283	0,03815	0,04581
A48	-0,36145	-0,38945	-0,40064	-0,40464
A49	0,34936	0,30365	0,31941	0,33281
A50	0,05027	0,10127	0,09995	0,1147
A51	0,13063	0,11817	0,0803	0,07193
A52	-0,01215	-0,00535	-0,00397	-0,0000296
A53	0,86326	0,71285	0,69353	0,70124
A54	0,67852	0,61424	0,58141	0,5489
A55	0,01449	-0,08303	-0,09105	-0,09589
A56	-0,02646	-0,18147	-0,13486	-0,15088
A57	0,23307	0,27335	0,27093	0,29366
A58	-0,21116	-0,13753	-0,15076	-0,1251
A59	-0,55495	-0,4417	-0,4522	-0,45439
A60	0,06671	0,08775	0,08773	0,10501
A61	0,13809	0,1042	0,11419	0,08708
A62	-0,8251	-0,75147	-0,76501	-0,74512
A63	-0,29189	-0,27664	-0,19947	-0,23397
A64	0,10739	0,10457	0,03286	0,0571
A65	0,54176	0,60354	0,61739	0,60214
A66	-0,42271	-0,44319	-0,41468	-0,42549
A67	-0,1539	-0,29231	-0,29964	-0,27426
A68	-0,70328	-0,60458	-0,62599	-0,5967
A69	0,56301	0,57906	0,56167	0,5053
A70	-0,34285	-0,22072	-0,20448	-0,22232
A71	0,24939	0,21763	0,27712	0,27853
A72	0,16966	0,30346	0,2661	0,28877
A73	0,50082	0,57501	0,55389	0,58367
A74	-0,6974	-0,72981	-0,75023	-0,71279
A75	0,30186	0,16273	0,19839	0,19035
A76	-0,60719	-0,69341	-0,70895	-0,71138
A77	-0,40882	-0,2338	-0,22315	-0,17786
A78	0,76775	0,73362	0,7281	0,71786
A79	0,7626	0,53521	0,55767	0,50967
A80	0,11915	0,07455	0,06794	0,07228
A81	0,03927	0,17635	0,14288	0,16901
A82	-0,37385	-0,45767	-0,41782	-0,43581
A83	0,11261	-0,01576	-0,04661	-0,04745
A84	0,14282	0,16932	0,16257	0,1732
A85	-0,13075	0,01061	-0,02271	-0,01428
A86	-0,48741	-0,48157	-0,47412	-0,52108
A87	-0,061	-0,01507	-0,00535	-0,01268
A88	-0,41151	-0,2572	-0,29001	-0,24411
A89	0,02431	-0,18476	-0,16863	-0,26192
A90	-0,76735	-0,56829	-0,58052	-0,55304
A91	0,26081	0,19071	0,21508	0,19348
A92	-0,64365	-0,60883	-0,5933	-0,5433
A93	-0,36472	-0,13811	-0,14537	-0,1115
A94	-0,18119	-0,09723	-0,06496	-0,07303
A95	0,32905	0,39463	0,3753	0,41038
A96	0,62334	0,38225	0,36491	0,31434
A97	0,57653	0,56797	0,52727	0,56518
A98	-0,18061	-0,22664	-0,17067	-0,18721