**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Aplicação da espectroscopia de infravermelho com transformada de
Fourier no monitoramento de adulterantes em leite cru**

Tatiane Barbosa Coitinho

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2017**

Tatiane Barbosa Coitinho
Zootecnista

**Aplicação da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no
monitoramento de adulterantes em leite cru**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO FERNANDO MACHADO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de Concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Coitinho, Tatiane Barbosa

Aplicação da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no monitoramento de adulterantes em leite cru / Tatiane Barbosa Coitinho. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

61 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fraude 2. Adulteração 3. FTIR 4. Laticínios 5. Calibração 6. Validação
I. Título

A Deus.

Aos meus pais, Nalzirene e Advarte.

Às minhas irmãs, Juliana e Luciana.

Ao Mateus.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que proporciona em minha vida.

Aos meus pais, Nalzirene e Advarte pelo amor incondicional, por renunciarem de seus próprios sonhos em prol dos filhos e serem verdadeiros exemplos de paternidade. Às minhas irmãs, Juliana e Luciana e ao Emerson, pelo companheirismo e amizade. Ao Mateus, pela paciência, respeito, e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Professor Paulo Fernando Machado, pelo interesse e valiosas orientações durante a elaboração desta tese.

Ao Dr. Laerte Dagher Cassoli pelo auxílio indispensável durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Laticínios Cemil e todos os funcionários pela calorosa recepção, amizade e apoio.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, por todos os ensinamentos. À toda equipe da Clínica do Leite, tanto funcionários quanto alunos de pós-graduação pela amizade e colaboração.

Aos meus amigos de longe e de perto, pela amizade sincera e apoio irrestrito, principalmente Camila, Helen, Jéssika, Sant'ana, João Pedro.

À Universidade de São Paulo, pelos momentos inesquecíveis e pela oportunidade de realização do Doutorado, e à CAPES e ao CNPq, pelo financiamento dos estudos.

Muito obrigada!

*“A mente que se abre a uma
nova ideia jamais voltará ao
seu tamanho original”.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
Referências	18
2. VALIDAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER NO MONITORAMENTO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU	21
Resumo	21
Abstract	21
2.1. Introdução	22
2.2. Material e métodos	24
2.2.1. Local de desenvolvimento	24
2.2.2. Construção do espectro de referência	24
2.2.3. Desenvolvimento das calibrações	25
2.2.4. Preparo das amostras para validação	26
2.2.5. Análises laboratoriais e validação	28
2.3. Resultados e discussão	29
2.3.1. Construção do espectro de referência	29
2.3.2. Desenvolvimento da calibração	30
2.3.3. Validação	30
2.4. Conclusões	36
Referências	37
3. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE FTIR E FÍSICO-QUÍMICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE CRU	41
Resumo	41
Abstract	41
3.1. Introdução	42
3.2. Material e Métodos	44
3.2.1. Local de desenvolvimento	44
3.2.2. Preparo das amostras	44
3.2.3. Análises amostrais	45
3.2.3.1. Equipamento de FTIR	45
3.2.3.2. Métodos físico-químicos convencionais	46

3.2.4. Análises estatísticas	46
3.3. Resultados e Discussão.....	47
3.3.1. Espectro de referência	47
3.3.2. Análise geral de adulterantes	47
3.3.3. Análise específica de adulterantes	49
3.3.3.1. FTIR	51
3.3.3.2. Métodos físico-químicos convencionais	54
3.4. Conclusões.....	55
Referências	56
4. CONCLUSÃO.....	61

RESUMO

Aplicação da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no monitoramento de adulterantes em leite cru

A adulteração do leite é uma prática comum e que preocupa as agências reguladoras, indústrias e a população. Apesar da crescente necessidade de identificação desse tipo de fraude, os métodos empregados geralmente possuem baixo rendimento analítico e alta dependência de mão-de-obra. Sendo assim, objetivou-se desenvolver calibração e validação para monitoramento de adulteração em leite cru, utilizando equipamento compacto (MilkoScan FT1), que adota a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Ademais, objetivou-se comparar a acurácia na detecção de adulterantes do método de FTIR com os testes físico-químicos tradicionais adotados pela indústria no controle de qualidade do leite. Para isso, cerca de 2500 amostras de leite foram utilizadas para construção do espectro de referência e 1625 amostras foram empregadas para validar a identificação de cinco dos principais adulterantes (em três diferentes concentrações cada) encontrados em leite: (1) amido de milho; (2) bicarbonato de sódio; (3) citrato de sódio; (4) formaldeído; (5) sacarose, além da adição de dois níveis de água ou soro de leite. Após esta etapa, 650 amostras foram preparadas para comparação dos métodos, utilizando os mesmos adulterantes nas mesmas concentrações da etapa anterior. Os resultados demonstraram que as calibrações desenvolvidas expressaram boa capacidade geral de detecção de adulteração, apresentando excelente sensibilidade (84%) e especificidade (100%), principalmente quando comparadas com os testes tradicionais, visto que o método de FTIR apresentou capacidade de identificação de adulterantes em leite cru superior aos métodos físico-químicos tradicionais, podendo ser utilizado diretamente nas plataformas de recepção do leite nos laticínios, melhorando os processos industriais de detecção de adulterantes.

Palavras-chave: Fraude; Adulteração; FTIR; Laticínios; Calibração; Validação

ABSTRACT

Application of Fourier transform infrared spectroscopy to monitoring adulterants in raw milk

Milk adulteration is a common practice that concerns regulatory agencies, industry and the population. Despite the growing need for the identification of this type of fraud, the methods employed generally present low performance and high dependency on hand labor. Therefore, this study aimed to calibrate and validate a compact equipment (MilkoScan FT1) that adopts a Fourier transform infrared spectroscopy to monitor adulteration in raw milk. Furthermore, this study aimed to compare the accuracy in adulterants detection, of the FTIR method with that of conventional physico-chemical tests, adopted by the dairy industry in milk quality control. For this, almost 2500 milk samples were used for reference spectrum construction and 1625 samples were used in the validation process, to identification of the following five main adulterants (at three different concentrations) found in milk: (1) cornstarch, (2) sodium bicarbonate, (3) sodium citrate, (4) formaldehyde, and (5) saccharose, plus the additions of two levels of water or whey. After this step, 650 samples were prepared to compare the methods, using the same adulterants at the same concentrations of the previous step. The results revealed that the developed calibration demonstrated a good adulteration detection ability with excellent sensitivity (84%) and specificity (100%), mainly when compared with traditional tests. The FTIR method showed capacity of adulterants identification higher than that presented by physico-chemical methods, which proves its ability to be used directly in the milk reception platforms in dairy industry, improving industrial processes of adulterants detection.

Keywords: Fraud; Adulteration; FTIR; Dairy industry; Calibration; Validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da divisão das amostras coletadas de cada caminhão transportador.....	27
Figura 2. Sensibilidade (para as amostras adulteradas) e especificidade (para amostras de controle - sem adulteração) das calibrações testadas.	33
Figura 3. Sensibilidades apresentadas pelos métodos de FTIR e físico-químicos para cada adulterante, em cada concentração utilizada, considerando também a adição de água (3% ou 6%) ou soro (3% ou 6%).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores médios, mínimos e máximos de gordura (Gord), proteína (Prot), sólidos não-gordurosos (SNG), caseína (Cas), acidez (Ac) e densidade (Dens) das amostras utilizadas na construção do espectro de referência.....	29
Tabela 2. Médias do ranqueamento das calibrações após a aplicação do teste de Kruskal-Wallis.	31
Tabela 3. Comparação múltipla entre as doze calibrações feita depois do ranqueamento do teste de Kruskal-Wallis e após a aplicação do teste de Dunn.	32
Tabela 4. Sensibilidade (%) apresentada pela calibração 7 para todos os adulterantes com adição de água ou soro de leite e somente com adição de água ou soro de leite.....	34
Tabela 5. Comparação da proporção de acertos dos método de FTIR com os testes físico-químicos tradicionais.....	49
Tabela 6. Comparação da proporção de acertos dos testes físico-químicos específicos para cada adulterante com o método de FTIR.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ASM: Abnormal Screening Module

ATR: Attenuated Total Reflectance

EA: Escore de Autenticidade

FTIR: Fourier Transform Infrared

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PCA: Principal Component Analysis

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCs: Principais Componentes

PLS: Partial Least Squares

PRESS: Predicted Residual Error of Sum of Squares

R^2 : coeficiente de determinação

RBQL: Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite

SE: erro padrão

SEC: erro padrão de calibração

SIMCA: Soft Independent Modeling by Class Analogy

1. INTRODUÇÃO

A autenticidade dos alimentos é uma grande preocupação para pesquisadores, consumidores, indústrias e formuladores de políticas em todos os níveis do processo de produção (De la Fuente & Juárez, 2005). Como produto com alto valor nutritivo e alto custo de produção, o leite se torna um dos alimentos mais vulneráveis às práticas fraudulentas, com grande potencial de adulteração (De la Fuente & Juárez, 2005; Karoui & De Baerdemaeker, 2007; Sharma & Paradakar, 2010).

Inúmeros casos de adulteração no leite têm ocorrido em alguns dos maiores produtores mundiais (OECD/FAO, 2016), principalmente China (Lim *et al.*, 2016; Manning & Soon, 2014; Sharma & Paradakar, 2010), Índia (Manning & Soon, 2014) e Brasil (Botelho, Reis, Oliveira, & Sena, 2015), neste último sobretudo devido às mudanças na legislação e exigências por leite de melhor qualidade, estabelecidas principalmente pela Instrução Normativa 62, que substituiu a Instrução Normativa 51 (Brasil, 2011).

Em 2008, na China, leite e outros alimentos foram adulterados com melamina (Sharma & Paradakar, 2010). Quase 52 mil lactentes e crianças foram hospitalizadas por problemas urinários, bloqueios de tubo renal, cálculos renais, além da morte de seis recém-nascidos, relacionados com o consumo de melamina em produtos lácteos (Xu *et al.*, 2009). A melamina foi intencionalmente adicionada ao leite diluído com água (para aumento de volume) para aumentar o teor de proteína e satisfazer o teor mínimo exigido (3%), determinado por métodos relativamente baratos, baseados no conteúdo de nitrogênio do produto, tais como o método de Kjeldahl ou Dumas (Lim *et al.*, 2016). Na Índia, de acordo com Manning & Soon (2014), foram encontrados diversos adulterantes em amostras de leite, como detergentes e glicose, chegando a 100% o nível de não conformidade do leite em alguns estados, o que demonstra o alto grau de adulteração do leite naquele país.

No Brasil, alguns escândalos de adulteração no leite foram recentemente relatados pela Polícia Federal (Botelho *et al.*, 2015). Em 2007, em uma operação denominada “Ouro Branco”, a polícia encontrou leite adulterado com citrato de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, sacarose, fosfatos, carbonatos, bicarbonatos e peróxido de hidrogênio (Botelho *et al.*, 2015). Já em 2013, com a operação “Leite Compensado”, um novo esquema de adulteração do leite foi identificado na região Sul do Brasil. Transportadores coletavam o leite nas fazendas e em seguida adicionavam água e ureia (que continha formaldeído) para corrigir as características

físico-químicas do leite¹ e, com isso, aumentar o volume de venda sem serem identificados pelas análises de qualidade do produto. As investigações revelaram que o esquema fraudou mais de 100 milhões de litros de leite e, com isso, os adulteradores conseguiram aumentar os lucros em até 10%².

Em 2014, esta mesma operação identificou novas adulterações do leite com formaldeído, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, em oito cidades do Rio Grande do Sul. As investigações concluíram que proprietários e funcionários de laticínios davam ordens para que subordinados corrigissem, com adição de diversos produtos (citrato de sódio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, bicarbonato de sódio, entre outros), a acidez do leite cru que estava se deteriorando³. A Polícia Federal segue com a operação em 2016, realizando novas prisões de pessoas envolvidas com fraude do produto⁴.

Tendo em vista os relatos anteriores, é possível notar que as principais adulterações ocorridas no leite são a adição de água e soro de leite com o objetivo de aumentar o volume do produto; neutralizantes, como bicarbonato de sódio, para mascarar a acidez desenvolvida devido às más condições sanitárias na coleta, transporte e/ou armazenamento; reconstituintes de densidade, como sal, açúcar, amido, para mascarar a adição de água ou aumentar o teor de sólidos totais; substâncias inibidoras do crescimento de microrganismos, como formaldeído, hipocloritos, peróxido de hidrogênio; adição de substâncias contabilizadas como proteína nas análises, como melamina e ureia; mistura de leite de diferentes espécies, entre outros (Bottero *et al.*, 2003; Das, Sivaramakrishna, Biswas, & Goswami, 2015; Harding, 1995; Kartheek, Smith, Muthu, & Manavalan, 2011; Liu, Ren, Liu, & Guo, 2015; Tronco, 2013).

Devido à crescente sofisticação das adulterações no leite e sua prática tanto pelas indústrias quanto pelos produtores e transportadores, o desenvolvimento de tecnologias para identificação desse tipo de fraude sempre se fez necessário. Em caso de prática fraudulenta na indústria de laticínios, são necessários métodos de controle adequados para avaliar a autenticidade das amostras (Santos, Pereira-Filho, & Rodriguez-Saona, 2013). Desta maneira, a partir da elaboração de fraudes, métodos de identificação foram sendo desenvolvidos, a exemplo da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Cassoli, Sartori, Zampar, & Machado, 2011; Jawaid, Talpur, Sherazi, Nizamani, & Khaskheli, 2013; Nicolaou, Xu, & Goodacre, 2010; Rodriguez-Saona & Allendorf, 2011), escaneamento por imagens

¹ ILHA, F. Até 15 milhões de litros de leite foram contaminados com formol no Rio Grande do Sul. O Globo, Porto Alegre, 08 mai. 2013.

² DORNELLES, E. MP faz nova operação contra fraude no leite em oito municípios do RS. RBS TV, 14 mar. 2014.

³ APÓS 5ª operação, MP denuncia 14 pessoas por fraude no leite no RS. G1. 16 mai. 2014.

⁴ OPERAÇÃO do MP combate fraude em leite e queijo em quatro cidades do RS. G1. 30 set. 2016.

(Santos, Wentzell, & Pereira-Filho, 2012), técnicas imunológicas, electroforéticas, cromatográficas e PCR (*polymerase chain reaction*) (Bottero *et al.*, 2003; Nicolaou *et al.*, 2010), além dos métodos físico-químicos convencionais, como análise do ponto crioscópico, pH, densidade, pesquisas de neutralizantes, conservantes e reconstituintes, dentre outros (Brasil, 2006).

No entanto, a maioria dos métodos físico-químicos convencionais exige um grande conjunto de ensaios para verificar a qualidade do leite, o que demanda um longo tempo para análise (Santos *et al.*, 2012), tornando difícil o uso desse tipo de técnica no rastreio de adulterantes na rotina de análise da maioria dos laticínios (Nicolaou *et al.*, 2010). Dificilmente uma indústria, em sua rotina diária, consegue analisar o leite de todos os seus produtores para todos os adulterantes já descritos. Além disso, outra preocupação é identificar a adulteração assim que ela é desenvolvida, já que historicamente, fica evidente o perfil reativo, ou seja, a adulteração precisa ocorrer para que só depois sejam desenvolvidos métodos para identificá-la (Cassoli, 2010).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) vem ganhando espaço no controle de qualidade do leite cru, principalmente por ser um método capaz, potencialmente, de resolver muitos destes problemas, pois é uma técnica rápida (análise em menos de um minuto), de fácil execução, que exige o mínimo de preparação da amostra, além de apresentar alta sensibilidade e baixo custo operacional (Nicolaou & Goodacre, 2008). O pressuposto básico por trás da aplicação das técnicas de espectroscopia baseia-se na geração da “impressão digital” dos alimentos (Karoui & De Baerdemaeker, 2007). Um produto lácteo com uma dada composição química exposta a uma fonte de luz tem um espectro característico, que é um resultado da absorção de vários componentes químicos (Karoui & De Baerdemaeker, 2007). Nesta técnica, são detectadas as frequências específicas de energia absorvida por uma molécula dentro de um grupo funcional, já que uma vez que uma molécula recebe a radiação infravermelha ($4000-600\text{ cm}^{-1}$, no infravermelho médio), ela atinge um estado vibracional excitado, passando para um nível de energia mais alto (Nicolaou & Goodacre, 2008). Como cada molécula só absorve a energia quando a frequência da energia infravermelha dirigida a ela é igual à frequência de um dos modos de vibração fundamentais dessa molécula, o resultado final desta absorvância é um espectro de infravermelho altamente específico (Nicolaou & Goodacre, 2008). Como a composição exata de qualquer material natural se modifica, dependendo da variedade, estação do ano, local e outras características, é necessário que se possua um conjunto de espectros representativos ou “padrões”, com os quais o espectro de um

material de teste possa ser comparado, de forma a estabelecer a sua qualidade ou autenticidade (Karoui & De Baerdemaeker, 2007).

A espectroscopia no infravermelho médio vem se tornando um dos métodos mais utilizados para análise do leite e de produtos lácteos. Isto porque quase todas as substâncias químicas (exceto alguns sais e compostos químicos muito simples) tem o seu próprio espectro distinto; apenas as substâncias que ocorrem em concentrações muito baixas podem ser difíceis de determinar, pois níveis de ruído podem ser encontrados no método (Karoui & De Baerdemaeker, 2007).

Um exemplo pioneiro da aplicação da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no monitoramento da qualidade do leite cru é a análise chamada Escore de Autenticidade (EA). A análise consiste em comparar o espectro da amostra adulterada com um espectro de referência, atribuindo-se um “escore”. Quanto maior for a diferença entre os espectros, maior será o EA (Cassoli *et al.*, 2011). A análise tem permitido a identificação de casos de adulteração em leite cru e se mostrado uma ferramenta promissora. No entanto, o EA apresenta algumas limitações, como por exemplo, baixo limite de detecção e baixa sensibilidade para determinados compostos (Cassoli *et al.*, 2011). Todavia, são necessários maiores estudos para comprovar a eficiência de tais métodos para que estes possam ser utilizados pelas indústrias e pela própria Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) nas amostras já recebidas para controle de qualidade previsto em legislação.

Neste contexto, esta tese justifica-se pela necessidade de desenvolvimento e validação de métodos rápidos e eficazes na determinação de fraudes ocorridas no leite. A hipótese é de que o método de FTIR, que vem sendo cada vez mais utilizado pelas indústrias para avaliação da composição do leite, possui capacidade de identificar as principais adulterações no leite cru, de forma equivalente ou superior aos métodos tradicionais. Sendo assim, o objetivo geral foi desenvolver calibração e validação para monitoramento de adulteração em leite cru, utilizando equipamento compacto (MilkoScan FT1), que adota a espectroscopia de FTIR. A calibração foi validada para diferentes adulterantes e concentrações, e seu desempenho foi comparado com os testes químicos tradicionais adotados pela indústria no controle de qualidade da matéria-prima (Brasil, 2006). Diferentemente de outros estudos, neste trabalho foi utilizado um equipamento compacto, com menor capacidade analítica (comparado com os equipamentos utilizados pelos grandes laboratórios especializados em análise de leite) e já adotado pelas principais indústrias nas análises de composição do leite. Além disso, foram testadas adulterações com algum tipo de diluente (água ou soro de leite) somadas ao uso de outros adulterantes, situação mais próxima

à praticada pelos adulteradores, que visam, quase sempre, aumento de volume e correções das características do leite que foram alteradas por essa prática.

Resultados deste estudo poderão ser aplicados diretamente no processo de detecção de fraudes e, dessa forma, contribuirão para a proteção da saúde pública, diminuição das perdas econômicas relacionadas à fraude e melhoria da qualidade do leite comercializado no país.

Referências

- Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., & Sena, M. M. (2015). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food Chemistry*, 181, 31–37. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.077>
- Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., & Turi, R. M. (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products, 13, 277–282.
- Brasil (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel*. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 30 de dezembro de 2011. Seção 1, p. 06.
- Brasil (2006). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos*. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 14 de dezembro de 2006. Seção 1, p. 08.
- Cassoli, L. D. (2010). *Validação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier para identificação de adulteração em leite cru*. PhD Thesis, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo. Piracicaba, SP. Retrieved in 07/04/2015 from <https://goo.gl/l8aZmo>
- Cassoli, L. D., Sartori, B., Zampar, A., & Machado, P. F. (2011). An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 480–485. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00711.x>
- Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2015). A low cost instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. *ISA Transactions*, 56, 268–275. <http://doi.org/10.1016/j.isatra.2014.11.021>
- De la Fuente, M. A., & Juárez, M. (2005). Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 563–85. <http://doi.org/10.1080/10408690490478127>
- Jawaid, S., Talpur, F. N., Sherazi, S. T. H., Nizamani, S. M., & Khaskheli, A. A. (2013). Rapid

- detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR-Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 141(3), 3066–3071. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.106>
- Harding, F. (Ed). (1995). *Milk Quality* (Chapter 6). London: Blackie Academic & Professional.
- Karoui, R., & De Baerdemaeker, J. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102(3), 621–640. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042>
- Kartheek, M., Anton Smith, A., Kottai Muthu, A., & Manavalan, R. (2011). Determination of adulterants in food: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(2), 629–636.
- Lim, J., Kim, G., Mo, C., Kim, M. S., Chao, K., Qin, J., ... Cho, B.-K. (2016). Detection of melamine in milk powders using near-infrared hyperspectral imaging combined with regression coefficient of partial least square regression model. *Talanta*, 151, 183–91. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.035>
- Liu, J., Ren, J., Liu, Z. M., & Guo, B. H. (2015). A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food Chemistry*, 172, 251–256. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.063>
- Manning, L., & Soon, J. M. (2014). Developing systems to control food adulteration. *Food Policy*, 49(P1), 23–32. <http://doi.org/10.1016/j.foodpol.2014.06.005>
- Nicolaou, N., & Goodacre, R. (2008). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *The Analyst*, 133, 1424–1431. <http://doi.org/10.1039/b804439b>
- Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2010). Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5651–60. <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3619>
- OECD/FAO (2016), “Dairy and Dairy Products”, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025, OECD. Publishing, Paris. DOI: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-11-en
- Rodriguez-Saona, L. E., & Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), 467–483. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133750>
- Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rodriguez-Saona, L. E. (2013). Application of hand-held and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), 1205–1211. <http://doi.org/10.1021/jf303814g>
- Santos, P. M., Wentzell, P. D., & Pereira-Filho, E. R. (2012). Scanner Digital Images Combined

- with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow's Milk. *Food Analytical Methods*, 5(1), 89–95. <http://doi.org/10.1007/s12161-011-9216-2>
- Sharma, K., & Paradakar, M. (2010). The melamine adulteration scandal. *Food Security*, 2(1), 97–107. <http://doi.org/10.1007/s12571-009-0048-5>
- Tronco, V. M. (2013). *Manual para inspeção da qualidade do leite*. 5ed. Santa Maria: UFSM. 208 p. (Chapter 5).
- Xu, X. min, Ren, Y. ping, Zhu, Y., Cai, Z. xuan, Han, J. long, Huang, B. fen, & Zhu, Y. (2009). Direct determination of melamine in dairy products by gas chromatography/mass spectrometry with coupled column separation. *Analytica Chimica Acta*, 650(1), 39–43. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.026>

2. VALIDAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER NO MONITORAMENTO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU

Resumo

A adulteração do leite é uma prática comum e que preocupa as agências reguladoras, indústrias e a população. Apesar da crescente necessidade de identificação desse tipo de fraude, os métodos empregados geralmente possuem baixo rendimento analítico e alta dependência de mão-de-obra. Sendo assim, objetivou-se calibrar e validar um equipamento compacto (MilkoScan FT1), que adota a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para monitoramento de adulteração em leite cru. Cerca de 2500 amostras de leite foram utilizadas para construção do espectro de referência e 1625 amostras foram utilizadas para validar a identificação dos cinco adulterantes mais utilizados (em três diferentes concentrações cada): (1) amido de milho; (2) bicarbonato de sódio; (3) citrato de sódio; (4) formaldeído; (5) sacarose, além da adição de dois níveis de água ou soro de leite. Os resultados demonstraram que as calibrações desenvolvidas expressaram boa capacidade geral de detecção de adulteração, apresentando sensibilidade de 84% e especificidade de 100%. Assim, a metodologia de FTIR configura-se como uma opção viável na identificação de adulteração em leite cru.

Palavras-chave: Fraude; Leite; FTIR; Validação; Calibração

Abstract

Milk adulteration is a common practice that concerns regulatory agencies, industry and the population. Despite the growing need for the identification of this type of fraud, the methods employed generally present low performance and high dependency on hand labor. This study aimed to calibrate and validate compact equipment (MilkoScan FT1) that adopts a Fourier transform infrared spectroscopy to monitor adulteration in raw milk. Almost 2500 milk samples were used for reference spectrum construction and 1625 samples were used in the validate process to identification of the following five most-used adulterants (at three different concentrations): (1) cornstarch, (2) sodium bicarbonate, (3) sodium citrate, (4) formaldehyde, and (5) saccharose, plus the additions of two levels of water or whey. The results revealed that the developed calibration demonstrated a good adulteration detection ability with sensitivity of 84% and specificity of 100%. Thus, this methodology is a viable option for identifying adulteration of raw milk.

Keywords: Fraud; Milk; FTIR; Validation; Calibration

2.1. Introdução

A adulteração de alimentos é uma prática antiga e que tem se tornado mais sofisticada com o passar do tempo (Kamal & Karoui, 2015). Alimentos que apresentam alto valor nutritivo, como o leite, são os mais vulneráveis à adulteração, o que torna crescente a demanda por produtos que tenham garantia de sua autenticidade (Karoui & De Baerdemaeker, 2007).

Nos últimos anos, têm-se observado diversas práticas de adulteração no leite, como a adição de melamina, ocorrida na China (Lim *et al.*, 2016) e de diversos outros compostos, como citrato de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, sacarose, fosfatos, carbonatos, bicarbonatos, peróxido de hidrogênio, ureia e formaldeído (Botelho, Reis, Oliveira, & Sena, 2015), ocorridos no Brasil e em outros países, como a Índia, gerando uma grande preocupação em toda cadeia de produção.

Devido à sofisticação das adulterações no leite e sua prática tanto pelas indústrias quanto pelos produtores e transportadores, o desenvolvimento de tecnologias para identificação desse tipo de fraude sempre se fez necessário. No entanto, estes métodos geralmente possuem baixo rendimento analítico, requerem utilização de reagentes e alta dependência de mão-de-obra (Harding, 1995). Tais características dificultam a implementação de programas de monitoramento em larga escala, o que torna muito difícil, para a indústria, analisar o leite de todos os produtores para todos os adulterantes já descritos, como rotina (Cassoli, 2010). Além disso, outro entrave é a identificação da adulteração assim que ela é desenvolvida, já que, historicamente, fica evidente o perfil reativo das fraudes, ou seja, a adulteração precisa ocorrer para que só depois sejam desenvolvidas metodologias para identificá-la (Cassoli, 2010).

Da mesma forma que as adulterações se tornam cada vez mais sofisticadas, tal evolução também é observada nos métodos analíticos. Exemplo disso é a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Cassoli, Sartori, Zampar, & Machado, 2011; Jawaid, Talpur, Sherazi, Nizamani, & Khaskheli, 2013; Nicolaou, Xu, & Goodacre, 2010) e outras técnicas espectroscópicas e cromatográficas (Andersen *et al.*, 2005; Bogialli *et al.*, 2004; Chen, Li, & Peng, 2005; Garcia *et al.*, 2012; Sassine, Moura, Léo, & Bustillos, 2004), além da técnica de escaneamento de imagens de leite para identificar adulteração (Santos, Wentzell, & Pereira-Filho, 2012).

A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) vem ganhando espaço no controle de qualidade do leite cru, principalmente pela rapidez de suas análises, pequena necessidade de preparo das amostras e ao uso reduzido de reagentes, o que

resulta em economia de tempo e custos e aumento do número de amostras que podem ser analisadas num mesmo intervalo de tempo (Rodriguez-Saona & Allendorf, 2011).

O pressuposto básico por trás da aplicação das técnicas de espectroscopia baseia-se na geração da “impressão digital” dos alimentos (Karoui & De Baerdemaeker, 2007). Um produto lácteo com uma dada composição química exposta a uma fonte de luz tem um espectro característico, que é o resultado da absorção de vários componentes químicos (Karoui & De Baerdemaeker, 2007). Como a composição exata de qualquer material natural se modifica, dependendo da variedade, estação do ano, local e outras características, é necessário que se possua um conjunto de espectros representativos ou “padrões”, com os quais o espectro de um material de teste possa ser comparado, de forma a estabelecer a sua qualidade ou autenticidade (Karoui & De Baerdemaeker, 2007).

Atualmente existem no mercado diferentes configurações de equipamentos de FTIR, desde o mais compacto (utilizado no controle de qualidade na recepção do leite pelas indústrias) até o de alto desempenho (utilizado por laboratórios centrais, com maior capacidade analítica, de até 600 amostras/hora). Os equipamentos compactos trazem à indústria a possibilidade de incluir o FTIR no seu programa de controle de qualidade da matéria-prima em adição, ou até mesmo substituição, aos métodos tradicionais (químicos) preconizados pelos órgãos fiscalizadores.

Sendo assim, devido à necessidade de desenvolvimento e validação de métodos rápidos, eficazes e de baixo custo analítico na determinação de fraudes ocorridas no leite, objetivou-se desenvolver calibração e validação de um equipamento compacto (MilkoScan FT1, Foss Analytical), que adota a metodologia de FTIR para monitoramento de adulteração em leite cru, utilizando sempre adulteração com água ou soro de leite somadas à inclusão de outros tipos de adulterantes. A hipótese é de que o equipamento que adota a metodologia de FTIR e que vem sendo cada vez mais utilizado pelas indústrias para avaliação da composição do leite, possui capacidade de identificar as principais adulterações no leite cru.

Resultados deste estudo poderão ser aplicados diretamente no processo de detecção de fraudes e, dessa forma, contribuirão para a proteção da saúde pública e melhoria da qualidade do leite comercializado.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Local de desenvolvimento

As amostras de leite cru analisadas foram obtidas de um laticínio localizado no estado de Minas Gerais, Brasil, que processa cerca de 800 mil litros de leite por dia. A indústria possui o equipamento MilkoScan FT1, o qual já é utilizado no controle de qualidade na recepção de leite, para realização de análises tradicionais como gordura, proteína, sólidos totais, nitrogênio ureico, ponto crioscópico, pH, etc.

2.2.2. Construção do espectro de referência

Para a construção do espectro de referência, foram coletadas 2497 amostras de leite cru provenientes de caminhões transportadores que chegavam diariamente à indústria, durante seis meses, do início de agosto de 2014 até o fim de janeiro de 2015, para representar a variação da composição ocorrida no leite em diferentes épocas do ano. De cada caminhão transportador foram coletadas, através da tampa do tanque, com utensílio próprio para este fim, amostras de leite em frascos esterilizados de 50 mL, que foram prontamente analisadas. Essas amostras representam o leite de todo caminhão transportador que chegou na indústria durante esse período de seis meses.

As análises foram feitas no equipamento MilkoScan FT1, que adota a metodologia de FTIR. O equipamento tem a capacidade de varrer toda a região do infravermelho médio, com comprimentos de onda entre 2.0 e 10.8 μm ($5012 - 926 \text{ cm}^{-1}$), sendo os espectros exportados e armazenados em arquivos eletrônicos (Foss Analytical, 2011a). Mensalmente foi realizada a equalização do equipamento, conforme recomendação do fabricante (Foss Analytical, 2011), para garantir a padronização da aquisição espectral ao longo do período experimental (Hansen, 1998).

A calibração prévia do equipamento, realizada para caracterização da composição do leite (teores de gordura, proteína, caseína, sólidos totais, nitrogênio ureico, crioscopia, pH, etc), foi feita com base nos kits (amostras) de teste (Valacta®), através do software FOSS Integrator,

que calcula automaticamente todos os parâmetros de calibração (erro padrão (SE); erro padrão de calibração (SEC); coeficiente de determinação (R^2)) e inclui o recurso de calibração “*slope intercept*” para fazer todos os cálculos necessários para otimizar o desempenho do equipamento.

2.2.3. Desenvolvimento das calibrações

Para análise do banco de dados espectral, foi utilizada a análise de componentes principais (ou fatores) através do software ASM (*Abnormal Screening Module*) (Foss Analytical, 2011a). Um dos objetivos da análise de componentes principais (PCA) é a redução da quantidade de dados, isto é, ajustar as informações do conjunto de dados original e substituí-las por um conjunto menor de variáveis latentes (Dunn, Scott, & Glen, 1989). Nesse tipo de análise, os primeiros componentes principais (PCs) contêm quase toda a informação útil do conjunto de dados, enquanto os PCs restantes contêm principalmente ruído (Dunn *et al.*, 1989). Logo, um número ótimo de componentes deve ser escolhido para melhor separar a informação útil do ruído (Dunn *et al.*, 1989).

Assim, foram desenvolvidas doze calibrações para o espectro de referência e amostras de validação, em que foram considerados diferentes números de fatores (ou componentes principais) no modelo estatístico: 8, 10, 12, 14, 16 e 18 fatores, com uma ou duas eliminações *outliers*. Na primeira eliminação de *outliers*, foram descartados os espectros das amostras que possuíam grande diferença em relação aos valores espectrais médios, sendo a curva de calibração ajustada e utilizada no cálculo dos escores. Na segunda eliminação, após a primeira exclusão de *outliers* e ajuste da curva de calibração, novos espectros discrepantes foram excluídos, sendo a curva de calibração novamente ajustada e, assim, utilizada no cálculo dos escores.

O cálculo do escore é baseado na diferença apresentada entre o espectro de referência (leite sem adulteração) e o espectro das amostras de teste, sendo calculado de acordo com a “distância espectral” (distância Euclidiana) média apresentada entre essas amostras-teste e as amostras de referência. Esta distância será baixa ou alta para as amostras que se assemelharem ou diferirem, respectivamente, da referência (Foss Analytical, 2011a).

Para interpretação dos resultados, adotou-se a seguinte referência para as diferentes calibrações utilizadas: (1) *calibração 1*: envolvendo 8 fatores com eliminação única de *outliers*; (2) *calibração 2*: 8 fatores com duas eliminações de *outliers*; (3) *calibração 3*: 10 fatores com

eliminação única de *outliers*; (4) *calibração 4*: 10 fatores com duas eliminações de *outliers*; (5) *calibração 5*: 12 fatores com eliminação única de *outliers*; (6) *calibração 6*: 12 fatores com duas eliminações de *outliers*; (7) *calibração 7*: 14 fatores com eliminação única de *outliers*; (8) *calibração 8*: 14 fatores com duas eliminações de *outliers*; (9) *calibração 9*: 16 fatores com eliminação única de *outliers*; (10) *calibração 10*: 16 fatores com duas eliminações de *outliers*; (11) *calibração 11*: 18 fatores com eliminação única de *outliers*; (12) *calibração 12*: 18 fatores com duas eliminações de *outliers*;

2.2.4. *Preparo das amostras para validação*

O leite utilizado nesta etapa foi coletado, de forma aleatória, de 25 caminhões transportadores e mantido sob refrigeração ($< 10^{\circ}\text{C}$) desde a coleta até a sua utilização. O leite coletado de cada caminhão (65 litros por dia de coleta) foi posteriormente subdividido em amostras de um litro para receber os adulterantes em suas diferentes concentrações.

O esquema de divisão das amostras está representado na Figura 1. Em cada amostra de um litro de leite foram adicionados 3% ou 6% de água e, posteriormente, os seguintes compostos e concentrações: (1) amido de milho (500 mg/L; 750 mg/L e 1000 mg/L); (2) bicarbonato de sódio (600 mg/L; 1200 mg/L e 1800 mg/L); (3) citrato de sódio (500 mg/L; 750 mg/L e 1000 mg/L); (4) formaldeído (150 mg/L; 300 mg/L e 450 mg/L); (5) sacarose (250 mg/L; 500 mg/L e 750 mg/L). No total, foram analisadas 750 amostras de leite adulteradas com água, em 25 repetições.

Também foi testada a adulteração com soro de leite. Para isso, em cada amostra de um litro de leite foram adicionados 3% ou 6% de soro de leite, e, posteriormente, os mesmos compostos e concentrações utilizados na adulteração com água. No total, foram analisadas 750 amostras de leite adulteradas com soro de leite, em 25 repetições.

As amostras controle eram constituídas de leite cru (sem nenhum tipo de adulteração), leite cru adicionado com água (3 ou 6%) e leite cru adicionada com soro de leite (3 ou 6%). Desse modo, foram analisadas 1625 amostras, sendo estas: 1500 amostras adulteradas com água ou soro de leite (3 ou 6%), com adição de cinco adulterantes (em três concentrações cada), além de 25 amostras-controle de leite cru e de 25 amostras adulteradas com água (3%); 25 amostras adulteradas com água (6%); 25 amostras adulteradas com soro de leite (3%) e 25 amostras adulteradas com soro de leite (6%).

Figura 1. Esquema representativo da divisão das amostras coletadas de cada caminhão transportador.

Nota: Este procedimento foi repetido 25 vezes. Amido 1 = amido na concentração de 500mg/L; Amido 2, amido a 750mg/L; Amido 3 = amido, a 1000mg/L; Bicarbonato 1 = bicarbonato de sódio, a 600 mg/L; Bicarbonato 2 = bicarbonato de sódio, a 1200 mg/L; Bicarbonato 3 = bicarbonato de sódio, a 1800 mg/L; Formol 1 = formaldeído, a 150 mg/L; Formol 2 = formaldeído, a 300 mg/L; Formol 3 = formaldeído, a 450 mg/L; Sacarose 1 = sacarose, a 250 mg/L; Sacarose 2 = sacarose, a 500 mg/L e Sacarose 3 = sacarose, a 750 mg/L.

2.2.5. Análises laboratoriais e validação

As análises foram realizadas seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante do equipamento MilkoScan FT1 (Foss Analytical, 2011). Foram determinados os teores de gordura, proteína, caseína, sólidos não gordurosos, acidez e densidade, para caracterização da composição do leite. O escore (baseado na diferença entre o espectro de referência e o espectro das amostras de teste, conforme relatado anteriormente) foi calculado de acordo com os dados obtidos com as doze calibrações desenvolvidas na etapa anterior e, aquelas amostras que apresentaram escore maior que três, foram consideradas adulteradas.

Para avaliação da acurácia de cada calibração em detectar leite adulterado, foram calculadas a sensibilidade (capacidade de identificar corretamente amostras adulteradas) e a especificidade (capacidade de identificar corretamente amostras não adulteradas) (Erdreich & Lee, 1981).

Aplicou-se, a partir da sensibilidade apresentada por cada calibração (que envolveu 8, 10, 12, 14, 16 ou 18 fatores, com eliminação única ou dupla de *outliers*) na detecção de cada adulterante, o teste de Kruskal-Wallis, que avalia o posicionamento das médias através da organização de um *ranking*, estipulando uma ordem de classificação, da melhor para a pior média (menores valores de médias são considerados melhores). Estabelecido o *ranking* das calibrações, foi utilizado o teste de Dunn para comparação múltipla entre os resultados.

Para definir a calibração que apresentou melhor desempenho, foram analisados os resultados de especificidade e sensibilidade conjuntamente, ou seja, as calibrações que tiveram os melhores resultados do ponto de vista da especificidade foram selecionadas e, em seguida, foram determinadas quais apresentaram os melhores resultados em relação à sensibilidade.

Todas as estimativas foram calculadas utilizando o *software* R (versão 3.2.4; R Foundation, Vienna, Austria) e com nível de significância estatística de 0,05.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Construção do espectro de referência

A composição do leite varia conforme a estação do ano, estágio de lactação, tipo de alimentação oferecida aos animais, estado fisiológico, intervalo de ordenhas, fatores genéticos, dentre outros (Heck, van Valenberg, Dijkstra, & van Hooijdonk, 2009). Dessa forma, o leite proveniente de diferentes regiões e sistemas de alimentação resultará em distintos efeitos sazonais nos principais componentes do leite cru (Chen, Lewis, & Grandison, 2014). Logo, para construção do espectro de referência, as amostras devem representar essa variabilidade (Soyeurt *et al.*, 2009).

Sendo assim, o espectro de referência foi construído através da análise de amostras de leite coletadas durante seis meses, para que fosse possível obter a variação sazonal a que o leite está submetido. As médias (depois da remoção de *outliers*) dos teores de gordura, proteína, caseína, sólidos não-gordurosos, acidez (g de ácido láctico/dL de leite) e densidade, durante esses seis meses de coleta de dados, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores médios, mínimos e máximos de gordura (Gord), proteína (Prot), sólidos não-gordurosos (SNG), caseína (Cas), acidez (Ac) e densidade (Dens) das amostras utilizadas na construção do espectro de referência.

	Gord. (%)	Prot. (%)	SNG (%)	Cas. (%)	Ac. (g/dL)	Dens. (g/mL)
Média	3,51	3,14	8,77	2,43	0,154	1,031
Máximo	5,06	3,35	9,24	2,87	0,178	1,034
Mínimo	2,95	2,94	8,38	2,28	0,141	1,028
CV* (%)	6	2	1	2	4	0

* CV = coeficiente de variação

2.3.2. Desenvolvimento da calibração

Nessa etapa, os resultados obtidos a partir do uso de dez fatores (componentes principais) conseguiram explicar mais que 90% da variação espectral das amostras utilizadas na construção do espectro de referência. De acordo com Heur *et al.* (2001) e Karoui e De Baerdemaeker (2007), para construção de um modelo de calibração, é necessário a escolha de fatores que representem cerca de 90% da variabilidade espectral das amostras.

Alguns trabalhos corroboram com os resultados obtidos nessa etapa, apresentando número de fatores semelhante ao que foi aqui encontrado. Cassoli *et al.* (2011) concluíram que nove fatores foram suficientes para explicar 90% da variação espectral das amostras de referência; já Santos *et al.* (2013) desenvolveram modelos utilizando 6-7 fatores e que explicavam >97% da variância nos dados multi-espectrais. Etzion *et al.* (2004), obtiveram melhores resultados na determinação da concentração de proteínas em leite cru utilizando nove fatores no modelo de PLS (mínimos quadrados parciais).

2.3.3. Validação

Como a adulteração do leite geralmente ocorre com a adição de substâncias em pequenas concentrações (Cassoli *et al.*, 2011), na etapa de validação foram desenvolvidas calibrações com variação no número de fatores (8 a 18), conforme descrito anteriormente.

Os fatores utilizados neste trabalho foram calculados através do uso de modelos de calibração, que foram automaticamente selecionados através da função “*auto select optimal*” do software ASM (Foss Analytical, 2011a) que acompanha o equipamento de FTIR utilizado. A seleção dos fatores foi baseada no valor PRESS (soma de quadrados do erro residual), que indica quão bem um modelo se encaixa nos dados de calibração (Jawaid *et al.*, 2013).

Os resultados descritos na Tabela 2 evidenciam que, dentre as doze calibrações comparadas, a calibração 12 (envolvendo 18 fatores com duas eliminações de *outliers*) apresentou melhor classificação, pelo teste de Kruskal-Wallis. Esta calibração apresentou o menor valor no ranqueamento porém, quando comparada com as demais (através do teste de Dunn), não diferiu ($p > 0,05$) das calibrações 10 e 8 (Tabela 3).

Tabela 2. Médias do ranqueamento das calibrações após a aplicação do teste de Kruskal-Wallis.

	Cal. 12	Cal. 10	Cal. 8	Cal. 9	Cal. 4	Cal. 11
Ranking	1,1333	1,3500	1,6000	2,3667	2,4000	2,5500
S*	0,0692	0,1136	0,1750	0,3566	0,2952	0,3887

	Cal. 2	Cal. 7	Cal. 5	Cal. 3	Cal. 1	Cal. 6
Ranking	2,6833	2,7333	3,0167	3,2333	3,6167	4,7333
S*	0,4182	0,4137	0,4495	0,4347	0,5165	0,6462

*S = erro padrão. Menores valores significam melhor posicionamento no *ranking*.

Contudo, é recomendado não utilizar as calibrações que envolvam um número máximo de fatores e, quando não existir diferenças significativas entre as calibrações, a que envolver um menor número de fatores deve ser escolhida (Tobias, 1995). Isso se deve ao fato de que, quanto maior o número de fatores utilizados, maior será a proporção de componentes que pouco explicam a variação amostral, introduzindo ruído à calibração, além do fato de que esses pequenos componentes irão carregar problemas de colinearidade (Geladi & Kowalski, 1986). Obedecendo a esse critério, as calibrações 8 e 10 poderiam ser escolhidas como as que melhor identificaram adulteração no leite, pois estas não diferiram estatisticamente da calibração 12 e envolveram menor número de fatores.

Tabela 3. Comparação múltipla entre as doze calibrações feita depois do ranqueamento do teste de Kruskal-Wallis e após a aplicação do teste de Dunn.

	Cal.1	Cal.2	Cal.3	Cal.4	Cal.5	Cal.6	Cal.7	Cal.8	Cal.9	Cal.10	Cal.11
Cal.2	1,1236 (0,1306)										
Cal.3	0,3703 (0,3556)	-0,7534 (0,2256)									
Cal.4	1,0224 (0,1533)	-0,1013 (0,4597)	0,6521 (0,2572)								
Cal.5	1,0743 (0,1413)	-0,0493 (0,4803)	0,7040 (0,2407)	0,0519 (0,4793)							
Cal.6	-0,8150 (0,2075)	-1,9386 (0,0263*)	-1,1852 (0,1180)	-1,8373 (0,0331*)	-1,8893 (0,0294*)						
Cal.7	1,3766 (0,0843)	0,2530 (0,4001)	1,0064 (0,1571)	0,3543 (0,3616)	0,3024 (0,3812)	2,1916 (0,0142*)					
Cal.8	2,4877 (0,0064*)	1,3641 (0,0863)	2,1175 (0,0171*)	1,4654 (0,0714)	1,4134 (0,0788)	3,3027 (0,0005*)	1,1111 (0,1333)				
Cal.9	1,7461 (0,0404*)	0,6224 (0,2668)	1,3758 (0,0844)	0,7237 (0,2346)	0,6718 (0,2509)	2,5610 (0,0052*)	0,3694 (0,3559)	-0,7417 (0,2291)			
Cal.10	2,7713 (0,0028*)	1,6476 (0,0497*)	2,4010 (0,0082*)	1,7489 (0,0402*)	1,6970 (0,0448*)	3,5862 (0,0002*)	1,3946 (0,0816)	0,2835 (0,3884)	1,0252 (0,1526)		
Cal.11	1,4919 (0,0679)	0,3683 (0,3563)	1,1216 (0,1310)	0,4695 (0,3193)	0,4176 (0,3381)	2,3069 (0,0105*)	0,1152 (0,4541)	-0,9958 (0,1597)	-0,2542 (0,3997)	-1,2794 (0,1004)	
Cal.12	3,9083 (0,0000*)	2,7847 (0,0027*)	3,5380 (0,0002*)	2,8859 (0,0020*)	2,8340 (0,0023*)	4,7233 (0,0000*)	2,5316 (0,0057*)	1,4206 (0,0777)	2,1622 (0,0153*)	1,1370 (0,1278)	2,4164 (0,0078*)

O valor entre parênteses representa o *p-valor*. Valores seguidos por asterisco (*), na comparação de linhas com colunas, diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Dunn. No teste de comparação múltipla de Dunn, feito depois do ranqueamento do teste de Kruskal-Wallis, o valor de cada célula é proveniente da diferença entre a calibração da coluna e da linha; por exemplo, a primeira coluna representa as diferenças da Calibração 1 menos as demais. Se o valor for positivo, os resultados da linha são melhores, se negativo, os da coluna são melhores (caso haja diferença estatística ($\alpha = 0,05$) entre as calibrações).

Para melhor avaliar as calibrações obtidas, foram plotadas, em %, a sensibilidade e especificidade de cada calibração (Figura 2). No entanto, ao observar esses dados, percebe-se que as calibrações 8 e 10 não possuem especificidade de 100%, ou seja, dentre as amostras controle (sem nenhum tipo de adulteração) analisadas, algumas apresentaram-se como falso-positivas para estas calibrações.

Figura 2. Sensibilidade (para as amostras adulteradas) e especificidade (para amostras de controle - sem adulteração) das calibrações testadas.

Deste modo, se a escolha da calibração que melhor identificou adulterações no leite for feita baseada nas que apresentaram especificidade máxima, ou seja, ausência de valores falsos-positivos (Calibrações 3, 5, 6, 7, 9 e 11), visto que nenhuma das doze calibrações apresentou sensibilidade máxima, a escolhida seria a Calibração 7 (14 fatores com eliminação única de *outliers*), apesar de não ter sido classificada pelo teste de Kruskal-Wallis como uma das melhores calibrações. Mas, de acordo com a Tabela 3, esta não difere estatisticamente ($p > 0,05$) das Calibrações 8 e 10 (previamente ranqueadas como as que melhor identificaram adulterantes no leite cru), além de incluir um menor número de fatores.

O número de fatores utilizados na identificação de adulterantes e contaminantes no leite através da espectroscopia de infravermelho varia muito conforme os compostos pesquisados. Kasemsumran, Thanapase, & Kiatsoonthon (2007), trabalhando com espectroscopia de infravermelho próximo definiram que o melhor modelo de calibração para adulteração do leite com soro de leite é o que leva em consideração o uso de 4 fatores, em um

modelo de PLS. Sivakesava e Irudayaraj (2002) definiram como 15 o número ótimo de fatores utilizando o método de PLS na identificação de tetraciclina em leite. Heuer *et al.* (2001), obtiveram um modelo preditivo que consistia em 19 principais componentes (fatores) na determinação de acetona em leite de vacas. Esses resultados evidenciam a necessidade de uma correta calibração do equipamento utilizado sempre que este for empregado na detecção de compostos que não pertencem naturalmente ao leite.

Os dados da Tabela 4 representam os resultados de sensibilidade da Calibração 7 para todos os adulterantes juntamente com adição de água ou soro de leite e também a sensibilidade apresentada quando somente água ou soro de leite foram adicionados. É possível observar que a adição de 6% de água fez com que a sensibilidade da Calibração 7 fosse de 100%, ou seja, a calibração foi capaz de definir todas as amostras adulteradas, independentemente da concentração e do tipo de adulterante utilizado. De modo similar, a adição de bicarbonato de sódio fez com que a sensibilidade da calibração fosse de 100%, para todas as concentrações desse adulterante e adição de água ou soro de leite.

Tabela 4. Sensibilidade (%) apresentada pela calibração 7 para todos os adulterantes com adição de água ou soro de leite e somente com adição de água ou soro de leite.

Adulterante [] mg/L	Água ou Soro	Amido			Bicarbonato de sódio			Citrato de sódio			Formaldeído			Sacarose		
		500	750	1000	600	1200	1800	500	750	1000	150	300	450	250	500	750
Água 3%	32	96	100	100	100	100	100	100	100	100	60	100	100	56	48	60
Água 6%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Soro 3%	4	92	100	100	100	100	100	96	100	100	28	88	100	16	24	32
Soro 6%	12	92	100	100	100	100	100	92	100	100	40	96	100	12	24	44

Utilizando a calibração 7, a adição de amido e citrato de sódio só foi detectada com sensibilidade menor que 100% na menor concentração adicionada desses adulterantes (500 mg/L). Já a adição de formaldeído apresentou menor sensibilidade quando foi adicionado 150 mg/L desse adulterante juntamente com a adição de soro (300 mg/L), o que evidencia o poder do soro de leite em mascarar a adição de formaldeído. Nas demais concentrações adicionadas, a sensibilidade foi próxima de 100%.

Botelho *et al.* (2015), encontraram sensibilidade de 83,3%, 100% e 93,8% para adição de 0,5-10% p/v (5-10 g/L) de amido, citrato de sódio e formaldeído, respectivamente, através de um método de rastreio, utilizando refletância total atenuada (ATR), espectroscopia no infravermelho médio e classificação multivariada. Cassoli *et al.* (2011) encontraram

sensibilidade máxima de 98% na detecção de 0,075% (750 mg/L) de citrato de sódio em leite cru.

A inclusão de sacarose nas concentrações utilizadas nesse trabalho (máximo de 750 mg/L), foi a que apresentou menor índice de detecção, principalmente quando soro de leite foi adicionado às amostras. No entanto, essas concentrações foram muito pequenas, quando comparadas às utilizadas em outros trabalhos, o que pode justificar a baixa taxa de identificação desse tipo de adulterante. He *et al.* (2010), utilizando espectroscopia de infravermelho combinada com análise de correlação bidimensional conseguiram identificar adulteração com glicose em leite cru na concentração de 1000 mg/dL, valores bem acima dos aqui utilizados. Já Liu *et al.* (2015), conseguiram identificar adulteração com 240 mg de sacarose por litro de leite cru, através da espectroscopia de infravermelho combinada com técnicas quimiométricas multivariadas.

Para mensurar o efeito da adição de somente água ou soro de leite, foram calculadas as sensibilidades das doze calibrações. Quando se adicionou 6% de água, foi de 100% para todas as calibrações testadas, exceto para a calibração 11 (95% de sensibilidade), o que permite inferir que, independentemente dos adulterantes utilizados, as calibrações desenvolvidas conseguem detectar água nessa concentração. No entanto, a sensibilidade para os demais diluentes (3% de água ou soro de leite) foi baixa, principalmente quando soro de leite foi adicionado. Entretanto, apesar dessas baixas sensibilidades, as calibrações conseguiram detectar os outros adulterantes utilizados, e não somente os adulterantes utilizados como diluentes (água ou soro de leite).

A sensibilidade dos diversos métodos de identificação de água e soro de leite em leite cru é muito variável, dependendo do procedimento aplicado. Santos *et al.* (2012), através do método de escaneamento de imagens conseguiram apontar adulteração em leite cru com níveis de 7% de adição de água. Liu *et al.* (2015), detectaram adição de 1% de água e 0,5% de soro de leite, através de espectroscopia de infravermelho combinada com técnicas quimiométricas multivariadas. Santos *et al.* (2013 e 2013a), identificaram adulteração no leite com soro de leite em níveis maiores que 7,5 g/L, através de modelos de classificação SIMCA (*Soft Independent Modeling by Class Analogy*) utilizados em espectroscopia de infravermelho médio. Cassoli *et al.* (2011), utilizando o método de FTIR observaram baixa sensibilidade mesmo quando altas concentrações (20%) de soro de leite foram adicionadas ao leite cru. Por meio de um novo método com sensor de impedância, Das *et al.* (2011), identificaram a adulteração do leite com 5% de soro de leite e 10% de água. Já Motta *et al.* (2014), através de análise proteômica e cromatografia líquida, obtiveram limite de detecção de soro de leite em leite cru de 1 µg/mL;

no entanto, essa técnica exige maior preparo da amostra e tempo de análise, quando comparada com a espectroscopia de infravermelho. Esses resultados sugerem que a adulteração do leite com soro de leite é difícil de ser identificada, provavelmente devido à sua similaridade química com o leite, visto que é um subproduto obtido no processo de fabricação de queijos.

Nesse trabalho, foram avaliadas 25 amostras de leite cru combinadas com diversos adulterantes: água ou soro de leite mais amido de milho, bicarbonato de sódio, citrato de sódio, formaldeído ou sacarose (em três diferentes concentrações), além das amostras de controle. Aproximadamente 2500 amostras foram utilizadas na construção do espectro de referência, que serviram de padrão para a comparação dos espectros das amostras-teste (adulteradas). Utilizando análises de sensibilidade e especificidade, obtidas através da avaliação do leite pelas calibrações desenvolvidas (envolvendo 8, 10, 12, 14, 16 ou 18 fatores, com eliminação única ou dupla de *outliers*), juntamente com o teste de ranqueamento de Kruskal-Wallis e o teste de comparação múltipla de Dunn, foram obtidos resultados que demonstraram que as calibrações desenvolvidas expressaram boa capacidade geral de detecção de adulteração em leite cru, visto que, a calibração que melhor identificou adulterantes (Calibração 7) apresentou 84% de sensibilidade (ou seja, 16% de valores falso-negativos) e 100% de especificidade (0% de valores falso-positivos), sendo que esta não diferiu estatisticamente da Calibração 10, que apresentou 89% de sensibilidade (Figura 2).

2.4. Conclusões

Através dos resultados obtidos com esse estudo, conclui-se que a metodologia de FTIR, com sensibilidade de 84% e especificidade de 100%, pode ser uma opção viável na identificação de adulteração em leite cru.

Por ser uma metodologia rápida, sem uso de reagentes e preparo da amostra e por utilizar um equipamento que já é adotado por grande parte das indústrias para determinação da composição do leite, seu uso é uma alternativa adicional potencial a ser aplicada diretamente no processo de detecção de fraudes. Além disso, se forem considerados as perdas decorrentes da identificação tardia de adulteração em leite, como prejuízos econômicos e à imagem do laticínio e danos à saúde do consumidor, o método pode se tornar de custo relativamente baixo. Dessa forma, o método pode contribuir para a proteção da saúde pública e melhoria da qualidade do leite comercializado.

Referências

- Andersen, W. C., Roybal, J. E., Gonzales, S. A., Turnipseed, S. B., Pfenning, A. P., & Kuck, L. R. (2005). Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529(1-2 SPEC. ISS.), 145–150. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.012>
- Bogialli, S., Capitolino, V., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., & Sergi, M. (2004). Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3286–3291. <http://doi.org/10.1021/jf0499572>
- Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., & Sena, M. M. (2015). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food Chemistry*, 181, 31–37. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.077>
- Cassoli, L. D., Sartori, B., Zampar, A., & Machado, P. F. (2011). An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 480–485. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00711.x>
- Cassoli, L. D. (2010). *Validação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier para identificação de adulteração em leite cru*. PhD Thesis, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo. Piracicaba, SP. Retrieved in 07/04/2015 from <https://goo.gl/18aZmo>
- Chen, B., Lewis, M. J., & Grandison, A. S. (2014). Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, 158, 216–223. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.118>
- Chen, C.-Y., Li, W.-J., & Peng, K.-Y. (2005). Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8474–8480. <http://doi.org/10.1021/jf052142o>
- Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2011). Performance study of a “constant phase angle based” impedance sensor to detect milk adulteration. *Sensors and Actuators, A: Physical*, 167(2), 273–278. <http://doi.org/10.1016/j.sna.2011.02.041>

- Dunn, W. J., Scott, D. R., & Glen, W. G. (1989). Principal components analysis and partial least squares regression. *Tetrahedron Computer Methodology*, 2(6), 349–376. [http://doi.org/10.1016/0898-5529\(89\)90004-3](http://doi.org/10.1016/0898-5529(89)90004-3)
- Erdreich, L. S., & Lee, E. T. (1981). Use of relative operating characteristic analysis in epidemiology. A method for dealing with subjective judgement. *American Journal of Epidemiology*, 114(5), 649–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7304595>
- Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., & Shmulevich, I. (2004). Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 2779–2788. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73405-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0)
- Foss Analytical (2011). *MilkoScan FT1: User Manual*. Hillerod, Denmark, p. 1-86.
- Foss Analytical (2011a). *MilkoScan FT1 Software Manual*. Hillerod, Denamark, p. 1-154.
- Garcia, J. S., Sanvido, G. B., Saraiva, S. A., Zacca, J. J., Cosso, R. G., & Eberlin, M. N. (2012). Bovine milk powder adulteration with vegetable oils or fats revealed by MALDI-QTOF MS. *Food Chemistry*, 131(2), 722–726. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.062>
- Geladi, P., & Kowalski, B. R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185, 1–17. [http://doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80028-9](http://doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9)
- Hansen, P. W. (1998). Urea Determination in Milk Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *MILCHWISSENSCHAFT*, 53(5), 251–255.
- Harding, F. (Ed). (1995). *Milk Quality* (Chapter 6). London: Blackie Academic & Professional,
- He, B., Liu, R., Yang, R., & Xu, K. (2010). Adulteration detection in milk using infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation analysis. *Library*, 7572, 75720P–75720P–9. <http://doi.org/10.1117/12.841580>
- Heck, J. M. L., van Valenberg, H. J. F., Dijkstra, J., & van Hooijdonk, A. C. M. (2009). Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4745–4755. <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2146>
- Heuer, C., Luinge, H. J., Lutz, E. T., Schukken, Y. H., van der Maas, J. H., Wilmink, H., & Noordhuizen, J. P. (2001). Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 84(3), 575–82. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74510-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74510-9)
- Jawaid, S., Talpur, F. N., Sherazi, S. T. H., Nizamani, S. M., & Khaskheli, A. A. (2013). Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR-Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 141(3), 3066–3071.

- <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.106>
- Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 46(1), 1–22. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- Karoui, R., & De Baerdemaeker, J. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102(3), 621–640. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042>
- Kasemsumran, S., Thanapase, W., & Kiatsoonthon, A. (2007). Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. *Analytical Sciences : The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 23(7), 907–910. <http://doi.org/10.2116/analsci.23.907>
- Lim, J., Kim, G., Mo, C., Kim, M. S., Chao, K., Qin, J., ... Cho, B.-K. (2016). Detection of melamine in milk powders using near-infrared hyperspectral imaging combined with regression coefficient of partial least square regression model. *Talanta*, 151, 183–91. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.035>
- Liu, J., Ren, J., Liu, Z. M., & Guo, B. H. (2015). A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food Chemistry*, 172, 251–256. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.063>
- Motta, T. M. C., Hoff, R. B., Barreto, F., Andrade, R. B. S., Lorenzini, D. M., Meneghini, L. Z., & Pizzolato, T. M. (2014). Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, 120, 498–505. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.093>
- Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2010). Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5651–60. <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3619>
- Rodriguez-Saona, L. E., & Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), 467–483. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133750>
- Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rodriguez-Saona, L. E. (2013). Application of hand-held and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), 1205–1211. <http://doi.org/10.1021/jf303814g>
- Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rodriguez-Saona, L. E. (2013a). Rapid detection and

- quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 138(1), 19–24. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.024>
- Santos, P. M., Wentzell, P. D., & Pereira-Filho, E. R. (2012). Scanner Digital Images Combined with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow's Milk. *Food Analytical Methods*, 5(1), 89–95. <http://doi.org/10.1007/s12161-011-9216-2>
- Sassine, A., Moura, S., Léo, V. M., & Bustillos, O. V. (2004). Cypermethrin residues determination in the milk of a lactating dairy cow by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 28(4), 238–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189673>
- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 85(3), 487–93. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74099-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74099-X)
- Soyeurt, H., Bruwier, D., Romnee, J.-M., Gengler, N., Bertozzi, C., Veselko, D., & Dardenne, P. (2009). Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2444–2454. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1734>
- Tobias, R. D. (1995). An introduction to partial least squares regression. *Proc. Ann. SAS Users Group Int. Conf., 20th, Orlando, FL*, 2–5. <http://doi.org/http://support.sas.com/techsup/technote/ts509.pdf>

3. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE FTIR E FÍSICO-QUÍMICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM LEITE CRU

Resumo

O leite é um dos alimentos com maior potencial de adulteração e, devido à dificuldade das indústrias em implantar programas eficientes de identificação de leite adulterado, objetivou-se comparar a acurácia, na detecção de adulterantes em leite cru, do equipamento compacto (MilkoScan FT1), que utiliza a espectroscopia de FTIR (infravermelho com transformada de Fourier), com aquela dos testes físico-químicos convencionais, preconizados em legislação e adotados pela indústria no controle de qualidade da matéria-prima. Para isso, cerca de 2500 amostras de leite foram utilizadas para construção do espectro de referência, durante seis meses de coleta de dados. Após esta etapa, 650 amostras foram preparadas para comparação dos métodos, utilizando cinco dos principais adulterantes encontrados no leite (em três concentrações cada): (1) amido de milho, (2) bicarbonato de sódio, (3) citrato de sódio, (4) formaldeído e (5) sacarose, com a adição de dois níveis de água ou soro de leite. Resultados indicaram que o método de FTIR possui capacidade de identificação de adulterantes em leite cru superior aos métodos físico-químicos tradicionais, apresentando sensibilidade geral de 85,83% e especificidade de 100%, podendo ser utilizado diretamente nas plataformas de recepção do leite nos laticínios, melhorando os processos industriais de detecção de adulterantes.

Palavras-chave: Fraude; Espectroscopia; Infravermelho com transformada de Fourier; Leite; Água; Soro de leite

Abstract

Milk is one of the most adulterated foods and due to the difficulty of industries in implementing effective programs of adulterated milk identification, we aimed to compare the accuracy in adulterants detection in raw milk, of a compact equipment (MilkoScan FT1) that uses the FTIR (Fourier transform infrared) spectroscopy with that of conventional physico-chemical tests, adopted by the industry in quality control of raw materials. For this, about 2,500 milk samples were used for the reference spectrum construction and, to compare the methods, 650 samples were prepared using five adulterants (in three concentrations each): (1) cornstarch, (2) sodium bicarbonate, (3) sodium citrate, (4) formaldehyde and (5) saccharose with the addition of two levels of water or whey. Results indicated that the FTIR method has superior capacity of adulterants identification than that presented by traditional physico-chemical methods, with sensitivity of 85.83% and

specificity of 100% and it can be used directly in the milk reception platforms in dairy industry, improving industrial processes of adulterants detection.

Keywords: Fraud; Spectroscopy; Fourier transform infrared; Milk; Water; Whey

3.1. Introdução

O leite está entre os alimentos com maior potencial de adulteração, visto que apresenta características como alto valor nutritivo e alto custo de produção que o tornam mais vulnerável a este tipo de prática fraudulenta (De la Fuente & Juárez, 2005; Karoui & De Baerdemaeker, 2007; Sharma & Paradakar, 2010).

Inúmeros casos de adulteração no leite têm ocorrido em alguns dos maiores produtores mundiais (OECD/FAO, 2016), principalmente China (Manning & Soon, 2014; Sharma & Paradakar, 2010), Índia (Lim *et al.*, 2016; Manning, & Soon, 2014) e Brasil (Botelho, Reis, Oliveira, & Sena, 2015), neste último sobretudo devido às recentes mudanças na legislação e exigências por um leite de melhor qualidade (Brasil, 2011).

As principais adulterações ocorridas no leite são a adição de água e soro de leite com o objetivo de aumentar o volume do produto; neutralizantes, como bicarbonato de sódio, para mascarar a acidez desenvolvida devido às más condições sanitárias na coleta, transporte e/ou armazenamento; reconstituintes de densidade, como sal, açúcar, amido, para mascarar a adição de água ou aumentar o teor de sólidos totais; substâncias inibidoras do crescimento de microrganismos, como formaldeído, hipocloritos, peróxido de hidrogênio; adição de substâncias contabilizadas como proteína nas análises, como melamina e ureia; mistura de leite de diferentes espécies, entre outros (Das, Sivaramakrishna, Biswas, & Goswami, 2015; Liu, Ren, Liu, & Guo, 2015; Tronco, 2013; Kartheek, Smith, Muthu, & Manavalan, 2011; Bottero, *et al.*, 2003; Harding, 1995).

Em caso de prática fraudulenta na indústria de laticínios, são necessários métodos de controle adequados para avaliar a autenticidade das amostras (Santos, Pereira-Filho, & Rodriguez-Saona, 2013). Desta maneira, a partir da elaboração de fraudes, métodos de identificação foram sendo desenvolvidos, a exemplo da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Jawaid, Talpur, Sherazi, Nizamani, & Khaskheli, 2013; Cassoli, Sartori, Zampar, & Machado, 2011; Rodriguez-Saona, & Allendorf, 2011; Nicolaou, Xu, & Goodacre, 2010), escaneamento por imagens (Santos, Wentzell, & Pereira-Filho, 2012), técnicas imunológicas, electroforéticas, cromatográficas e PCR (*polymerase chain reaction*)

(Nicolaou, Xu, & Goodacre, 2010; Bottero *et al.*, 2003), além dos métodos físico-químicos convencionais, como análise do ponto crioscópico, pH, densidade, pesquisas de neutralizantes, conservantes e reconstituintes, dentre outros (Brasil, 2006).

No entanto, a maioria dos métodos físico-químicos convencionais exige um grande conjunto de ensaios para verificar a qualidade do leite, o que demanda um longo tempo para análise (Santos, Wentzell, & Pereira-Filho, 2012), tornando difícil o uso desse tipo de técnica no rastreio de adulterantes, na rotina de análise da maioria dos laticínios (Nicolaou, Xu, & Goodacre, 2010). Além disso, fraudadores podem, muitas vezes, utilizar os métodos físico-químicos para testar o leite adulterado por eles antes do envio para os laticínios, para que este consiga passar pelos testes de qualidade, existindo, portanto, a possibilidade de uma “fórmula” não detectável por esses métodos convencionais.

Em contraste, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um método capaz, potencialmente, de resolver muitos destes problemas, por ser uma técnica rápida (análise em menos de um minuto), simples de usar, que exige o mínimo de preparação da amostra, além de apresentar alta sensibilidade e baixo custo operacional (Nicolaou, & Goodacre, 2008).

Devido à dificuldade das indústrias em implantar programas eficientes de identificação de leite adulterado, há necessidade de desenvolvimento de metodologias analíticas que sejam rápidas e menos laboriosas, possibilitando assim o monitoramento em larga escala, com pouco uso de reagentes e menor custo analítico para a determinação de fraudes ocorridas no leite.

Desse modo, a hipótese é de que o método de FTIR possui capacidade de identificar as principais adulterações no leite cru de forma equivalente ou superior aos testes tradicionais. Para tanto, objetivou-se comparar a acurácia, na detecção de adulterantes em leite cru, do equipamento compacto (MilkoScan FT1 – Foss Analytical), que utiliza a metodologia de FTIR, com aquela dos testes físico-químicos convencionais, preconizados em legislação e adotados pela indústria no controle de qualidade da matéria-prima.

Resultados desse estudo poderão ser utilizados para melhoramento dos processos industriais de detecção de adulterantes em leite, possibilitando a melhoria da qualidade do produto comercializado e diminuição das perdas econômicas relacionadas à fraude.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Local de desenvolvimento

O experimento foi desenvolvido em um laticínio localizado no Estado de Minas Gerais, Brasil, que processa cerca de 800 mil litros de leite por dia. A indústria possui o equipamento MilkoScan FT1, o qual já é utilizado no controle de qualidade na recepção do leite, para realização de análises de composição, como gordura, proteína e sólidos totais.

3.2.2. Preparo das amostras

O leite utilizado foi coletado aleatoriamente de 10 caminhões transportadores (10 repetições) e mantido sob refrigeração ($< 10^{\circ}\text{C}$) desde a coleta até a sua utilização. A cada dia eram coletados 65 L de leite de cada caminhão (um por dia), que foi subdividido em amostras de um litro para receber os adulterantes em suas diferentes concentrações.

Em cada amostra contendo um litro de leite foi adicionado 3% ou 6% de água e, posteriormente, em cada uma dessas misturas, foram acrescentados os seguintes compostos e concentrações: (1) amido de milho, nas concentrações de 500 mg/L; 750 mg/L e 1000 mg/L; (2) bicarbonato de sódio, nas concentrações de 600 mg/L; 1200 mg/L e 1800 mg/L; (3) citrato de sódio, nas concentrações de 500 mg/L; 750 mg/L e 1000 mg/L; (4) formaldeído, nas concentrações de 150 mg/L; 300 mg/L e 450 mg/L; (5) sacarose, nas concentrações de 250 mg/L; 500 mg/L e 750 mg/L.

Da mesma forma, foi avaliada a adulteração com soro de leite. Para isso, em cada amostra contendo um litro de leite foi adicionado 3% ou 6% de soro de leite, que recebeu a adição dos mesmos compostos e concentrações utilizados na adulteração com água. Também foi realizada a análise do leite adulterado somente com água (3 ou 6%) ou soro (3 ou 6%), sem o uso de outros adulterantes.

Desse modo, foram analisadas 650 amostras, sendo estas: 10 amostras de leite retiradas de caminhões transportadores, onde foram adicionados (em cada uma) dois tipos de solutos (água ou soro) em duas concentrações (3% ou 6%) e com cinco adulterantes em três concentrações cada (600 amostras), além da análise do controle (10 amostras de leite sem a

adição de adulterantes) e das amostras com somente água ou soro de leite (10 amostras com 3% de água, 10 amostras com 6% de água, 10 amostras com 3% de soro e 10 amostras com 6% de soro).

3.2.3. *Análises amostrais*

3.2.3.1. Equipamento de FTIR

As análises foram realizadas, utilizando cerca de 50 mL de leite, no equipamento MilkoScan FT1, que adota a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e que consegue varrer toda a região do infravermelho médio, com comprimentos de onda entre 2.0 e 10.8 μm ($5012 - 926 \text{ cm}^{-1}$) (Foss Analytical, 2011). Os espectros das amostras analisadas foram armazenados em arquivos eletrônicos (Foss Analytical, 2011a). Também foi realizada a equalização mensal do equipamento para garantir a padronização dos espectros ao longo do período experimental (Foss Analytical, 2011a).

O equipamento foi previamente calibrado utilizando aproximadamente 2500 amostras de referência, coletadas no período de seis meses, do início de agosto de 2014 até o final de janeiro de 2015, para representar a variabilidade sazonal a que os componentes do leite estão submetidos. Além da obtenção dos espectros, foram determinados os teores de gordura, proteína, caseína, sólidos não gordurosos, densidade e acidez para caracterização da composição média do leite nesse período.

As análises foram realizadas seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante (Foss Analytical, 2011) utilizando 14 fatores (ou componentes principais) no modelo matemático.

O escore de cada amostra foi calculado utilizando a “distância espectral” (distância Euclidiana) entre as amostras-teste e as amostras de referência. Esta distância será baixa ou alta para as amostras que se assemelharem ou diferirem, respectivamente, das amostras de referência (Foss Analytical, 2011a). Tendo obtido o escore de cada amostra fraudada, aquelas que apresentaram escore maior que três (Foss Analytical, 2011) foram consideradas adulteradas.

3.2.3.2. Métodos físico-químicos convencionais

As mesmas amostras preparadas com a adição de adulterantes para análise no equipamento MilkoScan FT1 também foram analisadas pelos métodos físico-químicos tradicionais, de acordo com o preconizado em legislação específica (Brasil, 2006).

Assim, de acordo com o estabelecido em legislação (Brasil, 1981; Brasil, 2006), foram realizadas análises de (1) pH (método potenciométrico); (2) acidez (processo Dornic); (3) densidade a 15°C (método lactodensimétrico); (4) crioscopia (método instrumental); (5) estabilidade ao etanol 72% v/v (método sensorial); (6) reconstituintes de densidade: sacarose (método da resorcina), cloretos (método do nitrato de prata), amido (prova de Lugol); (7) neutralizantes de acidez (método do ácido rosólico); (8) conservantes: formaldeído (método do ácido cromotrópico) e peróxido de hidrogênio (técnica do guaicol) e (9) peroxidase, com uso de kits com tiras reativas (Cap Lab®) indicadoras da presença da enzima peroxidase.

3.2.4. Análises estatísticas

Para avaliação da acurácia de cada método em detectar leite adulterado foram calculadas a sensibilidade (capacidade de identificação correta de amostras adulteradas) e a especificidade (capacidade de identificação correta de amostras não adulteradas) (Erdreich, & Lee, 1981).

Uma vez que o tamanho amostral era suficientemente grande, foi utilizado o teste de proporções para verificar se existiram diferenças entre as proporções de acertos de cada método utilizado. Logo, para fins de comparação entre as análises realizadas no equipamento MilkoScan e os métodos físico-químicos tradicionais preconizados em legislação, foi utilizado o teste de proporções. Sempre que um teste físico-químico falhou na identificação de uma amostra adulterada, foi considerado que o mesmo foi incapaz de identificar a adulteração (foram atribuídas notas 0, para a falha na identificação da adulteração e 1 quando o teste conseguiu identificar a fraude). Também foram comparadas as falhas em dois ou mais testes físico-químicos, visto que, para a indústria, sempre que uma amostra falha somente uma vez nos testes, esta é considerada suspeita e levada para reanálise; já quando ocorrem falhas em mais de um teste físico-químico, o leite é considerado alterado e rejeitado pela indústria.

Ademais, foram comparados com os resultados do equipamento de FTIR, os testes físico-químicos específicos para cada adulterante (amido, bicarbonato de sódio (neutralizantes

de acidez), formaldeído e sacarose), além do teste de crioscopia (quando foram utilizados somente água ou soro de leite na adulteração) e do controle (leite sem adulteração), este último para identificar a especificidade de cada teste, utilizando também o teste de proporções.

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* R (versão 3.2.4; R Foundation, Vienna, Austria) em nível de significância estatística de 0,05.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Espectro de referência

Para construção do espectro de referência no equipamento MikoScan, foram utilizadas amostras provenientes de caminhões transportadores que chegavam diariamente à indústria, durante seis meses, permitindo assim que as alterações na composição do leite que ocorrem em diferentes épocas do ano e em distintos sistemas de alimentação animal (como variações nos níveis de gordura e proteína) fossem contempladas (Chen, Lewis, & Grandison, 2014). Essas amostras foram retiradas de todo o caminhão transportador que chegou à indústria nesse período de seis meses.

Durante esse período, para essas amostras utilizadas na construção do espectro de referência, o teor médio de gordura foi de 3,51%, apresentando máximo de 5,06%, sendo o componente do leite com maior coeficiente de variação (6%). O teor de proteína variou de 2,94% a 3,35% (coeficiente de variação = 2%). Já os teores médios de sólidos não-gordurosos e caseína foram de 8,77% e 2,43%, respectivamente. A acidez média apresentada no período foi de 0,154 g/dL e a densidade média foi de 1,031 g/mL.

3.3.2. Análise geral de adulterantes

Na análise geral (de todos os adulterantes em todas as concentrações testadas), utilizando 14 componentes principais no modelo matemático, as análises realizadas no equipamento de FTIR, com sensibilidade de 85,83%, não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) das análises físico-químicas convencionais, que apresentaram sensibilidade de 85,5% (Tabela

5). Isso ocorreu quando os resultados apresentados pelo equipamento de FTIR na identificação de adulterantes foram comparados com todas as análises físico-químicas em conjunto, ou seja, foi testada a sensibilidade de todas as análises físico-químicas (pH, acidez, densidade, teste do álcool, peroxidase, neutralizantes de acidez, amido, sacarose, formol, crioscopia) e, se somente uma delas conseguisse identificar a adulteração, o método era considerado sensível.

Embora conjuntamente as análises físico-químicas tenham sido eficientes na identificação de adulterantes, quando somadas, elas são demoradas e exigem uso de reagentes (Karoui, & De Baerdemaerker, 2007), sendo um obstáculo para a análise de muitas amostras em um curto intervalo de tempo, tornando difícil, para a indústria, a análise para todos os adulterantes já descritos em sua rotina diária de monitoramento da qualidade. Em contraste, os métodos espectroscópicos são rápidos, ambientalmente amigáveis, muitas vezes exigem pouca ou nenhuma preparação da amostra, são relativamente fáceis de operar e fornecem uma grande quantidade de informações com apenas um teste, tornando-os mais adequados para o controle de qualidade do produto (Kamal, & Karoui, 2015).

Ademais, de acordo com a legislação em vigor no Brasil, na indústria, devido à imprecisão dos testes de rotina, sempre que somente um teste físico-químico identificar alguma alteração no leite, a amostra é reenviada para análise, sendo considerada fraudada apenas aquelas amostras que estejam fora do padrão em no mínimo três testes de rotina ou em duas outras análises (uma de rotina e uma de precisão), sendo consideradas provas de precisão a determinação do índice de refração no soro cúprico e a determinação do índice crioscópico (Brasil, 1952).

Sendo assim, optou-se por fazer a comparação do teste de FTIR com a identificação de adulteração por no mínimo dois testes físico-químicos (Geral 2). Nessa situação, a sensibilidade apresentada pelos testes físico-químicos foi de 54,67%, inferior ($p < 0,05$) à apresentada pelo método de FTIR (85,83%), conforme dados da Tabela 5.

Tabela 5. Comparação da proporção de acertos dos método de FTIR com os testes físico-químicos tradicionais.

		Proporção de acertos	Diferença entre as proporções	p-valor	Intervalo de Confiança
Geral 1	FTIR	0,8583	0,0033	0,8691305	-0,036 - 0,043
	Físico-químicos	0,8550			
Geral 2	FTIR	0,8583	0,3117	3,53e-32 (**)	0,259 - 0,363
	Físico-químicos	0,5467			

Nota: Geral 1 = identificação de adulteração por pelo menos um teste físico-químico; Geral 2 = identificação de adulteração por no mínimo dois testes físico-químicos. (**) Existe diferença entre os métodos ao nível de 1% e 5% de probabilidade.

3.3.3. Análise específica de adulterantes

Também foram comparadas as sensibilidades de cada método específico de identificação de adulterantes com o método de FTIR, onde foi considerada a sensibilidade média de cada teste, ou seja, a análise conjunta de um adulterante, em três concentrações diferentes, com água ou soro em duas concentrações cada. Por exemplo, na sensibilidade média apresentada pelo teste específico do amido, foram consideradas, em conjunto, a adulteração com 500 mg/L, 750 mg/L e 1000 mg/L, com 3% ou 6% de água e 3% ou 6% de soro (Tabela 6).

Nesse caso, de acordo com os dados apresentados na Tabela 6, a sensibilidade apresentada pelo teste de FTIR foi superior ($p < 0,05$) aos métodos físico-químicos específicos para amido (96,67% contra 89,17%), neutralizantes de acidez, no caso, bicarbonato de sódio (100% contra 56,67%) e sacarose (50% contra 0%), não havendo diferenças estatísticas ($p > 0,05$) no teste do formaldeído (84,16% contra 80,83%).

Os dados da Tabela 6 também evidenciam que não houve diferença entre a sensibilidade apresentada pelo método de FTIR (32,5%) e o teste de crioscopia (42,5%). Nesse caso foram consideradas apenas amostras adulteradas com água (3% ou 6%) ou soro (3% ou 6%), sem a inclusão de quaisquer outros adulterantes.

Ambos os métodos (FTIR e crioscopia) apresentaram baixa taxa geral de detecção de adulteração com diluentes no leite, conforme mostrado pela Tabela 6. Apesar do método de FTIR ter conseguido identificar 100% da adição de 6% de água, obteve baixa sensibilidade na

identificação principalmente de soro. Santos, Wentzell, & Pereira-Filho (2012) conseguiram detectar 7% de água no leite, empregando o método de escaneamento digital de imagens. Utilizando método com um sensor de impedância, Das, Sivaramakrishna, Biswas, & Goswami (2011) conseguiram identificar 10% de adição de água e 5% de soro de leite. Já Cassoli *et al.* (2011), obtiveram baixa sensibilidade mesmo com a adição de 20% de soro de leite ao leite cru, utilizando o método de FTIR, enquanto Liu *et al.* (2015), através de espectroscopia de infravermelho combinada com técnicas quimiométricas multivariadas, detectaram adição de 1% de água e 0,5% de soro de leite. Esses resultados mostram a variabilidade da taxa de detecção de adulteração principalmente com soro de leite, provavelmente devido ao fato deste apresentar composição química muito semelhante à do leite, tornando muito difícil sua identificação.

Tabela 6. Comparação da proporção de acertos dos testes físico-químicos específicos para cada adulterante com o método de FTIR.

		Proporção de acertos	Diferença entre proporções	p-valor	Intervalo de Confiança
Amido	FTIR	0,9667	0,0750	0,02354 (*)	0,010 - 0,1399
	Físico-químicos	0,8917			
Bicarbonato	FTIR	1,0000	0,4333	3,71e-16 (**)	0,329 - 0,537
	Físico-químicos	0,5667			
Formol	FTIR	0,8416	0,0333	0,4968	-0,063 - 0,129
	Físico-químicos	0,8083			
Sacarose	FTIR	0,5000	0,5000	3,74e-19 (**)	0,390 - 0,609
	Físico-químicos	0,0000			
Crioscopia	FTIR	0,3250	-0,1000	0,3556	-0,312 - 0,112
	Físico-químicos	0,4250			

(*) Existe diferença entre os métodos ao nível de 5% de probabilidade. (**) Existe diferença entre os métodos ao nível de 1% e 5% de probabilidade.

O ponto de congelamento do leite é afetado por vários fatores, como alimentação dos animais, estágio de lactação, variações sazonais, diferentes raças, coletas em diferentes períodos do dia, entre outros (Henno, Ots, Jõudu, Kaart, & Kärt, 2008; Shipe, Dahlberg, & Herrington, 1953) e, desde muitos anos, diversos autores discutem os limites de variação desse elemento (Sato, Hankinson, Gould, & Armstrong, 1957; Shipe, Dahlberg, & Herrington, 1953; Arlington, & Krienke, 1949; Aschaffenburg, & Veinoglou, 1944). De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2011), o ponto de congelamento pode variar de -0,530°H a -0,550°H devido aos diversos fatores que podem afetar o ponto crioscópico do leite. No entanto, a autenticação do leite torna-

se muito difícil de ser determinada pois, muitas vezes, não se sabe se a alteração do ponto de congelamento é devida a variações normais ou proveniente de adulterações propositas e, talvez, seja esse o motivo de os métodos utilizados terem apresentado baixa taxa de detecção quando água ou soro foram adicionados ao leite.

3.3.3.1. FTIR

O método de FTIR, quando foram considerados cada adulterante em cada concentração estudada com a adição de água ou soro em diferentes níveis (Figura 3), foi bastante eficaz na identificação da adição de 6% de água, apresentando sensibilidade de 100% independente do adulterante utilizado. O método também teve sensibilidade de 100% para todas as concentrações utilizadas de bicarbonato de sódio e para as concentrações intermediárias e mais altas de amido e formaldeído (750 mg/L e 1000 mg/L de amido e 300 mg/L e 450 mg/L de formaldeído) independente da adição de água ou soro.

Cassoli *et al.* (2011), também obtiveram taxa de 100% de sensibilidade na identificação de bicarbonato de sódio em concentrações de 0,05% (500 mg/L), adotando o método de FTIR. Utilizando espectroscopia de infravermelho médio e análise de mínimos quadrados parciais, Botelho *et al.* (2015), encontraram sensibilidade de 83,3% e 93,8% para adição de 0,5-10% p/v de amido e formaldeído, respectivamente, valores médios inferiores aos aqui encontrados na identificação de amido (96,67%) e superiores na identificação de formaldeído (84,16%).

Para a sacarose, o método de FTIR apresentou sensibilidade média de 50% (Tabela 6). Essa baixa porcentagem de identificação foi, provavelmente devido às baixas concentrações adicionadas desse adulterante, quando comparadas às usadas em outros trabalhos. Utilizando espectroscopia de infravermelho, He, Liu, Yang, & Xu (2010), identificaram adulteração em leite cru com 1000 mg/dL de outro açúcar (a glicose) concentração bem acima das aqui utilizadas. Também utilizando espectroscopia de infravermelho, mas combinada com técnicas quimiométricas multivariadas, Liu *et al.* (2015), identificaram adulteração com sacarose em leite cru na concentração de 240 mg/L, não utilizando, no entanto, nenhuma adulteração com diluente (como água ou soro) que pudesse mascarar a adição desse adulterante. Todavia, apesar de baixa sensibilidade de detecção de sacarose, o método de FTIR ainda foi melhor que os métodos físico-químicos tradicionais, que não foram capazes de identificar a adição desse adulterante em nenhuma amostra, independente da concentração adicionada (Figura 3).

Na identificação de citrato de sódio, a metodologia de FTIR apresentou sensibilidade média geral de 98,33%, não possuindo 100% de sensibilidade somente na menor concentração do adulterante utilizada (500 mg/L) e com o uso de soro de leite, nas concentrações de 3% ou 6% (90% de sensibilidade).

Cassoli *et al.* (2011), através do método de FTIR, obtiveram sensibilidade de no máximo 76,8% para adição de 0,05% (500 mg/L) de citrato de sódio e de 98% para adição de 0,075% (750 mg/L) desse mesmo adulterante. Alta sensibilidade (100%) também foi obtida por Botelho *et al.* (2015), na identificação de citrato de sódio em leite cru, em concentrações tão baixas quanto 0,5% (5 g/L), utilizando espectroscopia de infravermelho médio e análise de mínimos quadrados parciais. Esses resultados mostram que a espectroscopia de infravermelho pode ser um método eficiente na identificação de citrato de sódio em leite cru.

Figura 3. Sensibilidades apresentadas pelos métodos de FTIR e físico-químicos para cada adulterante, em cada concentração utilizada, considerando também a adição de água (3% ou 6%) ou soro (3% ou 6%).

Nota: A1 = amido, na concentração de 500mg/L; A2 = amido, a 750mg/L; A3 = amido, a 1000mg/L; B1 = bicarbonato de sódio, a 600 mg/L; B2 = bicarbonato de sódio, a 1200 mg/L; B3 = bicarbonato de sódio, a 1800 mg/L; F1 = formaldeído, a 150 mg/L; F2 = formaldeído, a 300 mg/L; F3 = formaldeído, a 450 mg/L; S1 = sacarose, a 250 mg/L; S2 = sacarose, a 500 mg/L e S3 = sacarose, a 750 mg/L.

3.3.3.2. Métodos físico-químicos convencionais

Na determinação de adulterantes em específico, as sensibilidades apresentadas pelos métodos físico-químicos foram, em geral, menores do que as registradas para o método de FTIR. De acordo com os resultados apresentados na Figura 3, os métodos físico-químicos foram pouco eficientes na detecção de bicarbonato de sódio na menor concentração utilizada (600 mg/L) e ineficazes na detecção de sacarose, já que não conseguiram identificar nenhuma adulteração independente de qual adulterante tenha sido utilizado. Já na identificação de amido, o método físico-químico teve sensibilidade próxima à apresentada pelo método de FTIR.

Também utilizando método do Lugol na identificação de amido em leite, Gondim, Souza, Palhares, Junqueira, & Souza (2015) não conseguiram identificar amido na concentração de 0,1 g/L, encontrando sensibilidade acima de 90% somente quando 0,8 g/L de amido foram adicionados ao leite, evidenciando que os métodos físico-químicos tradicionais possuem taxa de detecção desse adulterante muito variável.

Trabalhando com limites de detecção dos testes físico-químicos preconizados na legislação brasileira, Silva, Tamanini, Pereira, Rios, Ribeiro Junior, & Beloti (2015), conseguiram detectar a presença de formaldeído em leite na concentração de 0,05% (500 mg/L). No entanto, se comparados com os resultados obtidos nesse trabalho, que utilizou este mesmo método de identificação de formaldeído, percebe-se que a análise apresenta variações quanto à detecção desse adulterante, talvez devido à adição de água ou soro ao leite realizadas no presente trabalho.

O citrato de sódio é utilizado como estabilizante e/ou conservante, com objetivo de evitar a precipitação de nutrientes (Botelho *et al.*, 2015), no entanto, na rotina diária dos laticínios, não são realizados testes específicos para detectar tal adulterante, razão pela qual este não foi incluído na análise individual de adulterantes.

De modo geral, os métodos tradicionais para análise de adulterantes em leite apresentam sensibilidade muito variável, dependendo do adulterante e das concentrações utilizadas sendo, pelos resultados aqui apresentados, geralmente menos sensíveis na identificação de adulterantes em leite do que o método de FTIR, com exceção da menor concentração de formol adicionada (150 mg/L). Ademais, além do maior tempo necessário para realização das análises, esses métodos são quase sempre visuais, ou seja, por diferença na coloração apresentada o analista deve indicar se a amostra está ou não adulterada, o que torna esse tipo de análise muito subjetiva.

Um outro obstáculo na autenticação do leite é que este possui composição muito variável, sofrendo influência do clima, das diferentes estações do ano, da fase de lactação, dos alimentos oferecidos aos animais, entre outros, o que pode tornar a autenticação desse produto muito difícil de ser determinada com alta precisão (Kamal, & Karoui, 2015) pois é necessária uma larga faixa de variação entre os componentes para contemplar as modificações naturais que ocorrem no leite.

Sendo assim, embora o método de FTIR não tenha obtido sensibilidade máxima para todos os adulterantes pesquisados, este é um método promissor, pois, além de ter sido superior aos testes físico-químicos tradicionais, é um método rápido, sem uso de reagentes e preparo da amostra, consegue determinar se o leite está fraudado ou não com vários tipos de adulterantes com apenas um teste e possui custo relativamente baixo pois um grande número de indústrias já contam com o equipamento de FTIR para fazer as análises de composição do leite, necessitando, somente, de calibração para ser utilizado amplamente na identificação de adulterantes.

3.4. Conclusões

O método de FTIR possui capacidade de identificação de adulterantes em leite cru superior aos métodos físico-químicos tradicionais, apresentando sensibilidade geral de 85,83% e especificidade de 100%, comprovando a possibilidade de uso da técnica diretamente nas plataformas de recepção do leite nos laticínios, permitindo a identificação da adulteração antes do seu processamento. Ademais, esta técnica permite identificar a fraude no leite independente do adulterante utilizado, tornando a análise mais rápida que os métodos convencionais, que precisam de testes específicos para cada adulterante.

Apesar de não apresentar sensibilidade máxima na identificação de alguns adulterantes em particular, o método de FTIR é rápido, sem uso de reagentes e preparo da amostra e consegue determinar se o leite está fraudado ou não com vários tipos de adulterantes com apenas um teste, possuindo capacidade promissora para ser utilizado diretamente no processo de identificação de fraudes ocorridas no leite na rotina diária da indústria, podendo, deste modo, contribuir para melhoria da qualidade do leite comercializado.

Referências

- Arlington, L., & Krienke, W. A. (1949). Some observations on the range of freezing points of normal milk. In *Proceedings of the Association of Southern Agricultural Workers* (pp. 77-78).
- Aschaffenburg, R., & Veinoglou, B. C. (1944). 308. The freezing-point of milk: II. The influence of various factors and their bearing on the detection of added water. *Journal of Dairy Research*, 13(03), 267-280.
- Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., & Sena, M. M. (2015). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food Chemistry*, 181, 31–37. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.077>
- Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., & Turi, R. M. (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows ', goats ' and sheep ' s milk in dairy products, 13, 277–282.
- Brasil (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel*. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 30 de dezembro de 2011. Seção 1, p. 06.
- Brasil (2006). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos*. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 14 de dezembro de 2006. Seção 1, p. 08.
- Brasil (1981). Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). *Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: métodos físicos e químicos*. Portaria nº 01, de 07 de outubro de 1981. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 13 de outubro de 1981.
- Brasil (1952). Ministério da Agricultura. *Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Decreto-Lei Nº 30.691, de 29 de março de 1952. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, 07 de julho de 1952. Seção 1, p. 10.785.

- Cassoli, L. D., Sartori, B., Zampar, A., & Machado, P. F. (2011). An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 480–485. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00711.x>
- Chen, B., Lewis, M. J., & Grandison, A. S. (2014). Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, 158, 216–223. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.118>
- Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2015). A low cost instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. *ISA Transactions*, 56, 268–275. <http://doi.org/10.1016/j.isatra.2014.11.021>
- Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2011). Performance study of a “constant phase angle based” impedance sensor to detect milk adulteration. *Sensors and Actuators, A: Physical*, 167(2), 273–278. <http://doi.org/10.1016/j.sna.2011.02.041>
- De La Fuente, M. A., & Juárez, M. (2005). Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 563–85. <http://doi.org/10.1080/10408690490478127>
- Erdreich, L. S., & Lee, E. T. (1981). Use of relative operating characteristic analysis in epidemiology. A method for dealing with subjective judgement. *American Journal of Epidemiology*, 114(5), 649–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7304595>
- Foss Analytical (2011). *MilkoScan FT1: User Manual*. Hillerød, Denmark, p. 1-86.
- Foss Analytical (2011a). *MilkoScan FT1 Software Manual*. Hillerød, Denmark, p. 1-154
- Gondim, C. S., Souza, R. C. S., Palhares, M. P. P., Junqueira, R. G., & Souza, S. V.C. (2015). Performance improvement and single laboratory validation of classical qualitative methods for the detection of adulterants in milk: starch, chlorides and sucrose. *Anal. Methods*, 7(22), 9692–9701. <http://doi.org/10.1039/C5AY01822F>
- Harding, F. (Ed). (1995). *Milk Quality*. London: Blackie Academic & Professional, (Chapter 6).
- He, B., Liu, R., Yang, R., & Xu, K. (2010). Adulteration detection in milk using infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation analysis. *Library*, 7572, 75720P–75720P–9. <http://doi.org/10.1117/12.841580>
- Henno, M., Ots, M., Jõudu, I., Kaart, T., & Kärt, O. (2008). Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. *International Dairy Journal*, 18(2), 210–215. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.006>

- Jawaid, S., Talpur, F. N., Sherazi, S. T. H., Nizamani, S. M., & Khaskheli, A. A. (2013). Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR-Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, *141*(3), 3066–3071. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.106>
- Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *46*(1), 1–22. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- Karoui, R., & De Baerdemaeker, J. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, *102*(3), 621–640. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042>
- Kartheek, M., Anton Smith, A., Kottai Muthu, A., & Manavalan, R. (2011). Determination of adulterants in food: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *3*(2), 629–636.
- Lim, J., Kim, G., Mo, C., Kim, M. S., Chao, K., Qin, J., ... Cho, B.-K. (2016). Detection of melamine in milk powders using near-infrared hyperspectral imaging combined with regression coefficient of partial least square regression model. *Talanta*, *151*, 183–91. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.035>
- Liu, J., Ren, J., Liu, Z. M., & Guo, B. H. (2015). A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food Chemistry*, *172*, 251–256. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.063>
- Manning, L., & Soon, J. M. (2014). Developing systems to control food adulteration. *Food Policy*, *49*(P1), 23–32. <http://doi.org/10.1016/j.foodpol.2014.06.005>
- Nicolaou, N., & Goodacre, R. (2008). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *The Analyst*, *133*, 1424–1431. <http://doi.org/10.1039/b804439b>
- Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2010). Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science*, *93*(12), 5651–60. <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3619>
- OECD/FAO (2016), “Dairy and Dairy Products”, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2016–2025, OECD. Publishing, Paris. DOI: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-11-en
- Rodriguez-Saona, L. E., & Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annual Review of Food Science and Technology*, *2*(1), 467–483. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133750>

- Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rodriguez-Saona, L. E. (2013). Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 138(1), 19–24. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.024>
- Santos, P. M., Wentzell, P. D., & Pereira-Filho, E. R. (2012). Scanner Digital Images Combined with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow's Milk. *Food Analytical Methods*, 5(1), 89–95. <http://doi.org/10.1007/s12161-011-9216-2>
- Sato, I., Hankinson, C. L., Gould, I. A., & Armstrong, T. V. (1957). Some Factors Affecting the Freezing Point of Milk. *Journal of Dairy Science*, 40(4), 410–417. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(57\)94495-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(57)94495-8)
- Sharma, K., & Paradakar, M. (2010). The melamine adulteration scandal. *Food Security*, 2(1), 97–107. <http://doi.org/10.1007/s12571-009-0048-5>
- Shipe, W. F., Dahlberg, A. C., & Herrington, B. L. (1953). Variations in the Freezing Points of Cow's Milk. *Journal of Dairy Science*, 36(1), 924–933. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(53\)91582-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(53)91582-3)
- Silva, L. C. C. da, Tamanini, R., Pereira, J. R., Rios, E. A., Ribeiro Junior, J. C., & Beloti, V. (2015). Preservatives and neutralizing substances in milk: analytical sensitivity of official specific and nonspecific tests, microbial inhibition effect, and residue persistence in milk. *Ciência Rural*, 1613–1618. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141013>
- Tronco, V. M. (2013). *Manual para inspeção da qualidade do leite*. 5ed. Santa Maria: UFSM. 208 p. (Chapter 5).

4. CONCLUSÃO

As calibrações desenvolvidas utilizando a metodologia de FTIR apresentam, de modo geral, excelente sensibilidade e especificidade, principalmente quando comparadas com os testes tradicionais, sendo uma opção viável na identificação de adulteração em leite cru. O método de FTIR mostrou-se superior aos métodos físico-químicos tradicionais, apresentando sensibilidade geral de 85,83% e especificidade de 100%, comprovando a possibilidade de uso da técnica diretamente nas plataformas de recepção do leite nos laticínios, permitindo a identificação da adulteração antes do seu processamento. Outrossim, a técnica de FTIR permite identificar a fraude no leite independente do adulterante utilizado, tornando a análise mais rápida que os métodos convencionais, que precisam de testes específicos para cada adulterante.

Apesar de não apresentar sensibilidade máxima na identificação de alguns adulterantes em particular, o método de FTIR é rápido, sem uso de reagentes e preparo da amostra e consegue determinar se o leite está fraudado ou não com vários tipos de adulterantes com apenas um teste, sendo uma alternativa adicional potencial a ser aplicada diretamente no processo de detecção de fraudes.

Ademais, além da construção do espectro de referência e cálculo do score, como o modo de atuação da metodologia de FTIR é a comparação de espectros, visto que cada produto possui um espectro único e característico, existe a possibilidade de se desenvolver calibrações específicas para identificação de cada adulterante possivelmente utilizável na adulteração do leite, se, contudo, forem estabelecidos os espectros de tais adulterantes para serem utilizados como referência para comparação entre os espectros normal e adulterado, sendo esta, portanto, uma sugestão para trabalhos futuros.