Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Validação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier para identificação de adulteração em leite cru

Laerte Dagher Cassoli

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

Piracicaba
2010

Laerte Dagher Cassoli
Engenheiro Agrônomo

Validação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier para identificação de adulteração em leite cru

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

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

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Cassoli, Laerte Dagher
Validação da metodologia de infra-vermelho com transformada de Fourier para identificação de adulteração em leite cru / Laerte Dagher Cassoli. - - Piracicaba, 2010.
48 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Adulteração de alimentos 2. Infravermelho 3. Leite 4. Transformada de Fourier I. Título

CDD 637.1
C345v

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo que vem demonstrando sua habilidade como líder e gestor definindo o rumo para o nosso trabalho e fazendo com que a Clínica cumpra a sua missão de contribuir para a melhoria da produtividade e qualidade do leite.

Agradeço a toda equipe da Clínica do Leite que desempenha suas atividades com excelência e sem a qual este projeto não poderia ter sido realizado.

Aos profissionais da Foss Dinamarca pelo treinamento e apoio ao projeto, em especial a Tove, Johannes, Berte e Villy. Muito obrigado a todos vocês pela recepção, treinamento e suporte.

A colega Beatriz Sartori pelo apoio e dedicação na formatação e revisão dos artigos. A todos os demais colegas da PG (Augusto, Fábio, Aline, Beatriz, Juliana e Rafael) pelo auxílio na revisão e sugestões.

E a minha companheira Clarissa pelo apoio constante e cumplicidade.

SUMÁRIO

RESUMO 5
ABSTRACT 7
1 INTRODUÇÃO 9
1.1 Referências 12
2 APLICAÇÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF) NA IDENTIFICAÇÃO DE LEITE CRU ADULTERADO 16
2.1 Introdução 17
2.2 Material e Métodos 19
2.2.1 Amostragem 19
2.2.2 Desenvolvimento da calibração 19
2.2.3 Validação 20
2.2.4 Análises laboratoriais 20
2.3 Resultados e discussão 21
2.3.1 Espectro referência 21
2.3.2 Calibração 22
2.3.3 Validação calibração 23
2.3.3.1 Amostras de validação 23
2.3.3.2 Desempenho das calibrações 25
2.4 Conclusão 27
2.5 Referências 27
3 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU PELA METODOLOGIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER 33
3.1 Introdução 35
3.2 Material e Métodos 36
3.3 Resultados e discussão 38
3.3.1 Amostras para desenvolvimento da calibração 38
3.3.2 Desempenho das calibrações 40
3.4 Conclusão 46
3.5 Referências 46

RESUMO

Validação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier para identificação de adulteração em leite cru

Objetivou-se avaliar a utilização da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) na identificação de adulteração em leite cru. O objetivo no primeiro estudo foio de desenvolver calibração para identificação de adulteração através da comparação do espectro de leite adulterado com um espectro de referência para leite cru. Para construção do espectro referência foram coletadas 800 amostras de diferentes fazendas localizadas na região de estudo no período de agosto de 2009 a março de 2010. Através da análise de componentes principais, foram desenvolvidas oito calibrações com diferentes números de fatores (componentes principais). Para validação das diferentes calibrações, foram coletadas outras 100 amostras da mesma região de estudo. As amostras foram adulteradas com três diferentes adulterantes geralmente utilizados na adulteração do leite cru sendo eles: bicarbonato de sódio (BS), citrato de sódio (CS) e soro de queijo (SO). Para cada adulterante foram utilizadas três diferentes concentrações (BS: 0,05, 0,10 e 0,25 %; CS: 0,025, 0,050 e 0,075% e SO: 5, 10 e 20%). Para avaliação do desempenho das calibrações foram calculadas a especificidade e a sensibilidade para cada adulterante e respectivas concentrações. A especificidade foi de 92,9% na calibração com 12 fatores. Já a sensibilidade variou em função do adulterante, concentração e número de fatores. Todas as amostras adulteradas com bicarbonato foram identificadas corretamente com modelos de 10 fatores e na concentração mais baixa (0,05%). Já para o citrato, somente amostras com concentração de 0,075% foram identificadas em 93,9% dos casos para o modelo de 18 fatores. Amostras adulteradas com soro, mesmo na concentração mais alta (20%) puderam ser identificadas em menos de 47,1% dos casos, talvez pelo tratamento espectral realizado pelo software ASM em que parte do espectro não é considerado na construção das calibrações. A comparação espectral mostrou-se uma técnica interessante para identificação de leite adulterado e que também poderia antecipar a descoberta de novos adulterantes. Já no segundo estudo o objetivo foi desenvolver calibrações para determinação da concentração dos adulterantes bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro de queijo. Para desenvolvimento das calibrações foram utilizadas as amostras adulteradas do primeiro estudo e, para validação, foram coletadas outras 60 amostras que foram novamente adulteradas. O desempenho de cada calibração foi avaliado através da acurácia (Se), limite de detecção (LD) e coeficiente de determinação (R^2). Todas as calibrações apresentaram R^2 superior a 0,91 com LD de 0,015%, 0,017% e 3,9% para BS, CS e SO, respectivamente. Já a acurácia foi de 0,005%, 0,009 % e 2,26% para BS, CS e SO, respectivamente. Através dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a metodologia de IVTF pode ser utilizada para determinação da concentração de bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro de queijo em leite cru. Associada à equipamentos automatizados, é uma opção viável no monitoramento destes adulterantes, tendo o baixo custo operacional e alto desempenho analítico como características adicionais.

Palavras - chave: Adulteração; Leite cru; Infravermelho; Soro; Bicarbonato de sódio; Citrato de sódio

ABSTRACT

Validation of the Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulteration of raw milk

The objective of this research was to evaluate the use of the methodology of Fourier Transform Infrared (FTIR) in identifying adulteration in raw milk. The objective of the first study was to develop scales to identify contamination by comparing the spectrum of adulterated milk with a reference spectrum for raw milk. To build the reference spectrum, 800 samples were collected from different farms located in the study area from August 2009 to March 2010. Through the analysis of principal components, eight scales with different numbers of factors (principal components) were developed. To validate the different calibrations, other 100 samples were collected from the same region of study. The samples were adulterated with three different adulterants commonly used in the adulteration of raw milk: sodium bicarbonate (SB), sodium citrate (SC) and whey (W). Each adulterant was used at three different concentrations (SB: 0.05, 0.10 and 0.25%; SC: 0.025, 0.050 and 0.075% and W: 5, 10 and 20%). To evaluate the performance of the calibrations, the specificity and sensitivity for each adulterant and its concentration were calculated. The specificity was 92.9% in the calibration with 12 factors. Sensitivity varied according to the adulterant, concentration and number of factors. All samples adulterated with bicarbonate were accurately identified in the 10-factor model and at the lowest concentration (0.05%). As for citrate, only samples at a concentration of 0.075% were identified in 93.9% of cases for the 18-factor model. Samples adulterated with whey, even at the highest concentration (20%) were identified in less than 47.1% of cases, which maybe attributed to the fact that part of the spectrum is not consideredin the spectral processing performed by ASM software. The spectral comparison proved to be an interesting technique for the identification of adulterated milk and that could also be used to discover new adulterants. In the second study, the aim was to develop calibrations for determining the concentration of sodium bicarbonate, sodium citrate and whey used as raw milk adulterants. To develop the calibrations, adulterated samples of the first study were used and, for validation, other 60 samples were collected and adulterated. The performance of each calibration was evaluated regarding accuracy (Se), detection limit (DL) and determination coefficient (R^2). All calibrations presented R^2 higher than 0.91 with DL of 0.015%, 0.017% and 3.9% for SB, SC and W, respectively. Accuracy was 0.005%, 0.009% and 2.26% for SB, SC and W, respectively. Results show that the FTIR methodology can be used for determining the concentration of sodium bicarbonate, sodium citrate and whey in raw milk. Associated with automated equipment, it is a feasible option for monitoring these adulterants, presenting low operational costs and high analytical performance as additional features.

Keywords: Adulteration; Raw milk; Infrared; Whey; Sodium bicarbonate, Sodium citrate

1 INTRODUÇÃO

Um dos fatos mais importantes para o setor leiteiro nos últimos anos foi a aprovação da Instrução Normativa 51 (IN-51), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que determinou novas variáveis de avaliação da qualidade do leite cru. De acordo com a IN-51, análises de contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), composição centesimal (gordura, proteína, lactose) e resíduos de antibióticos (ATB) deverão ser realizadas mensalmente em um dos laboratórios oficiais da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) (BRASIL, 2002). Somado à criação do Sistema Integrado de Gestão do Serviço de Inspeção Federal (SIGSIF), o país passou a conhecer de fato quem são seus produtores e a respectiva qualidade, uma vez que os resultados obtidos pela RBQL são transferidos para este banco de dados.

Paralelamente à iniciativa do MAPA, as indústrias passaram a incentivar a melhoria da qualidade do leite de seus fornecedores através da adoção de programas de valorização da qualidade do leite. A remuneração do produtor passa a ser feita não somente, pelo volume, mas também em função da composição do leite, CBT e CCS (CASSOLI; MACHADO, 2007a; MACHADO; CASSOLI, 2008). As maiores indústrias captadoras de leite do país, já implementaram algum tipo de remuneração por critérios de qualidade, sendo que o diferencial pode chegar a até 20% da receita, quando comparado um leite com qualidade mediana e outro de qualidade superior (CASSOLI; MACHADO, 2007b). Algumas indústrias processadoras também adotaram esta remuneração diferenciada para a compra de leite de terceiros, conhecido também como leite "spot". Portanto, se uma cooperativa fornece leite a uma indústria e recebe pela qualidade, a cooperativa também passa a diferenciar o valor de compra dos cooperados, ocorrendo um efeito dominó em toda a cadeia de produção.

Publicações da RBQL apontam que o leite produzido no Brasil possui baixa qualidade quando comparado ao leite produzido em outros países, principalmente quanto a qualidade microbiológica medida através da CBT (ESTADOS UNIDOS, 2001; MACHADO; CASSOLI, 2008; MESQUITA et al., 2008; SANTOS, 2008; SOUZA et al., 2008). Em estados da região sul do país (RS e SC) mais de 70% dos produtores possuem CBT superior ao limite máximo proposto de 750 mil UFC/mL. A proporção de produtores não conformes para CBT é de aproximadamente 20% (CASSOLI; MACHADO, 2007a), e após 2011, com a redução do limite

para 100 mil UFC/mL, estima-se que este número se eleve para 40%. Neste cenário de forte pressão econômica e baixa qualidade microbiológica do leite, a prática de adulteração do leite cru passa a ser um fator de risco para toda a cadeia de produção.

As primeiras adulterações no leite, reportadas na literatura, foram a adição de água para aumento do volume e o desnate para produção de creme de leite (MILK …, 1882; MILK …, 1890; SOMMERFELD, 1901). A adição de água passou a ser controlada pela determinação do ponto de congelamento do leite, que está diretamente correlacionada com a concentração de solutos no leite (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002). Porém, conhecido o método e o seu princípio, passou a ser adicionado, juntamente com a água, solutos como açúcar e sal para que o ponto de congelamento fosse restabelecido. O passo seguinte foi desenvolver métodos que pudessem identificar a presença de açúcar, sais e outros compostos que tinham tal finalidade (PEREIRA et al., 2001; VELOSO et al., 2002).

Ao longo dos anos surgiram novas técnicas de adulteração em praticamente todos os agentes envolvidos na cadeia de produção. No final do ano de 2007, a Polícia Federal juntamente com o Ministério Público deflagrou a operação conhecida como Ouro Branco que investigou fraude em leite UHT. Segundo as investigações, a adulteração ocorria no leite cru, antes do processamento, com a adição de soro do leite e água para aumentar o volume, adição de peróxido de hidrogênio para reduzir carga bacteriana, citrato de sódio como estabilizante, bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio (soda cáustica) para corrigir o pH. Este leite foi também comercializado como leite cru para outras indústrias (OPERAÇÃO…, 2007).

Em 2008, nova prática de adulteração para aumento no teor de proteína bruta do leite, foi descoberta na China. Os produtores passaram a adicionar o composto melamina ao leite para aumentar o teor de proteína e, desta forma, aumentar o valor de venda do seu produto junto às indústrias, uma vez que a remuneração era feita em função do teor de proteína. O leite adulterado não foi identificado pelas indústrias e milhares de toneladas de leite em pó contaminado foram produzidos e consumidos trazendo impactos significativos para a saúde da população, além de prejuízos comerciais para o país e indústrias envolvidas (XIN; STONE, 2008; TUNICK, 2009).

Fica evidente que tanto a IN-51 do MAPA, como os programas de valorização da qualidade exercem pressão sobre os produtores para que estes busquem constantemente a melhoria da qualidade do seu produto. Tal processo de melhoria contínua exige do produtor conhecimento técnico, tempo, dedicação, disciplina e, inevitavelmente, investimentos. Por tal

motivo, muitos talvez optem por adulterar o leite para mascarar a má qualidade ou também para aumentar o volume de venda.

Já existem métodos qualitativos e quantitativos para a maioria dos adulterantes, porém possuem baixo rendimento analítico, requerem utilização de reagentes e alta dependência de mão-de-obra (HARDING, 1995; ASHURST; DENNIS, 1998). Além disso, para alguns deles, o elevado custo passa a ser outro fator restritivo, a exemplo do que ocorre com o método para identificar possível adição de soro (BRASIL, 2006). Tais características dificultam a implementação de programas de monitoramento em larga escala. Dificilmente uma indústria 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. Pela história, fica evidente o perfil reativo, ou seja, a adulteração precisa ocorrer primeiro para que depois os métodos sejam desenvolvidos para identificá-la.

Neste contexto, estudos demonstram o alto potencial de aplicação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) no controle de qualidade e monitoramento da autenticidade de leite e produtos lácteos.

O IVTF consiste na emissão de energia eletromagnética que interage sobre a matriz que absorve parte desta energia gerando assim, o espectro de absorção (MENDENHALL; BROWN, 1991; GUNASEKARAN; IRUDAYRAJ, 2000; KAROUI; BAERDEMAEKER, 2007). Quanto maior a concentração de uma molécula maior será a energia absorvida num dado comprimento de onda, e, desta forma, pode-se correlacionar o comportamento espectral com a concentração do composto. Esta metodologia, embarcada em equipamentos automatizados, já vem sendo aplicada com sucesso na determinação dos principais componentes do leite como gordura, proteína,(LEIFIER et al., 1996) e mais recentemente na determinação de caseína, nitrogênio uréico, ácidos graxos livres, minerais, pH e ponto crioscópico (HEWAVITHARANA; BRAKEL, 1997; HEUER et al., 2001; ARUNVIPAS et al., 2003; SOYEURT et al., 2006; LINKER; ETZION, 2009; SOYEURT et al., 2009). Outros estudos com leite cru mostram que compostos como tetraciclina, gordura vegetal, uréia, melamina e glucose também podem ser identificados e suas concentrações determinadas (SIVAKESAVA et al., 2002; CHEN et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a aplicação da metodologia de IVTF na identificação de adulteração em leite cru. Desta maneira, laboratórios da RBQL que possuam equipamentos com IVTF, poderiam realizar análises adicionais na mesma amostra que já é

coletada para determinação da composição e CCS ampliando o programa de monitoramento e controle de qualidade do leite cru.

Referências

ARUNVIPAS, P.; VANLEEUWEN, J.; DOHOO, I.; KEEFE, G. Evaluation of the reliability and repeatability of automated milk urea nitrogen testing. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Canada, v.67, p. 60-63, 2003.

ASHRUST, P.R.; DENNIS, M.J. **Analytical methods of food authentication**. New York: Blackie Academic, 1998. 350 p.

BRASIL. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Estabelece o regulamento fixar os requisitos mínimos que devem ser observados para a produção, a identidade e a qualidade do leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 13-22, set. 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos laboratórios nacionais agropecuários. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, 8 p., 14. dez. 2006.

CASSOLI. L,D.; MACHADO. P,F. Impacto de programas de valorização da qualidade sobre a CBT. **Boletim do Leite**, Piracicaba,v.13, n.156, p. 4-5, 2007a.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Impacto da Instrução Normativa 51 (MAPA) na qualidade do leite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DE MASTITE, 4, 2007. Botucatu , **Anais**... Botucatu, 2007. p. 30-37 b.

CHEN H-C.; HSIEH C-L.; LEE C-W.; CHEN J-J. Using visible/NIR spectroscopy to detect adulteration in rawmilk with Canonical variate analysis. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MACHINERY AND MECHATRONICS FOR AGRICULTUREAND BIOSYSTEMS ENGINEERING 4., 2008. Taichung. **Proceedings…** Taiwan**:**ISMAB, 2008. p. 13-18,

ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **Grade "A" pasteurized milk ordinance**, Washington, 2001, 57 p.

GUNASEKARAN, S.I.; IRUDAYARAJ,J. **Optical methods:** visible, NIR, and FTIR Spectroscopy**.** Local: Madison CRD PRESS, 2000. 423 p.

HARDING, F. Adulteration of milk. Composition quality In: HARDING, F.; CHAPMAN, H. (Ed.). **Milk quality**. Wiltshire: Aspen Publishers 1995. chap 5 p. 60-74; chap 6:p. 75-96.

HEUER, C.; LUINGE, H.; LUTZ, E.; SCHUKKEN, J. Determination of acetone in cow milk by fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, p. 575-582, 2001.

HEWAVITHARANA, A.K.; BRAKEL, B.V. Fourier transform infrared spectrometric method for rapid determination of casein in raw milk. **Analyst** , London, v. 122, p. 701–704, 1997.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk determination of freezing point**: thermistor cryoscope method (reference method). Bélgica, 2002. (FIL-IDF Standard, 108)

KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, London, v.102, p. 621-640, 2007.

LEIFIER, D.; GRAPPIN, R.; POCHET, S. Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, p. 711-717, 1996.

LINKER, R.; ETZION, Y. Potential and limitation of mid-infrared attenuated total reflectance spectroscopy for real time analysis of raw milk in milking lines. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 76, n.1, p. 42-48, Feb. 2009.

MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D. Diagnóstico da qualidade do leite na região Sudeste entre 2005 e 2008. In: CONGRESSO. BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE,3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v. 3, p. 187-189.

MENDENHALL, I.; BROWN, R. Fourier Transform Infrared of whey powder in nonfat determination dry milk. **Journal of Dairy Science,** Champaign, v.74, p. 2896-2900, 1991.

MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; BUENO, V.F.A qualidade do leite na região Centro Oeste e Norte do Brasil avaliada no laboratório de qualidade do leite, Goiânia – GO. In: COMGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE,3., 2008, Recife. **Anais...**Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v. 3. p. 11-21.

MILK adulteration checked, forty dealers fined from $25 to $100 each. **The New York Times**, New York, 7 Oct. 1882. Disponível em: <http://query.nytimes.com/gst/ abstract.html?res= 9805E7DD1F3EE433A25754C0A9669D94639FD7CF> Acesso em: 22 maio. 2009.

MILK adulteration. **The New York Times**, New York, 13 Aug. 1890. Disponível em: < http://query.nytimes.com/gst/abstract.html?res=9C03E2D7133BE533A25750C1A96E9C94619ED7CF> Acesso em: 22 maio. 2009.

OPERAÇÃO da PF e Procuradoria prende 26 acusados de adulterar leite em MG. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 22 out. 2007. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u338769 .shtml>. Acesso em: 22 maio. 2009.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados:** métodos analíticos. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001; 234 p.

SANTOS, M.V. Como o sistema de pagamento afeta a qualidade do leite. **MilkPoint**, 2008. Disponível em:<http://www.milkpoint.com.br/como-o-sistema-de-pagamento-afeta-a-qualidade-do-leite-parte-1 noticia_44337_61_180_.aspx>. Acesso em: 27 Jan. 2009.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYRAJ, J Rapid determination of tetracycline in milk by ft-mir and ft-nir spectroscopy. **Journal of Dairy Science** , Champaign, v.85, p. 487-493, 2002.

SOMMERFELD, P. **Methods for the examination of milk for chemists, physicians and hygienists.** Tradução de PETERS, A.T. ; HILTNER, A.M.R.S. Chicago:Alex and Eger, 1901. 96 p.

SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Janeiro/ 2007 a Julho/ 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. **Anais...**Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v. 3. p. 187-189.

SOYEURT, H.; BRUWIER, J.; ROMNEE, N.; BERTOZZI, C.; DARDENNE, P. Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.6, p. 2444-2454, 2009.

SOYEURT, H.; DARDENNE, P.; LOGNAY, G.; VESELKO, D.; MAYERES, P; GENGLER, N. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 3611-3626, 2006.

TUNICK, M.H. Dairy innovations over the past 100 years. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. *57* n. 18, p. 8093–8097, 2009.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p. 609-615, 2002.

XIN H.; STONE, R. Tainted milk scandal: Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine. **Science**, Washington, v.322, p. 1310-1311, 2008.

2 APLICAÇÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF) NA IDENTIFICAÇÃO DE LEITE CRU ADULTERADO

Resumo

Objetivou-se avaliar a utilização da metodologia do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) na identificação de leite cru adulterado. Foi construído espectro referência com 800 amostras representativas da região de estudo. Através da análise de componentes principais, foram desenvolvidas equações com diferente número de fatores. Para validação, foram utilizadas 100 amostras adulteradas com três diferentes concentrações de bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro de queijo não ácido. Calculou-se a sensibilidade e especificidade para as diferentes equações e adulterantes. Resultados indicam que o IVTF pode ser utilizado para identificação de leite adulterado.

Palavras-chave: Adulteração; Leite cru; Infravermelho com transformada de Fourier; Bicarbonato de Sódio; Citrato de Sódio; Soro de queijo não ácido; Análise Principais Componentes

Abstract

The objective was to evaluate the application of the methodology of Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR) to the identification of adulterated raw milk. A reference spectrum with 800 representative samples of the study area was built. Through the analysis of principal components, equations with a distinct number of factors were developed. For the validation test, 100 adulterated samples were used at three different concentrations of sodium bicarbonate, sodium citrate and non-acid cheese whey. The sensitivity and specificity for the different equations and adulterants were calculated. Results indicate that the FT-IR can be used for the identification of adulterated milk.

Keywords: Adulteration; Raw milk; Fourier Transform Infrared, Sodium Bicarbonate, Sodium Citrate, Non-acid cheese whey; Principal component analysis

2.1 Introdução

A adulteração de alimentos é uma prática antiga e que preocupa não somente os consumidores, mas também processadores e produtores. Tal tema vem ganhando destaque, sendo crescente a demanda por produtos que tenham garantia de sua autenticidade (KAROUI; BAERDEMAEKER, 2007).

Na cadeia produtiva do leite, a adulteração é relatada desde início do século passado. Em 1859, o estado americano de Massachusets foi um dos primeiros naquele país a publicar lei proibindo a adulteração do leite. Naquela época já era comum a adição de água e de outros compostos como formaldeído, amido e neutralizantes da acidez (PROGRESS …, 1916). Em 1906 foi publicada a primeira lei federal que tratava da produção de alimentos seguros e os primeiros parâmetros de qualidade passaram a ser monitorados (TUNICK, 2009).

Com a regulamentação da produção de leite e definição de parâmetros de qualidade, o desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos e qualitativos foi um dos pilares para o processo de busca por alimentos seguros.

As primeiras adulterações no leite, reportadas na literatura, foram a adição de água para aumento do volume e o desnate para produção de creme de leite (MILK …, 1882; MILK …, 1890; SOMMERFELD, 1901). A adição de água passou a ser controlada pela determinação do ponto de congelamento do leite, que está diretamente correlacionada com a concentração de solutos no leite (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002). Porém, conhecido método e o seu princípio, passou a ser adicionado, juntamente com a água, solutos como açúcar e sal para que o ponto de congelamento fosse reestabelecido. O passo seguinte foi desenvolver métodos que pudessem identificar a presença de açúcar, sais e outros compostos que tinham tal finalidade (PEREIRA et al., 2001; VELOSO et al., 2002).

Atualmente as adulterações no leite ficaram mais sofisticadas e outros produtos passaram a ser adicionados com diferentes finalidades (XIN; STONE, 2008). Além disso, a adulteração passou a ser praticada por diferentes elos da cadeia de produção, como produtores, transportadores e indústrias.

Em 2008 o mundo passou a conhecer uma nova prática de adulteração para aumento no teor de proteína bruta do leite, descoberta na China. Os produtores passaram a adicionar o composto melamina ao leite para aumentar o teor de proteína, e desta forma, aumentar o valor de

venda do seu produto junto as indústrias. O leite adulterado não foi identificado pelas indústrias e milhares de toneladas de leite em pó contaminado foram produzidos e consumidos trazendo impactos significativos para a saúde da população, além de prejuízos comerciais para o país e indústrias envolvidas (XIN; STONE, 2008; TUNICK, 2009). Logo após a descoberta deste tipo de adulteração, foi desenvolvido teste rápido de Elisa para determinação da concentração de melamina e que passou a ser adotado por algumas indústrias no controle de qualidade da sua matéria prima (BRADLEY, 2008; GARBER, 2008).

A cada nova adulteração, se desenvolve um método analítico para monitorá-la e tal análise passa a ser incorporada ao programa de controle de qualidade da indústria. Estes métodos, geralmente possuem baixo rendimento analítico, requerem utilização de reagentes e alta dependência de mão-de-obra (HARDING, 1995; ASHURST; DENNIS, 1998.) Tais características dificultam a implementação de programas de monitoramento em larga escala. Dificilmente uma indústria consegue analisar o leite de todos os seus produtores para todos os adulterantes já descritos, como rotina.

Além disso, outra preocupação é identificar a adulteração assim que ela é desenvolvida. Pela história, fica evidente o perfil reativo, ou seja, a adulteração precisa ocorrer primeiro para que depois os métodos sejam desenvolvidos para identificá-la.

Da mesma forma que as adulterações se tornaram cada vez mais sofisticadas, tal evolução também é observada nos métodos analíticos. Exemplo disso é o infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), baseado na emissão de energia eletromagnética que interage sobre a matriz que absorve parte desta energia gerando assim o espectro de absorção (MENDENHALL; BROWN, 1991; GUNASEKARAN; IRUDAYRAJ, 2001; KAROUI; BAERDEMAEKER, 2007). O espectro gerado é característico da matriz, podendo sofrer pequenas variações em função da composição química. Ao adulterar a matriz com determinado composto/substância, o espectro gerado pode ser significativamente diferente do espectro referência, reflexo da presença do adulterante.

Estudos disponíveis até o momento sinalizam que existe alto potencial de aplicação da metodologia de IVTF no monitoramento de adulteração no leite (LUO et al., 2006; HE et al. 2010). O desenvolvimento de espectros de referência para o leite poderia antecipar a descoberta de um novo adulterante. Além disso, o IVTF já é amplamente utilizada em equipamentos

automatizados para determinação da composição do leite, possuindo alta capacidade analítica e baixo custo operacional (SÁNCHEZ et al., 2007).

Portanto, objetivou-se o desenvolver calibração para identificar leite cru adulterado através de comparação com espectro referência, em equipamento automatizado com tecnologia de IVTF.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostragem

A construção do espectro de referência requer amostras que representem a variabilidade na composição do leite (SOYEURT et al., 2009). Fatores que interferem nesta variabilidade (localização geográfica, época do ano e raça) foram considerados no plano amostral. Seguindo procedimentos padrões (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1995), foram coletadas 800 amostras provenientes de fazendas distribuídas em três estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais e Bahia), durante o período de agosto de 2009 a março de 2010. De cada fazenda foi coletada amostra do leite do tanque em frasco de 50 mL adicionado de conservante bronopol. As amostras foram mantidas sob refrigeração (< 10°C) e analisadas em até 96 horas após a coleta.

2.2.2 Desenvolvimento da calibração

Para análise do banco de dados espectral utilizou-se a análise de componentes principais (ACP) através do software ASM (FOSS ANALYTICAL, 2009; FOSS ANALYTICAL, 2010). Foram desenvolvidas oito calibrações para espectro de referência em que foram considerados diferentes números de componentes principais (fatores) no modelo estatístico (6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 fatores).

Componentes como gordura, proteína e lactose podem ser preditos com calibrações que utilizam um menor número de fatores em função das concentrações em que são encontradas no leite. Por outro lado, compostos em menor concentração como por exemplo, nitrogênico uréico, ácido cítrico, ácidos graxos livres, requerem modelos mais complexos (HANSEN, 1998; HANSEN 1999).

2.2.3 Validação

A validação das calibrações foi realizada com 100 amostras independentes, coletadas nas mesmas regiões durante o mês de Abril de 2010. Cada uma das amostras foi adulterada com três diferentes compostos, geralmente utilizados para fraude do leite cru (CERDÁN et al., 1992, VELOSO et al., 2002): bicarbonato de sódio (BS), citrato de sódio (CS) e soro de queijo não ácido (SO).

Para obtenção do soro, foi adicionado 10 mL de coalho líquido em 5 litros de leite cru colocado em banho-maria a 32°C por 60 minutos. Após este período a massa foi cortada, agitada e dessorada. O soro coletado foi aquecido até princípio de fervura para inativação da enzima do coalho.

Adotaram-se os seguintes tratamentos: controle (sem adição de adulterante), BS (0,05, 0,10 e 0,25 %), CS (0,025, 0,050 e 0,075%) e SO (5, 10 e 20%). Todas as amostras foram adicionadas do conservante bronopol, mantidas sob refrigeração (< 6°C) e analisadas após 24h de adulteração. O impacto da adição dos adulterantes sobre as variáveis de composição do leite, pH e crioscopia foi verificado, através do teste de Dunnett ($p<0,05$), utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS, 2003) comparando-se tratamentos controle com os demais.

Para avaliação do desempenho de cada calibração, em detectar leite adulterado, calculou-se a sensibilidade e a especificidade (ERDREICH; LEE, 1981).

2.2.4 Análises laboratoriais

As amostras foram analisadas no equipamento MilkoScan FT+ 6000 (Foss Analytical), que adota a metodologia de IVTF. As leituras foram feitas na região do infravermelho médio, com comprimentos de onda entre 3 e 10 μm (1.000 – 5.000 cm $^{-1}$), sendo os espectros exportados e armazenados em arquivos eletrônicos (FOSS ANALYTICAL, 2008). Mensalmente foi realizada a equalização do equipamento conforme recomendação do fabricante. Com isso, garantiu-se a padronização da aquisição espectral ao longo do período experimental e a possibilidade de transferência de calibrações entre diferentes equipamentos submetidos ao mesmo processo de equalização (HANSEN, 1998).

Além da obtenção dos espectros, determinaram-se os teores de gordura, proteína, caseína, nitrogênio uréico, pH, ponto de congelamento e contagem de células somáticas para caracterização da composição do leite. As análises foram realizadas seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante (FOSS ANALYTICAL, 2008).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Espectro referência

O Brasil é um país de grande extensão territorial e diferenças climáticas. Fatores associados ao rebanho como raça, alimentação e manejo contribuem para a variação na qualidade do leite entre as diferentes fazendas. A variabilidade espectral das 800 amostras é apresentada na Figura 1. Além do espectro de todas as amostras, é exibido o desvio padrão em função do comprimento de onda, o que ressalta a variabilidade.

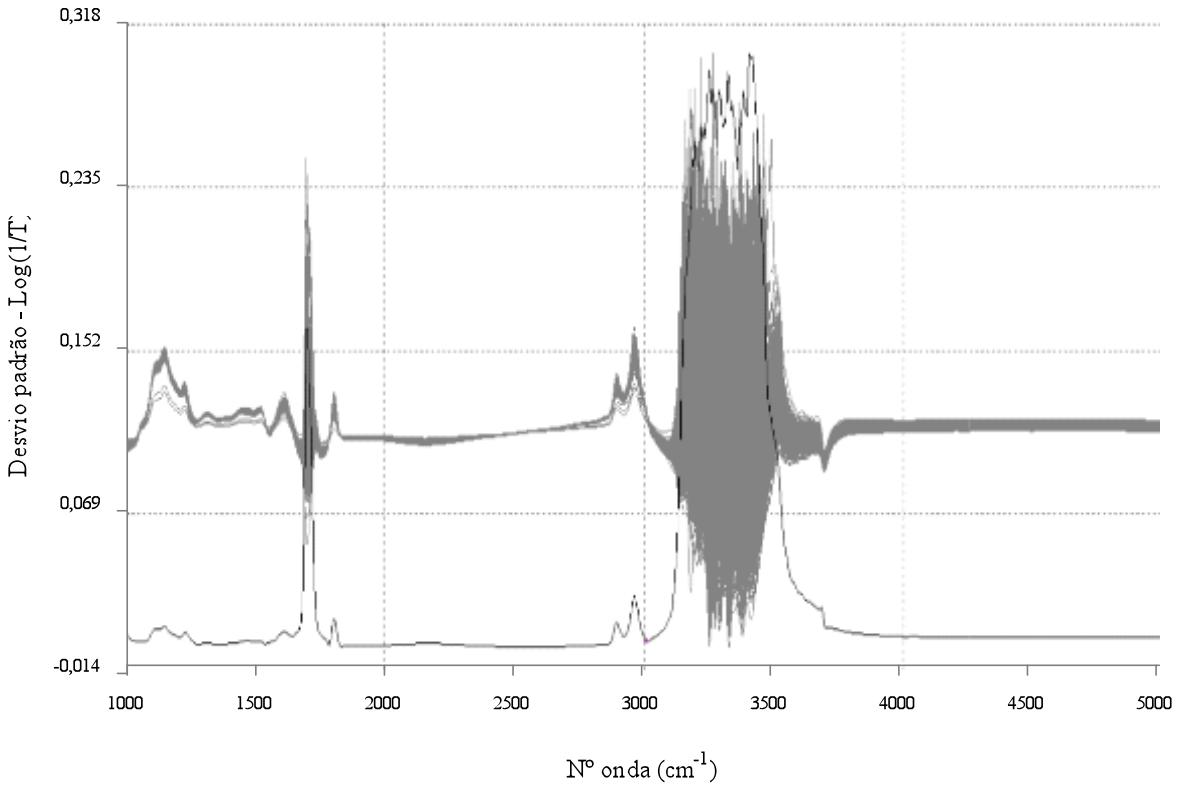


Figura 1 - Variabilidade espectral das 800 amostras (linhas cinza) e o desvio padrão nos diferentes comprimentos de onda (linha preta)

A variação espectral refletiu na variação nos resultados de composição, CCS, pH e crioscopia (Tabela 1), sendo esta variação semelhante ao reportado por outros levantamentos nas mesmas regiões. Machado et al. (2008) observaram coeficientes de variação de 15, 5 e 108 % para gordura, proteína e CCS respectivamente em levantamento realizado com aproximadamente 25.000 fazendas nos anos de 2007 e 2008 (MACHADO et al., 2008; MESQUITA et al., 2008; SOUZA et al., 2008). Tais características, indicam que o espectro referência construído é representativo da região de estudo.

Tabela 1 - Análise descritiva da composição do leite das 800 amostras utilizadas para construção das calibrações do espectro de referência

Variável	Média	Q1	Mediana	Q3	Min	Máx	CV (%)
Gordura (% m/m)	3,60	3,38	3,548	3,79	2,15	7,83	11
Proteína (% m/m)	3,18	3,07	3,17	3,27	2,06	3,87	5
Caseina (%m/m)	2,44	2,35	2,44	2,53	1,28	3,07	6
Sólidos (%m/m)	12,24	11,95	12,22	12,49	7,82	15,89	4
Nitrogênio uréico (mg/dL)	11,3	7,8	11,0	14,3	0,5	28,6	39
Ponto congelamento (^{o}H)	541	538	542	545	298	579	2
pH	6,70	6,68	6,70	6,73	6,33	6,84	0,7
CCS (mil céls/mL)	518	287	426	636	8	4687	73

Q1 : primeiro quartil, Q3: tercerio quartil, Min: valor mínimo, Max: valor máximo, CV(%): coeficiente de variação

Das 800 amostras, 12 foram excluídas por apresentarem resultados discrepantes de gordura (muito altos ou muito baixos), o que indicam homogeneização insuficiente do leite antes da coleta (GOODRIDGE et al., 2004; CASSOLI; MACHADO, 2006). A inclusão destas amostras no modelo poderia aumentar a variabilidade espectral e diminuir a sensibilidade das calibrações.

2.3.2 Calibração

Autores sugerem que para a construção de calibrações seja utilizado o número de componentes principais (fatores) responsáveis por explicar cerca de 90% da variação espectral

(LEFIER et al., 1996; HEUER et al., 2001; LUO et al., 2006; KAOURI; BAERDEMAEKER, 2007).

No presente estudo, foram necessários nove fatores para explicar 90% da variação espectral das amostras utilizadas para construção do espectro referência. Em trabalhos semelhantes, menor número de fatores foram necessários para explicar a mesma variação (BORIN et al., 2006; LUO et al., 2006). Tal fato pode ser explicado pelo grande número de amostras utilizadas neste estudo e variação expressiva na composição do leite (Tabela 1).

Trabalhos mostram que para identificação de componentes em baixas concentrações, obrigatoriamente deve-se utilizar um maior número de fatores no modelo. Hansen (1998), estudando determinação de nitrogênio uréico no leite desenvolveu modelos com 20 fatores. O mesmo foi observado para a determinação de ácidos graxos livres em que foram necessários 16 fatores para melhor resposta de predição (HANSEN, 1999). Chen et al. (2008) buscando desenvolver calibração para diferenciação de leite natural e leite adulterado com leite reconstituído, observaram que o modelo de melhor desempenho foi o que utilizou 19 fatores. Tal fato pode ser explicado pela alta semelhança entre as matrizes estudadas, o que demanda maior complexidade do modelo.

Como a adulteração do leite pode ocorrer com a adição de substâncias em pequenas concentrações, foram desenvolvidas diferentes calibrações variando-se o número de fatores (6 a 20), como descrito anteriormente.

2.3.3 Validação calibração

2.3.3.1 Amostras de validação

Na Tabela 2 são apresentados os resultados analíticos para os componentes do leite, CCS, pH e ponto de congelamento das amostras utilizadas para a validação das equações.

Como pode ser observado, a adição do bicarbonato de sódio não teve impacto nos resultados de gordura, proteína, caseína, sólidos totais e CCS. Utilizado em fraudes para neutralizar a acidez do leite promove obrigatoriamente a elevação do pH (AUGUSTIN, 2000; MARTINS et al., 2008). Este comportamento foi observado somente na análise pelo método referência (pHr) mas não nos resultados obtidos pelo IVTF (pH). Observou-se também um decréscimo no teor de nitrogênio uréico com o aumento do nível de adição, sendo que algumas

amostras apresentaram resultados negativos para o componente. Acredita-se que o bicarbonato possa influenciar em regiões do espectro relacionadas as calibrações de nitrogênio uréico e pH do IVTF e com isso ocasionar alterações na predição e resultados não representativos. O ponto de congelamento se comportou de maneira esperada, em que se observa queda nos valores com o aumento no nível de adição (CERDÁN et al., 1992).

Tabela 2 - Composição, ponto de congelamento, pH e contagem de células somáticas (CCS) das 100 amostras nos diferentes tratamentos (Controle, BS, CS e SO)

Variável	**Controle**	**Bicarbonato de Sódio (%)**			**Citrato de Sódio (%)**			**Soro (%)**		
		0,05	**0,1**	**0,15**	**0,025**	**0,05**	**0,075**	**5**	**10**	**20**
Gordura (% m/m)	3,67	3,65	3,65	3,64	3,65	3,66	3,65	3,52*	3,35*	3,01*
Proteína (% m/m)	3,26	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,13*	3,02*	2,78*
Caseína (%m/m)	2,48	2,48	2,47	2,47	2,49	2,49	2,49	2,38*	2,28*	2,07*
Sólidos (%m/m)	12,34	12,32	12,33	12,36	12,34	12,35	12,36	12,06*	11,80*	11,27*
Nitrogênio uréico (mg/dL)	13,6	11,4*	9,1*	2,2*	13,5	13,7	14,1	13,2	13,1	12,5
Ponto congelamento (^{o}H)	-0,539	-0,550*	-0,562*	-0,600*	-0,544	-0,549*	-0,554*	-0,541	-0,543	-0,547*
pH	6,68	6,64*	6,56*	6,20*	6,68	6,69	6,69	6,68	6,67	6,67
pHr	6,69	6,79*	6,84*	6,95*	6,69	6,70	6,69	6,67	6,65	6,65
CCS (mil céls/mL)	723	708	694	683	720	713	705	715	702	676

* Existe diferença entre o controle e o adulterante (Dunnett, $p<0,05$)

Por outro lado, nenhuma alteração na composição do leite e pH foi observada com a adição do citrato de sódio nas concentrações utilizadas, sendo observado somente a redução do ponto de congelamento. Outros estudos que avaliam o impacto da inclusão do citrato como agente estabilizante de caseína no processo industrial também observaram redução do ponto de congelamento (McMAHON et al., 1991; UDABAGE et al., 1998; PASTORINO et al., 2003).

Já a adulteração com soro promoveu decréscimo na concentração de todos os componentes do leite que pode ser explicado pelo perfil centesimal desta matriz (TEIXEIRA; FONSECA, 2008). O soro utilizado neste estudo era um soro não ácido e portanto esperava-se a manutenção do pH.

2.3.3.2 Desempenho das calibrações

A Tabela 3 apresenta o desempenho de cada equação em identificar corretamente amostras adulteradas.

Tabela 3 - Sensibilidade e especificidade das calibrações

Fatores	Especificidade %	Bicarbonato de Sódio (%)			Citrato de Sódio (%)			Soro (%)		
		0,05	0,1	0,15	0,025	0,05	0,075	5	10	20
6	87,9	51,5	99,0	100,0	14,1	29,3	61,6	5,6	4,5	20,2
8	90,9	96,0	100,0	100,0	14,1	24,2	52,5	6,7	5,6	14,6
10	91,9	100,0	100,0	100,0	11,1	22,2	61,6	7,8	5,6	11,2
12	92,9	100,0	100,0	100,0	10,1	25,3	74,7	6,7	5,6	12,3
14	89,9	100,0	100,0	100,0	14,1	34,3	79,8	6,7	6,7	14,6
16	88,9	100,0	100,0	100,0	16,2	54,5	87,9	8,9	7,8	17,9
18	88,9	100,0	100,0	100,0	23,2	63,6	93,9	12,3	8,9	32,5
20	88,9	100,0	100,0	100,0	26,3	76,8	98,0	14,6	10,1	47,1

A calibração com 12 fatores foi a que apresentou maior especificidade, em que 92,9% das amostras controle foram classificadas corretamente como não adulteradas e 7,1% consideradas como falso positivas. Calibração com seis fatores, ou mais de 16 tiveram menor especificidade (87,9%) comportamento este, esperado dentro da análise de componentes principais (FOSS ANALYTICAL, 2009). Em estudo semelhante desenvolvido por Luo et al. (2006) todas as amostras não adulteradas foram identificadas corretamente, apesar do pequeno número de amostras avaliado.

A sensibilidade do IVTF, variou em função do número de fatores, adulterante e sua concentração.

Todas as amostras adulteradas com bicarbonato foram identificadas com calibração de 10 fatores e na concentração mais baixa de 0,05%. A calibração com oito fatores também apresentou bom desempenho com sensibilidade de 96% para a concentração de 0,05% e 100% para os maiores níveis.

Estudos mostram que o bicarbonato é adicionado em concentrações que variam entre 0,01 e 0,05%, sendo que o método do ácido rosólico possui nível de detecção ao redor de 0,02 %

segundo Paradkar et al. (2001). Descrito desde 1900 (SOMMERFELD, 1901) este método ainda é utilizado em vários países para identificação de fraude por bicarbonato (BRASIL, 2006).

Para as amostras adulteradas com citrato, a sensibilidade foi baixa para as menores concentrações (0,025 e 0,05%) independentemente do número de fatores. Já para o nível de 0,075%, calibração com 18 fatores apresentou sensibilidade de 93,9%. Outros métodos desenvolvidos para determinação de citrato no leite reportam limite de detecção entre 0,01% e 0,025% (BABAD; SHTRIKMAN, 1951; MUTZELBURG, 1979)

O citrato é utilizado como estabilizante da caseína em diferentes processos industriais sendo permitido o seu uso com esta finalidade (McMAHON et al., 1991; PASTORINO et al., 2003). Na produção de leite UHT em alguns países, por exemplo, é prevista adição máxima de 0,02%. Por outro lado, não é permitida a sua utilização em leite cru o que vem sendo reportado na literatura. Neste caso a adição do citrato promove a melhoria da estabilidade do leite cru além de corrigir o ponto de congelamento do leite após fraude com água ou soro (VELOSO et al., 2002). Não existem informações precisas das concentrações de citrato geralmente utilizadas para a adulteração.

Em relação à adulteração pela adição de soro não ácido, todas as calibrações apresentaram baixa sensibilidade, mesmo quando adicionado em altas concentrações (20%). A concentração dos demais componentes (Tabela 2) sofreram alterações significativas, principalmente em relação a proteína total e caseína. Apesar desta alteração, os espectros destas amostras não foram identificados como diferentes do esprectro referência. Tal comportamento pode ser explicado pelo tratamento espectral realizado pelo software ASM, em que parte do espectro (região entre 1.480 e 1.490 cm^{-1}) não é considerado no modelo, sendo a principal região relacionada com a fração protéica (FOSS ANALYTICAL, 2009). Talvez a inclusão desta região espectral nas calibrações poderia melhorar a sensibilidade para tal adulterante e outros que venham influenciar na variação espectral nesta região.

Estudo semelhante utilizando o IVTF para identificação de soro em leite em pó desnatado mostrou que o método foi capaz de identificar o adulterante quando em concentrações acima de 5% (MENDENHAL; BROWN, 1991), apesar da semelhança entre a matriz soro e leite.

Outros estudos reportam o potencial do IVTF na identificação de adulterantes em produtos lácteos. Chen et al. (2008) utilizando metodologia de infravermelho associada a analise de discriminante, desenvolveu calibração capaz de diferenciar leite adulterado com leite

reconstituído já a partir da concentração de 0,55% do adulterante. Da mesma forma, Mauer et al. (2009) verificaram que a melamina pode ser identificada a partir da concentração de 1 ppm em fórmulas infantis através da metodologia de infravermelho.

A aplicação do IVTF no monitoramento de qualidade do leite cru foi reportado por Luo et al. (2006), que desenvolveram espectro referência para leite não adulterado. Para validação do modelo, utilizaram amostras adulteradas com uréia, óleo vegetal e proteína hidrolizada. Todas as amostras adulteradas foram identificadas como tal, e os autores ainda reportam limite de detecção de 0,02% para estes adulterantes. Em estudo semelhante desenvolvido por He et al. (2010), utilizando IVTF, amostras de leite cru adulteradas com melamina, glucose, uréia e contaminadas com tetraciclina também puderam ser identificadas.

A comparação com espectro de referência se mostra uma técnica interessante e, no caso de adição de uma nova substância adulterante, esta poderia ser rapidamente identificada. Deve-se, no entanto, considerar que somente moléculas que absorvam energia no intervalo de comprimento de onda avaliado podem ser identificadas. Por ser uma técnica adotada por equipamentos automatizados poderia ser implementada facilmente pelas indústrias e laboratórios centrais para monitorar em larga escala a autenticidade do leite cru de toda a cadeia de produção.

2.4 Conclusão

Através dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a metodologia de IVTF pode ser utilizada para identificação de leite cru adulterado. Associada à equipamentos automatizados, é uma opção viável no monitoramento e garantia de autencitidade do leite cru, tendo o baixo custo operacional e alto desempenho analítico como características adicionais.

Referências

ASHRUST, P.R.; DENNIS, M.J. **Analytical methods of food authentication**. New York: Blackie Academic, 1998. 350 p.

AUGUSTIN, M.A. Mineral salts and their effect on milk functionality. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 55, p. 61–64, 2000.

BABAD; SHTRIKMAN. Technical Notes: Colorimetric determination of citrate in milk by Babad and Shtrikman. **Journal of Dairy Science**, Campaign, v. 40, n. 11, p. 1495. 1957.

BORIN, A.; FERRAO, M.; POPPI, R. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. **Analytica Chimica,** Amsterdan, v. 579, p. 25-32, 2006.

BRADLEY, D. Melamine scandal widens. **Sciencebase**. 2008. Disponível em: <http://www.sciencebase .com/science-blog/melamine-scandal-widens.html>. Acesso em: 22 maio. 2009.

BRASIL. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos laboratórios nacionais agropecuários. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14. dez. 2006. Seção 1, 8 p.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Amostragem de leite para pagamento por qualidade. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. (Org.). **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia, 2006. p. 135-148

CERDÁN, J.F.; PERIS-TORTAJADA, M.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. Automation of the determination of hydrogen peroxide, dichromate, formaldehyde and bicarbonate in milk by flow injection analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 344, n. 3, p. 123-127, 1992.

CHEN H-C.; HSIEH C-L.; LEE C-W.; CHEN J-J. Using visible/NIR spectroscopy to detect adulteration in raw milk with Canonical variate analysis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MACHINERY AND MECHATRONICS FOR AGRICULTURE AND BIOSYSTEMS ENGINEERING**,** 4, 2008**.** Taichung. **Proceedings…**Taiwan**:ISMAB**, 2008. p. 13-18,

ERDREICH, L.S.; LEE, E.T. Use of relative operating characteristic analysis in epidemiology. A method for dealing with subjective judgment. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 114, p. 649-662. 1981.

FOSS ANALYTICAL. **MilkoScan 6000 FT+**: Operator's Manual. Dinamarca, 2008. p. 1-90.

FOSS ANALYTICAL. **Abnormal spectrum screening module application note 28**. Dinamarca2009. p. 1-8.

FOSS ANALYTICAL**. How to get started with Abnormal Spectrum Screening Module Application Note 37**. Dinamarca,. 2010. p. 1-3.

GARBER E.A. Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, p. 590-594, 2008.

GOODRIDGE, L.; HILL, A.R.; LENCKI, W. A review of international standards and the scientific literature on farm milk bulk-tank sampling protocols. **Journal of Dairy Science**, Campaign, v. 87, p. 3099-3104, 2004.

GUNASEKARAN, S.I.; IRUDAYARAJ, J. **Optical methods:** visible, NIR, and FTIR Spectroscopy. Local: Madison, CRD Press, 2000. 423 p.

HANSEN, P.W. Urea determination in milk using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and multivariate calibration. **Milk Science International**, Munchen, v. 53, p. 251–255,1998.

HANSEN, P.W.; van BRAKEL, A.S.; GARMAN, J.; NORGAARD, L. Detection of specific sugars in dairy process samples using multivariate curve resolution. **Journal of Dairy Science**, Campaign, v. 82, p.1351–1360, 1999.

HARDING, F. Adulteration of milk. Composition quality In:HARDING, F.; CHAPMAN, H. (Ed.).**Milk quality**. Wiltshire, UK, 1995. chap 5 p. 60-74; chap6 p. 75-96.

HE, B.; LIU, R.; YANG, R.; XU, K. Adulteration detection in milk using infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation analysis. **SPIE Journals and Conference Proceedings**, San Francisco , v. 7572, p. 134-139, 2010.

HEUER, C.; LUINGE, H.; LUTZ, E.; SCHUKKEN, J. Determination of acetone in cow milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, p. 575-582, 2001.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk and milk products:** methods of sampling, Bélgica, 1995. 25 p. (IDF Standard, 50C.).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk determination of freezing poin**t: thermistor cryoscope method (reference method), Bélgica, 2002. (IDF Standard ,108).

KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, London, v.102, p. 621-640, 2007.

LEFIER, D.; GRAPPIN, R.; POCHET, S. Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, p. 711-717, 1996.

LUO, H.; ZHANG, J.; LIU, F.; QIN, Y. Quick detection of adulterant milk by Infrared Spectroscopy. **IDF World Summit Shanghai,** Shanghai, v.3, n.2, p. 1-5, 2006.

MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D. Diagnóstico da qualidade do leite na região Sudeste entre 2005 e 2008. In: III CONGRESSO. BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2008, Recife. **Anais...** Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. v. 3. p. 187-189.

MARTINS; M.E.P.; NICOLAU, E.S.N.; MESQUITA, A.J de; NEVES, R.B.S.; ARRUDA, M.T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158. Out./Dez. 2008.

MAUER, L.J.; CHERNYSHOVA, A.A.; HIATT, A.; DEERING, A.; DAVIS, R. Melamine detection in Infant Formula Powder Using Near- and Mid-Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Easton, v. 57, p. 3974–3980, 2009.

McMAHON, D.J., SAVELLO, P.A.; BROWN, R.J.; KALA´B, M. Effects of phosphate and citrate on the gelation properties of casein micelles in renneted ultra-high temperature (UHT) sterilized concentrated milk. **Food Structure**, Chicago, v. 10, p. 27–36, 1991.

MENDENHALL, I.; BROWN, R. Fourier Transform Infrared of whey powder in nonfat determination dry milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p. 2896-2900, 1991.

MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; BUENO, V.F. A qualidade do leite na região Centro Oeste e Norte do Brasil avaliada no laboratório de qualidade do leite, Goiânia – GO. In: ICONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE,3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v. 3. p. 11-21.

MILK adulteration checked, forty dealers fined from $25 to $100 each. **The New York Times**, New York, 7 Oct. 1882. Disponível em: <http://query.nytimes.com/gst /abstract.html?res= 9805E7DD1F3EE433A25754C0A9669D94639FD7CF> Acesso: 22 maio. 2009.

MILK adulteration. **The New York Times**, New York, 13 Aug. 1890. Disponível em: < http://query.nytimes.com/gst/abstract.html?res=9C03E2D7133BE533A25750C1A96E9C94619ED7CF> Acesso em: 22 maio. 2009.

MUTZELBURG, I.D. An enzymatic method for the determination of citrate in milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 34, n.2, p. 82-84, 1979.

PARADKAR, M.M.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. An approach to the detection of synthetic milk in dairy milk: 3. Detection of vegetable oil and sodium bicarbonate. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 54, n. 1, p. 34-35, Feb.. 2001.

PASTORINO, A.J.; HANSEN, C.L.; McMAHON, D.J. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 60–69, 2003.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados:** métodos analíticos. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001; 234 p.

PROGRESS in the milk industry. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 66, p. 429-430, 1916.

SÁNCHEZ, D.S.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C.; FE, C. de la.; MORALES, C.T.; CONTRERAS, A.; GONZALO, C. Evaluation of the MilkoScan FT 6000 milk analyzer for determining the freezing point of goat's milk under different analytical conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 3153-3161, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide 9.3** Cary, 2003. 1 CD_ROM.

SOMMERFELD, P. **Methods for the examination of milk for chemists, physicians and hygienists.** traduzido por PETERS, A.T. ; HILTNER, A.M.R.S. Chicago:Alex and Eger, 1901. 96 p.

SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Janeiro/ 2007 a Julho/ 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v. 3. p. 187-189.

SOYEURT, H.; BRUWIER, J.; ROMNEE, N.; BERTOZZI, C.; DARDENNE, P. Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry. **Journal of Dairy Science,** Champaign, v.92 , n.6, p. 2444-2454, 2009.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozarela e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n.1, p. 243-250. 2008.

TUNICK, M.H. Dairy innovations over the past 100 years. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57 n. 18, p. 8093–8097, 2009.

UDABAGE, P.; AUGUSTIN, M.A.; McKINNON, I.R. Effects of mineral salts on renneted milk gels. **Journal of Dairy Technology**, Australia, v. 53, p. 139, 1998.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

XIN H.; STONE, R. Tainted milk scandal: Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine. **Science**, Washington, v. 322, p. 1310-1311, 2008.

PROGRESS in the milk industry. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 66, p. 429-430, 1916.

3 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU PELA METODOLOGIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Resumo

Objetivou-se desenvolver calibrações para determinação da concentração de alguns adulterantes de leite em equipamento automatizado com metodologia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF). Para construção da calibração foram coletadas 100 amostras provenientes de fazendas dos estados de São Paulo e Minas Gerais. As amostras foram adulteradas com três diferentes adulterantes geralmente utilizados na adulteração do leite cru sendo eles: bicarbonato de sódio (BS), citrato de sódio (CS) e soro de queijo (SO). Para cada adulterante foram utilizadas três diferentes concentrações (BS: 0,05, 0,10 e 0,25 %; CS: 0,025, 0,050 e 0,075% e SO: 5, 10 e 20%). Para validação, foram coletadas 60 amostras de outras fazendas que não foram consideradas na fase de desenvolvimento da calibração.Os adulterantes foram adicionados nas seguintes concentrações: 0,03, 0,06, 0,10 e 0,12% para BS, 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08% para CS e 5, 10 e 20% para SO. O desempenho de cada calibração foi avaliado através da acurácia (Se), limite de detecção (LD) e coeficiente de determinação (R^2). Todas as calibrações apresentaram R^2 superior a 0,91 com LD de 0,015%, 0,017% e 3,9% para BS, CS e SO, respectivamente. Já a acurácia foi de 0,005%, 0,009 % e 2,26% para BS, CS e SO, respectivamente. Através dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a metodologia de IVTF pode ser utilizada para determinação da concentração de bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro de queijo em leite cru. Associada à equipamentos automatizados, é uma opção viável no monitoramento destes adulterantes, tendo baixo custo operacional e alto desempenho analítico como características adicionais.

Palavras-chave: Adulteração; Leite cru;Infravermelho com transformada de Fourier; Bicarbonato de Sódio; Citrato de Sódio; Soro de queijo não ácido

Abstract

The aim of this study was to develop calibrations to determine the concentration of some milk adulterants using the automated methodology of Fourier Transform Infrared (FTIR). For construction of calibrations, samples were collected from 100 farms in the states of Sao Paulo and Minas Gerais. The samples were tainted with three different adulterants commonly used in the adulteration of raw milk being: sodium bicarbonate (SB), sodium citrate (SC) and cheese whey (W). Each adulterant was used at three different concentrations (SB: 0.05, 0.10 and 0.25%; SC: 0.025, 0.050 and 0.075% and W: 5, 10 and 20%). For validation, 60 samples were collected in other farms that were not considered at the development stage of calibration. The adulterants were added at the following concentrations: 0.03, 0.06, 0.10 and 0.12% for SB; 0.02, 0.04, 0.06 and 0.08% for SC and 5, 10 and 20% for W. The performance of each calibration was evaluated in terms of accuracy (Se), detection limit (DL) and determination coefficient (R^2). All calibrations presented R^2 higher than 0.91 with DL of 0.015%, 0.017% and 3.9% for SB, SC and W, respectively. Accuracy was 0.005%, 0.009% and 2.26% for SB, SC and W, respectively. Results show that the FTIR methodology can be used for determining the concentration of sodium bicarbonate, sodium citrate and whey in raw milk. Associated with automated equipment,

it is a viable option for monitoring these adulterants, having low operational costs and high analytical performance as additional features.

Keywords: Adulteration; Raw milk; Infrared Fourier Transform Spectroscopy, Sodium Bicarbonate, Sodium Citrate, Non-acid whey

3.1 Introdução

Um dos fatos mais importantes para o setor leiteiro nos últimos anos foi a aprovação da Instrução Normativa 51 (IN-51), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que determinou novas variáveis de avaliação da qualidade do leite cru. De acordo com a IN-51, análises de contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), composição centesimal (gordura, proteína, lactose) e resíduos de antibióticos (ATB) deverão ser realizadas mensalmente em um dos laboratórios oficiais da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) (BRASIL, 2002). Paralelamente algumas indústrias passaram a incentivar a melhoria da qualidade do leite de seus fornecedores através da adoção de programas de valorização da qualidade do leite (MACHADO; CASSOLI, 2008).

Publicações da RBQL apontam que o leite produzido no Brasil possui baixa qualidade microbiológica quando comparado ao leite produzido em outros países (ESTADOS UNIDOS, 2001; MACHADO; CASSOLI, 2008). Estima-se que 40% do produtores não atenderiam o limite máximo de 100 mil UFC/mL previsto para 2011 (CASSOLI; MACHADO, 2007[a]). Neste cenário de forte pressão econômica e baixa qualidade microbiológica do leite, a prática de adulteração do leite cru passa a ser um fator de risco para toda a cadeia de produção.

Já existem métodos capazes de identificar a maioria dos adulterantes. No entanto, possuem baixo rendimento analítico, requerem utilização de reagentes e alta dependência de mão-de-obra (HARDING, 1995; ASHURST; DENNIS, 1998). Tais características dificultam a implementação de programas de monitoramento em larga escala. Neste contexto, trabalhos demonstram o alto potencial de aplicação da metodologia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) no controle de qualidade e monitoramento da autenticidade do leite cru (GUNASEKARAN; IRUDAYRAJ, 2000; KAROUI; BAERDEMAEKER, 2007).O IVTF embarcado em equipamentos automatizados, já é utilizado para determinação dos componentes do leite (LEIFIER et al. 1996). Da mesma forma, outros compostos como tetraciclina, gordura

vegetal, uréia, melamina e glucose também podem ser identificados e suas concentrações determinadas (SIVAKESAVA et al., 2002; CHEN et al., 2006).

Portanto, objetivou-se desenvolver calibrações para determinação da concentração de alguns adulterantes em equipamento automatizado com IVTF. Desta maneira, novas análises poderiam ser realizadas pelos laboratórios da RBQL nas mesmas amostras já coletadas para análise de composição e CCS.

3.2 Material e Métodos

Para a construção de calibrações robustas em equipamentos de IVTF é necessária a seleção de amostras que apresentem variação em sua composição química e conseqüentemente variação espectral (SOYEURT et al., 2009). Fatores que interferem nesta variabilidade (localização geográfica, época do ano e raça) foram considerados no plano amostral. Foram coletadas 100 amostras provenientes de fazendas localizadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais. De cada fazenda, foi coletada amostra do leite do tanque em frascos de 1 L, adicionado do conservante bronopol. Antes da coleta, o leite do tanque foi homogeneizado por 5 minutos. As amostras foram mantidas sob refrigeração (< 6°C) e encaminhadas ao laboratório em 24 horas.

Foram selecionados três adulterantes: bicarbonato de sódio (BS), citrato de sódio (CS) e soro de queijo (SO), comumente utilizados na adulteração de leite cru (CERDÁN et al., 1992, VELOSO et al., 2002, OPERAÇÃO…, 2007). Para cada adulterante foram também utilizadas três diferentes concentrações: 0,05, 0,10 e 0,15% para BS, 0,025, 0,05 e 0,075 para CS e 5, 10 e 20% para SO.Para obtenção do soro, foi adicionado 10 mL de coalho líquido em 5 litros de leite cru colocado em banho-maria a 32°C por 60 minutos. Após este período a massa foi cortada, agitada e dessorada. O soro coletado foi aquecido até princípio de fervura para inativação da enzima do coalho.

A amostra de cada fazenda foi homogeneizada e subdividida em uma amostra de 50 mL sem adição de adulterante (tratamento controle), seis sub-amostras de 100 mL para adição do BS e CS e mais três sub-amostras com 60, 90 e 95 mL para adição do SO até completar os 100 mL originais. As amostras foram mantidas sob refrigeração e analisadas três dias após a adulteração para simular o tempo em que geralmente as amostras são analisadas pelos laboratórios da RBQL (CASSOLI et al., 2010).

As análises foram realizadas no equipamento MilkoScan FT+ 6000 (Foss Analytical), que adota a metodologia de IVTF e em duplicata. As leituras foram feitas na região do infravermelho médio, com comprimentos de onda entre 3 e 10 μm (1.000 – 5.000 cm^{-1}), sendo os espectros exportados e armazenados em arquivos eletrônicos (FOSS ANALYTICAL, 2008). Mensalmente foi realizada a equalização do equipamento conforme recomendação do fabricante. Com isso, garantiu-se a padronização da aquisição espectral ao longo do período experimental e a possibilidade de transferência de calibrações entre diferentes equipamentos submetidos ao mesmo processo de equalização (HANSEN, 1998).

Além da obtenção dos espectros, determinaram-se os teores de gordura, proteína, caseína, nitrogênio uréico, pH, ponto de congelamento e contagem de células somáticas para caracterização da composição do leite. As análises foram realizadas seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante (FOSS ANALYTICAL, 2008).

Conforme sugerido por alguns autores foram consideradas na construção das calibrações as regiões espectrais entre 963-1.580, 1.715-1812 e 2.698-2968 cm^{-1}. As regiões relacionadas com absorção das moléculas de água (1.584-1712 e acima de 2968 cm^{-1}) foram removidas bem como a região entre 1.815-2.694 cm^{-1} que não fornece informação significativa para a matriz leite (FOSSANALYTICAL, 2008; HANSEN, 1998; SOYEURT, 2009).

Após tratamento espectral, utilizou-se análise multivariada de quadrados mínimos parciais (QMP) através do software WinISI (WinISI, 2009) para desenvolvimento das calibrações. Para cada adulterante foi desenvolvida calibração para predição da concentração. Para verificar o desempenho de cada calibração foram calculados o coeficientede determinação entre valor predito e real (R^2), o erro padrão da estimativa (Se) e o limite de detecção (LD).

O impacto da adição dos adulterantes sobre as variáveis de composição do leite, pH e crioscopia foi verificado, através do teste de Dunnett ($p<0,05$), utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS, 2003) comparando-se tratamentos controle com os demais.

Para validação das calibrações, foram coletadas 60 amostras de outras fazendas não utilizadas na etapa de desenvolvimento da calibração. Os procedimentos de coleta foram os mesmos descritos anteriormente.

Os adulterantes foram adicionados nas seguintes concentrações: 0,03, 0,06, 0,10 e 0,12% para BS, 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08% para CS e 5, 10 e 20% para SO, seguindo também os mesmos procedimentos de preparo realizados na etapa de desenvolvimento da calibração. Da mesma

maneira, foram calculados os parâmetros estatísticos (R^2, Se e LD) para cada um dos adulterantes considerando somente as amostras de validação.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Amostras para desenvolvimento da calibração

O Brasil é um país de grande extensão territorial e diferenças climáticas. Fatores associados ao rebanho como raça, alimentação e manejo contribuem para a variação na qualidade do leite entre as diferentes fazendas. A variabilidade espectral das 100 amostras selecionadas é ilustrada na Figura 1. Além do espectro de todas as amostras, é exibido o desvio padrão em função do comprimento de onda, o que ressalta a variabilidade.

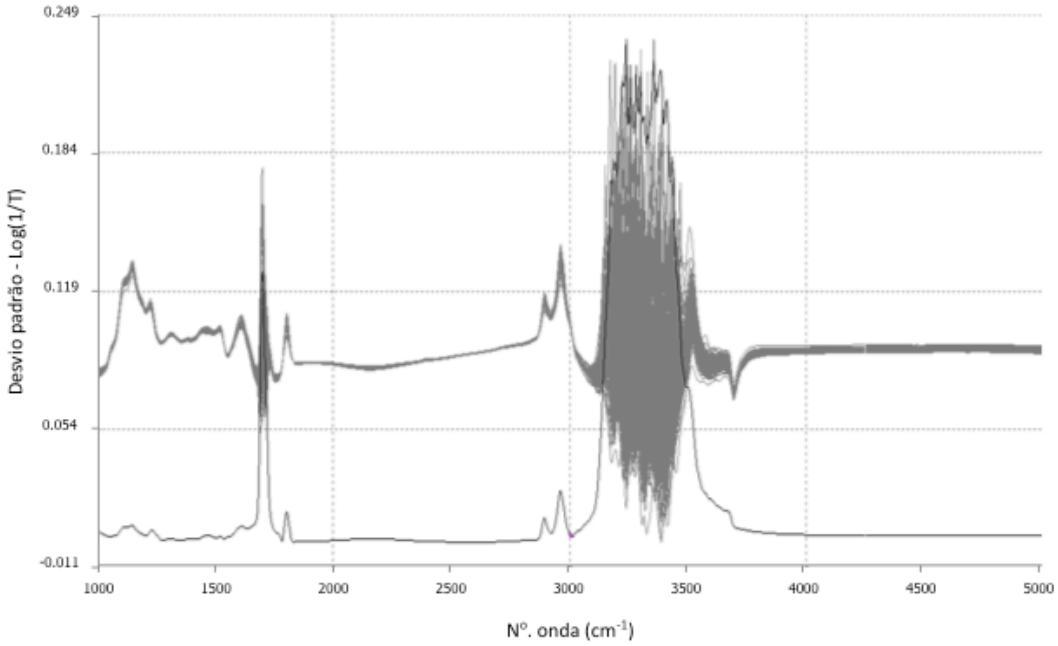


Figura 1 - Variabilidade espectral das 100 amostras (linhas cinza) e o desvio padrão nos diferentes comprimentos de onda (linha preta)

A variação espectral refletiu na variação nos resultados de composição, CCS, pH e crioscopia (Tabela 1), sendo esta variação semelhante ao reportado por outros levantamentos nas mesmas regiões. Machado e Cassoli (2008) observaram coeficientes de variação de 15, 5 e 108 % para gordura, proteína e CCS respectivamente em levantamento realizado com aproximadamente

25.000 fazendas nos anos de 2007 e 2008 (MACHADO; CASSOLI, 2008; MESQUITA et al., 2008; SOUZA et al., 2008). Tais características indicam que as amostrasselecionadas são representativas da região de estudo.

Os resultados analíticos para os componentes do leite, contagem de células somáticas, pH e ponto de congelamento dos diferentes tratamentos também são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição, ponto de congelamento, pH e contagem de células somáticas (CCS) das 100 amostras de leite nos diferentes tratamentos (Controle, BS, CS e SO)

Variável	**Controle Média**	**Controle CV (%)**	**Bicarbonato Sódio (%)**			**Citrato Sódio (%)**			**Soro (%)**		
			0,05	**0,10**	**0,15**	**0,025**	**0,05**	**0,075**	**5**	**10**	**20**
Gordura (% m/m)	3,67	10	3,65	3,65	3,64	3,65	3,66	3,65	3,52*	3,35*	3,01*
Proteína (% m/m)	3,26	5	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,13*	3,02*	2,78*
Caseína (%m/m)	2,48	14	2,48	2,47	2,47	2,49	2,49	2,49	2,38*	2,28*	2,07*
Sólidos (%m/m)	12,34	4	12,32	12,33	12,36	12,34	12,35	12,36	12,06*	11,80*	11,27*
Nitrogênio uréico (mg/dL)	13,6	27	11,4*	9,1*	2,2*	13,5	13,7	14,1	13,2	13,1	12,5
Ponto congelamento (ºH)	-0,539	1	-0,550*	-0,562*	-0,600*	-0,544	-0,549*	-0,554*	-0,541	-0,543	547*
pH	6,68	1	6,64*	6,56*	6,20*	6,68	6,69	6,69	6,68	6,67	6,67
pHr	6,69	1	6,79*	6,84*	6,95*	6,69	6,70	6,69	6,67	6,65	6,65
CCS (mil céls/mL)	723	72	708	694	683	720	713	705	715	702	676

Existe diferença entre o controle e o adulterante (Dunnett, $p<0,05$)

A adição do bicarbonato de sódio não influenciou os resultados de gordura, proteína, caseína e sólidos totais. Utilizado em fraudes para neutralizar a acidez do leite promove obrigatoriamente a elevação do pH (AUGUSTIN, 2000; MARTINS, 2008). Tal comportamento foi observado somente na análise pelo método referência (pHr) mas não nos resultados obtidos pelo IVTF. Observou-se também um decréscimo no teor de nitrogênio uréico com o aumento do

nível de adição, sendo que algumas amostras apresentaram resultados negativos para o componente. Tal fato sugere que o bicarbonato pode influenciar em regiões do espectro relacionadas às calibrações de nitrogênio uréico e pH do IVTF e com isso ocasionar alterações na predição e resultados não representativos. O ponto de congelamento se comportou de maneira esperada, onde se observa queda nos valores com o aumento no nível de adição (CERDÁN et al., 1992).

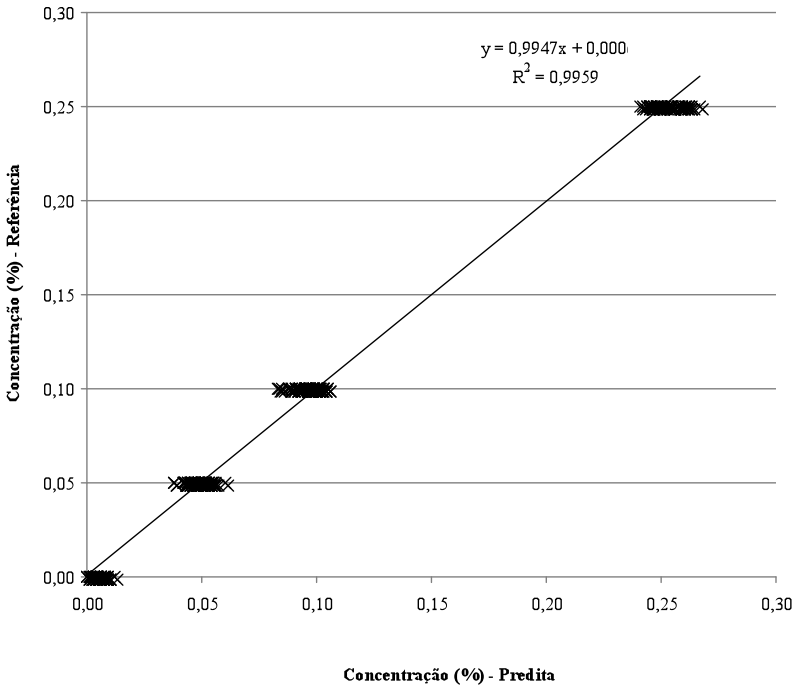
Por outro lado, nenhuma alteração na composição do leite e pH foi observada com a adição do citrato de sódio nas concentrações utilizadas, sendo observado somente a redução do ponto de congelamento. Tal comportamento foi reportado também por outros estudos que avaliaram o impacto da inclusão do citrato como agente estabilizante de caseína no processo industrial (McMAHON et al., 1991; UDABAGE et al., 1998; PASTORINO et al., 2003).

Já a adulteração com soro promoveu decréscimo na concentração de todos os componentes do leite que pode ser explicado pelo perfil centesimal desta matriz (TEIXEIRA;FONSECA, 2008). O soro utilizado neste estudo era um soro não ácido e, portanto, esperava-se a manutenção do pH.

3.3.2 Desempenho das calibrações

A correlação entre os valores esperados e preditos, para cada um dos adulterantes, é apresentada nas Figuras 2, 3 e 4, tanto para amostras utilizadas no desenvolvimento da calibração (a) quanto para amostras de validação (b).

a)



b)

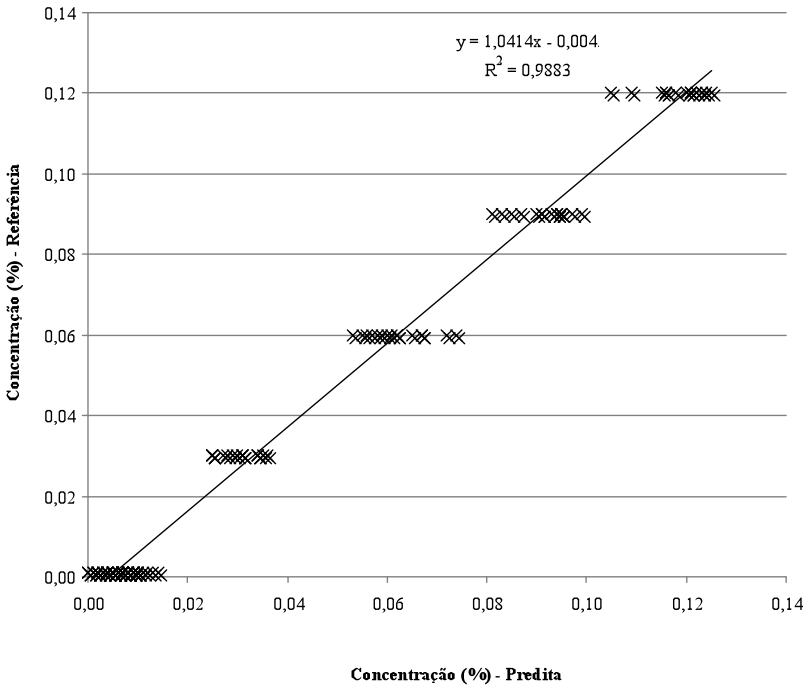
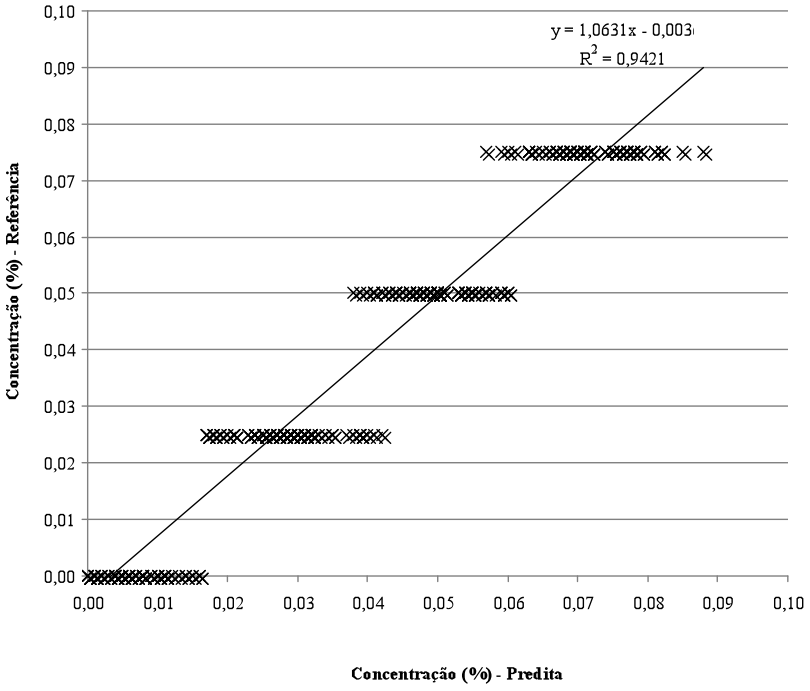


Figura 2 - Relação entre valores preditos e referência para bicarbonato de sódio (BS) em amostras utilizadas no desenvolvimento (a) e validação da calibração (b)

a)



b)

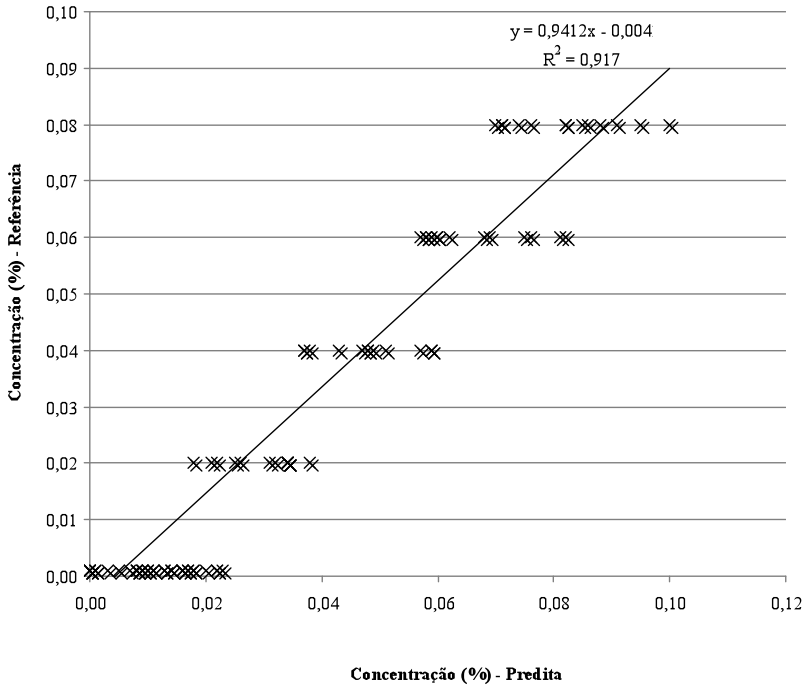
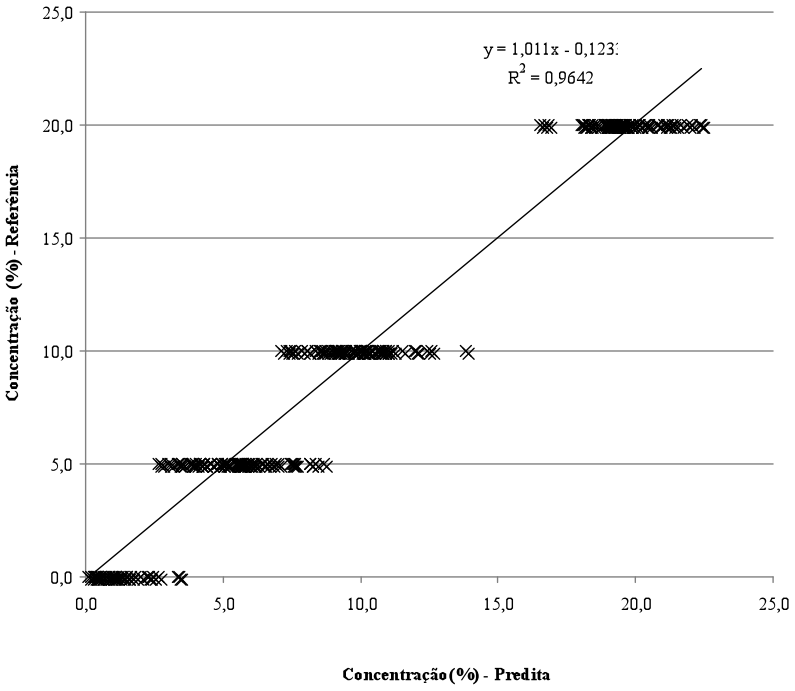


Figura 3 - Relação entre valores preditos e referência para citrato de sódio (CS) em amostras utilizadas no desenvolvimento (a) e validação da calibração (b)

a)



b)

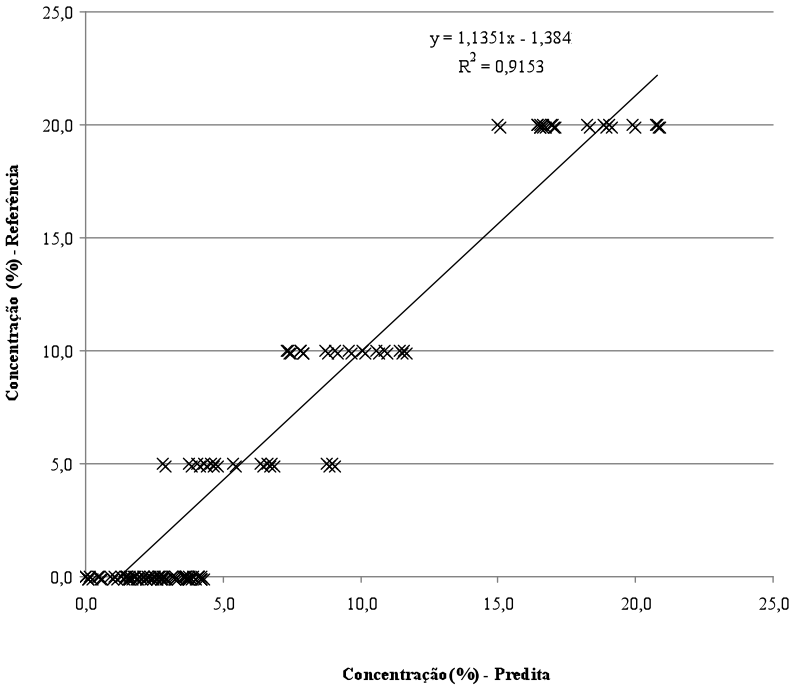


Figura 4 - Relação entre valores preditos e referência para soro (SO) em amostras utilizadas no desenvolvimento (a) e validação da calibração (b)

A calibração desenvolvida para BS foi a que apresentou melhor desempenho (Tabela 2), tanto na calibração inicial quanto na validação, com R^2 superior a 0,98. Para as amostras de validação, a acurácia medida pelo erro padrão da estimativa (Se) foi de 0,007 e o limite de detecção de 0,015%. Estudos mostram que o bicarbonato é adicionado em concentrações que variam entre 0,01 e 0,05%, sendo que o método do ácido rosólico, considerado método referência no Brasil (BRASIL, 2006), possui nível de detecção ao redor de 0,02%, segundo Paradkar et al. (2001). A acurácia (Se) de 0,007 também foi semelhante ao do método referência (SOMMERFELD, 1901). Para uma concentração alvo de 0,05%, o intervalo de predição individual seria entre 0,037 a 0,063%.

Tabela 2 - Desempenho das calibrações desenvolvidas para predição da concentração de bicarbonato de sódio (BS), citrato de sódio (CS) e soro (SO)

Adulterante	**Calibração**	**R^2**	**Se (%)**	**LD (%)**	**Equação linear**	
					Inclinação	**Intercept**
BS - % m/v	Inicial	0,99	0,007	0,012	1,063	-0,003
	Validação	0,98	0,005	0,015	1,041	-0,004
CS - % m/v	Inicial	0,94	0,005	0,009	0,994	0,000
	Validação	0,92	0,009	0,017	0,941	-0,004
SO - % v/v	Inicial	0,96	1,39	0,97	1,011	-0,123
	Validação	0,91	2,26	3,94	1,135	-1,384

R^2 – Coeficiente de determinação, Se – Erro padrão da estimativa, LD – Limite de detecção, % m/v (gramas adulterante em 100 mL de leite), % v/v (mililitros adulterante em 100 mL de leite).

Da mesma forma, a calibração para CS apresentou R^2 de 0,92 com limite de detecção de 0,017% e acurácia (Se) de 0,009. O MAPA validou recentemente (BRASIL, 2009) o equipamento CL 10 para análise quantitativa de citrato em leite, sendo que o LD estabelecido foi de 0,010%. Outros métodos desenvolvidos para determinação de citrato no leite reportam limite de detecção entre 0,01% e 0,025% (BABAD; SHTRIKMAN, 1951; MUTZELBURG, 1979). Apresentando acurácia inferior ao observado para o BS, para concentração alvo de 0,05%, o intervalo de predição individual seria de entre 0,027 a 0,073%.

O citrato é utilizado como estabilizante da caseína em diferentes processos industriais sendo permitido o seu uso com esta finalidade (McMAHON et al., 1991; PASTORINO et al., 2003). Na produção de leite UHT em alguns países, por exemplo, é prevista adição máxima de 0,02%. Por outro lado, não é permitida a sua utilização em leite cru, o que vem sendo reportado

na literatura. Neste caso, a adição do citrato promove a melhoria da estabilidade do leite cru além de corrigir o ponto de congelamento do leite após fraude com água ou soro (VELOSO et al., 2002). Não existem informações precisas das concentrações de citrato geralmente utilizadas para a adulteração do leite cru.

Já a calibração para SO apresentou R^2 de 0,91 com limite de detecção de 2,26% e acurácia (Se) de 3,9% na fase de validação, desempenho inferior ao observado para os demais adulterantes. Levantamentos reportam a adição de soro ao leite cru para aumento do volume de venda em concentrações que variam entre 5 e 10% (VELOSO et al., 2002). O método referência utilizado no Brasil para este tipo de adulterante é a determinação da concentração de GMP (glicomacropeptideo) por cromatografia, e que apresenta limites de detecção ao redor de 1 a 2% (BRASIL, 2006). Tal molécula é resultante da ação da enzima renina e é liberada no soro durante a fabricação do queijo. Portanto, existe alta correlação entre sua concentração e a presença de soro (FURLANETTI ; PRATA, 2003). Por outro lado, a ação de bactérias psicotróficas pode também influenciar na concentração de macropeptídeos e pseudo-macropeptídeos, ocasionando resultados falso-positivos (DATTA; DEETH, 2001), o que seria uma desvantagem do método. A calibração desenvolvida poderia prover resultados acurados, quando a adulteração ocorrer em concentrações acima de 10%. A análise conjunta dos demais componentes do leite, em especial ao teor de caseína, poderia prover informações adicionais para confirmação da presença do soro. Da mesma forma, sabe-se que a adulteração por adição de soro é feita geralmente com soro ácido, o que obriga necessariamente a utilização de neutralizantes, como o bicarbonato de sódio, e que poderiam ser detectados por calibrações específicas.

Outros estudos reportam o potencial do IVTF na identificação e quantificação de outros adulterantes em produtos lácteos. Chen et al. (2008), utilizando metodologia de infravermelho associada a análise de discriminante, desenvolveu calibração capaz de diferenciar leite adulterado com leite reconstituído já a partir da concentração de 0,55% do adulterante. Da mesma forma, Mauer et al. (2009) verificaram que a melamina pode ser identificada a partir da concentração de 1 ppm em fórmulas infantis através da metodologia de infravermelho. Já para a aplicação em leite cru, existem poucos estudos disponíveis. Sivakesava et al. (2002) estudaram a utilização do IVTF como um método rápido para identificação e quantificação de resíduos de tetraciclina. Os autores observaram correlação entre valor predito e o real entre 0,90 e 0,92 o que mostra o potencial da metodologia em quantificar compostos na concentração de ppb. Deve-se, no entanto, considerar

que somente moléculas que absorvam energia no intervalo de comprimento de onda avaliado podem ser identificadas.

3.4 Conclusão

Através dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a metodologia de IVTF pode ser utilizada para identificação e quantificação de bicarbonato de sódio, citrato de sódio e soro de queijo em leite cru. Associada à equipamentos automatizados, é uma opção viável no monitoramento destes adulterantes, tendo o baixo custo operacional e alto desempenho analítico como características adicionais.

Referências

ARUNVIPAS, P.; VANLEEUWEN, J.; DOHOO, I.; KEEFE, G. Evaluation of the reliability and repeatability of automated milk urea nitrogen testing. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, Canada, v.67, p. 60-63, 2003.

ASHRUST, P.R.; DENNIS, M.J. **Analytical methods of food authentication**. New York: Blackie Academic, 1998. 350 p.

AUGUSTIN, M.A. Mineral salts and their effect on milk functionality. Australian **Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 55, p. 61–64, 2000.

BABAD, J.; SHTRIKMAN, N.The estimation of citric acid in dairy products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 18, p. 72, 1951.

BRASIL. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Estabelece o regulamento fixar os requisitos mínimos que devem ser observados para a produção, a identidade e a qualidade do leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 13-22, set. 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos laboratórios nacionais agropecuários. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, 8 p., 14. dez. 2006.

BRASIL. Instrução Normativa n. 11, de 30 de abril de 2009. Métodos oficiais alternativos para análise da qualidade do leite e seus derivados, que utilizem o sistema de detecção por diferencial de pH e reação enzimática – CL 10 Plus. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, 12 p., 4. mai. 2009.

CASSOLI, L.D.; MACHADO. P,F. Impacto de programas de valorização da qualidade sobre a CBT. **Boletim do Leite**, Piracicaba, v.13, n.156, p. 4-5, 2007a.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Impacto da Instrução Normativa 51 (MAPA) na qualidade do leite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DE MASTITE, 4., 2007. Botucatu. **Anais...** Botucatu. 2007. p. 30-37 b.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.2, p.434-439, 2010.

CERDÁN, J.F.; PERIS-TORTAJADA, M.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. Automation of the determination of hydrogen peroxide, dichromate, formaldehyde and bicarbonate in milk by flow injection analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 344, n. 3, p. 123-127, 1992.

CHEN H-C.; HSIEH C-L.; LEE C-W.; CHEN J-J. Using visible/NIR spectroscopy to detect adulteration in raw milk with Canonical variate analysis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MACHINERY AND MECHATRONICS FOR AGRICULTUREAND BIOSYSTEMS ENGINEERING**,** 4., 2008. **Proceedings…**Taichung, Taiwan: **ISMAB** , 2008. p. 13-18.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Age gelation of UHT milk: a review. **Food and bioproducts processing**, Rugby, v. 79, p. 197-210, 2001.

ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **Grade "A" pasteurized milk ordinance**, Washington, 2001. 57 p.

FOSS ANALYTICAL. **MilkoScan 6000 FT+**: Operator's Manual. Dinamarca, 2008. 90 p.

FURLANETTI, A.; PRATA, L.F. Free and total GMP (glyco-macropeptide) contents of milk during bovine lactation. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.23, p. 121-125, 2003.

GUNASEKARAN, S. I.; IRUDAYARAJ, J. **Optical methods:** visible, NIR, and FTIR Spectroscopy. Cidade: Madison CRD Press, 2000. 423 p.

HANSEN, P. W. Urea determination in milk using Fourier TransformInfrared Spectroscopy and multivariate calibration. **Milk Science International**, v. 53, p. 251–255, 1998.

HARDING, F. Adulteration of milk. Composition quality In: HARDING, F.; CHAPMAN, H. (Ed.) **Milk quality**. . Wiltshire,, 1995, chap 5 p. 60-74; chap 6 p. 75-96.

HEUER, C.; LUINGE, H.; LUTZ, E.; SCHUKKEN, J. Determination of acetone in cow milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, Campaign, v.84, p. 575-582, 2001.

HEWAVITHARANA, A. K.; BRAKEL, B.V. Fourier transform infrared spectrometric method for rapid determination of casein in raw milk. **Analyst**, London ,v. 122, p. 701–704, 1997.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION.**Milk determination of freezing point**: thermistor cryoscope method (reference method). Bélgica, 2002 (FIL-IDF Standard, 108:)

KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, London, v.102, p. 621-640, 2007.

LEIFIER, D.; GRAPPIN, R.; POCHET, S. Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, p. 711-717, 1996.

LINKER, R.; ETZION, Y. Potential and limitation of mid-infrared attenuated total reflectance spectroscopy for real time analysis of raw milk in milking lines. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 76, n.1, p. 42-48, Feb. 2009.

MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D. Diagnóstico da qualidade do leite na região Sudeste entre 2005 e 2008. In: CONGRESSO. BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. v. 3, p. 187-189.

MARTINS; M.E.P.; NICOLAU, E.S.N.; MESQUITA, A.J de; NEVES, R.B.S.; ARRUDA, M.T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, Out./Dez. 2008.

MAUER, L.J.; CHERNYSHOVA, A.A.; HIATT, A.; DEERING, A.; DAVIS, R. Melamine detection in Infant Formula Powder Using Near- and Mid-Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 3974–3980, 2009.

McMAHON, D.J., SAVELLO, P.A.; BROWN, R.J.; KALA´B, M. Effects of phosphate and citrate on the gelation properties of casein micelles in renneted ultra-high temperature (UHT) sterilized concentrated milk. **Food Structure**, Chicago, v. 10, p. 27–36, 1991.

MENDENHALL, I.; BROWN, R. Fourier Transform Infrared of whey powder in nonfat determination dry milk. **Journal of Dairy Science**, Campaign, v.74, p. 2896-2900, 1991.

MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; BUENO, V.F. A qualidade do leite na região Centro Oeste e Norte do Brasil avaliada no laboratório de qualidade do leite, Goiânia – GO. In: COMGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE,3., 2008, Recife. **Anais...**Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v. 3. p. 11-21.

MILK adulteration checked, forty dealers fined from $25 to $100 each. **The New York Times**, New York, 7 Oct. 1882. Disponível em: <http://query.nytimes.com/gst/abstract.html?res= 9805E7DD1F3EE433A25754C0A9669D94639FD7CF> Acesso em: 22 maio. 2009.

MILK adulteration. **The New York Times**, New York, 13 Aug. 1890. Disponível em: < http://query.nytimes.com/gst/abstract.html?res=9C03E2D7133BE533A25750C1A96E9C94619ED7CF> Acesso em: 22 maio. 2009.

MUTZELBURG, I.D. An enzymatic method for the determination of citrate in milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 34, p. 82-84, 1979.

OPERAÇÃO da PF e Procuradoria prende 26 acusados de adulterar leite em MG. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 22 out. 2007. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ ult95u338769.shtml>. Acesso em: 22 maio. 2009.

PARADKAR, M.M.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. An approach to the detection of synthetic milk in dairy milk: 3. Detection of vegetable oil and sodium bicarbonate. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 54, n. 1, p. 34-35, Feb. 2001.

PASTORINO, A.J.; HANSEN, C.L.; McMAHON, D.J. Effect of salt on structure-function relationships of cheese. **Journal of Dairy Science**, Caimpagn, v. 86, p.60–69, 2003.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados:** métodos analíticos. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001; 234 p.

SANTOS, M.V. Como o sistema de pagamento afeta a qualidade do leite. **MilkPoint**, 2008. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/como-o-sistema-de-pagamento-afeta-a-qualidade-do-leite-parte-1_noticia_44337_61_180_.aspx>. Acesso em: 27 Jan. 2009.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide 9.3** Cary, 2003. 1 CD-ROM.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYRAJ, JRapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, Caimpagn, v.85, p. 487-493, 2002.

SOMMERFELD, P. **Methods for the examination of milk for chemists, physicians and hygienists.** Tradução de PETERS, A.T. ;HILTNER, A.M.R.S. Chicago:Alex and Eger, 1901. 96 p.

SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V. P.; LANGE, C.C. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Janeiro/ 2007 a Julho/ 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE,3.,2008. Recife. **Anais...**Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. v. 3. p. 187-189.

SOYEURT, H.; DARDENNE, P.; LOGNAY, G.; VESELKO, D.; MAYERES, P;GENGLER, N. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Caimpagn, v. 91, p. 3611-3626, 2006.

SOYEURT, H.; BRUWIER, J.; ROMNEE, N.; BERTOZZI, C.; DARDENNE, P. Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Caimpagn, v.92, n.6, p. 2444-2454, 2009.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozarela e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n.1, p. 243-250, 2008.

TUNICK, M.H. Dairy innovations over the past 100 years. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57 n. 18, p. 8093–8097, 2009.

UDABAGE, P.; AUGUSTIN, M. A.; McKINNON, I. R. Effects of mineral salts on renneted milk gels. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 53, p. 139, 1998.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

WinISI IV Software.**User's manual**. Intrasoft, Florida, USA. 2009. 254p.

XIN H.; STONE, R. Tainted milk scandal: Chinese probe unmasks high-tech adulteration with melamine. **Science**,Washington, v. 322, p. 1310-1311, 2008.