



POLLYANA AUGUSTO PINTO

**POTENCIAL DA ESPECTROMETRIA NO
INFRAVERMELHO MÉDIO PARA ANÁLISE DE LACTOSE
EM LEITE**

**LAVRAS – MG
2019**

POLLYANA AUGUSTO PINTO

**POTENCIAL DA ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA
ANÁLISE DE LACTOSE EM LEITE**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Engenharia de Alimentos, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes

**LAVRAS – MG
2019**

POLLYANA AUGUSTO PINTO

**POTENCIAL DA ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA
ANÁLISE DE LACTOSE EM LEITE**

**POTENTIAL SPECTROMETRY IN MEDIUM INFRARED FOR LACTOSE
ANALYSIS IN MILK**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Engenharia de Alimentos, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

APROVADA em 14 de junho de 2019.

Profa. Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães

Prof. PhD. Luiz Ronaldo de Abreu

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

*À minha mãe Toninha pelo apoio, carinho e dedicação em
todas as etapas e por ser meu maior exemplo de vida.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao departamento de Ciências dos Alimentos.

Ao professor Cleiton Nunes, pela orientação e disposição incondicional a ajudar e esclarecer.

À minha mãe e pai, Toninha Augusto e Donizeti Candido Pinto, pelo cuidado que sempre tiveram comigo, pelos braços abertos sempre prontos a me acolher, pelas palavras de incentivo e os puxões de orelha quando precisava.

À minha tia Maria de Lurdes Augusto, minha irmã Caroline Martins, minha prima Daniela Augusto, minha avó de coração Vania Maria, meu primo Cleuder Augusto, meu tio Cleuder Braga e meu avô Benício, por todo carinho e cuidado.

Ao meu namorado, Pedro Gabriel, pelas inúmeras vezes que seu amor foi refúgio e abrigo durante essa caminhada, não me deixando desistir.

Às minhas amigas e irmãs de coração, Rafaela, Mariana, Ligia, Barbara, Mariane, Fábria e Isabella, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e dando força em todos os momentos.

Às minhas professoras Alcinéia Ramos, Roberta Piccoli e Luísa Figueiredo, por serem exemplo de mulheres e por todo incentivo e ajuda que me deram durante minha graduação.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu e à técnica de laboratório Creuza Pedroso do Amaral Rezende, por toda disponibilidade e ajuda durante o desenvolvimento do projeto.

E por fim, não menos importante, à Deus, pelas bênçãos a mim concedida e pela força dada para enfrentar cada obstáculo. A Ele toda honra e toda Glória.

RESUMO

Tendo em vista que o setor de produtos lácteos reduzidos ou zero lactose vem crescendo consideravelmente e que a legislação para esses produtos está cada vez mais rígida, há necessidade de desenvolver métodos analíticos mais eficientes, capazes não só de identificar a lactose, mas também de quantificá-la, de forma rápida e precisa. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia baseada na utilização da espectrometria no infravermelho médio associada à métodos quimiométricos para detectar e prever o teor de lactose presente no leite. Na primeira parte foi demonstrada a possibilidade de discriminar as amostras de leite com lactose daquelas sem lactose usando os espectros de infravermelho médio e Análise de Componentes Principais (PCA). Na segunda parte, foram preparadas amostras a partir de misturas de leites com e sem lactose e analisadas no espectrômetro de infravermelho. As absorvâncias na faixa espectral de 935 a 1200 cm^{-1} , a qual concentra informações de grupos funcionais presentes nos carboidratos, foram usadas como descritores para avaliar as eficiências de modelos obtidos por regressão Por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), Regressão Linear Múltipla (MLR) e Regressão Por Mínimos Quadrados (MQ). Os três métodos se mostraram eficientes nessa determinação, sendo os menores erros obtidos por PLS. Na terceira parte, tais modelos foram utilizados para acompanhamento do teor de lactose durante um processo de hidrólise de lactose usando enzima lactase, sendo demonstrada a aplicabilidade e eficiência dos métodos no monitoramento desse processo. Assim, concluiu-se que a Espectrometria no Infravermelho Médio associada a métodos Quimiométricos se constitui um método rápido que dispensa preparo de amostra capaz de detectar e prever o teor de lactose em leite bovino.

Palavras chave: FTIR. Laticínio. Lactase. Hidrólise. Quimiometria.

ABSTRACT

Considering that the lactose free dairy sector has been growing considerably and that the legislation for these products is becoming more and more rigid, there is a need to develop more efficient analytical methods capable not only of identifying lactose but also of quantifying it, quickly and accurately. The present work aimed to develop methodology based on the use of infrared spectrometer associated with chemometric methods to detect and predict the lactose content present in milk. In the first it was demonstrated that the possibility of discriminating milk samples with lactose from those without lactose using the medium infrared spectra and Principal Component Analysis (PCA). In the second part, samples were prepared from milk mixtures with and without lactose and analyzed in the medium infrared spectrophotometer. The absorbances in the 935 to 1200 cm^{-1} spectral range, which concentrates information on functional groups present in the carbohydrates, were used as descriptors to evaluate the efficiencies of the models obtained by Regression by Partial Least Squares (PLS), Multiple Linear Regression (MLR) and Least Squares Regression (MQ). The three methods proved to be efficient in this determination, with the smallest errors being obtained by PLS. In the third part, these models were used to monitor the lactose content during a lactose hydrolysis process using enzyme lactase, demonstrating the applicability and efficiency of the methods in the monitoring of this process. Thus, it was concluded that the Medium Infrared Spectrometry associated with Chemometrics methods constitutes a rapid method that requires sample preparation capable of detecting and determining the lactose content in bovine milk.

Keywords: FTIR. Dairy. Lactase. Hydrolysis. Chemometrics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Leite	11
2.2	Lactose	12
2.3	Determinação de lactose no leite	14
2.4	Espectrometria no infravermelho.....	16
2.5	Quimiometria	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Materiais	21
3.2	Método	21
3.2.1	Etapa 1. Diferenciação do leite com e sem lactose por espectrometria no infravermelho médio.....	21
3.2.2	Etapa 2. Predição do teor de lactose no leite por espectrometria no infravermelho médio.....	21
3.2.3	Etapa 3. Predição do teor de lactose durante um processo de hidrólise com lactase por espectrometria no infravermelho médio	22
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	24
4.1	Etapa 1. Diferenciação do leite com e sem lactose por espectrometria no infravermelho médio.....	24
4.2	Etapa 2. Predição do teor de lactose no leite por espectrometria no infravermelho médio.....	26
4.3	Etapa 3. Predição do teor de lactose durante um processo de hidrólise com lactase por espectrometria no infravermelho médio	32
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

No Brasil o setor leiteiro exerce um importante papel na economia. Durante o ano de 2017 houve um aumento de 4 % na produção em comparação ao ano 2016, encerrando-se com uma produção de 35,233 bilhões de litros de leite (FAO, 2018). Com esse valor o Brasil destaca-se em sexto lugar na classificação mundial feita pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO).

Para Müller (2002) leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporcionando nutrientes e proteção imunológica para o recém-nascido. Além de suas propriedades nutricionais, o leite oferece elementos anticarcinogênicos, presentes na gordura, como ácido linoleico conjugado, esfingomiéline, ácido butírico, β caroteno, vitaminas A e D. Mesmo com tantos benefícios, a ingestão do leite por uma parcela da população acaba sendo afetada devido a algumas condições como intolerância a lactose ou alergia a proteína presente nesse alimento.

Atualmente existe cerca de 5,2 bilhões de pessoas no mundo com intolerância à lactose (EMBRAPA, 2018). Essa condição é caracterizada pela reação adversa ao carboidrato mais comum no leite, a lactose, e afeta pessoas de todas as faixas etárias. É causada pela deficiência da enzima β -galactosidase, responsável pela digestão do açúcar do leite. A lactose que não é hidrolisada em galactose e glicose é dirigida por inteira para o intestino grosso, atuando osmoticamente para atrair água. As bactérias ali presentes fermentam a lactose não digerida, gerando ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e gás hidrogênio, podendo resultar em inchaço, flatulência, cólicas e diarreia (BEYER, 2002).

Devido a esse grande número de pessoas com intolerância à lactose, as alternativas alimentares são importantes, pois para essas pessoas, normalmente, a única alternativa é a eliminação do leite da alimentação para evitar os sintomas (Dietrich *apud* FAEDO, 2013). Essa realidade leva a indústria de laticínios a apostar mais no segmento de produtos lácteos reduzidos ou zero lactose fazendo com que o mercado cresça de forma considerável. No ano de 2016 a produção desses produtos representou 2,5%, subindo para 3,3 % no ano de 2017, em volume total, esse nicho já envolve mais de 1 bilhão de litros de leite por ano (EMBRAPA, 2018).

A hidrólise enzimática, através da enzima β -galactosidase, é um dos métodos mais interessantes para redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados (MATIOLI *et al.*, 1994). É um processo importante para a indústria de alimentos, pois além de atender a demanda

dos consumidores, possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em suas composições. Esta operação oferece certas vantagens tecnológicas, na medida em que ela diminui os riscos de cristalização nos derivados lácteos e aumenta o poder adoçante (LONGO, 2006).

Para a certificação que a reação enzimática ocorreu corretamente é necessário o controle do grau da hidrólise, onde LONGO (2006) recomenda o uso da técnica de crioscopia. Essa técnica tem como princípio medir o ponto de congelamento do leite, pois está diretamente relacionado com a concentração dos constituintes solúveis na solução (TREVISAN, 2008).

A crioscopia é uma das características físicas mais constantes do leite e, portanto, utilizada também pelos laticínios para detecção de adulteração com água (BOTARO; SANTOS, 2008). Porém, apesar da ocorrência de tentativas de fraude por alguns produtores, o índice crioscópico pode apresentar variações em faixas fora dos padrões aceitáveis pela legislação sem que tenha ocorrido fraude por adição de água. Estas variações também podem ser causadas por fatores tais como raça, qualidade da dieta, manejo de bebedouro, estágio de lactação, composição do leite, estação do ano e região geográfica. (SANTOS; ARCARI, 2012). O índice crioscópico também pode ser alterado por alguns fatores durante o processamento, como o vapor de água injetado diretamente para fabricação de leite UAT (FAGNANI, 2014). Além disso, a adição dos estabilizantes de proteína, como o citrato de sódio, alteram o índice crioscópico (BELOTI; *et al.*, 2010).

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar e detectar a lactose em leite se destaca entre os métodos existentes por ser muito eficiente e preciso (ACQUARO JUNIOR *et al.*, 2013). Porém devido à alta complexidade na elaboração dos procedimentos de análises e o alto custo de equipamento e de análise, pode se tornar inviável em certos casos, principalmente em empresas e laboratórios de médio e pequeno porte (BURDICK, 2018).

Neste contexto, é de grande importância o desenvolvimento de outras metodologias efetivas para avaliar a lactose. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial da espectrometria no infravermelho médio e modelos quimiométricos para determinar níveis de lactose em leite.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leite

Pela legislação brasileira, leite é o produto proveniente da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Esse produto é obtido em circunstâncias naturais, sendo uma emulsão de cor branca, um pouco amarelada, de odor suave e sabor ligeiramente adocicado. Oriundo das glândulas mamárias, é um alimento indispensável aos mamíferos principalmente nos primeiros meses de vida (LONGO, 2006).

Na natureza o leite tem a função de nutrir e fornecer proteção imunológica para o mamífero na primeira fase de sua vida (ABREU, 2000). Desde o início da civilização, este alimento tem sido usado como fonte de proteína, gordura, energia e outros constituintes essenciais (TRONCO, 2008).

Devido ao seu alto valor nutritivo e energético, o leite é considerado um dos alimentos mais ricos e completos, com mais de 100.000 espécies moleculares já identificadas. No entanto os fatores genéticos, fisiológicos e ambientais podem influenciar diretamente na produção, composição e propriedades (CHALFUN, 2009). Para Tronco (2008) as proporções que constitui a composição do leite podem variar de forma significativa entre as espécies, assim como a estrutura química dos mesmos. Porém, comumente, a sua composição se dá, por 87,3% de água, 3,6% de gordura, 3,3% de proteínas, 4,9 % de lactose e 0,9 % de minerais e vitaminas.

A qualidade nutricional do leite é muito dependente da quantidade e da distribuição de seus constituintes sólidos. O leite possui em torno de 12,7% de substâncias sólidas como proteína, gordura, lactose e minerais (MADALENA, 2006). Os 87,3% restante equivale à água, tendo como função dissolver os demais componentes. Ela constitui, em volume, o principal componente do leite, influenciando diretamente na densidade (LONGO, 2006).

Os sólidos presentes no leite são o que o faz ser um produto nobre e com alto valor nutritivo. Representado pelas proteínas, lactose, gordura e sais minerais, a riqueza dos sólidos totais é diretamente responsável pelo rendimento industrial do leite (ABREU, 2004). Desta forma, por serem o maior interesse da indústria, em alguns países de primeiro mundo a precificação do leite é dada de acordo com a quantidade de sólidos totais (MADALENA, 2006). Já no Brasil apenas os grandes laticínios adotam esse tipo de precificação, enquanto que os

laticínios de médio e pequeno porte ainda utilizam a precificação por volume de leite.

Um componente de grande importância é a lactose, definida como o principal carboidrato do leite, sendo um dissacarídeo formado por glicose e galactose e quantitativamente o mais importante dos sólidos não graxos. Na indústria, exerce um papel de destaque devido à fermentação, por microrganismos, desse açúcar, transformando-o em ácido láctico, sendo utilizada para produção de vários derivados como iogurte, leite acidófilo, queijos, requeijões e outros (Goursaud, 1985; Albuquerque, 1997 apud LONGO, 2006).

Apesar de a composição ter grande influência na qualidade do leite, a caracterização das propriedades físico-químicas é muito necessária para assegurar e determinar qualidade. Desta forma, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2002), as principais análises para o controle de qualidade da matéria-prima são: teste do álcool/alizarol, contagem padrão em placas, contagem de células somáticas, redutase, resíduos de antibióticos, teor de sólidos totais e não-gordurosos, densidade relativa, acidez titulável, teor de gordura, temperatura, indicadores de fraudes e adulterações e índice crioscópico.

2.2 Lactose

A lactose é o carboidrato presente exclusivamente no leite, sendo este a única fonte de ingestão desse açúcar. Trata-se de um dissacarídeo, formado por dois monossacarídeos, uma molécula de glicose e uma de galactose, ligadas por uma ligação glicosídica β -1,4. Esse açúcar é sintetizado nas células alveolares da glândula mamária a partir de glicose sanguínea produzida essencialmente no fígado a partir do ácido propiônico proveniente da fermentação ruminal (Goursaud, 1985 apud LONGO, 2006).

Segundo Sousa (2015), na vaca, a lactose atua no controle do influxo de água e, por consequência, na osmolaridade do leite. Então a concentração de lactose é bastante constante, sendo o componente do leite que menos apresenta variação.

A lactose é um açúcar que possui um poder adoçante baixo, aproximadamente 1/6 da doçura da sacarose. É considerada pouco solúvel quando comparada com os outros tipos de açúcares altamente solúveis, apresentando, desta forma, menor tendência de irritação das mucosas do estômago (TRONCO, 2008). Outra característica atribuída a esse dissacarídeo é a propriedade redutora devido ao grupo no carbono anomérico da porção glicose que não está envolvido na ligação glicosídica, estando livre para reagir com agentes oxidantes (TREVISAN,

2008).

Devido a ligação glicosídica β -1,4, a absorção da lactose é lenta, o que por consequência causa efeito levemente laxante devido ao seu elevado massa molecular e a formação de lactato que reduz o nível de pH no intestino, fazendo aumentar a sua atividade peristáltica. Outro fator relevante atribuído pela absorção lenta é que a lactose é considerada uma fonte de energia persistente (TRONCO, 2008).

Os mamíferos só conseguem utilizar a molécula de lactose após a hidrólise da mesma (LONGO, 2006). Por isso, segundo Tronco (2008), ao ser ingerida através do leite, a lactose é hidrolisada no intestino delgado por ação da enzima β -galactosidase (lactase) existente nas células epiteliais da mucosa intestinal, fazendo com que a absorção intestinal seja possível.

Essa absorção é de grande importância, pois a utilização da lactose pela microflora intestinal resulta na produção de ácido lático e na diminuição do pH, promovendo o desenvolvimento da microflora intestinal lactofílica desejável, inibindo o desenvolvimento de bactérias putrefativas e patogênicas. Além disso, a lactose age como um promotor na absorção e na retenção de cálcio no intestino e na absorção de magnésio e manganês (Manan; Karin; Kit, 1999 apud LONGO, 2006). Também prolonga a ação da vitamina D, ajudando na prevenção do raquitismo e da osteomalácia (Kocián, 1988 apud LONGO, 2006).

A absorção da lactose pelos mamíferos é uma função natural do organismo, porém uma parcela da população possui a incapacidade de absorvê-la devido à deficiência da enzima β -galactosidase. Essa condição é chamada de intolerância à lactose. Ela pode ser classificada em três grupos, que representam o modo como se manifesta. A intolerância genética ou congênita, considerada muito rara, acontece em recém-nascidos, sendo resultante de herança autossômica recessiva e é uma condição permanente. Já a intolerância transitória ou primária caracteriza-se por diminuição de quantidade produzida de lactase, havendo manifestação dessa deficiência por volta dos 2 aos 15 anos de idade. E por fim a intolerância adquirida ou secundária que é decorrente de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal, ou após cirurgias no aparelho digestivo (MATTANNA, 2011).

A intolerância à lactose pode causar um conjunto de sintomas como dores abdominais, diarreia, flatulência, náuseas, vômitos. Quando sistêmicos, podem oferecer outros sintomas, conhecidos como secundários, que se caracterizam por dores de cabeça, dificuldade de concentração e redução de memória, dores musculares, arritmia cardíaca, úlceras bucais e

reações alérgicas, como rinites, eczemas, sinusite e asma (FAEDO, 2013). A severidade dos sintomas depende da quantidade ingerida e da quantidade de lactose que cada pessoa pode tolerar (Suenaga et al., 2001 apud MATTANA, 2011).

É importante ressaltar que os pacientes com intolerância a lactose não são alérgicos ao leite, visto que a alergia ao leite está relacionada à hipersensibilidade às proteínas e não ao dissacarídeo lactose. Portanto, encontradas alternativas lácteas toleráveis, tais pessoas não necessitam excluir o leite e seus derivados da dieta (ANTUNES; PACHECO, 2009).

Segundo Oliveira (2005) a população intolerante tende a aumentar. Desta forma, torna-se muito importante a redução do teor de lactose em leite e produtos lácteos. A enzima lactase e os produtos lácteos tratados com ela estão disponíveis para essas pessoas que não digerem a lactose e possuem desconforto com ingestão de leite (LEVRI et al, 2005).

2.3 Determinação de lactose no leite

Crioscopia é um método físico-químico, desenvolvido por Julius Hortvet em 1920, visando identificar fraudes por aguagem no leite (ARCARI; SANTOS, 2012). Consiste em um método qualitativo que permite fazer a medição do ponto de congelamento.

O ponto de congelamento do leite é a temperatura em que ele passa do estado líquido para o estado sólido (TRONCO, 2003). Devido às substâncias presente no leite, como lactose e sais minerais, a temperatura de congelamento é mais baixa que a da água (FACHINELLI, 2010).

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL,2002) para que o leite seja considerado normal o índice crioscópico máximo é de $-0,530^{\circ}\text{H}$ ($-0,512^{\circ}\text{C}$). O equipamento de crioscopia não fornece a temperatura de congelamento em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$) e sim em $^{\circ}\text{H}$. Dessa forma, para não haver a necessidade de fazer o cálculo de conversão é estabelecido como adequado para consumo a amostra de leite que tiver ponto de congelamento de $-0,530^{\circ}\text{H}$ (graus Horvet) a $-0,550^{\circ}\text{H}$, o que em graus Celsius é de $-0,512^{\circ}\text{C}$ a $-0,540^{\circ}\text{C}$.

O índice crioscópico pode ser medido através de crioscópios eletrônicos digitais. Estes são equipamento termistores, os quais consistem no super-resfriamento de até -3°C de uma amostra de leite, seguido de imediata cristalização desta amostra induzida por vibração mecânica (PZL, 2011). Esse processo produz uma elevação rápida da temperatura da amostra de leite, com consequente liberação de calor de fusão, até alcançar o ponto de congelamento da

amostra (TRONCO, 2008).

O ponto de congelamento de um líquido é baseado no número de moléculas em solução, não na massa das substâncias dispersas. Portanto, a hidrólise da lactose tem um efeito direto sobre esse parâmetro (BAER et al, 1980). Desta forma o método de crioscopia é também usado nos laticínios para a confirmação da hidrólise da lactose realizada para fabricação de produtos zero ou baixo teor de lactose.

Mesmo o índice crioscópico sendo considerado uma das características físicas mais constantes do leite, essa propriedade física pode apresentar variações fora dos padrões aceitáveis pela legislação que podem ser causadas por fatores como estagio de lactação, raça, qualidade da dieta, manejo de bebedouro, estação do ano, região geográfica e composição do leite (ARCARI; SANTOS, 2012).

A composição do leite é um fator que influencia diretamente no ponto de congelamento. Para Longo (2003) os componentes como lactose, alguns minerais, certas proteínas solúveis e os gases dissolvidos, são responsáveis pela diminuição do índice crioscópico. Porém a lactose e os cloretos são os que mais afetam o ponto de congelamento, assim como a adição de água ao leite, pois diluem as concentrações dos componentes que estão solúveis na água do leite.

Outra possibilidade é a quantificação e detecção da lactose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A alta sensibilidade da técnica permite a determinação da lactose no leite a baixíssimas concentrações (ACQUARO JUNIOR et al, 2013). No entanto, a CLAE geralmente resulta em soluções analíticas que precisam passar por procedimentos dispendiosos de preparo de amostra, levando a um aumento exponencial na complexidade e custo analítico. Embora geralmente possa se simplificar e acelerar processos para aumentar a eficiência, o custo de desenvolvimento de um método por CLAE pode se tornar inviável quando comparado com o desenvolvimento de outros ensaios (BURDICK, 2018).

Além das técnicas citadas acima para detecção da lactose em produtos lácteos, algumas empresas estão investindo no desenvolvimento de equipamento específicos para a detecção de lactose com métodos alternativos, como o Biomilk 300 desenvolvido pela Biolan, que se baseia na utilização da técnica de amperimetria para detecção, e o Foodlab Jr., desenvolvido pela CapLab, que utiliza a técnica de espectrofotometria para o teste quantitativo.

Outro método bastante utilizado para detecção de componentes presentes em alimentos

é a espectrometria no infravermelho médio, já sendo utilizada no setor lácteo na realização de análises de leite para precifica-lo de acordo com os componentes presentes. Como mencionado por Casadio et al (2010), esse método pode ser uma alternativa eficiente, precisa e rápida para a detecção da lactose.

2.4 Espectrometria no infravermelho

Espectrometria é estudo da interação de uma onda eletromagnética com matéria, tendo como objetivo principal a determinação dos níveis de energia e transição de espécies atômicas e moleculares. Podem ser definidas em função do comprimento de onda (ou números de onda - cm^{-1}) algumas regiões de interesse para fins analíticos (DUFOUR, 2009).

A região de interesse nesse trabalho é a de infravermelho. Essa faixa espectral é muito extensa, possuindo radiações com números de onda no intervalo de 12.800 a 10 cm^{-1} . Devido a isso, ela é dividida em três diferentes regiões: o infravermelho próximo que possui os números de onda no intervalo entre 12.800 a 4000 cm^{-1} , o infravermelho médio com números de onda entre 4000 a 200 cm^{-1} e o infravermelho distante entre 200 a 100 cm^{-1} (HOOLER et al., 2009).

A região do infravermelho próximo exhibe bandas de absorção relacionadas às vibrações das moléculas caracterizadas por harmônicos e bandas de combinação, sendo amplamente utilizada para análises de composição de produtos alimentares. Já a região do infravermelho médio é a principal região de espectrometria vibracional, apresentando informações sobre estrutura e conformação de moléculas orgânicas como proteínas, polissacarídeos e lipídeos (DUFOUR, 2009).

Segundo Paiva et al. (2010) quase todos os compostos que tenham ligações covalentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, absorvem várias frequências de radiação eletromagnéticas na região do infravermelho. Os espectros de duas moléculas diferentes jamais serão idênticos, podendo servir para elas como para seres humanos servem as impressões digitais.

As regiões de 650 a 900 cm^{-1} e de 1300 a 4000 cm^{-1} são as duas mais importantes para o exame preliminar dos espectros. Devido à ausência de bandas fortes na região de 650 a 900 cm^{-1} geralmente indica que não contem anéis aromáticos na estrutura em questão. De 900 a 1300 cm^{-1} é conhecida como região intermediária, nela a absorção é provavelmente diferente para diferentes espécies moleculares, por isso é conhecida também como região da “impressão digital” (SILVERSTEIN, 1994). Ela é bastante útil para identificar compostos, visto que

pequenas diferenças na estrutura e na constituição das moléculas resultam em mudanças significativas no perfil e na distribuição dos picos de absorção (PEREIRA, 2012). Já a região de 1300 a 4000 cm^{-1} ocorrem as absorções que correspondem a grupos funcionais importantes, como OH, C=O e NH (SILVERSTEIN, 1994).

A espectrometria no infravermelho médio possui potencial para uma ampla variedade de aplicações na indústria alimentícia, incluindo monitoramento de processos, determinação de qualidade e adulteração de cafés e de produtos lácteos, como leite, leite em pó, manteiga e queijo (VIANA, 2018).

Como as vibrações fundamentais no espectro no infravermelho médio estão associadas a diferentes grupos químicos, que se correlacionam diretamente com a gordura, proteína e lactose, esse método é de grande interesse para as indústrias. Por isso, atualmente, é um método certificado para precificação de leite no setor lácteos pela ISO 9622: 1999, AOAC (Associação de Químicos Analíticos Oficiais) e FIL (Federação Internacional de Laticínios) (CASADIO *et al.* 2010).

Atualmente, nota-se uma crescente aplicação das metodologias espectrométricas juntamente às ferramentas estatísticas no controle de qualidade de alimentos, principalmente nos produtos lácteos, como alternativa de substituição das técnicas convencionais. Segundo Sauer – Leal *et al.* (2008) a utilização da espectrometria no infravermelho próximo e médio, aliadas à calibração multivariada, para determinação dos teores de gordura, proteína, umidade, extrato seco, cinzas e pH em amostras de queijo prato, apresentou resultados satisfatório, com exatidão e precisão.

Outra proposta de utilização da técnica veio de Oliveira (2011), que avaliou o teor de ureia em leite cru, onde também se obteve um bom resultado, no qual concluiu que o método é confiável, além de ser rápido, baixo custo, eficiente e versátil para tal finalidade. No entanto, mesmo sendo uma técnica bastante utilizado no setor lácteo, são poucas as aplicações e publicações voltadas para identificação da hidrólise da lactose, principalmente de forma a avaliar e quantificar em comparação aos métodos tradicionais, como um método alternativo.

Na quase totalidade dos casos, a aplicação da espectrometria no infravermelho na análise de leite é viabilizada por meio de métodos multivariados de análise de dados, principalmente aqueles tratados dentro da Quimiometria como métodos de reconhecimento de padrões e de calibração multivariada.

2.5 Quimiometria

Quimiometria é a área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada (VIANA, 2018). Refere-se à aplicação de métodos matemáticos e estatísticos às ciências químicas de modo a obter um delineamento ótimo dos procedimentos experimentais, assim como, obter informações sobre o sistema através de dados físicos e químicos obtidos (NASCIMENTO, 2011).

Para Viana (2018), a utilização da quimiometria é de grande importância, pois o número das variáveis que podem ser medidas em uma única amostra, exige a necessidade de ferramentas mais sofisticadas para trata-los e extrair informações relevantes.

O uso de técnicas espectrométricas no infravermelho possibilitou manipular dados de absorvância espectral associadas a mais de uma frequência ao mesmo tempo. Conhecido como métodos de análise multivariada, estes tornaram possível modelar propriedade químicas e físicas de sistemas simples e complexos a partir de seus dados espectrométricos (KILLNER et al., 2011). Além disso, informações de grande relevância de dados espectrais relacionadas à estrutura molecular de carboidratos, proteínas e gorduras em produtos alimentares são possibilitadas pela aplicação da quimiometria (DUFOUR, 2009).

Os métodos como a Análise de Componentes Principais e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais são agora amplamente utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos para a previsão de composição e qualidade de alimentos em geral (DUFOUR, 2009).

Dentre diversos métodos para realizar análises estatísticas multivariadas, está a análise por componentes principais (PCA). Essa técnica quimiométrica visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados originais multivariados (matriz X), mantendo a maior quantidade de informação estatística (variância) possível. Os gráficos obtidos representam as amostras num sistema cartesiano, possibilitando a interpretação multivariada de conjuntos de dados elevados e complexos por meio de gráficos bidimensionais e tridimensionais (WIBERG, 2004).

Esta técnica é principalmente utilizada pela sua capacidade de compressão dos dados em função de existência de correlação entre diversas variáveis medidas (VIANA, 2018). Sendo um tipo de análise exploratória de dados que visa extrair o máximo de informações de uma tabela com muitas variáveis, a partir da combinação linear das variáveis originais. Desta forma, afirma-se que a PCA tenta agrupar aquelas variáveis que estão altamente correlacionados

(SIMAS, 2005).

A aplicação da PCA a um conjunto de variáveis, como espectros no infravermelho, submete o conjunto original a um novo conjunto de variáveis denominado de componentes principais (CPs). Com isso, cada componente principal, tem sua contribuição expressada em porcentagem e sua importância avaliada segundo essa contribuição, ou seja, a parcela de variância total explicada pelo componente (SANTOS et al., 2012). O novo conjunto normalmente concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, como vantagem diminui assim a dimensionalidade de dados, sem perda considerável da informação original (SABIN; FERRAO, 2004).

Desta forma, Nascimento (2011) afirma que a análise dos componentes principais é bastante utilizada na seleção de amostras para a construção de modelos de calibração, como na identificação de grupos de amostras com características semelhantes, assim como na verificação de qual dos parâmetros analisados (variáveis) são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras.

A calibração multivariada tem como propósito estabelecer uma relação matemática quantitativa entre os dados de saída de um instrumento e o parâmetro físico ou químico de interesse previamente determinado por uma técnica analítica independente (FERREIRA et al., 1999). Portanto esse processo baseado em dados espectrais consiste em construir um modelo matemático que relacione as medidas de absorvância, ao longo dos espectros, com parâmetros de interesse como concentração de analitos, índice de refração, acidez, viscosidade e etc., nas amostras (BURNS; CYURCZAK, 2008).

Métodos clássicos de análise univariada, associam apenas a absorvância de uma frequência à concentração. A precisão desses métodos univariados é dependente da capacidade de identificar uma única banda isolada para cada componente. Já os métodos que usam simultaneamente duas ou mais frequências são conhecidos como métodos multivariados, estes podem ser utilizados igualmente quando estão sobrepostas informações espectrais de vários componentes através de várias regiões espectrais selecionadas (HELFER et al., 2006).

A utilização da calibração multivariada possui muitas vantagens quando comparada com a calibração univariada, como a possibilidade de determinações simultâneas de mais de um analito, o método é mais robusto a pequenas mudanças nos parâmetros experimentais ou instrumentais, tais como temperatura e pH, permite contornar problemas associadas à

interferência espectral, principalmente quando a informação analítica disponível não apresenta elevada seletividade e facilita a localização e avaliação de amostras anormais (WIBERG, 2004).

Entre os métodos de calibração, podem ser citadas a regressão linear múltipla (MLR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (ROCHA, 2009).

A regressão linear múltipla (MLR) é uma técnica estatística para investigar e modelar a relação entre variáveis, sendo uma das mais utilizadas na análise de dados. Um dos objetivos da análise de regressão é estimar parâmetros desconhecidos do modelo (COELHO-BARROS et al., 2008). Esse método tem grande aplicabilidade devido à sua simplicidade e facilidade de interpretação dos resultados. No entanto, é limitado no sentido de que o número de variáveis deve ser menor ou igual ao número de pontos de calibração, para que a equação da regressão tenha uma única solução (FERRERIRA; MONTANARY; GAUDIO, 2012). Outra limitação da MLR é a colinearidade: variáveis altamente correlacionadas podem tornar os coeficientes de regressão instáveis e sem significado. Portanto, é adequado que as variáveis tenham baixos valores de correlação entre si ($<0,7$) (MARTINS; FERREIRA, 2013). Contudo, a utilização de procedimentos de seleção de variáveis pode reduzir a dimensionalidade das matrizes de dados e resolver o problema de colinearidade.

A regressão por PLS é baseada em uma análise de fatores, que busca estipular um vínculo entre a matriz de dados de uma dada resposta instrumental, como os espectros (matriz X), como dados de uma informação de interesse, como a concentração de um determinado analito (matriz Y) (PEREIRA, 2012). Além da matriz de dados independentes X ser projetada num novo sistema de coordenadas, também a matriz dependente Y é decomposta da mesma maneira, simultaneamente. Por isso, a PLS utiliza as respostas analíticas, assim como as informações de interesse, para capturar a variância dos dados da matriz X e da matriz dependente Y, através de suas decomposições sucessivas e simultâneas, correlacionando-as (BRERETON, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Inicialmente foram utilizados leites UHT (UAT) com e sem lactose da mesma marca e com datas de fabricação próximas, buscando uma maior semelhança nas características físico-químicas do leite. E em seguida, para o acompanhamento da hidrólise da lactose descrito na etapa 3, usou-se leite cru com lactose previamente pasteurizado, com pH 6,73 e acidez 23° Dornic.

Para reação enzimática de hidrólise da lactose foi empregada enzima lactase de origem microbiana (Prozyn), conforme descrito na RDC nº 53/2014 sobre utilização de enzimas na indústria de alimentos (ANVISA, 2014).

As análises espectrométricas foram realizadas em um no espectrofotômetro Varian – 660 IR (Pike), acoplados ATR com 16 scans e resolução 4 cm⁻¹, na faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹.

3.2 Métodos

3.2.1 Etapa 1. Diferenciação do leite com e sem lactose por espectrometria no infravermelho médio

Foram usadas dez amostras de leite com lactose e dez de leite sem lactose, em temperatura ambiente. De cada uma delas, retirou-se uma alíquota de aproximadamente 0,5 ml utilizando pipeta descartável e foram colocadas individualmente no leitor do espectrofotômetro, realizando as obtenções dos espectros em triplicada.

Visando discriminar as amostras de leite com lactose daquelas sem lactose usando os espectros de infravermelho, as absorbâncias de todo o espectro foram usadas como descritores em uma Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando o software Chemoface (NUNES et al., 2012). Antes da análise, os espectros foram pré-tratados por correção multiplicativa de sinais e em seguida centrados na média.

3.2.2 Etapa 2. Predição do teor de lactose no leite por espectrometria no infravermelho médio

Foram preparadas amostras de calibração a partir da mistura de leite com lactose e sem

lactose nas proporções de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 % de leite com lactose. O teor de lactose no leite com lactose usando no preparo dessas misturas foi analisado no equipamento Laktan (modelo 230), sendo encontrado um teor de 4,5%. Assim, tais diluições resultaram nos teores de 0, 0,45, 0,9, 1,35, 1,8, 2,25, 2,7, 3,15, 3,6, 4,05 e 4,5 % de lactose nas amostras de calibração.

Uma alíquota de aproximadamente 0,5 ml foi retirada de cada amostra utilizando pipeta descartável e analisada individualmente no espectrofotômetro, realizando as leituras dos espectros em triplicada.

As absorvâncias dos espectros de infravermelho foram usadas como descritores em modelos de calibração visando à estimativa do teor de lactose. Foram avaliadas as eficiências de modelos obtidos por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), regressão linear múltipla (MLR) e regressão por mínimos quadrados (MQ). Foi utilizada a faixa espectral de 935 a 1200 cm^{-1} , a qual concentra informações de grupos funcionais presentes nos carboidratos. Além disso, foram construídos modelos considerando a absorvância em bandas específicas associadas a tais grupos funcionais. Foram testados pré-tratamentos baseados em correção multiplicativa de sinais e primeira e segunda derivada. Para avaliar o desempenho da calibração foram analisados os valores obtidos do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) e do coeficiente de correlação ao quadrado (r^2). Tais parâmetros também foram usados na etapa de validação do modelo empregando um grupo teste constituído de 1/3 das observações. Já a robustez do modelo foi atestada a partir dos valores obtidos do teste de randomização de y ($\text{RMSEC}_{\text{rand}}$ e r^2_{rand}), o qual baseia-se em etapas de calibração onde a matriz do descritor original x é fixada e somente o vetor y é randomizado. Para garantir uma ampla representatividade o valor do teste de randomização de y, uma média de 10 repetições do processo é considerada. Para melhor validar o modelo, também foram usados outros parâmetros estatísticos, como o R^2_m , que fornece uma visão sobre a inclinação da curva entre os valores experimentais e previstos, considerado aceitável quando for maior ou igual a 0,5; e $C_r^2_p$, que quando maior ou igual a 0.5 garante uma diferença válida entre r^2 e r^2_{rand} (NUNES; FREITAS, 2013). Todos os cálculos foram realizados no programa Chemoface (NUNES et al., 2012).

3.2.3 Etapa 3. Predição do teor de lactose durante um processo de hidrólise com lactase por espectrometria no infravermelho médio

Inicialmente diluiu-se na proporção 1:100 a solução concentrada de enzima lactase em

água destilada, visando obter a concentração correta para quantidade de leite utilizada. Posteriormente foi retirado uma alíquota de 4 ml da solução preparada de lactase, com pipeta automática e dispôs em 900 ml de leite que já estava previamente aquecido no banho maria na temperatura adequada de 34°C – 35°C. A partir disso, foi feito o acompanhamento da reação enzimática retirando, a cada 15 minutos, amostras de 2 ml de leite e realizando análises no espectrofotômetro de infravermelho médio em triplica. O acompanhamento foi feito por 2 horas, tempo indicado para que ocorra a hidrólise da lactose nessas condições.

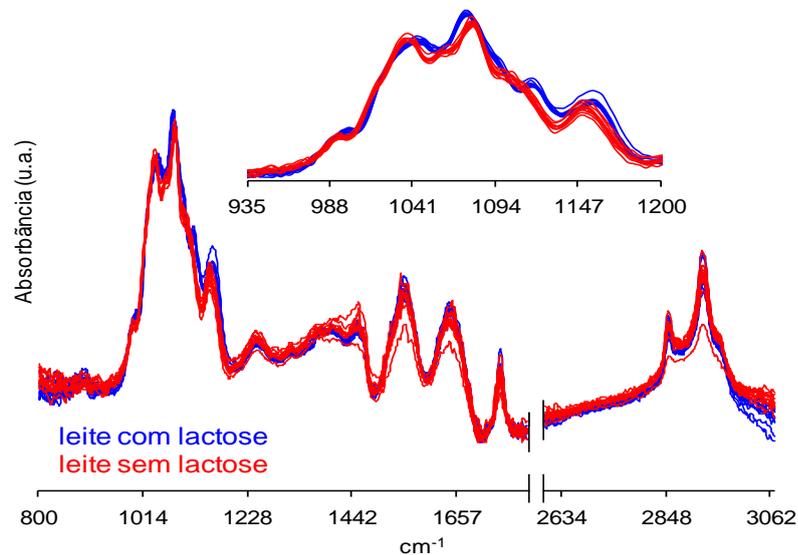
Ao final das análises, os espectros obtidos em cada tempo foram usados como descritores na predição do teor de lactose usando os melhores modelos de calibração obtidos por PLS, MLR e MQ. Todos os cálculos foram realizados no programa Chemoface (NUNES et al., 2012).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Etapa 1. Diferenciação do leite com e sem lactose por espectrometria no infravermelho médio

Os espectros das amostras de leite com e sem lactose apresentaram um comportamento espectral bastante similar sendo possível notar que na faixa de 935 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} houve uma modificação em algumas bandas, o que pode ser associado às diferenças na estrutura dos carboidratos nos leites com e sem lactose, sobretudo a ausência da ligação glicosídica entre a glicose e a galactose (Gráfico 1).

Gráfico 1- Espectros obtidos no infravermelho médio para leite com lactose e leite sem lactose.



Fonte: Do autor (2019)

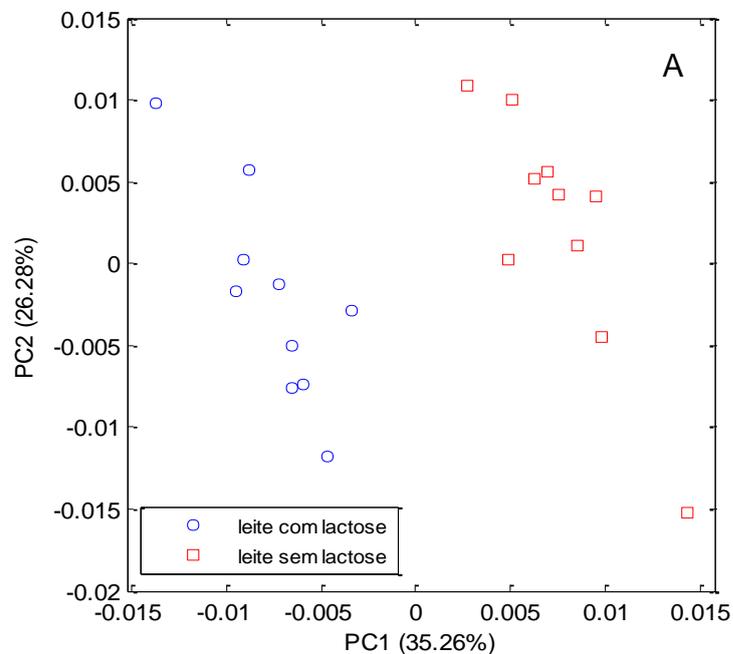
Os três componentes majoritários do leite, além da água, são os carboidratos, os lipídios e as proteínas, cujos grupos funcionais típicos podem ser atribuídos a bandas espectrais na região do infravermelho médio. Os carboidratos absorvem principalmente por volta de 1045 cm^{-1} a 1250 cm^{-1} (estiramento C – O, C – C e C – H). As cadeias de gordura absorvem em torno de 1390 cm^{-1} a 1454 cm^{-1} (deformação angular de –CH₃ e –CH₂), de 1743 cm^{-1} (estiramento de C = O do éster C = O) e em torno de 2862 cm^{-1} a 2927 cm^{-1} (estiramento de –CH₃ e –CH₂). Já as proteínas absorvem tipicamente por volta de 1544 cm^{-1} a 1654 cm^{-1} (estiramento de C – N e N – N) (GRELET et al., 2015).

Para avaliar a possibilidade de discriminar leite com lactose do leite sem lactose, foi

realizada análise de componentes principais utilizando as absorbâncias de toda a faixa espectral de modo a observar os agrupamentos possíveis de acordo com a similaridade.

A PCA revelou que duas componentes principais explicaram juntas 61,54% da variância dos dados, onde 35,26% foram explicados pela primeira componente principal (CP1) e 26,28% pela segunda (CP2). Essa baixa variância explicada por esses dois componentes pode ser devido à semelhança entre os espectros, mesmo havendo diferença na composição dos carboidratos presente no leite. Ainda assim, foi possível discriminar as amostras de leite com e sem lactose (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Escores da análise de componentes principais dos espectros no infravermelho médio de leites com e sem lactose



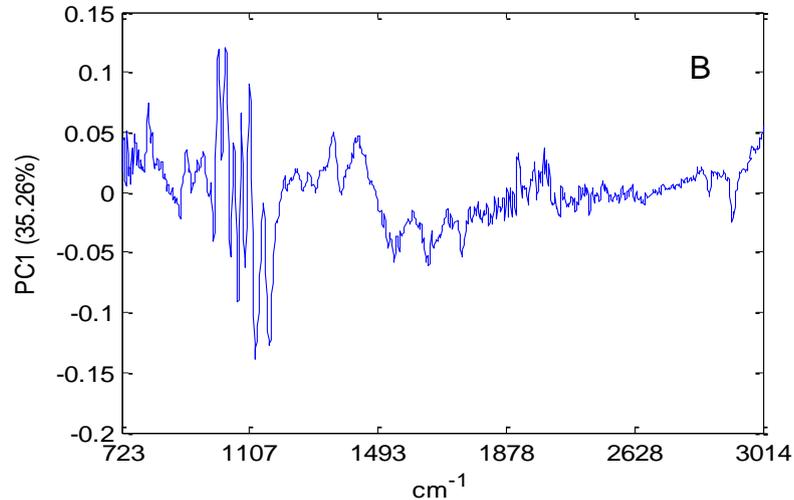
Fonte: Do autor (2019)

De acordo com os escores apresentados no Gráfico 2, ocorreu uma perfeita separação entre as amostras de leite com e sem lactose, sobretudo ao longo da primeira componente principal (à esquerda e à direita do gráfico).

A componente principal 1 foi a que mais contribuiu para a diferenciação das amostras. Portanto, foi feita uma avaliação da contribuição de cada faixa espectral nessa diferenciação com base na primeira componente principal (Gráfico 3), sendo verificado que as bandas entre 900 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} foram as que apresentaram maiores pesos. Como reportado anteriormente, essa região do espectro concentra absorções típicas de grupos funcionais presentes nos carboidratos, evidenciando então que mesmo havendo grande similaridade espectral, essa

região em contribuição fundamental na diferenciação do leite com e sem lactose.

Gráfico 3 – Pesos da análise de componentes principais dos espectros no infravermelho médio de leites com e sem lactose.



Fonte: Do autor (2019)

4.2 Etapa 2. Predição do teor de lactose no leite por espectrometria no infravermelho médio

Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é um dos métodos de calibração multivariada mais utilizados e de fácil aplicação. Apesar disso, uma certa atenção é necessária ao aplicar tal método, por exemplo, a escolha do número de variáveis latentes (VL) é uma etapa fundamental, uma vez que a escolha equivocada pode levar a erros de sobre ou subajuste. A escolha do número de variáveis latentes é baseada na produção do menor erro de previsão sem perda significativa da variância dos dados, ou seja, o menor número de variável latente reduz o erro médio quadrático para validação cruzada de forma eficaz (PIANTAVINI, 2014). Na Tabela 2 encontram-se os resultados estatísticos do modelo PLS aplicando no espectro de FTIR completo e na região de 935 – 1200 cm^{-1} sem transformação, assim como em suas respectivas transformações por correção multiplicativa de sinais, 1ª derivada e 2ª derivada.

Os coeficientes de determinação da calibração (R^2 cal) foram satisfatórios ($R^2 > 0.9$) para o espectro completo com e sem transformação. Pelo baixo valor de cR^2p pôde-se inferir que não houve diferença estatística ($cR^2p < 0.5$) na correlação entre o R^2 cal e o R^2 y-rand. Além disso, os baixos valores de coeficiente de determinação de validação cruzada (R^2cv), da predição (R^2 pred) e o parâmetro $R^2m < 0.5$ indicam que a utilização do espectro completo de FTIR não é o mais adequado para o objetivo desejado, tendo em vista que os dados preditos não são significativamente congruentes com os dados experimentais.

A região entre 935 – 1200 cm^{-1} utilizada no espectro de FTIR para predição do teor de lactose, por outro lado, tornou-se viável, visto que a cR^2p foi superior a 0.5 usando o espectro original e suas transformações. A diferença estatística observada entre a calibração e à randomização de y analisada juntamente com os altos valores da validação cruzada (R^2cv), de predição (R^2pred) e de R^2m superiores a 0.90, permite indicar uma boa correlação entre os valores preditos e experimentais. Partindo desses pressupostos, a aplicação da correção multiplicativa de sinais (MSC) demonstrou ser a mais indicada para quantificar lactose em diferentes concentrações de leite dentre as transformações possíveis (original, MSC, 1ª derivada e 2ª derivada) devido aos baixos erros de RMSEcv e RMSEp apresentados combinados aos altos valores de R^2pred e R^2m .

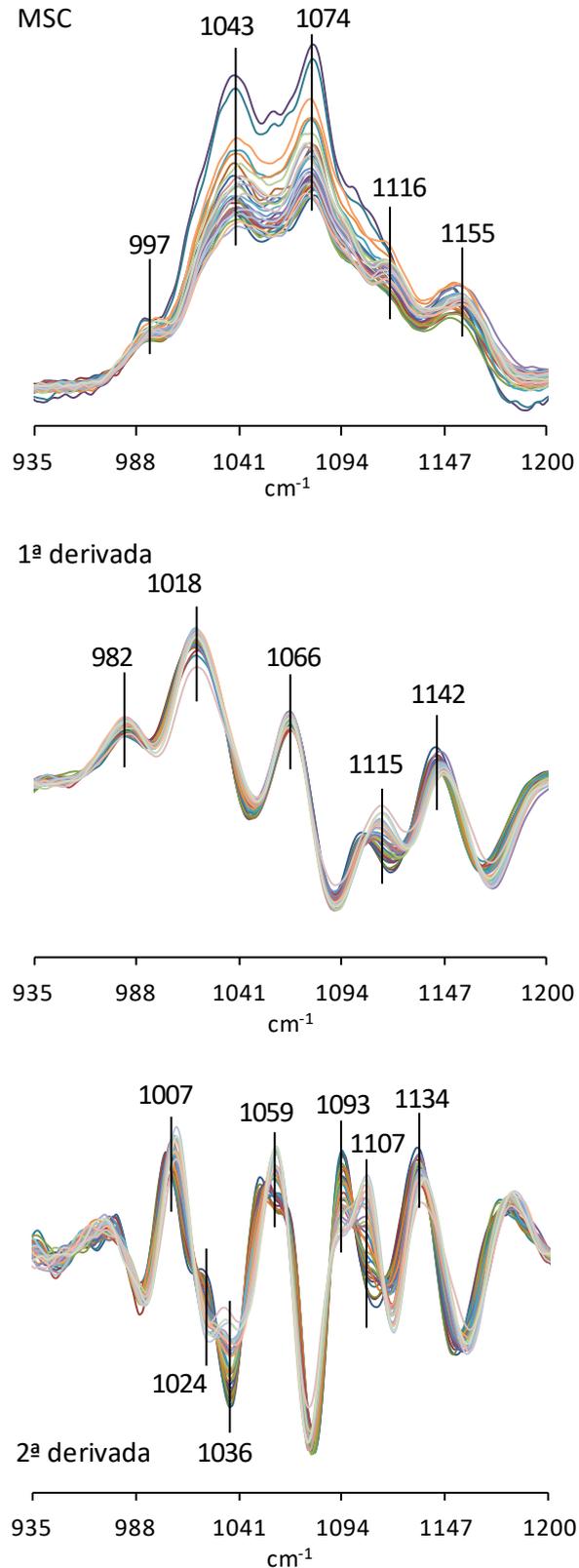
Tabela 2- Desempenho dos modelos PLS na predição do teor de lactose usando todo o espectro (400 - 4400 cm^{-1}) e a região entre 935 e 1200 cm^{-1} com diferentes transformações de dados.

	400 - 4400 cm^{-1}				935-1200 cm^{-1}			
	Original	MSC	1ª deriv	2ª deriv	Original	MSC	1ª deriv	2ª deriv
VL	5	9	6	4	4	2	2	1
RMSEc	0.28	0.04	0.16	0.21	0.07	0.09	0.10	0.14
R^2 cal	0.96	1.00	0.99	0.98	1.00	1.00	0.99	0.99
RMSE y-rand	0.34	0.03	0.23	0.34	0.93	1.23	1.23	1.34
R^2 y-rand	0.94	1.00	0.97	0.94	0.56	0.25	0.25	0.12
cR^2p	0.14	0.01	0.12	0.19	0.66	0.86	0.86	0.93
RMSEcv	1.37	1.25	1.27	1.22	0.11	0.11	0.15	0.16
R^2cv	0.16	0.25	0.22	0.28	0.99	0.99	0.99	0.99
RMSEp	1.11	1.12	1.18	1.14	0.11	0.08	0.11	0.14
R^2pred	0.55	0.53	0.42	0.36	1.00	1.00	1.00	0.99
R^2m	0.29	0.27	0.24	0.00	0.99	0.99	0.98	0.99

Fonte: Do autor (2019)

Como visto a partir do modelo por mínimos quadrados parciais (PLS), a utilização da região 935-1200 cm^{-1} na predição do teor de lactose tornou-se viável em relação ao espectro de FTIR completo. Então, na tentativa de simplificar ainda os descritores, novos modelos foram construídos usando regressão linear múltipla (MLR) e mínimos quadrados (MQ) considerando bandas específicas na região 935-1200 cm^{-1} . No Gráfico 4, observa-se os espectros com correção multiplicativa de sinais, com 1ª derivada e com 2ª derivada da região de 935-1200 cm^{-1} com as respectivas identificações das bandas, as quais foram usadas como descritores nos modelos MLR e MQ.

Gráfico 4 – Região dos espectros no infravermelho médio com bandas típicas de carboidratos para as amostras de leite com diferentes teores de lactose transformados por correção multiplicativa de sinais (MSC), 1ª derivada e 2ª derivada.



Fonte: Do autor (2019)

Na Tabela 3 são apresentados os resultados estatísticos do modelo MLR utilizando as bandas de vibração da região de 935-1200 cm^{-1} selecionadas no espectro original e nas transformações conforme Gráfico 4. A utilização de derivadas como método de transformação de dados do espectro de FTIR torna as bandas de vibrações mais definidas, o que resulta na melhora da calibração do modelo estatístico, resultando no aumento do coeficiente de determinação da calibração (R^2_{cal}) e no aumento do cR^2_p . Além disso, a aplicação do mesmo é melhorada tendo em vista que ocorre a redução do erro e aumento do coeficiente de determinação da validação cruzada ($RMSE_{\text{cv}}$ e R^2_{cv} , respectivamente), a diminuição do erro e aumento do coeficiente de determinação do predito ($RMSE_p$ e R^2_{pred} , respectivamente) e o aumento do R^2_m . Sendo assim, a utilização da derivada como forma de transformação para aplicação no modelo MLR foi a mais efetiva, sobretudo a 2ª derivada.

Tabela 3 - Desempenho dos modelos MLR na predição do teor de lactose usando diferentes transformações de dados.

	Original*	MSC*	1ª deriv**	2ª deriv***
RMSEc	0.53	0.57	0.15	0.13
R^2_{cal}	0.86	0.84	0.99	0.99
RMSE y-rand	1.24	1.22	1.23	1.24
R^2_{Yrand}	0.24	0.25	0.24	0.24
cR^2_p	0.73	0.70	0.86	0.86
$RMSE_{\text{cv}}$	0.76	0.83	0.25	0.25
R^2_{cv}	0.72	0.69	0.97	0.97
$RMSE_p$	0.30	0.42	0.24	0.17
R^2_{pred}	0.96	0.92	0.98	0.99
R^2_m	0.96	0.89	0.94	0.98

*997, 1043, 1074, 1116, 1155 cm^{-1} ; **982, 1018, 1066, 1115, 1142 cm^{-1} ; ***1007, 1024, 1036, 1059, 1093, 1107, 1134 cm^{-1} .

Fonte: Do autor (2019)

Na Tabela 4 são apresentados os resultados estatísticos do modelo Mínimos Quadrados (MQ) utilizando as bandas de vibração da região de 935-1200 cm^{-1} selecionadas no espectro original e nas transformações (conforme Gráfico 4), sendo consideradas de forma individual. A partir da análise do R^2_m , é possível verificar que somente na 2ª derivada do espectro de FTIR a maioria das bandas de vibração resultou em bons ajustes ($R^2_m > 0.5$). Comparando os resultados das bandas de vibração da 2ª derivada, pode-se inferir que a banda 1107 cm^{-1}

demonstrou ser a mais viável para a aplicação desse modelo, pois possui um alto valor cR^2p , indicando assim, diferença estatística entre a calibração e a y-randomização, além de possuir o mais alto valor para a validação cruzada (R^2cv), predição (R^2pred) e R^2m .

Tabela 4 - Desempenho dos modelos MQ na predição do teor de lactose usando diferentes transformações de dados e números de onda.

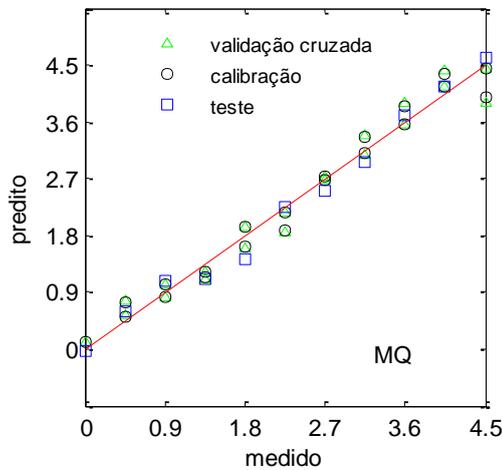
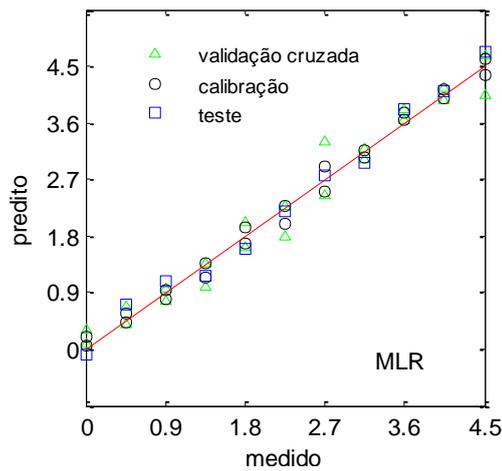
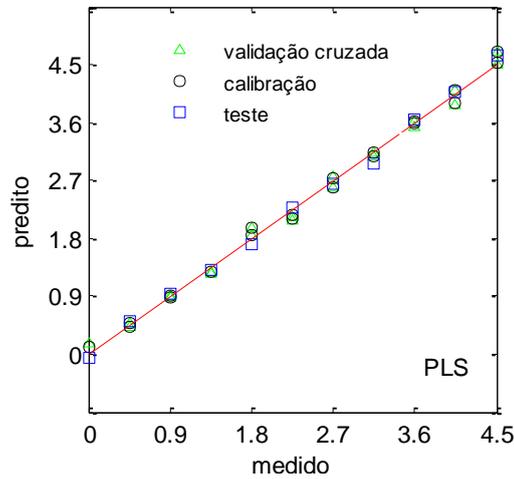
cm-1	Original					1ª deriv						
	997	1043	1074	1116	1155	982	1018	1066	1115	1142		
RMSEc	1.28	1.41	1.31	1.29	1.32	1.18	1.40	1.18	0.37	0.78		
R^2cal	0.19	0.01	0.15	0.17	0.14	0.31	0.04	0.31	0.93	0.70		
RMSE y- rand	1.39	1.37	1.38	1.39	1.42	1.40	1.37	1.39	1.39	1.38		
$R^2 Yrand$	0.05	0.08	0.06	0.05	0.01	0.03	0.07	0.04	0.04	0.06		
cR^2p	0.17	0.00	0.12	0.15	0.14	0.29	0.00	0.29	0.91	0.67		
RMSEcv	1.44	1.74	1.55	1.44	1.45	1.31	1.86	1.28	0.42	0.83		
R^2cv	0.05	0.14	0.00	0.04	0.03	0.17	0.09	0.20	0.91	0.66		
RMSEp	1.12	1.37	1.11	1.12	1.20	0.96	1.27	0.96	0.34	1.38		
R^2pred	0.57	0.31	0.73	0.66	0.52	0.78	0.66	0.68	0.95	0.48		
R^2m	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.95	0.47		
cm-1	MSC					2ª deriv						
	997	1043	1074	1116	1155	1007	1024	1036	1059	1093	1107	1134
RMSEc	1.25	1.42	1.39	1.30	1.21	0.91	0.46	0.33	0.50	0.31	0.20	1.18
R^2cal	0.22	0.00	0.04	0.17	0.28	0.59	0.90	0.95	0.88	0.95	0.98	0.31
RMSE y- rand	1.37	1.41	1.40	1.38	1.39	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40	1.37	1.41
$R^2 Yrand$	0.07	0.02	0.03	0.06	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.07	0.02
cR^2p	0.18	0.00	0.03	0.13	0.25	0.57	0.88	0.93	0.86	0.94	0.94	0.30
RMSEcv	1.40	1.63	1.61	1.44	1.31	1.00	0.50	0.38	0.55	0.34	0.22	1.27
R^2cv	0.08	0.25	0.05	0.04	0.18	0.51	0.88	0.93	0.85	0.94	0.98	0.21
RMSEp	1.49	1.45	1.53	1.50	1.37	0.59	0.40	0.24	0.35	0.31	0.18	1.39
R^2pred	0.00	0.14	0.06	0.00	0.16	0.94	0.96	0.98	0.95	0.98	0.99	0.17
R^2m	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57	0.93	0.89	0.83	0.94	0.96	0.00

Fonte: Do autor (2019)

Após a seleção das melhores condições de cada modelo para a predição do teor de lactose, uma comparação entre os modelos foi realizada de modo a verificar qual modelo melhor se ajustou aos dados experimentais. O Gráfico 5 mostra os valores medidos e preditos pelos modelos aplicados (PLS, MLR e MQ). A partir da análise dos gráficos é possível verificar que todos os modelos foram bem ajustados, sendo melhor o modelo de PLS, seguido pelo MLR e por último, pelo modelo MQ. Entretanto, como todos os modelos possuem elevados valores de R^2pred e R^2m , fato previamente visualizado nas Tabelas 2, 3 e 4, todos os modelos aplicados são eficientes na predição do teor de lactose em amostras de leite, desde que seja respeitado

cada parâmetro utilizado neste trabalho.

Gráfico 5 - Valores medidos e preditos pelos modelos PLS empregando correção multiplicativa de sinais (MSC) da região 935-1200 cm^{-1} , MLR empregando as bandas 997, 1043, 1074, 1116, 1155 cm^{-1} após 2ª derivada, e MQ empregando a banda 1107 cm^{-1} após 2ª derivada.

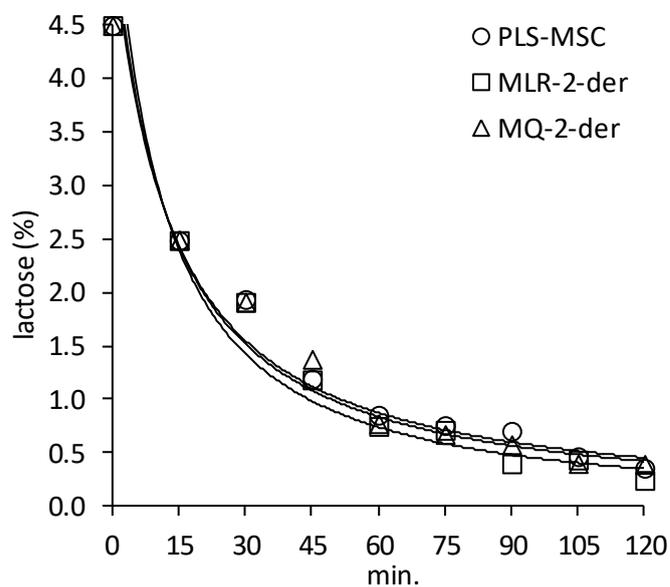


Fonte: Do autor (2019)

4.3 Etapa 3. Predição do teor de lactose durante um processo de hidrólise com lactase por espectrometria no infravermelho médio

Tendo em vista que todos os modelos aplicados foram bem ajustados para os dados experimentais de teor de lactose, o uso de tais modelos foi realizado para acompanhamento do teor de lactose durante um processo de hidrólise de lactose usando lactase. No Gráfico 6 é apresentada a evolução do teor de lactose ao longo do tempo conforme predições pelos modelos PLS, MLR e MQ. Verificou-se que os teores preditos por esses modelos foram similares, indicando assim, a aplicabilidade de qualquer um dos modelos na predição do teor de lactose durante um processo de hidrólise da lactose em leite usando enzima lactase.

Gráfico 6 – Predição do teor de lactose pelos modelos PLS, MLR e MQ durante um processo de hidrólise da lactose em leite usando enzima lactase.



Fonte: Do autor (2019)

5 CONCLUSÃO

Este trabalho propôs uma nova metodologia para a determinação de lactose em leite com e sem lactose, onde foi empregado a combinação da espectrometria no infravermelho médio com métodos quimiométricos.

A espectrometria no infravermelho médio associada com a Análise de Componentes Principais (PCA) mostrou-se eficiente na diferenciação entre o leite com e sem lactose, sendo possível discrimina-los perfeitamente. Quando aliada com Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), Regressão Linear Múltipla (MRL) e Mínimos Quadrados (MQ) foi possível obter modelos efetivos para prever com o teor de lactose em amostras de leite, sendo capaz também aplicar esse método na predição do teor de lactose durante um processo de hidrólise, desde que seja respeitado cada parâmetro utilizado neste trabalho.

Portanto, a metodologia de Espectrometria no Infravermelho Médio desenvolvida neste trabalho apresentou-se como alternativa viável para a determinação de lactose, viabilizando uma análise rápida e direta da amostra, possibilitando a redução de custo com reagentes e quantidade de resíduos.

Considerações finais

Mesmo havendo conseguido modelos com boa capacidade preditiva nas condições do experimento deste trabalho, deve ser considerada uma etapa futura de validação do método aqui proposto contra um método de referência, tal como cromatografia líquida de alta eficiência.

REFERÊNCIAS

ABREU, L.R **Tecnologia de leite e derivados**. 2005p. Lavras: UFLA, 2000.

ABREU, L.R. **Qualidade e processamento do leite**. 87P. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.

ACQUARO JUNIOR, V. R. et al. **Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação através de HPLC com índice de refração para lactose em leite pasteurizado**. *Scientia Chromatographica*, v. 5, n. 2, p. 137–145, 2013. Disponível em:< <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2013.010> > Acesso em 02 de jun de 2019.

ALMEIDA, F. M. N. **Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril**. p. 84, 2009.

ALVES, O.L. **Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier: Feliz Combinação de Velhos Conhecimentos de Óptica, Matemática e Informática**. Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES). Instituto de Química. UNICAMP. Disponível em: < http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_me Protec_espec_fourier.pdf>. Acesso em: 15 de abril de 2019.

ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos: Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, 2009

BAER, R. J.; FRANK, J. F.; LOEWENSTEIN, M. **Freezing point measurement of lactose hydrolysis in acid whey and lactose solutions**. *Association of Official Chemists*, V.63, 1980.

BARTH, A. **Infrared spectroscopy of proteins**. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1767, p. 1073–1101, 2007.

BATISTA, A. L. et al. **Lactose intolerance: possibility of ingesting fermented dairy products**. *Milch-wissenschaft*, v. 63, n. 4, p. 364-367, 2008.

BELOTI, V.; MANTOVANI, F.D.; SILVA, M. R.; TAMANINI, R.; GARCIA, D.T.; SILVA, F. A. **Alterações do ponto de congelamento do leite por adição do estabilizante citrato de sódio**. Anais do IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

BERTRAND, D.; DUFOUR, E. **La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques**. Tec & Doc. Paris, França, 2000.

BEYER, P.L. **Terapia clínica nutricional para distúrbios do trato gastrointestinal baixo**. In: MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. (Ed.). Krause alimentos, nutrição & dietoterapia. 10^aed, p.643-670. São Paulo: Roca, 2002

BOTARO, B.; SANTOS, M. V. **Entendendo a variação da crioscopia do leite**. MilkPoint, Campinas, 04 ago. 2008. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/entendendo-a-variacao-da-crioscopia-do-leite-46948n.aspx>>. Acesso em: 30 jan. 19.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Leite Tipo B, Leite Tipo C, Leite Pasteurizado e Leite Cru Refrigerado**. Aprovado pela Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Brasília-DF, 2002.

BRERETON, R. G.; **Chemometrics: Data Analysis for the laboratory and Chemical Plant**. John Wiley & Sons, USA, 2003.

BRERETON, R.G. **Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry**. *Analyst*, 2000. 125: p 2125.

BURDICK, R. **What are the disadvantages of HPLC?** *Sciencing*, 09 de janeiro de 2018. Disponível em: <<https://sciencing.com/list-7237518-disadvantages-hplc-.html>>. Acesso em: 02 de jun. de 2019.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of Near-Infrared Analysis**. 3rd ed, (practical spectroscopy, 35), CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

CASADIO, Y. S et al. **Evaluation of a Mid-Infrared Analyzer for the Determination of the Macronutrient Composition of Human Milk**. *J Hum Lact* v. 26, p. 376–383, 2010.

CHALFUN, L.T.F. **Produção e composição do leite de diferentes grupamentos genéticos da raça holandesa**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal De Lavras, Lavras, 2009.

COELHO-BARROS, E. A. et al. **Métodos de estimação em regressão linear múltipla:**

aplicação a dados clínicos. Revista Colombiana de Estadística, v. 31, n. 1, p. 111-129, 2008.

DUFOUR, E. **Principles of Infrared Spectroscopy.** In: SUN, Da-Wen (Org.). Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. 1. ed. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009. p. 3–26.

EMBRAPA Gado de Leite. **Anuário Leite: 2018.** São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>>.

Acesso em: 26 jan. 19.

FACHINELLI, C. **Controle de Qualidade do Leite – Análises Físico-químicas e Microbiológicas.** Trabalho de conclusão de curso, Tecnologia em Alimentos. Instituto Federal, de Educação, Ciência e Tecnologia. Bento Gonçalves, RS. 2010.

FAEDO, R. BRIÃO, V.B. CASTOLDI, S. GIRARDELLI, L. MILANI, A. **Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processo de separação por membranas associados à hidrólise enzimática.** Revista CIATEC – UPF, vol. 3 (1), p. p. 44-54, 2013.

FAGAN, CC et al. Milk and Dairy Products. In: SUN, Da-Wen (Org.). **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control.** 1. ed. p. 241–267. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009.

FAGNANI, R.; CARRARO, P.E.; BATTAGLINI, A.P.P.; ARAÚJO, J.P.A. **Alterações na densidade e crioscopia do leite pela adição de diferentes concentrações de citrato e fortificante.** Revista Caatinga, Mossoró, v.27, n.4, p. 208-215, out- dez. 2014.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Dairy Market Review.** Rome. Abril, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9210EN/i9210en.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 19.

FERRARINI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por Espectroscopia no Infravermelho e Calibração Multivariada.** Universidade Federal do Paraná, 2004.

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

FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A.C. **Variable selection in QSAR.** Química nova, São Paulo, v.25, n.3, p. 439-448, set. 2002.

GRIFFITHS, P.R.; HASETH, J.A. **Fourier Transform Infrared Spectrometry**. (Chemical analysis, v.83) Wiley-Interscience Publication, 1986.

HELPER, G. A.; FERRÃO, M. F.; FERREIRA, C. V.; HERMES, N. **Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio**. Ciências e tecnologia de alimentos, Campinas, v. 26, n. 4. p. 779-786, 2006.

HERSCHEL, F.W. **Philosophical Transactions Royal Society**. London 90, 49, 1800.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Tradução para o português: CÉLIO PASQUINI et al. [Coord.]. 6ª ed. Porto Alegre. 2009.

INFRARED PROCESSING AND ANALYSIS CENTER (IPAC). **Herschel Discovers Infrared Light**. Disponível em:

<http://coolcosmos.ipac.caltech.edu/cosmic_classroom/classroom_activities/herschel_bio.htm
>. Acesso em: 18 fev. 2019

JUNIOR, F. P. **Porcentagem de gordura, proteína e lactose em amostras de leite de tanques**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

KILLNER, M. H. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; PASQUINI, C. A **PLS regression model using NIR spectroscopy for on-line monitoring of the biodiesel production reaction**. Fuel, v. 90, p. 3268-3273, 2011.

LEVRI, K. M.; et al. **Tratamento Nutricional nos Distúrbios do Trato Gastrointestinal Inferior**. In: DECHER, N.; KRENITSKY, J.S. (Ed.). **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 13aed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda, p. 1249-1253, 2013

LIN, M. et al. **Infrared (IR) Spectroscopy—Near- Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy**. In: SUN, Da-We (Org.). **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**. 1. Ed, p. 119–143. National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc., 2009.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurte**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M.C. **QSAR modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR**. Química Nova, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 554-560, mai. 2013.

MATIOLI, G.; ENDO, A.S.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. **Beta-galactosidase de Kluyveromyces fragilis: estabilidade operacional**. In: 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química. p. 1308-1311. Anais, 1994.

MATTANNA, P. **Desenvolvimento de requeijão cremoso com baixo teor de lactose produzida por acidificação direta e coagulação enzimática**. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

NASCIMENTO, A. P. R. **Quantificação dos taninos dos vinhos por transformada de Fourier dos espectros no infravermelho médio (FTIR)**. Dissertação (Mestrado em Viticultura e Enologia). Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

NUNES, C. A. et al. **Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics**. J. Braz. Chem. Soc., São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012. Disponível em :<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010350532012001100007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 03 Jun 2019. Epub Nov 30, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>.

NUNES, C. A., FREITAS. M. P. **Aug-MIA-QSAR modeling of antimicrobial activities and design of multi-target anilide derivatives**. Journal of Microbiological Methods, v 94, p. 217-220, Set. 2013.

OLIVEIRA, C.C.M. de. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005

OLIVEIRA, M. C. P. P. **Espectrofotometria no Infravermelho- por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): Validação na análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite**. 70 p. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à**

Espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, W. A. **Calibração multivariada de misturas de óleos vegetais utilizando espectroscopia no infravermelho médio.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2012.

PERKINELMER. **FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). Technical Note** (2005). Disponível em: <www.perkinelmer.com>. Acesso em: 18 fev. 2019.

PIANTAVINI, M. S. **Desenvolvimento e validação de modelos multivariados usando PLS para quantificação de Febantel, Pamoato de Piratel e Praziquantel utilizando UV e IV.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná em Ciências farmacêuticas. Curitiba, 2014

PIZARRO, C.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; ORIO, P. **Prediction of total and volatile acidity in red wines by Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and iterative predictor weighting.** Anal Bioanal Chem , 399, 2061–2072, 2011.

PZL, PZL Tecnologia. **Manual de Operação** – Rev. 1.0. Londrina, 2011

ROCHA, J. T. C. **Emprego de espectrometria no infravermelho e métodos quimiométricos para a identificação e quantificação de petróleo a partir de misturas de frações de diesel.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

RODRIGUES, L. N. **Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados para a produção de etanol celulósico.** 2012. 143f. Dissertação (Mestrado em física) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. **Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food.** Annual Review of Food Science and Technology. v. 2, n. 1, p. 467–483, 1941-1413, 2011

SABIN, J. G.; FERRAO, M. F. **Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA.** Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.40, n.3, p. 387-396, 2004.

SANTOS, M.F.P. **Desenvolvimento e Validação de Métodos de Espectroscopia no**

Infravermelho Próximo e Médio para Caracterização de Lamas de ETAR para Uso Agrícola. Dissertação de Mestrado. Engenharia Biológica. Universidade Técnica de Lisboa, 2007.

SANTOS, M.V.; ARCARI, M. A. **Fatores que podem alterar a crioscopia do leite.** MilkPoint, Campinas, 05 mai. 2012. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/fatores-que-podem-alterar-a-crioscopia-do-leite-204319n.aspx>>. Acesso em: 30 jan. 19.

SANTOS, P. M. et al. **Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*.** Revista Brasileira de Engenharia Biomedica v. 28, n. 4, p. 398–409, 2012.

SEXTON, D. L. **Determination of Lactose by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography.** Tese (Doutorado em química). Universidade Estadual do Tennessee, Maio de 2004.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMAS, R. C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia de infravermelho próximo.** Universidade Estadual de Campinas, 2005

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** Trad. de Inez Caracelli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida Santos e Regina Helena Porto Francisco. Porto Alegre. RS.: Ed. Guanabara Dois S.A, 2002.

SOUSA, A.S. **Leite: Importância, Síntese e Manipulação da composição.** Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

SUN, D. (Ed.). **Infrared Spectroscopy: For Food Quality Analysis and Control.** Academic Press, 2009.

TREVISAN, A.P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturassobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Centro de Ciências Rurais,

Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 203 p., 2008.

VIANA, C. C. R. **Caracterização fórmulas infantis para lactentes usando espectroscopia no infravermelho médio**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.

WIBERG, K. **Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions**. Stockholm University: PhD Thesis, 2004.