

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

Marceli Pazini Milani

**MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE
LEITE E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR
ESPECTROSCOPIA NIR**

**Santa Maria, RS
2016**

Marceli Pazini Milani

**MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE E
QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR ESPECTROSCOPIA NIR**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador Prof. Dr. José Laerte Nörnberg

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Milani, Marcell Pazini
Modelos de classificação de sistemas de produção de
leite e quantificação de ácidos graxos por Espectroscopia
NIR / Marcell Pazini Milani.- 2016.
135 p.; 30 cm

Orientador: José Laerte Nörnberg
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

1. Calibração multivariada 2. Leite orgânico 3.
Quimiometria I. Nörnberg, José Laerte II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Marcell Pazini Milani. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: marci_vet@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado**

**MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE
LEITE E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR
ESPECTROSCOPIA NIR**

elaborada por:
Marceli Pazini Milani

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

José Laerte Nörnberg, Dr.
(Presidente/Orientador)

Eduardo Bohrer de Azevedo, Dr. (UNIPAMPA)

Jorge Schafhäuser Júnior, Dr. (EMBRAPA)

Renius de Oliveira Mello, Dr.(UFSM)

Roger Wagner, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 22 de julho de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao meu noivo Almir Lohrentz e ao nosso filho que nascerá em poucos meses.

Aos meus pais Revir e Fátima.

Ao meu irmão Révis e minha cunhada Bruna.

A família Pazini Alves, em especial meu afilhado Guilherme e a Bianca.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Laerte Nörnberg.

Aos meus colegas do Instituto Federal Farroupilha *campus* de Frederico Westphalen.

Aos meus amigos, parceiros do Nidal.

Aos colegas Vanusa Granella, Diego Prado de Vargas, Rudolf Brand Scheibler, Fábio Antunes Rizzo e Eduardo Garcia Becker pelo fornecimento de matéria-prima para o presente trabalho.

Ao todos os docentes do PPGCTA.

À UFSM, CAPES e CNPq.

Aos meus avós que já partiram, mas deixaram seus ensinamentos e muita saudade.

RESUMO

MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE LEITE EQUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR ESPECTROSCOPIA NIR

AUTORA: Marcell Pazini Milani
ORIENTADOR: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg

Foi avaliado o perfil de ácidos graxos do leite orgânico e convencional em diferentes estações do ano e, o uso de dados espectrais obtidos na região do infravermelho proximal para classificação do leite (orgânico vs convencional) e quantificação de ácidos graxos. Os modelos de classificação testados foram: máquina de vetores de suporte (SVM) e modelagem independente flexível por analogia de classe (SIMCA); e de quantificação: regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) por intervalo (iPLS), regressão por componentes principais (PCR), regressão por máquina de vetores de suporte (SVR) e redes neurais artificiais (RNA). As amostras de leite utilizadas para desenvolver os modelos de quantificação totalizaram 421, sendo 286 oriundas de tanques de resfriamento de unidades produtoras e 135 individuais de vacas. O banco de dados utilizado para desenvolver os modelos de classificação foi construído a partir de amostras de leite coletadas a cada 2 meses, de julho de 2011 a maio de 2012, proveniente de 20 unidades produtoras de leite orgânico e 20 convencionais, localizadas na região Sul do Brasil. Utilizou-se como método de referência para quantificação de ácidos graxos a cromatografia gasosa (GC/FID). Os registros espectrais foram realizados na faixa de 1100 a 2500nm tanto nas amostras de leite in natura como liofilizada. Os resultados não acusaram diferença significativa entre o sistema de produção (orgânico e convencional) quanto ao teor da maioria dos ácidos graxos, inclusive para os identificados como benéficos à saúde do consumidor. O uso da espectroscopia no infravermelho proximal associado a modelos quimiométricos de classificação possibilitou a diferenciação entre amostras de leite de diferentes sistemas, com acurácia de 80,93% para amostras liofilizadas e 59,32% para amostras in natura pelo método SVM. A quantificação de ácidos graxos no leite a partir de dados NIR é possível, sendo que a seleção de comprimentos de onda através do iPLS melhorou a predição do modelo em relação ao uso do espectro inteiro. A rede neural artificial apresentou desempenho superior aos demais modelos. O teor de água interfere no desempenho dos modelos, tanto para classificar as amostras como para quantificar ácidos graxos, com resultados significativamente superiores com amostras liofilizadas.

Palavras-chave: Calibração multivariada. Leite orgânico. Quimiometria.

ABSTRACT

MILK PRODUCTION SYSTEMS CLASSIFICATION OF MODELS AND QUANTIFICATION OF FATTY ACIDS FOR NIR SPECTROSCOPY

AUTHOR: MARCELI PAZINI MILANI

ADVISER: PROF. DR. JOSÉ LAERTE NÖRNBERG

It was evaluate the fatty acid profile of organic and conventional milk in differen seasons, the use of spectral data obtained in the near infrared region for classification of milk (organic vs conventional) and quantification of fatty acids. The tested rating models were: support vector machine (SVM) and independent flexible modeling by analogy class (SIMCA); and quantification: regression by partial least square (PLS) by interval (iPLS), principal component regression (PCR), regression by support vectors machine (SVR) and artificial neural networks (RNA). The milk samples used tanks producing units 135 and individual cows. The database used to develop the classification models were constructed from milk samples collected every two months, from July 2011 to May 2012, from 20 units producing organic milk and 20 conventional, located in the Southern of Brazil. The reference method the quantification of fatty acids used was gas chromatography (GC/FID). Spectral recordings were made in the range of 1100 to 2500nm in both samples of fresh milk as freeze-dried. The results did not show significant difference between the production system (organic and conventional) and the content of most fatty acids, including those identified as beneficial to consumer health. The use of near infrared spectroscopy associated with chemometric classification models made it possible to differentiate between milk samples from different systems, with an accuracy of 80,93% for freeze-dried samples and 59,32% for in natura samples by MVS method. Quantification of fatty acid in milk from NIR data is possible, and the selection of wavelengths by iPLS improved prediction model regarding the use of the entire spectrum. The artificial neural network has better performance than other models. The water content interfere with the performance of the models, both as to rate the samples to quantify fatty acids with significantly superior results with lyophilized samples.

Keywords: Chemometry. Multivariate calibration. Organic milk.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Regiões espectrais do infravermelho.....	22
Tabela 2 –	Atribuições das regiões espectrais as possíveis transições vibracionais	24
Tabela 3 –	Perfil de ácidos graxos no leite de pesquisas realizadas	40

Manuscrito I

Tabela 1.	Médias das variáveis em função do sistema de produção e da estação do ano...	77
Tabela 2.	Médias das variáveis em função do sistema produtivo	78
Tabela 3.	Médias das variáveis em função da estação do ano	78
Tabela 4.	Performance da análise SIMCA do espectro pré-tratado NIRS de amostras de leite	79
Tabela 5.	Parâmetros e acurácia das MSV obtidas, para classificação das amostras de leite orgânico e convencional	79

Manuscrito II

Tabela 1.	Perfil de ácidos graxos (mg g^{-1}) das amostras de leite in natura e liofilizadas, determinado por cromatografia gasosa	100
Tabela 2.	Parâmetros estatísticos dos modelos para predição dos ácidos graxos saturados em amostras de leite in natura e liofilizada	101
Tabela 3.	Parâmetros estatísticos dos modelos para predição dos ácidos graxos insaturados em amostras de leite in natura e liofilizadas	102
Tabela 4.	Parâmetros estatísticos dos modelos para predição de agrupamentos de ácidos graxos em amostras de leite in natura e liofilizadas.....	103
Tabela 5.	Média \pm desvio padrão dos parâmetros estatísticos obtidos a partir de distintos modelos de calibração e amostras.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo matemático de neurônio artificial	33
------------	--	----

Manuscrito I

Figura 1.	Projeções bidimensionais da análise de componentes principais mostrando a relação entre o perfil de ácidos graxos e o sistema produtivo.....	79
Figura 2.	Projeções bidimensionais da análise de componentes principais mostrando a relação entre o perfil de ácidos graxos e a estação do ano	79

Manuscrito II

Figura 1.	Espectro no infravermelho proximal de amostras de leite in natura (a) e liofilizadas (b)	105
Figura 2.	Histograma das regiões espectrais (comprimentos de onda) selecionadas pelo algoritmo iPLS para quantificação de ácidos graxos no leite in natura e liofilizado	106

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PROXIMAL	21
3.2	QUIMIOMETRIA	25
3.2.1	Pré-tratamento nos dados espectrais	27
3.2.2	Seleção de variáveis espectrais	29
3.2.3	Modelos de calibração	30
3.2.3.1	<i>Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)</i>	30
3.2.3.2	<i>Regressão por componentes principais (PCR)</i>	32
3.2.3.3	<i>Redes neurais artificiais (RNA)</i>	33
3.2.3.4	<i>Máquina de vetores de suporte (SVR)</i>	35
3.2.3.5	<i>Avaliação dos modelos de calibração</i>	36
3.3	CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA GORDURA DO LEITE	38
3.3.1	Método analítico de referência para ácidos graxos no leite	43
3.3.2	Análise do leite por espectroscopia no infravermelho proximal (NIR)	46
3.4	LEITE ORGÂNICO	52
4	DESENVOLVIMENTO	57
4.1	MANUSCRITO I – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE ORGÂNICO E CONVENCIONAL, SAZONALIDADE E CLASSIFICAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA	59
4.2	MANUSCRITO II – QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM LEITE IN NATURA E LIOFILIZADO ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PROXIMAL	81
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXO	127
	ANEXO A – NORMAS DA REVISTA	129

1 INTRODUÇÃO

Entre as técnicas de análise de alimentos destaca-se a espectroscopia no infravermelho próximo, que apresenta inúmeras vantagens sobre as metodologias tradicionais, como maior rapidez na obtenção de resultados, redução da produção de resíduos, demanda reduzida de mão de obra e não destruição da amostra. Sendo um método bastante rápido e não invasivo, que se baseia na observação das vibrações moleculares excitadas por um feixe de radiação infravermelha, através de ferramentas quimiométricas que envolvem calibração multivariada, sendo uma das técnicas analíticas mais promissoras, com vasto campo de aplicação, ideal para monitoramento e controle de qualidade dos alimentos.

A espectroscopia no infravermelho proximal trabalha na região espectral com comprimento de onda que vai de 780 a 2500nm, que aliada a quimiometria permite identificar, qualificar e quantificar compostos orgânicos nos alimentos, através de equações de calibração para cada um deles. Para isso, é necessário seguir algumas etapas, como: seleção das amostras que irão compor o banco de dados; aquisição dos resultados analíticos pela metodologia de referência; leitura espectral; tratamento matemático do sinal analítico; construção e validação das equações de calibração e, finalmente, implantação na rotina analítica.

Os dados obtidos através da espectroscopia de infravermelho são muito complexos, em especial quando o alimento possui elevado teor de água, como é o caso do leite. As técnicas e operações associadas com a manipulação matemática e interpretação do sinal analítico, devem ser eficientes para que o resultado analítico seja acurado. De maneira geral, o modelo matemático contruído deve extrair as informações relevantes contidas no espectro NIR, que estejam relacionadas direta ou indiretamente com o analito em questão.

A expansão da espectroscopia infravermelha para análise de alimentos tem grande influência dos avanços estatísticos, viabilizados através de sistemas e processadores de alto desempenho, que permitem a execução rápida de inúmeras operações matemáticas. Dentre os métodos de modelagem mais utilizados em dados espectrais, destaca-se a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), e por intervalo (iPLS) e a regressão por componentes principais (PCR). Entretanto, ferramentas antes aplicadas em outras áreas do conhecimento, vêm sendo implementadas com sucesso na busca da resolução de problemas antes considerados de difícil resolução, como redes neurais artificiais (RNA) e máquinas de vetores de suporte (SVR).

A espectroscopia de infravermelho já é utilizada em larga escala para a análise da composição centesimal do leite, entretanto pesquisas com resultados satisfatórios para quantificação de ácidos graxos neste alimento ainda são incipientes. Conhecer o perfil de ácidos graxos que compõem a gordura do leite é importante devido aos efeitos distintos que os componentes dessa fração exercem sobre a saúde do consumidor, e a influência de fatores ligados ao ambiente (como, estação do ano), e a vaca (como, nutrição e genética), que afetam a composição do leite.

Além da aplicação da espectroscopia infravermelha para obtenção de informações quantitativas dos alimentos, seu uso para classificar alimentos vem ganhando espaço. Uma discriminação importante para o consumidor é a de alimento orgânico e convencional, pois, dentre outras diferenças, há uma questão monetária entre ambos, sendo um campo atrativo para fraudadores e que precisa ser monitorado.

Dessa forma, objetivou-se avaliar modelos para classificação e quantificação de ácidos graxos no leite por espectroscopia no infravermelho proximal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver curvas de calibração baseadas na espectroscopia de infravermelho proximal para classificação e quantificação de ácidos graxos no leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar modelos de calibração para quantificação de ácidos graxos em amostras de leite;
- Avaliar o efeito da forma da amostra de leite, in natura e liofilizada, na classificação e quantificação de ácidos graxos por espectroscopia de infravermelho proximal;
- Avaliar modelos para classificação de sistemas de produção de leite (orgânico e convencional) com emprego da espectroscopia no infravermelho proximal;
- Comparar o perfil de ácidos graxos do leite produzido em sistema de produção orgânica e convencional nas diferentes estações do ano.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PROXIMAL

A origem da espectroscopia no infravermelho, data do início do século XIX, com o alemão Frederick William Herschel. Em 1800, durante a execução de um experimento que consistia em utilizar um prisma para separar as faixas espectrais associadas à região espectral do visível, Herschel observou que cada uma das cores decompostas pelo prisma apresentava uma quantidade de energia distinta. Para monitorar a quantidade de energia associada a cada cor, ele utilizou um termômetro, observando que abaixo do vermelho, onde não havia luz visível, era a região que apresentava a maior temperatura (BURNS; CIURCZAK, 2001). O experimento de Herschel não somente descobriu o infravermelho, como demonstrou que existem formas de luz invisíveis ao olho humano.

Historicamente a região do infravermelho médio (MIR, do inglês *Middle Infrared*) teve uma aplicação analítica mais imediata devido à alta intensidade das bandas de transições vibracionais fundamentais, e da maior facilidade de interpretação dessas bandas. Porém, utilizando-se medidas de reflectância difusa para a obtenção dos espectros, as baixas intensidades das bandas NIR (do inglês, *Near Infrared*) puderam ser compensadas através da utilização direta de amostras sólidas, sem qualquer tipo de diluição ou controle severo da espessura (GONZAGA, 2006).

O desenvolvimento de métodos analíticos utilizando NIRS (do inglês, *Near Infrared Spectroscopy*) começou em 1949, com o projeto para avaliar a qualidade de ovos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Seu uso como análise quantitativa foi publicado em 1962 com autoria de Hart, Norris e Golumbic (HART et al., 1962), aplicando a metodologia para determinar o teor de umidade em sementes, sendo este o primeiro a realizar uma determinação quantitativa utilizando simultaneamente medidas em mais de um comprimento de onda (análise multivariada), contrapondo a utilização clássica de apenas um comprimento de onda através da Lei de Beer (GONZAGA, 2006).

Impulsionada pelos trabalhos de Hart, Norris e Golumbic nas décadas 80 e 90, o avanço da informática e da estatística, o advento da quimiometria, o interesse de grupos de pesquisa acadêmicos, governamentais e industriais, a espectroscopia no infravermelho proximal tornou-se uma importante ferramenta para análise de matrizes complexas, como os alimentos.

O termo espectroscopia designa métodos analíticos que estudam a interação de radiação eletromagnética com as moléculas. A ligação de dois átomos em moléculas envolve diferentes tipos de energia, tais como energia translacional, vibracional e eletrônica. No caso da espectroscopia de infravermelho, esta tem por base os movimentos relativos dos átomos numa molécula, isto é, as suas vibrações (ALCACER, 2007). Assim, esta espectroscopia detecta a radiação que é absorvida pelas ligações vibracionais moleculares.

A energia denominada infravermelha corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de ondas entre 12800 e 10 cm^{-1} , e comprimento de onda de 780 a 10000 nm. Esta região se divide em infravermelho próximo (NIR), médio (MIR) e distante (FIR) (SKOOG et al., 2002), sendo o número de ondas diretamente proporcional a energia. A Tabela 1 apresenta os limites aproximados de cada região.

Tabela 1 – Regiões espectrais do infravermelho

Região	Número de onda (cm^{-1})	Comprimento de onda (nm)	Frequência (Hz)
Próximo (NIR)	12800 a 4000	780 a 2500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4000 a 200	2500 a 5000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FIR)	200 a 10	5000 a 10000	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

Fonte: Skoog et al. (2002); Holler et al. (2009).

A radiação no infravermelho proximal não tem energia suficiente para promover transições eletrônicas, porém é suficiente para excitar seus estados rotacionais e vibracionais (SKOOG et al., 2005), sem causar sua decomposição (BARBOSA, 2007). A faixa de energia infravermelha é suficiente para promover transições das moléculas de seu estado vibracional fundamental para outros estados excitados (PASQUINI, 2003; HOLLER et al., 2009). Devido a este caráter vibracional, as moléculas, quando submetidas à ação de radiações, estão sujeitas ao desenvolvimento de uma série de efeitos inerentes às ondas eletromagnéticas, tais como absorção, refração, reflexão e espalhamento. Tais efeitos são específicos dos átomos presentes na molécula, bem como da região do espectro envolvida, estando relacionados com a constituição química e parâmetros físicos da amostra, permitindo a identificação de compostos (SILVERSTEIN et al., 2005). Embora a radiação penetre no produto, suas características espectrais mudam devido ao espalhamento da radiação e dos processos de absorção. As propriedades de espalhamento da luz estão relacionadas com a estrutura da amostra analisada (NICOLAI, 2007). O espectrômetro é simples de operar e tem um sinal muito elevado em relação ao ruído que é tipicamente 10000:1 (BÜNING-PFAUE, 2003).

O efeito do tamanho da partícula causa deslocamento da linha de base e se torna muito pronunciado em comprimentos de onda de grande absorção pela amostra. Por exemplo, em duas amostras com mesma composição, mas diferentes granulometrias há maior reflexão nas partículas menores (MESSERSCHMIDT, 1999). O espectro NIR varia com alguns parâmetros físicos, como por exemplo, tamanho das partículas, umidade, temperatura e compactação da amostra (COSTA FILHO, 2003).

O espectro na região do infravermelho próximo se origina devido à transformação da energia da radiação absorvida em energia vibracional das moléculas (SILVERSTEIN et al., 2005). Em algumas moléculas, os elétrons sofrem efeitos de átomos ou grupos vizinhos, influenciando o estiramento, o comprimento da ligação, o ângulo de ligação e, portanto, a frequência de vibração das ligações químicas. As diferenças específicas geradas por estas interações possibilitam que cada substância tenha um espectro característico (LIRA et al., 2010).

Qualquer transição vibracional de um estado de energia 0 para 1 ou 2 para 3, em que a variação dos níveis vibracionais (Δv), seja ± 1 é considerada uma transição fundamental. Tais transições são permitidas pela teoria quântica, conforme suas regras de seleção. A diferença de energia entre dois estados vizinhos é sempre o mesmo, ou seja, todos os níveis estão igualmente espaçados. Essas transições fundamentais são intensas e responsáveis pelas bandas na região do infravermelho médio (HOLLER et al., 2009).

Por sua vez, os sinais observados na região do infravermelho próximo ocorrem em frequências aproximadamente duas ou três vezes maiores que as de uma transição fundamental, isto é, $\Delta v = \pm 2$ ou ± 3 , sendo esse tipo de transição conhecida como sobretons (*overtone*). Este fato é inconsistente com a teoria quântica, uma vez que esta prevê que tais transições seriam proibidas. Outras bandas que aparecem na região do NIR são provenientes das bandas de combinações, que ocorrem quando um fóton excita simultaneamente dois estados vibracionais diferentes. A frequência da banda de combinação é aproximadamente igual à soma ou à diferença entre as duas frequências das bandas fundamentais que interagem para a sua formação (PASQUINI, 2003).

Os sobretons são transições entre estados vibracionais não consecutivos. As bandas provenientes desse tipo de transição são caracterizadas por apresentarem intensidade de 10-100 vezes mais fracas do que a transição entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado (COSTA FILHO, 2003). As bandas de absorção, mais proeminentes da região do infravermelho próximo, estão relacionadas a sobretons das vibrações de estiramento envolvendo grupos funcionais com átomos de hidrogênio ou combinações de vibrações

fundamentais e deformação angular dos grupos funcionais C-H, N-H e O-H (WORKMAN Jr. et al., 1996).

A anarmonicidade mecânica no infravermelho próximo, estudada por Frank-Condon, está relacionada ao fato de que as ligações envolvendo átomos de hidrogênio vibram com maior amplitude devido à baixa massa do átomo de hidrogênio. Portanto, as bandas de absorção observadas na região do infravermelho próximo, surgem dos sobretons das vibrações de estiramento envolvendo grupos funcionais com átomos de hidrogênio, ou combinações de módulos vibracionais de estiramento e deformação angular (COSTA FILHO, 2003).

As bandas de absorção que se referem os sobretons tendem a ocorrer em aproximadamente metade a um terço do seu comprimento de onda fundamental (SOUSA, 2005). A tabela 2 apresenta as principais regiões espectrais do infravermelho próximo e a natureza vibracional associada a elas.

Tabela 2 – Atribuição das regiões espectrais às possíveis transições vibracionais

Região Espectral (nm)	Natureza da transição vibracional
2200 – 2450	Estiramento da combinação C-H
2000 – 2200	Estiramento da combinação N-H, O-H
1650 – 1800	Primeiro sobretom do estiramento C-H
1400 – 1500	Primeiro sobretom do estiramento N-H, O-H
1100 – 1225	Segundo sobretom do estiramento C-H
950 – 1100	Segundo sobretom do estiramento N-H, O-H
850 – 950	Terceiro sobretom do estiramento C-H
775 – 850	Terceiro sobretom do estiramento N-H, O-H

Fonte: Workman Jr. et al. (1996).

As bandas referentes ao O-H da água aparecem em 1.940 nm (próximo de 5.155 cm^{-1}) são bandas de combinação e em 1.440 nm (próximo de 6.945 cm^{-1}) atribuída ao primeiro sobretom do estiramento O-H, sendo úteis para a determinação de água em vários tipos de amostras (CHAGAS, 2006; XIAOBO et al., 2010).

As bandas observadas na região do infravermelho próximo são sobretons e combinações do nível fundamental de vibrações com os sobretons. As probabilidades das transições envolvidas nos sobretons são menores que as das transições do nível fundamental, e por este motivo, a intensidade do sinal é menor que o observado na região do infravermelho médio. Devido a este fato, esta região espectral pode ser utilizada na análise de amostras biológicas, pois a intensidade da banda de água é menor, permitindo desta maneira que

importantes informações sobre a amostra possam ser extraídas (COSTA FILHO, 2003). Entretanto, como as bandas espectrais no NIR normalmente são largas e frequentemente sobrepostas, raramente existem bandas limpas que permitam uma correlação simples com a concentração do analito. Devido à complexidade do espectro NIR é inviável fazer uso quantitativo ou qualitativo desta técnica sem um tratamento matemático dos espectros obtidos (VOGEL, 2008; ANDRADE, 2009). Como a intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que causa esta banda, a quantidade de um composto existente numa amostra pode ser determinada através de uma curva de calibração (intensidade da banda *versus* concentração) construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão (variável dependente), através de uma análise multivariada, devido ao elevado número de variáveis independentes obtidas num espectro infravermelho (ALMEIDA, 2009).

A quimiometria forneceu aos espectroscopistas diferentes formas de resolver o problema de calibração para análise de dados espectrais. Modelos clássicos de quantificação, tal como a regressão linear, se tornaram insuficientes para sistemas complexos, frente à quantidade de dados que podem ser obtidos a partir de um espectro. Para que estes modelos apresentem bons resultados é necessário que sejam utilizadas apenas amostras simples: compostos puros e misturas binárias e que a banda espectral selecionada não sofra outra influência, a não ser do próprio analito, garantindo uma relação linear entre a concentração e o sinal, o que não se aplica na região NIR. Portanto, o uso de modelos de calibração multivariada para a obtenção de dados quantitativos apresenta uma série de vantagens, pois podem ser utilizados em sistemas complexos apresentando bons resultados (BRO, 2003).

3.2 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é definida como a pesquisa e a utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos de forma a extrair uma maior e melhor quantidade de informações e resultados analíticos (BLANCO e ALCALA, 2006).

Pode-se dividir a quimiometria em diferentes aplicações de acordo com OTTO (1999):

- a) Processamento de sinais analíticos;
- b) Planejamento e otimização de experimentos;
- c) Reconhecimento de padrões e classificação de dados;
- d) Calibração multivariada;
- e) Métodos de inteligência artificial.

Devido ao comportamento não muito específico dos espectros obtidos no infravermelho proximal, onde é possível observar picos de absorção largos e sobrepostos, essa região foi conhecida por muito tempo de difícil compreensão. A calibração multivariada é empregada de forma bastante efetiva justamente nos casos onde existe o problema da sobreposição de sinais analíticos e para determinações simultâneas, possibilitando a análise de todo o espectro para a construção de modelos de calibração (HALL et al., 1996). A análise multivariada é constituída de procedimentos que relaciona muitas respostas instrumentais, a respeito de um analito. Os métodos de calibração multivariada são contemporâneos e relevantes, uma vez que se tornaram comuns no meio científico (GELADI, 2002).

A popularização da calibração multivariada deu-se pela utilização do método dos mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, *Partial Least Square*). Com a utilização deste método, muitos problemas de cálculo puderam ser superados, e um grande número de aplicações analíticas começaram a aparecer. Mais recentemente, com a utilização de técnicas de inteligência artificial no tratamento de dados químicos, como redes neurais e algoritmos genéticos, certos problemas que ainda não eram resolvidos pela utilização do PLS, como a modelagem de sistemas não lineares, puderam ser suplantados. Isso ampliou ainda mais a aceitação da calibração multivariada em química analítica (UNICAMP, 2014).

A complexidade dos procedimentos de calibração multivariados e suas exigências levaram, no ano de 1995, a ASTM (do inglês, *American Standards for Testing and Materials*) lançar o guia denominado “Práticas Padrão para Análises Quantitativas Multivariadas por Infravermelho”, incluindo a região proximal, identificada pela sigla ASTM-1655-05, a qual foi revisada no ano de 2012, documento que norteia o analista no processo de calibração multivariada. O documento é bastante completo e dá ênfase especial à seleção das amostras representativas e ao processo de validação e manutenção de métodos multivariados. De forma implícita à sua existência, está o reconhecimento da aplicabilidade dos processos analíticos baseados em espectroscopia e calibração multivariada (PASQUINI et al., 2007).

A aceitação e implementação da metodologia de análise por infravermelho proximal, passa pela validação do método analítico, tal procedimento pode ser atestado através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito. Esses parâmetros, dependendo de onde o método será aplicado, do propósito e ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito. A partir deles é possível garantir que a metodologia proposta é confiável para a estimativa das concentrações de amostras desconhecidas e pode ser usada efetivamente para o controle de qualidade de parâmetros químicos e físicos (SIMÕES, 2008).

3.2.1 Pré-tratamento nos dados espectrais

O pré-processamento pode ser definido como qualquer manipulação matemática dos dados realizada antes da construção dos modelos quimiométricos (BEEBE et al., 1998), sendo este o primeiro passo de uma calibração multivariada baseada em espectros obtido na região do infravermelho proximal.

A razão deste é que os dados espectrais brutos, muitas vezes contêm variações sistemáticas ou aleatórias que não estão relacionadas com a resposta de interesse. Tais variações podem ocorrer devido à instabilidade do instrumento, espalhamento da luz, diferenças de comprimento do caminho óptico durante a realização das medidas, falhas na varredura dos comprimentos de onda e ocorrência de ruído (SIMÕES, 2008). O tratamento dos dados espectrais permite reduzir, eliminar ou padronizar o impacto desses interferentes nos espectros, sem alterar a informação espectroscópica contida neles (SIESLER et al., 2002). Normalmente a aplicação dos pré-tratamentos leva a melhorias significativas no desenvolvimento do modelo de calibração (ALMEIDA, 2009).

Todos os métodos analíticos instrumentais produzem medidas. Na espectroscopia NIR, por exemplo, a medida é um espectro, o qual pode-se definir como uma sequência de medidas, constituída por componentes que contém a informação desejada do analito, e outro que contém informações espúrias, que traz diversas consequências à precisão da medida (WENTZELL; BROWN, 2000). Nenhuma medida está livre desse último componente, que pode ter proveniência química ou instrumental.

Em medidas espectrométricas, o ruído pode ser homocedástico ou heterocedástico (BARROS NETO et al., 2007). Ambos mascaram a informação química sobre o analito de interesse e podem diminuir a eficácia de modelos quimiométricos (JOSÉ, 2008). No ruído homocedástico, características como média e desvio-padrão permanecem constantes ao longo de todo o espectro. Já a natureza do ruído heterocedástico depende das características da medida para cada dado (WENTZELL; BROWN, 2000), o que dificulta a eliminação do ruído.

A maioria dos equipamentos produz algum componente heterocedástico. Além do mais, o ruído homocedástico em um espectro pode ser convertido em heterocedástico através de transformação não-linear, como transmitância para absorbância (ALSBERG et al., 1997; WOODWARD et al., 1998), tornando a remoção do componente ruidoso uma tarefa não trivial, por serem desconhecidas as características do ruído. Sua análise e eliminação são realizadas usando-se estimativas aproximadas de suas características, através do uso de técnicas elaboradas de processamento de sinais (JOSÉ, 2008). Dentre os principais pré-

tratamentos utilizados nos dados brutos dos espectros obtidos no infravermelho proximal, destacam-se a variação padrão normal ou SNV (do inglês, *Standard Normal Variate Method*) e o uso das derivadas.

A SNV é utilizada para minimizar interferências causadas pelo tamanho de partículas e diferenças de densidade das amostras (ALMEIDA, 2009). Normalmente, os espectros no infravermelho próximo apresentam problemas de linha base, inclinações e algumas vezes curvaturas, devido principalmente ao espalhamento de luz (MARTENS; NAES, 1989; WU et al., 1999; BERTRAN et al., 1999). O espalhamento é fortemente dependente do comprimento de onda da luz, do tamanho das partículas, do nível de compactação, do índice de refração da amostra, etc. Para minimizar este efeito, é necessário o uso de técnicas como a transformação variação padrão normal. Esta técnica é aplicada para corrigir os efeitos do espalhamento multiplicativo e o tamanho de partícula (COSTA FILHO, 2003). Seu princípio é centrar cada espectro em torno de zero, por subtração da média (ajuste aditivo) e divisão pelo desvio padrão (ajuste multiplicativo) em todos os pontos do espectro, o que, embora melhore a precisão dos resultados, não simplifica o modelo matemático, e também, não reduz as interferências sistemáticas (NAES et al., 2002).

A aplicação das derivadas remove uma parte da deformação da linha de base, e melhora a definição de bandas que se encontram sobrepostas em uma mesma região espectral, revelando picos de pequena absorbância (SAVITZKY; GOLAY, 1964). A primeira derivada é uma das técnicas de pré-processamento mais utilizadas para corrigir variações de linha de base em espectros MIR/NIR (LIRA, 2010), pois remove deslocamento constante de linha de base, além de possibilitar uma melhor visualização de picos existentes nos sinais originais (PONTES, 2009) e eliminar interferências causadas pelo tamanho de partículas (OSBORNE, 2000).

Entretanto, o uso de derivadas provoca, no caso de espectros, uma diminuição na relação sinal-ruído, tornando-se necessário o uso de filtros de suavização, tais como Savitzky-Golay (LIRA, 2010). Nesse caso, primeiramente os dados espectrais são separados em grupos contendo um número fixo de elementos (janela), onde é calculado o valor médio. Em seguida, ajusta-se o valor médio no modelo polinomial, através dos mínimos quadrados. Assim, os ruídos são reduzidos pela raiz quadrada do número de pontos utilizados. O sistema fundamentado em ajuste polinomial móvel, através do algoritmo de Savitzky-Golay (1964), é utilizado com maior frequência (SAUER, 2007; RINNAN et al., 2009), sendo considerado um clássico entre os filtros de suavização de sinais analíticos, minimizando os ruídos espectrais com a mínima perda de informação.

3.2.2 Seleção de variáveis espectrais

Por muito tempo foi defendida a ideia do uso do sinal analítico completo (*full spectrum*), quando se emprega dados espectroscópicos em ferramentas quimiométricas, como PCR e PLS. No entanto, alguns trabalhos (SPIEGELMAN et al., 1998; LUCASIUS; KATEMAN, 1991; LUCASIUS; KATEMAN, 1993; LEARDI; GONZÁLEZ, 1998; HÖSKULDSSON, 2001) têm apontado que a seleção de variáveis pode melhorar a capacidade preditiva dos modelos, mesmo em calibrações por regressão PLS. Os benefícios da seleção de regiões espectrais vão desde a estabilidade do modelo de calibração em relação à colinearidade, como também a interpretação das relações entre o modelo e a composição da amostra (JIANG et al., 2002).

Regiões específicas do espectro infravermelho são selecionadas onde a colinearidade não é tão forte, gerando modelos mais robustos. Na prática, essa otimização de modelos de regressão multivariada, está baseada na identificação de subconjuntos dos dados completos (sub-regiões espectrais), que combinados ou não, minimizam os erros de predição (SILVA, 2007b).

Existem várias maneiras de selecionar a região espectral utilizando critérios objetivos, como por exemplo, avaliar a correlação da região selecionada com o método de referência, ou avaliar a raiz quadrada dos erros médios de previsão, e ainda utilização de algoritmos que indicam o conjunto de variáveis espectrais que poderá dar melhores resultados com base nesses dois parâmetros. Dentre os algoritmos mais empregados encontram-se os métodos heurísticos como o algoritmo genético e a busca “tatu”, ou determinísticos como, por exemplo, o método de mínimos quadrados parciais por intervalo (do inglês, *Interval Partial Least Square – iPLS*) (SILVA, 2007b).

O algoritmo iPLS é um considerado uma extensão do PLS, no qual divide-se o conjunto de dados (espectros) em um determinado número de intervalos, constrói-se o modelo PLS para cada intervalo, apresentando os resultados em um gráfico para facilitar a comparação (NORGAARD et al., 2000). Permite dessa forma, localizar o conjunto de variáveis que podem resultar nos melhores modelos, eliminando informações irrelevantes, como bandas que não contenham informação do analito de interesse, além de eliminar parte do ruído do sistema (OLIVEIRA et al., 2004).

3.2.3 Modelos de calibração

Para o estabelecimento de relações quantitativas entre o fenômeno observado (espectro) e o analito, utiliza-se a técnica de análise de regressão. A regressão tem o propósito de buscar uma função que reproduza de forma aproximada o comportamento apresentado pelo fato em estudo (HORST, 2013). Segundo a terminologia da norma ASTM 1655-05 (2012), calibração multivariada é um processo para criação de um modelo que relaciona concentrações ou propriedades de componentes à absorbâncias de um conjunto conhecido de amostras de referência, em mais de um comprimento de onda ou frequência.

Regressão por componentes principais (PCR), e mínimos quadrados parciais (PLS) constituem as principais técnicas de análise multivariada dos dados utilizados na elaboração de modelos. A aplicação da calibração multivariada apresentou avanço significativo com a utilização do método PLS, permitindo que muitos problemas de cálculo pudessem ser superados. Recentemente, com a utilização de técnicas de inteligência artificial problemas antes insolúveis mesmo por técnicas como PLS, como por exemplo, modelagens de sistemas não lineares, puderam ser suplantadas, ampliando campos de aplicação da calibração multivariada.

As técnicas de calibração multivariada, como regressão por componentes principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), consideram que o modelo é linear (LARA, 2009). Entretanto uma observação nos resíduos obtidos nesses métodos pode indicar a ocorrência de uma relação não-linear, que sugere o uso de métodos como regressão por redes neurais (RNA) (SVOZIL et al., 1997) e máquina de vetores de suporte (SVR) (CORTES; VAPNIK, 1995; THISSEN et al., 2004).

3.2.3.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

A regressão por PLS é bastante discutida na literatura (DARDENNE et al., 2000). A técnica de PLS (do inglês, *Partial Least Squares*) foi desenvolvida por Herman O. A. Wold, e é basicamente um algoritmo de regressão multivariada particular, capaz de manipular entradas correlacionadas a dados limitados. É um método de construção de equações de regressão cujo algoritmo é baseado numa extensão do algoritmo NIPALS (do inglês, *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) desenvolvido por Wold (WOLD, 1966; BRUNS; FAIGLE, 1985). Algumas referências básicas sobre o método PLS são Geladi e Kowalski (1986), Höskuldsson (1988) e Wold et al. (2001).

A utilização da regressão PLS, para construção do modelo, retira informações do conjunto de dados da matriz espectral para correlacioná-los com as informações retiradas do conjunto de dados de referência. Das combinações lineares dos dados espectrais com os dados de referência, se obtém as variáveis latentes necessárias para correlacionar os espectros e as concentrações, este método soluciona problemas de colinearidade com satisfatória habilidade de previsão. Por esse motivo, esta técnica é adequadamente aplicada em dados espectrais (MUNIZ et al., 2012).

O método PLS é atualmente o mais popular algoritmo quimiométrico para construção de modelos de calibração. Trata-se de um método linear de análise de dados capaz de modelar suave não linearidade pela escolha adequada de variáveis latentes (ALVES, 2012), o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada (*“cross validation”*), no qual o erro mínimo de previsão é buscado.

Geralmente a técnica de regressão por PLS apresenta um poder de previsão melhor que a regressão por componentes principais (PCR) (NUNES, 2008). Os algoritmos PCR e PLS são parecidos, pois ambos utilizam técnicas de decomposição espectral. No PLS, a decomposição considera a informação das concentrações das amostras de calibração, o que resulta em pesos maiores para espectros com concentrações do analito mais altas e dois conjuntos de matrizes chamados vetores e escores, uma para os dados espectrais e outra para as concentrações. Os passos de decomposição ocorrem simultaneamente e como resultado as equações do modelo são mais complexas que as de PCR (GELADI; KOWALSKI, 1986).

Existem algumas modificações no algoritmo PLS que o tornam apropriado para tratar dados não lineares: Poly-PLS e Spline-PLS (SVOZIL et al., 1997). A única diferença entre esses dois algoritmos e o PLS linear está em uma etapa, na qual a função linear é substituída por uma função polinomial (no poli-PLS) ou por uma função spline, uma junção de variáveis polinomiais lado a lado (no spline-PLS). Os cálculos implementados por tais algoritmos não lineares demandam elevado tempo de processamento, similar as redes neurais (YANG et al., 2003; BALADIN et al., 2007).

Várias estratégias têm sido utilizadas para a calibração de sistemas de dados não lineares (BALADIN et al., 2007). Os dois métodos mais importantes para esse tipo de situação são as variantes não lineares de PLS (por exemplo, PLS-poly) e redes neurais artificiais (BALADIN et al., 2008). Vários estudos comparativos sobre essas duas técnicas têm sido realizados utilizando vários conjuntos de dados. Em alguns estudos, as redes neurais apresentaram melhor desempenho do que o PLS (BALADIN et al., 2007; BALADIN et al.,

2008), enquanto em outras situações, RNA e PLS tiveram resultados equivalentes (SEKULIC et al., 1993).

Um comparativo entre o desempenho de técnicas lineares (MLR, PCR e PLS) e técnicas de calibração não lineares, PLS-poly e RNA, para predição de propriedade do biodiesel no espectro infravermelho próximo foi estudado por Baladin et al. (2011), nessa abordagem a rede neural foi mais eficiente, principalmente quando comparada com os métodos lineares (MLR, PCR e PLS).

3.2.3.2 Regressão por componentes principais (PCR)

Na técnica de PCR, a correlação (colinearidade) das informações dos espectros é eliminada, fazendo-se inicialmente a análise de componentes principais, que basicamente é uma análise de autovalores-autovetores da matriz. Cada componente principal (CP) é uma combinação linear das variáveis originais, mas os CP's são linearmente independentes, ou seja, a correlação entre as variáveis independentes é eliminada (LARA, 2009). O modelo de regressão é realizado não mais com todas as informações dos espectros, mas com um conjunto menor, os componentes principais.

O método de regressão por componentes principais utiliza as variações espectrais para calcular as equações de calibração. Como as variações mais significativas no conjunto de calibração são as mudanças no espectro relacionadas às diferentes concentrações das amostras, é possível calcular um conjunto que represente as mudanças nas absorbâncias em todo o espectro. Essas variações são conhecidas como autovetores (componentes principais ou fatores) e as constantes utilizadas para multiplicar os espectros são conhecidas como escores (pesos) (OLIVEIRA, 2006).

Uma das formas de calcular os autovetores do espectro é através do método de análise dos componentes principais (PCA). Este método foi introduzido na química na década de 1960 e consiste em um processo de simplificação dos dados, que torna possível encontrar relações entre objetos. O PCA apresenta como vantagem a detecção de outliers (amostras que não respondem bem ao modelo de calibração) e a possibilidade de classificação e predição de resultados (WOLD, 1987).

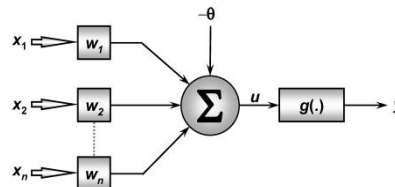
A regressão dos componentes principais (PCR) tem como principal vantagem não requerer seleção do comprimento de onda e sua desvantagem é requerer uma grande número de amostras para um modelo robusto (OLIVEIRA, 2006).

3.2.3.3 Redes neurais artificiais (RNA)

Uma rede neural artificial (RNA) é um modelo computacional baseado na arquitetura do cérebro humano, consistindo de unidades múltiplas de processamento (neurônios artificiais) conectadas por pesos adaptativos (AZEVEDO et al., 2000). Os pesos, quando treinados e ajustados, representam o aprendizado da rede. Esta ferramenta é especialmente útil em situações nas quais é difícil, ou mesmo impossível, a resolução explícita de um problema (BIGUS, 1996; HAYKIN, 2001; RUSSEL; NORVIG, 1995). As RNA são comumente utilizadas na resolução de problemas de mineração de dados, uma vez que possuem habilidade de aprender e de generalizar, gerando resultados para entradas que não existiam em seu conjunto de treinamento (BIGUS, 1996).

O primeiro modelo matemático (artificial) de neurônio foi proposto por McCulloch e Pitts (1943) (Figura 1), constituído de sete elementos básicos: 1) Sinais de entrada (x_1, x_2, \dots, x_n); 2) Pesos sinápticos (w_1, w_2, \dots, w_n); 3) Combinação linear (Σ); 4) Limiar de ativação (θ); 5) Potencial de ativação (u); 6) Função de ativação ($g(\cdot)$) e 7) Sinal de saída (y).

Figura 1 – Modelo matemático de neurônio artificial



Em 1947, Donald Hebb, desenvolveu a teoria do aprendizado neural, constatando que quanto mais correlacionadas estiverem as saídas de dois neurônios em cascata, maior deverá ser o nível ou intensidade da ligação entre eles (sinapses). Bernard Widrow (1959) desenvolveu o elemento linear Adaline, capaz de auto ajustar-se de forma a minimizar o erro entre resposta desejada e gerada pelo sistema. Em 1958, Franck Rosenblatt conclui o projeto Perceptron, que consistia numa rede formada por apenas uma camada de neurônios de saída, os quais estão conectados por pesos às entradas, sendo utilizado como um classificador de padrões (SILVA et al., 2010). Em 1969, Minsky e Papert analisaram matematicamente o Perceptron e demonstraram que redes de uma camada não são capazes de solucionar problemas que não sejam linearmente separáveis. Como não acreditavam na possibilidade de se construir um método de treinamento para redes com mais de uma camada, concluíram que as redes neurais seriam sempre suscetíveis a essa limitação (CARVALHO, 2014).

O reaquecimento das pesquisas em redes neurais surgiu com a publicação de McClelland e David Rumelhart (1986), criando as redes perceptron multicamadas (MLP, do inglês *Multi Layer Perceptron*) e o algoritmo de treinamento conhecido como *backpropagation* (HORST, 2013). Esse algoritmo mostrou que é possível treinar eficientemente redes com camadas intermediárias, resultando no modelo de redes neurais mais utilizado atualmente, a MLP treinadas com algoritmo *backpropagation*. Além das redes perceptron, Adaline e perceptron multicamadas, existe atualmente outras formas de estrutura a rede neural, como redes de funções de base radial, redes recorrentes de Hopfield, redes auto-organizáveis de Kohonen, entre outras.

O processo de treinamento da rede, também conhecido como aprendizado, consiste na modificação ordenada dos pesos, visando a minimização de uma medida de erro, também conhecida como função de custo (HAYKIN, 2001). Todo o conhecimento adquirido pela rede fica acumulado nos pesos sinápticos. Dentre as formas de treinamento, a utilizada em modelos NIR é o supervisionado, no qual são oferecidos à rede padrões de entrada e de saída desejada, oriunda do conhecimento prévio do ambiente. Esta comparação é feita por meio de uma medida de erro (GÖRGENS, 2006).

A rede neural mais popular é a backpropagation (BPNN- do inglês, *Back Propagation Neural Network*), que tem sido utilizada para muitas aplicações, como método de calibração para dados espectrais, com aprendizagem supervisionada obtendo bons resultados (LIU et al., 2008).

A entrada do BPNN pode ser componentes principais (CP) obtidos a partir a análise de componentes principais (PCA), ou ser variáveis latentes (VL) obtidas a partir de PLS. Adotar PC e VL como entrada do BPNN é uma forma eficaz de reduzir os recursos de computação e melhorar a robustez da calibração por redes neurais artificiais (JANIK et al., 2007). Comparando diferentes modelos de calibração para análise das propriedades do solo por espectroscopia no infravermelho proximal, Mouazen et al. (2010) concluíram que o modelo BPNN-VL (rede neural backpropagation – variável latente), foi mais eficiente que PCR, PLS e BPNN-PC.

Uma série de descrições da utilização de redes neurais artificiais especificamente para espectroscopia pode ser encontrada na literatura, como Liu et al. (1993), Meyer et al. (1993), Luinge et al. (1995) e Wu et al. (1996).

Para Sharda e Patil (1992), as formas funcionais dos modelos de previsão das redes neurais são mais flexíveis que os métodos estatísticos tradicionais, pois assumem que existe uma relação (conhecida ou desconhecida) subjacente entre as entradas e as saídas. Os

modelos estatísticos de previsão têm limitações na estimativa desta função subjacente devido a complexidade do sistema real, enquanto as redes neurais podem indicar métodos alternativos para identificar esta função (SOUZA; MENEZES, 2013).

A indústria de alimentos tem sido beneficiada com a utilização de redes neurais artificiais, tais como na classificação de amostras de carne bovina, possibilitando a identificação de sexo e raça dos animais através do processamento de sinais de ressonância magnética nuclear (SILVA, 2007b). Já em Nazário et al. (2009) foram utilizadas redes neurais artificiais associadas às técnicas de ultra-som objetivando a caracterização de leite líquido em termos de gordura e adulteração por adição de água.

Como desvantagem da utilização de RNA pode-se citar o maior tempo necessário para o treinamento da rede, algumas vezes são necessários milhares de ciclos para se chegar à níveis de erros aceitáveis, consumindo aproximadamente 10^3 vezes mais tempo que os modelos PCR e PLS (BALADIN et al., 2011). Resultados satisfatórios tem forte dependência da quantidade e qualidade dos dados disponíveis (KHANMOHAMMADI et al., 2009) e dificuldade de interpretação do modelo (DESPAGNE; MASSART, 1998; SVOZIL et al., 1997). Redes neurais artificiais podem ser vistas como “caixas pretas”, na qual pouco se sabe por que a rede chega a um determinado resultado, uma vez que os modelos não apresentam justificativas para suas respostas. Neste sentido, muitas pesquisas vêm sendo realizadas visando a extração de conhecimento das RNA, e na criação de procedimentos explicativos, onde se tenta justificar o comportamento da rede em determinadas situações (CARVALHO, 2014).

3.2.3.4 Máquina de vetores de suporte (SVR)

A máquina de vetores de suporte é uma ferramenta inicialmente aplicada para solucionar problemas de classificação, mas que foi estendida com sucesso para tratar problemas de quantificação (regressão multivariada), sendo bastante utilizada na engenharia, mas com aplicações escassas na área da quimiometria.

A SVR é uma adaptação do algoritmo Generalized Portrait desenvolvido nos anos sessenta (VAPNIK; LERNER, 1963), fundamentada na teoria do aprendizado estatístico ou teoria Vapnik-Chervonenkis (VAPNIK, 1982; VAPNIK, 1995; SCHOLKOPF; SMOLA, 2002; LORENA; CARVALHO, 2007). Tal algoritmo eleva a dimensionalidade dos dados (contrário aos métodos PLS e PCR que reduzem essa dimensionalidade) através da função kernel, que mapeia os pontos amostrais do espaço de entrada em um espaço de características

de elevada dimensão, através de uma transformação não linear. Nesse espaço de características de elevada dimensão, pontos amostrais não linearmente separáveis no espaço de entrada podem ser linearmente separáveis com a máxima margem de separação, e um algoritmo de separação linear pode ser utilizado para obter um modelo matemático com excelente capacidade de previsão (CHEN et al., 2004).

A ideia principal de uma máquina de vetor de suporte é construir um hiperplano como superfície de decisão de tal forma que a margem de separação entre exemplos positivos e negativos seja máxima (MARETTO, 2011). O princípio é minimizar o risco estrutural, que envolve um limite superior sobre o erro de generalização, diferente de outros métodos, como redes neurais artificiais, cujo objetivo é minimizar o risco empírico, o qual envolve a minimização dos erros sobre os dados de treinamento. Tal princípio, tem demonstrado superioridade ao princípio da minimização do risco empírico (SCHOLKOPF; SMOLA, 2002; LORENA; CARVALHO, 2007).

Modelos matemáticos com capacidade de aproximação universal, como as redes neurais artificiais, ainda não são dotadas de algoritmos de treinamento capazes de maximizar a capacidade de generalização de uma forma sistemática, o que pode levar a um sobreajuste do modelo aos dados. Como não são conhecidas as não linearidades presentes e a complexidade intrínseca do problema, os algoritmos de otimização e as ferramentas estatísticas utilizadas para seleção de modelos podem induzir a modelos com baixa capacidade de generalização, assim o SVR se torna uma poderosa alternativa para resolver problemas de classificação e calibração (MARETTO, 2011). Além disso, destaca-se pela robustez em grandes dimensões e a possibilidade de modelar relações lineares e não lineares, com elevado poder de generalização, evitando sobreajuste.

3.2.3.5 Avaliação dos modelos de calibração

Todo modelo considerado será, de alguma forma, errado (BROWNE, 2000). Essa afirmação denota que procurar pelo modelo correto é uma impossibilidade. Por isso, ao invés de procurar por esse modelo perfeito e inexistente, deve-se procurar um modelo que seja uma aproximação adequada da realidade. Essa análise pode ser feita através de índices capazes de quantificar o ajuste do modelo aos dados experimentais.

A capacidade preditiva de um modelo está relacionada com sua capacidade de estimar a variável resposta em pontos fora do conjunto de calibração, isso pode ser analisado utilizando um conjunto de dados externo ou por meio da validação cruzada. Na validação

cruzada o conjunto de dados original é dividido em conjunto de calibração e de validação. Constroi-se o modelo a partir do conjunto de calibração e utiliza-se o conjunto de validação para mensurar a performance da curva, novos subconjuntos são gerados e repete-se o procedimento, o modelo selecionado é aquele cuja soma dos erros de calibração e validação for menor. A metodologia mais utilizada para implementação do algoritmo de validação cruzada é a *leave one out*, na qual uma amostra, ao invés de um conjunto destas, é retirada por vez, em seguida, a capacidade preditiva do modelo é avaliada usando o dado removido. Teoricamente o método *leave one out* é capaz de extrair o máximo de informação e, portanto, é o melhor (LI et al., 2002). A validação cruzada também é utilizada para escolha do número de componentes principais ou variáveis latentes, baseada na avaliação da magnitude de erros de previsão de um dado modelo de calibração. O menor erro corresponderá à escolha do número ótimo de componentes principais ou variáveis latentes para o modelo de calibração.

Para avaliação da capacidade preditiva dos modelos produzidos, se faz uso de alguns parâmetros, como coeficiente de determinação (R^2), número de variáveis latentes ou de componentes principais, erro médio da calibração (RMSEC), erro médio da validação cruzada (RMSECV), erro relativo (ER) e relação de desempenho do desvio (RPD).

O coeficiente de determinação (R^2), determina o ajuste do modelo, podendo ser interpretado como a proporção da variação total da variável dependente que é explicada pela variação da variável independente. A análise do valor de R^2 , nos mostra a correlação dos pontos da curva de calibração, quanto mais próximo de 1,0 este valor, mais correlacionado estão os valores com a curva obtida (ZENI, 2005).

Segundo o tipo de validação, o erro de predição pode ser chamado de raiz quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV), quando é efetuada uma validação interna (cruzada), ou através de raiz quadrada do erro médio da predição (RMSEP), quando é utilizada uma validação externa. O RMSECV é uma medida quantitativa para determinar a exatidão em que a amostra é predita durante a validação, isto é, o quão próxima está a predição do modelo em relação à propriedade medida. O RMSECV é definido pela seguinte expressão:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2}{I}}$$

Onde, y_i é o valor medido da propriedade, \hat{y}_i é o valor calculado ou previsto da propriedade quando o modelo é construído sem a amostra i ; I é o número de amostras de calibração.

O erro relativo (ER) e a relação de desempenho do desvio (RPD) relacionam o erro padrão da validação com parâmetros oriundos dos dados de referência. Sendo o erro relativo calculado a partir da relação entre erro padrão da validação e a média dos dados de referência, e a relação de desempenho do desvio (RPD), o desvio padrão dos dados obtidos pelo método de referência e o erro padrão da validação, sendo os valores de RPD inversamente proporcional ao erro de predição, ou seja, quanto maior o valor de RPD, melhor a calibração.

Na prática NIR, o RPD pode ser considerado como índice de qualidade na validação de um modelo de calibração (CONZEN, 2006), segundo a escala:

- RPD entre 2,5 e 3 pode ser considerado como um modelo para estabelecer um rápido indicativo (*rough screening*).
- RPD > 3 pode ser considerado como um modelo apto para seleção.
- RPD > 5 pode ser considerado como um modelo para controle de qualidade.
- RPD > 8 é considerado como um modelo excelente para tarefas analíticas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA GORDURA DO LEITE

O leite é um fluido composto por uma série de nutrientes, sendo a quantidade e qualidade altamente dependentes da quantidade de tecido mamário ativo, bem como a eficiência da célula secretora na síntese dos componentes, e a disponibilidade de nutrientes adequados a partir dos quais é sintetizado. O leite de vaca contém cerca de 87% de água, 3,9% de gordura, 3,2% de proteínas, 4,6% de lactose e 0,9% de minerais e vitaminas (HARDING, 1995). O perfil de ácidos graxos da gordura do leite pode variar mediante diversos fatores, porém segundo Reis et al. (2004), o efeito da dieta das vacas em lactação é o fator que assume maior influência.

A maioria dos lipídios nos alimentos está na forma de triglicerídeos. Esse componente é formado pela união de três moléculas de ácidos graxos a uma molécula de glicerol. Os ácidos graxos podem ser classificados pelo número de carbonos e tipo de ligação entre eles. Quanto ao número de carbono, geralmente classificam-se em ácidos graxos de cadeia curta (dois a quatro átomos de carbono), média (seis a dez átomos de carbono) e longa (acima de doze átomos de carbono). Quanto ao tipo de ligação, classificam-se em saturados aqueles que apresentam apenas ligações simples entre carbonos (C-C), e insaturados os que apresentam ligação dupla (C=C), sendo que, quando apresentam uma insaturação são denominados monoinsaturados, duas ou mais poli-insaturados.

Ácidos graxos saturados encontram-se em uma conformação linear, flexível em estado de energia menor quando comparado com os ácidos graxos insaturados, que apresentam dobramentos na cadeia carbônica e uma angulação de 30° (em ligação *cis*) para cada dupla ligação presente. Este fato permite maior interação entre as moléculas de ácidos graxos saturados, e consequentemente, maior ponto de fusão (CURI et al., 2001).

A presença de ligações duplas nos ácidos graxos insaturados, permite a ocorrência de isomeria de configuração *cis* e *trans* (SOUZA e VISENTAINER, 2006). A insaturação *trans* promove aumento da linearidade da cadeia carbônica, tornando suas propriedades físicas semelhantes a dos ácidos graxos saturados (CHRISTIE, 1989), na natureza predomina a configuração *cis* (SOMMERFELD, 1983).

A gordura do leite se apresenta na forma de glóbulos envolvidos por uma membrana fosfolipídica correspondendo a uma mistura de lipídios, principalmente por triglicerídeos que compõem 98% do total da gordura do leite, seguido por diacilglicerídeos (0,25-0,48%), monoacilglicerídeos (0,02-0,4%), glicolipídios (0,06%) e ácidos graxos livres (0,1-0,4%), fosfolipídios e esteróis (SEÇKIN et al., 2005).

Dos ácidos graxos que compõem a gordura do leite em torno de 70% são saturados, 25% insaturados e 5% poli-insaturados (LaCOUNT, 1994; GRUMMER, 1991). O perfil de ácidos graxos do leite e sua variação pode ser representado pelos trabalhos apresentados na tabela 3.

Uma característica da gordura do leite é a grande proporção de ácidos graxos saturados, com cadeias de 4 a 16 carbonos, produto da síntese *de novo*, alguns destes são apontados como precursores do colesterol sanguíneo de baixa densidade (LDL), associada à ocorrência de doenças cardiovasculares (PARODI, 1999). No entanto, estudos sobre os efeitos individuais dos ácidos graxos na saúde evidenciam que apenas três ácidos graxos saturados tem propriedades de aumentar o colesterol sérico, sendo eles, láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) (SIRI-TARINO et al., 2010).

Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos no leite de pesquisas realizadas

Ácido graxo		g/100g de ácidos graxos totais			
Símbolo	Nome usual	Fuke et al (2012)	Pereira et al (2011)	Ryhänen et al. (2005)	Eifert et al. (2006)
C4:0	Ácido butírico	0,99	2,21	2,90	3,35
C6:0	Ácido caprótico	0,82	1,71	2,50	2,46
C8:0	Ácido caprílico	0,68	1,09	1,60	1,37
C10:0	Ácido cáprico	1,87	2,59	3,70	2,85
C12:0	Ácido láurico	2,57	3,22	4,20	3,28
C14:0	Ácido mirístico	10,59	11,81	12,50	11,10
C14:1	Ácido miristoléico	0,83	nc*	nc	1,52
C15:0	Ácido pentadecanóico	1,24	0,97	nc	1,68
C16:0	Ácido palmítico	32,30	35,90	30,10	33,00
C16:1	Ácido palmitoléico	1,27	1,22	nc	0,94
C17:0	Ácido margárico	0,92	0,60	nc	0,94
C18:0	Ácido esteárico	14,92	10,16	11,20	11,36
C18:1t11	Ácido vacênico	2,95	nc	1,60	nc
C18:1n9c	Ácido oléico	23,07	20,90	21,70	21,90
C18:2n6c	Ácido linoléico	1,83	0,98	1,30	2,02
C18:2n9c11t	Ácido linoléico conjugado	0,72	0,50	nc	0,55
C18:2n10t12c	Ácido linoléico conjugado	0,22	nc	nc	<0,01
C18:3n3	Ácido linolênico	0,31	0,45	0,40	nc
Σ ácidos graxos saturados		67,71	70,63	nc	nc
Σ ácidos graxos monoinsaturados		29,05	23,52	nc	nc
Σ ácidos graxos poli- insaturados		3,46	2,13	nc	nc

*nc = não consta.

A variação no perfil de ácidos graxos, a relativa quantidade de ácidos graxos saturados presente no leite, e o seu papel na obtenção de uma dieta saudável vem sendo largamente debatido (PALMQUIST et al., 2006). Apesar da presença, na gordura do leite, de ácidos graxos prejudiciais à saúde, estudos observacionais sugerem que o consumo de produtos lácteos está associado a redução do risco de doença cardiovascular (ASTRUP, 2014). Isso provavelmente está associado à presença, também, de ácidos graxos benéficos à saúde, como os poli-insaturados, oleico e o trans vacênico, este último pode ser convertido em humanos à ácido rumênico, CLA com comprovada funcionalidade e potencialidade nutracêutica (FUENTE et al., 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados (ômega 6 e ômega 3) vêm despertando grande interesse, pois apresentam diversas funções biológicas, como manutenção da integridade de células endoteliais, prevenindo aterosclerose e alterações cardiovasculares, estimulando a liberação de insulina, inibindo a vasoconstrição e agregação plaquetária, participando no desenvolvimento normal da placenta, do crescimento fetal e do desenvolvimento neuronal e participando nas funções imunomoduladoras (PERINI et al., 2010).

Ácido linoleico conjugado (CLA) corresponde a mistura de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico, em que as insaturações são conjugadas, ou seja, separadas por ligações simples entre carbonos (COLLOMB et al., 2006). Os diferentes isômeros de CLA têm distintos efeitos fisiológicos, relacionados principalmente com a inibição do crescimento de diversas células cancerígenas, estresse oxidativo e metabolismo lipídico e sua relação com a composição corporal.

O CLA t10, c12 tem sido apontado como um potente inibidor da síntese de gordura no leite e também responsável pela redistribuição na gordura do músculo, sendo capaz de diminuir a massa gorda e aumentar a massa magra, reciprocamente (FUENTE et al., 2006), melhorando o perfil lipídico sanguíneo, redução de aterosclerose, e ainda, melhora da resistência à insulina (SANTOS-ZAGO et al., 2008). Além disso, tanto o CLA t10,c12 como o CLA c9,t11 possuem efeito antiproliferativo de células cancerígenas, como as responsáveis pelo câncer mamário, de cólon, de próstata e gástrico, além de células leucêmicas, por mecanismos que envolvem controle do ciclo celular, indução de apoptose e controle do metabolismo celular (FUENTE et al., 2006).

Nos últimos anos, pesquisas vem sendo desenvolvidas com o intuito de alterar a composição lipídica do leite, tornando-a mais adequada ao consumo humano ao buscar reduzir os teores de láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0), e aumentar a concentração dos isômeros de CLA (DEWHURST et al., 2006). Sendo que, resultados consistentes vem sendo encontrados na literatura, quanto ao efeito da ingestão de pastagens, forragens conservadas e da relação volumoso:concentrado na dieta de vacas sobre o perfil de ácidos graxos no leite.

Pesquisas demonstram um aumento nas quantidades de CLA na gordura do leite de vacas em pastejo. O aumento da participação de pastagens na dieta resulta em aumento dos teores de ácido alfa linolênico, trans vacênico e rumênico, com decréscimo nos saturados que possuem entre 10 e 16 carbonos (COUVREUR et al., 2006). Esse efeito está relacionado ao elevado teor de ácido alfa linolênico na maioria das pastagens, o qual é parcialmente biohidrogenado no rúmen a ácido trans vacênico que é em parte absorvido intacto pela

corrente sanguínea, no intestino delgado, chegando a glândula mamária, onde pode ser diretamente secretado na sua forma original, ou sofrer dessaturação pela enzima delta 9 dessaturase, formando CLA. Sendo que o leite de vacas em pastejo de gramíneas de inverno é mais rico em trans vacênico do que em dietas mistas (FERLAY et al., 2006).

A utilização de forragens conservadas, como feno e silagem de milho, tem destaque em sistemas de criação em confinamento. No entanto, os processos de fenação e ensilagem causam perdas oxidativas de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente do ácido alfa linolênico (DEWHURST et al., 2006), o qual é o principal substrato para formação de ácidos trans vacênico na biohidrogenação ruminal (BARGO et al., 2006; ELGERSMA et al., 2006). Em consequência, o leite de vacas, cujo principal volumoso são forrageiras frescas, apresentam maior relação de insaturados e saturados, e maior concentração de poli-insaturados e CLA, quando comparado com o leite de vacas onde o principal volumoso disponibilizado são plantas forrageiras conservadas (ELGERSMA et al., 2006).

A relação volumoso:concentrado também influencia tanto no teor de gordura do leite como no seu perfil de ácidos graxos, sendo que mudanças significativas são observadas, principalmente quando o concentrado excede 60% da dieta (LOCK; SHINGFIELD, 2004). Nessas situações, ocorre um decréscimo da bio-hidrogenação ruminal dos ácidos graxos de cadeia longa e uma inibição na etapa final desse processo, onde os isômeros trans do 18:1 são convertidos em esteárico (18:0), o que acaba por deprimir o teor de gordura do leite com aumento dos isômeros trans do 18:1 e rumênico, e diminuição dos saturados (LOOR et al., 2005). Abaixo disso há um favorecimento do processo de bio-hidrogenação ruminal e de síntese *de novo*, aumentando os ácidos graxos de cadeia curta e os saturados, com diminuição nos isômeros trans 18:1 e do ácido rumênico (BARGO et al., 2006).

Além do fator nutricional influenciar a variação do perfil de ácidos graxos do leite (PALMQUIST, 2006), o fator genético parece também estar relacionado (SOYEURT; GENGLER, 2008; STOOP et al., 2008), indicando ser uma característica passível de seleção (FERLAY et al., 2006; ARNOULT; SOYEURT, 2009).

Observando a variabilidade do perfil de ácidos graxos do leite em função de mudanças na dieta das vacas e potencial influência genética, associado aos efeitos distintos que os ácidos graxos acima mencionados têm sobre a saúde dos consumidores, percebe-se a importância de mensurar esses compostos em alimentos de forma rápida com acurácia e precisão, no entanto, sua quantificação hoje se restringe a experimentos, uma vez que a metodologia analítica é onerosa.

3.3.1 Método analítico de referência para ácidos graxos no leite

A cromatografia gasosa (GC) tem sido o método de eleição para a análise de ácidos graxos. O método baseia-se na separação de substâncias voláteis presentes em uma determinada amostra, que distribuem-se entre duas fases, uma estacionária (coluna) e outra móvel (gás). É uma ferramenta analítica extremamente importante para a análise do perfil de ácidos graxos de fontes variadas, que prosperou principalmente após o advento das colunas capilares e de softwares analíticos.

Previamente a análise cromatográfica faz-se necessário o preparo da amostra, que incluiu a extração dos lipídios e derivatização dos ácidos graxos. A extração é uma etapa crítica, podendo ocorrer erros na análise química, assim como, contaminação ou extração inadequada do componente de interesse, o que conseqüentemente irá remeter a resultados e interpretações errôneas (TANAMATI et al., 2005). Os solventes utilizados para extração devem ser suficientemente polares para remover os lipídios das associações de membrana celular ou com lipoproteínas, sem que ocorra reação química (CHRISTIE, 1982).

Um dos procedimentos de extração mais versáteis e efetivos é a metodologia de Bligh e Dyer (1959), uma versão simplificada do procedimento proposto por Folch et al. (1957), com uso de clorofórmio e metanol. Uma das vantagens desse método é a formação de um sistema bifásico a partir das proporções de solventes adicionados durante o processo de extração. A formação desse sistema bifásico está baseada na teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes (clorofórmio/metanol/água). Como desvantagem temos a toxidez dos solventes usados e a indesejável extração de contaminantes não lipídicos da fase orgânica (CHRISTIE, 1982; HOLE; TAYLOR, 1996; SMEDES; ASKLAND, 1999; IVERSON et al., 2001; MANIRAKIZA et al., 2001). Porém, se comparado com os métodos Folch, Roese-Gootlieb e Gerber, Bligh e Dyer apresenta os melhores resultados para análise da composição de ácidos graxos do leite (TONIAL et al., 2009).

Considerando a toxidez, com riscos potenciais à saúde e ao meio ambiente, dos métodos que tem uso da mistura clorofórmio-metanol, Hara e Radin (1978) e, em seguida, Radin (1981), propuseram um método bastante simples e menos tóxico, baseado no uso de uma mistura de n-hexano-isopropanol. Além da baixa toxidez dos solventes utilizados, outros fatores devem ser levados em consideração na escolha dos solventes para a extração da fração lipídica de determinada matriz: a volatilidade, a ausência de impurezas, de natureza tóxica ou que reajam com os lipídios, a capacidade de formar um sistema de duas fases com água (para remoção dos não lipídios), o poder de extração de componentes indesejáveis (lipoproteínas,

pequenas moléculas), o poder de extração dos diferentes tipos de lipídios, a transparência na região da luz ultravioleta para subseqüentes análises espectrofotométricas ou em colunas cromatográficas e o custo para a realização dos procedimentos (HARA; RADIN, 1978).

Após a extração, faz-se necessária a conversão dos ácidos graxos em componentes que apresentem maior volatilidade, sendo ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) os derivados preferenciais, esse processo é conhecido como derivatização, o qual torna o ácido graxo menos polar e mais solúvel (FUENTE et al., 2006). A derivatização pode gerar problemas associados à preparação dos ésteres, os quais incluem: conversão incompleta; mudança na composição dos ácidos graxos durante a transesterificação; formação de artefatos que podem ser erroneamente identificados como ácidos graxos ou sobreposição com picos de ésteres metílicos de ácidos graxos na análise cromatográfica; contaminação por traços do reagente esterificante, com conseqüente dano à coluna capilar; extração incompleta de ésteres metílicos de ácidos graxos e perda de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e muito voláteis (MILINSK et al., 2008). O procedimento clássico para obtenção de EMAG são reações de saponificação, catalisadas por bases e envolvem dois processos: hidrólise e esterificação ou transesterificação (MANCINI-FILHO et al., 2007).

As primeiras análises de EMAG por cromatografia gasosa foram realizadas usando colunas empacotadas com 1 a 3 metros e diâmetro de 2-4 mm, sendo característico haver perdas de componentes com o aumento do número de carbonos e insaturação (TVRZICKÁ et al., 2002). Essas colunas foram sendo substituídas por colunas capilares por serem mais eficientes e promover resultados mais precisos devido a melhor resolução (FREEDMAN et al., 1986). As colunas capilares utilizadas atualmente, com 50 a 100 m de comprimento, permite que o número de pratos teóricos seja suficiente para promover resolução cromatográfica adequada para separar misturas complexas de EMAG (SEPPÄNEN-LAAKSO et al., 2002).

O detector de ionização de chama (FID) é o mais conveniente e usado para detecção de compostos orgânicos, em especial para análise de alimentos devido à quantidade mínima detectável de aproximadamente 10^{-12} g (para alcanos), uma resposta quase universal, faixa de linearidade ampla, simples de operar e de resposta rápida (CRASKE; BANNON, 1988). A magnitude do sinal gerado pelo DIC é proporcional ao número de átomos de carbono e hidrogênio na molécula que está sendo analisada (COLLINS et al., 2006), ou seja, é proporcional aos átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio (carbono ativo C*). Porém, existem fatores intrínsecos de uma determinada molécula de EMAG que afetam a resposta do FID, tais como, a presença de oxigênio, que diminui a resposta do FID

(COLLINS et al., 2006; HOLM, 1999), o átomo de carbono do grupo carboxilato (COO) não é ionizado apreciavelmente, durante a combustão e não é considerado carbono ativo (ACKMAN, 1972; CHRISTIE, 1994). Além disso, a existência de diferentes efeitos na combustão, entre cadeia saturada e insaturada, ocorre devido à redução de átomos de hidrogênio nas duplas ligações (ACKMAN, 1972).

Devido ao fato de os EMAG responderem diferencialmente no FID, faz-se necessário utilizar na estimativa o fator de resposta experimental (FRE) ou fator de resposta teórico (FRT), ambos são obtidos pela comparação entre o EMAG e o padrão interno (VISENTAINER; FRANCO, 2006), o qual, para alimentos, é recomendado o tricosenoato de metila (23:0) (JOSEPH; ACKMAN, 1992). O uso de padrão interno também proporciona resultados com maior exatidão e permite expressar os resultados em concentração e não em porcentagem de área (VISENTAINER, 2012). Acrescido aos fatores acima descritos, temos ainda o fator de erro (FE), o qual representa a relação entre FRE e FRT, com o objetivo de auxiliar na decisão de escolha entre qual fator utilizar no cálculo da concentração dos ácidos graxos, ou seja, quando o FE ficar próximo a unidade, utiliza-se o FRT.

A identificação dos EMAG pode ser feita através da comparação dos tempos de retenção dos constituintes da amostra com aqueles obtidos através da injeção de padrões contendo EMAG padrão. No entanto, este procedimento não é conclusivo, pois componentes diferentes podem ter o mesmo tempo de retenção (MILINSK, 2007). Dessa forma, utilizam-se alternativas para a identificação, como: adição de padrão (*spilking*), utilização de padrão secundário, métodos gráficos, uso de colunas com diferentes polaridades e índices sistêmicos de retenção. O índice de retenção de Kovats é um método que se baseia no comprimento equivalente de cadeia, sendo simples, de fácil aplicação e de baixo custo (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

Em geral, na cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), geralmente o método da normalização de área é o mais utilizado, nesse os resultados são expressos em porcentagem de área relativa (VISENTAINER; FRANCO, 2006; VISENTAINER et al., 2007; TARLEY et al., 2004). A desvantagem da normalização são as propagações de erros devido à interdependência dos resultados. Na normalização de área, todos os componentes da amostra devem ser detectados e, na ocorrência de omissão ou estimativa de um componente, a área dos demais componentes é afetada (VISENTAINER, 2012). Além disso, os resultados apresentados por este método apresentam dificuldades de interpretação e muitas vezes são publicados de forma errônea (VISENTAINER; FRANCO, 2006; AGUIAR et al., 2011). Dessa forma, sempre que possível, deve-se utilizar a

padronização interna e fatores de correção em detrimento a normalização de área, por apresentar resultados confiáveis e facilmente interpretados (VISENTAINER, 2012). Dessa forma, o cálculo da concentração dos ácidos graxos contidos em amostras de leite pode ser realizado conforme proposto por Simionato et al. (2010), que considera a área do EMAG, do padrão interno, bem como a massa do padrão adicionado a amostra, a massa da amostras, e os fatores (FRT e FRE).

A avaliação da exatidão do método cromatográfico pode ser verificada através da análise de material certificado, o qual é submetido aos mesmos procedimentos laboratoriais das amostras experimentais e calcula-se a recuperação (R) baseada na relação percentual entre o valor experimental obtido e o esperado, de acordo com o material certificado.

3.3.2 Análise do leite por espectroscopia no infravermelho proximal (NIR)

O potencial da espectroscopia no infravermelho para análise de leite já está bem fundamentada na literatura, principalmente para previsão dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e ureia (SATO et al., 1987; RODRIGUEZ-OTERO et al., 1997; LAPORTE; PAQUIN, 1999; PURNOMOADI et al., 1999; RU; GLATZ, 2000; KUKACKOVÁ et al., 2000; ÉTZION et al., 2004; NAVRÁTILOVÁ et al., 2006; BOBE et al., 2007; WU et al., 2007; WU et al., 2008; WU et al., 2008b; SARANWONG; KAWANO, 2008; AERNOUTS et al., 2011; LI et al., 2011; MELFSEN et al., 2013). Dessa maneira, sua aplicabilidade está comprovada por muitos trabalhos que relatam a previsão de componentes do leite utilizando essa ferramenta.

A espectroscopia NIR tem sido utilizada com êxito para quantificar ácidos graxos em amendoim (FOX; CRUICKSHANK, 2005), produtos cárneos (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2005, PÉREZ-JUAN et al. 2010), carne de coelho (PLA et al., 2007) e em queijo (LUCAS et al., 2008). Sendo considerada método oficial da AOCS (Cd 14d-99) para quantificação de ácidos graxos monoinsaturados trans (AOCS, 1999) por espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR/FTIR), os quais estão presentes naturalmente em gorduras vegetais e óleos hidrogenados, porém seu uso não foi extensivamente testado para matrizes complexas, como a gordura do leite. Mais recentemente foi aprovado pela AOAC o Método 2007.04 para a análise de gordura, umidade e proteína em carne e produtos cárneos, que utiliza espectrofotômetro infravermelho próximo com modelo de calibração por rede neural artificial e banco de dados associado.

Com relação a análise de ácidos graxos individuais ou grupos que compõem a gordura do leite, tanto a região do infravermelho médio (MIR) como próximo (NIR) tem sido utilizadas (SOYEURT et al., 2006; COPPA et al., 2010; SOYEURT et al., 2011; MAURICE-VAN EIJNDHOVEN et al., 2013; COPPA et al., 2014; FERRAND-CALMELS et al., 2014). De maneira geral, tem-se obtido predições mais acuradas para os ácidos graxos presentes em maiores quantidades, em comparação com os de menor concentração, isso tanto no MIR (SOYEURT et al., 2006; SOYEURT et al., 2011; RUTTEN et al., 2009) quanto no NIR (COPPA et al., 2010). Observa-se que, em sua maioria, as estimativas para ácidos graxos presentes em maior quantidade no leite ($\geq 0,1\text{g/dL}$ de leite) são altamente precisas ($R^2V > 0,80$), enquanto que os resultados para os minoritários ($< 1\text{g/dL}$ de leite) são inconsistentes.

Os estudos realizados até o presente momento têm buscado basicamente avaliar a aplicabilidade do uso do infravermelho (tanto médio como proximal) como ferramenta analítica para quantificação de ácidos graxos no leite, com enfoque nos parâmetros relacionados aos procedimentos analíticos em si, como estado físico da amostra (líquida ou sólida), modo de obtenção dos espectros (reflectância, transmitância ou transflectância), estudo da região espectral relacionadas com os ácidos graxos, forma de expressão dos dados de referência (g/100g de ácidos graxos, g/kg de leite, g/dL de leite, mg/g de lipídios), influência da conservação da amostra por congelamento. Além disso, os trabalhos sempre buscam utilizar banco de dados representativos, que abranja uma vasta gama de ácidos graxos com suas respectivas variações individuais, dando maior robustez aos modelos, uma vez que tanto a robustez como a confiabilidade e a acurácia das calibrações espectroscópicas são restritas ao intervalo de valores que compõem os dados de referência utilizados durante a calibração (WILLIAMS; NORRIS, 2001).

Apesar de ser uma ferramenta promissora, com uso consagrado para quantificar alguns constituintes do leite, a espectroscopia no infravermelho para ser eficiente precisa superar alguns obstáculos inerentes a amostras líquidas, como a interferência do alto teor de água e influência da temperatura sobre o espectro da amostra.

O leite contém cerca de 87% de água, a qual absorve fortemente a luz infravermelha (THYHOLT; ISAKSSON, 1997; FOX; McSWEENEY, 1998), dessa forma as bandas de absorção da gordura por exemplo, são em grande parte sobrepostas por bandas de absorção de água. A presença da água determina o aparecimento de dois picos dominantes e largos em 1440-1450nm e 1930-1940nm (THYHOLD; ISAKSSON, 1997; BÜNING-PFAUE, 2003) os quais são responsáveis por complicações típicas da análise (OSBORNE; FEARN, 1988).

O uso da tecnologia da liofilização ou a desidratação a frio (*freeze dry*) é um processo confiável de conservação de produtos biológicos, sendo isento de conservantes ou produtos químicos. Na liofilização o leite é congelado em temperaturas inferiores a -20°C e submetido à baixa pressão (alto vácuo), fazendo com que a água dos produtos que foi transformada em gelo, sublima, ou seja, passe diretamente do estado sólido para o gasoso. O resultado final é um produto com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituído pela simples adição de água. Dessa forma, os produtos liofilizados não sofrem alterações de tamanho, textura, cor, sabor, aroma, teor de vitaminas, sais minerais, proteínas, etc. e, quando conservados adequadamente, mesmo à temperatura ambiente, resistem intactos por muitos anos (MARTINS et al., 2011).

Outro procedimento utilizado para desidratar o leite é o DESIR (do inglês, *Dry-Extract System for Infrared*) (NÚÑEZ-SÁNCHEZ et al., 2008), que consiste basicamente em utilizar um filtro de microfibras de vidro, como Milipore, AP40 utilizado por Núñez-Sánchez et al. (2016) ou Whatman GF/A, 55m, Cat. No. 1820 055 (Whatman International Ltd, Maidston, UK) empregado por Coppa et al. (2010), impregná-lo com leite e secar a 40°C por 24 horas, após 1 hora no dessecador, os filtros são colocados em uma célula e é feita a leitura espectral no modo reflectância.

Tanto os métodos utilizados por Coppa et al., (2010) e Núñez-Sánchez et al. (2016) como a liofilização propriamente dita, são procedimentos prévios a análise de leite por NIR, que resultam em maior clareza nas informações espectrais, porém aumentam o tempo para se obter o resultado analítico, o que é uma desvantagem notável quando se pensa em utilizar essa metodologia na indústria de laticínios. Além das questões relacionadas a presença da água, outro fator que interfere negativamente na análise NIR de amostras líquidas é a temperatura da amostra sobre os dados espectrais. Espectros provenientes de músculos *longissimus dorsi* foram comparados com amostras mantidas a 5, 10, 15 e 20°C . Observou-se que as diferenças espectrais entre 5 e 10°C foram muito pequenas, no entanto, as diferenças espectrais entre as amostras a 10 e 15°C , ou entre 15 e 20°C foram significativas (MITSUMOTO et al., 2000). Essas variações espectrais foram induzidas por alterações da estrutura das ligações de hidrogênio da água devido às colisões térmicas, resultando em alteração no perfil de absorção (THYHOLT; ISAKSSON, 1997).

Tendo em vista essa influência, os trabalhos utilizam padronizar a temperatura de leitura da amostra de leite, cujos valores mais encontrados são entre 37°C e 40°C (ALBANELL et al., 1999; AERNOUTS et al., 2011; COPPA et al., 2014), com intuito de obter uma emulsão homogênea. Mudanças na temperatura afetam a intensidade das vibrações

moleculares, de modo que o espectro varia de acordo com a variação da temperatura (HANSEN et al., 2000), por isso é importante definir essa variável previamente às análises espectrométricas.

A região do infravermelho proximal tem como natureza da transição vibracional a presença do estiramento da combinação C-H (2200-2450 nm), e do seu primeiro (1650-1800 nm) e segundo sobretom (1100-1225 nm), a presença das regiões com dois picos sequencias em 1734, 1764 e 2300, 2344 nm foram relacionadas por Coppa et al. (2010), como sendo bandas de absorção de ácidos graxos, conforme definem Osborne e Fearn (1988). Além destas, as ondas curtas do infravermelho proximal (800-1050nm), a qual refere-se a região do terceiro sobretom do estiramento C-H em 930nm (SASIC; OZAKI, 2001; WU et al., 2008b; SASIC; OZAKI, 2001b), também estão relacionadas com ácidos graxos. Aernouts et al. (2011), identificaram como bandas de absorção de gordura as regiões 930 e 1690nm e de proteína em 1650 e 2160nm, apresentando resultados promissores para análise de leite in natura a partir de medições no modo reflectância.

A região de ondas curtas do NIR tem sido estudada para aplicação na análise de leite, por ter menor impacto da presença da água no espectro, uma vez que nessa faixa a energia penetra mais profundamente na amostra, produzindo menos calor que a região NIR de onda longa (1100-2500nm), de modo que o efeito de interferência da água na região curta é praticamente descartado, além disso esses equipamentos são mais baratos que os do infravermelho longo (WU et al., 2008).

A região entre 400-1100nm foi estudada por Villar et al. (2012), abrangendo a região visível (400-780nm) e as ondas curtas do infravermelho próximo (780-1100nm), obtendo bons resultados para o monitoramento do conteúdo de gordura, ácidos graxos saturados e monoinsaturados em amostras de leite, porém a quantificação de poli-insaturados não foi satisfatória. Os autores acreditam que a razão mais provável seja a baixa concentração desse agrupamento, não sendo o sensor suficientemente sensível para detectar as mudanças nessa fração.

Investigando o modo de leitura (reflectância ou transmitância) no Vis/NIR de amostras de leite in natura e a previsão da composição do leite, Aernouts et al. (2011), obtiveram as melhores estimativas para o teor de gordura utilizando a região NIR entre 1100-2500nm e espectro por transmitância, porém esse modelo não foi significativamente melhor do que os que utilizaram transmitância e todo o espectro (400-2500nm), reflectância (400-1700nm), NIR reduzido (1000-1700nm ou 1700-2500nm) com transmitância, ou NIR reduzido (1000-1700nm) com reflectância. Observou-se que a utilização de espectros de reflectância

levou a previsões muito boas para o teor de gordura do leite in natura, especialmente na região NIR entre 1000-1700nm. Isso provavelmente se deve a combinação de absorção e dispersão da luz pelos glóbulos de gordura nessa faixa espectral. Núñez-Sánchez et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes ou melhores utilizando transfectância do que o modo de reflectância, porém as amostras obtidas por reflectância foram previamente desidratadas pelo método DESIR, diferente de Aernouts et al. (2011) que utilizaram amostras líquidas.

A principal desvantagem de medidas de transmitância na região de 1000 a 2500nm é a necessidade de caminho óptico curto (0,5 a 1mm), devido a elevada absorção pela água e a forte dispersão da luz pelos glóbulos de gordura nessa faixa (LAPORTE; PAQUIN, 1999; PURNOMOADI et al., 1999; TSENKOVA et al., 1999; AERNOUTS et al., 2011).

A influência do processo de congelamento-descongelamento das amostras de leite previamente a leitura NIR, foi estudada por Coppa et al. (2014). Observou-se que a gordura do leite e suas frações proteicas separam-se da água durante o processo de congelamento e descongelamento, tornando as amostras líquidas menos homogêneas quando descongeladas. Esta separação de fases pode aumentar os fenômenos de interferência relacionados com a água e os picos de absorção de gordura no espectro NIR, reduzindo assim a fiabilidade da predição (VILLAR et al., 2012). O efeito tanto da absorção pelas moléculas químicas como o espalhamento da luz pelas partículas físicas estão interligados e não podem ser separados com precisão. Dessa maneira, uma mudança nas propriedades de dispersão de uma amostra de leite pode ser mal interpretada como sendo uma alteração na composição química do leite (MELSFEN et al., 2013). No trabalho de Coppa et al. (2014), esse efeito negativo sobre a amostra fez com que as previsões obtidas a partir do leite descongelado fossem inferiores as do leite fresco usando NIR e amostra líquida. Porém, o desempenho foi mantido se compararmos com o obtido para dados NIR com amostras secas e MIR com amostras líquidas.

Com relação a forma de expressão dos dados de referência, Rutten et al. (2009) utilizando infravermelho médio, comparou a eficácia da predição da concentração de alguns ácidos graxos individuais na forma de g/dL de leite ou g/100g de ácidos graxos, obtendo valores de R^2 para C14:0 e C16:0 de 0,94 quando expressos em g/dL, e de 0,73 para C14:0 e 0,71 para C16:0 quando expressos com base no teor de gordura (g/100g de ácidos graxos (AG)). As equações construídas com base em dados expressos em g/dL parecem conduzir a melhores resultados, isso pode ocorrer devido ao efeito combinado de prever o teor de gordura e a composição de ácidos graxos concomitantemente, assim os erros nas previsões do teor de gordura se acumulam para a previsão dos valores com base nessa informação, como

g/100g de AG (SOYEURT et al., 2011). Porém, pensando na aplicabilidade do resultado, nos países onde esse parâmetro é utilizado na elaboração do preço pago pelo leite, os ácidos graxos são expressos em g/100g de AG (BORREANI et al., 2013), uma vez que o teor de gordura ainda é incluído no cálculo do preço do leite.

É possível observar que a maioria dos trabalhos desenvolvidos nesse tema, não explora de forma mais aprofundada as diferentes possibilidades quimiométricas de análise de dados, tanto no que se refere ao uso de distintos pré-processamentos espectrais, como de modelos de calibração, onde predomina o método de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS). Tal situação foi apontada na conclusão do trabalho de Coppa et al. (2010), os quais sugerem a utilização de outros métodos de calibração que tenham capacidade para mensurar de forma satisfatória relações lineares e não lineares. Dentre essas metodologias tem-se as redes neurais artificiais e a máquina de vetores de suporte, além de algumas variações do próprio modelo PLS.

Analizando o potencial de cada uma das regiões do infravermelho estudadas para quantificar ácidos graxos no leite (MIR e NIR), observa-se que os espectrofotômetros utilizados para análise MIR são desenvolvidos especificamente para amostras líquidas, tem elevado custo, mas permite analisar um número significativo de amostras em curto espaço de tempo (até 500 amostras/h), sendo mais indicado para uso em laboratórios que realizam grande número de análises diariamente. Os equipamentos NIR, tem um potencial inferior de análise diária (cerca de 150-200 análises por dia), mas é um equipamento mais barato (relação em torno de 1:20 com o MIR) e não é configurado especificamente para um produto. Assim, o NIR pode ser utilizado em laboratórios menores, com menor número de análises diárias, e que trabalhe com outros alimentos (COPPA et al., 2014).

Além de ser uma técnica valiosa para análise rápida da composição química do leite, seu campo e aplicação no controle de qualidade vem ganhando cada vez mais espaço, com potencial aplicação para detecção de adulterantes (SANTOS et al., 2013), resíduos e conservantes em leite e derivados. A necessidade de analisar a qualidade do leite de forma rápida é um problema presente no setor leiteiro e que deve ser resolvido. Nesse contexto, a metodologia NIRS é um método conveniente de ser aplicado por inúmeras vantagens, como não ser destrutivo, ter baixo custo analítico com resultados rápidos e precisos, que permite aplicação online.

Dados espectrais oriundo do infravermelho proximal (NIR) por si só são complexos, devido às bandas de sobreposição e combinação. Já espectros de amostras líquidas são ainda mais difíceis de interpretar e de extrair informações relevantes, uma vez que esses dados

sofrem influência do elevado teor de água e, em menor escala, da temperatura da amostra. Acrescido a isto, tem-se a baixa quantidade de ácidos graxos no leite, principalmente os insaturados, e a menor sensibilidade NIR para detectar compostos minoritários. Essas características inerentes ao leite e amostras líquidas, representam os principais obstáculos a serem superados na construção de modelos de calibração, aptos para predição confiável dos ácidos graxos no leite por espectroscopia NIR.

3.4 LEITE ORGÂNICO

No Brasil, a produção de leite orgânico segue as normas definidas pela Lei 10.831 de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003), bem como a Instrução Normativa nº 46 de 06 de outubro de 2011, que estabelece o Regulamento Técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal (BRASIL, 2011), o qual teve alguns artigos alterados pela Instrução Normativa nº 17 de 18 de junho de 2014 (BRASIL, 2014), sendo semelhante aos regulamentos americano e europeu para produção orgânica. Tal regulamento determina que a propriedade deve elaborar, implementar e ter aprovado o Plano de Manejo Orgânico, no qual consta todo o manejo da produção animal, relacionado a bem-estar animal, manejo sanitário, reprodução e material de multiplicação, instalações, evolução do plantel e nutrição, incluindo plano anual de alimentação.

Com relação à alimentação a IN 46/2011 afirma que a mesma deve ser nutritiva, saudável, de qualidade e quantidade adequada, produzida na própria unidade de produção ou de outra sob manejo orgânico. No entanto, em caso de escassez ou em condições especiais, é permitido o uso de alimento não orgânico em até 15% da ingestão de matéria seca, devendo priorizar ao máximo o sistema de pastejo, sendo que forragens frescas, secas ou ensiladas, deverão constituir pelo menos 60% do total de matéria seca que compõem a dieta.

Dados oficiais sobre a produção de leite orgânico no Brasil são escassos. Estima-se que a produção tenha sido em torno de 6,8 milhões de litros no ano de 2010 (SOARES et al., 2012), o que representa 0,02% da produção de leite convencional, que naquele ano foi de aproximadamente 30,7 bilhões de litros (IBGE, 2011). Há uma tendência que essa proporção se altere nos próximos anos, principalmente a partir do momento que houver uma compensação financeira para o produtor orgânico. Essa baixa representatividade no mercado nacional se reflete na escassez de literatura que discorra sobre as características do leite orgânico produzido no país.

Em vários países, onde a produção leiteira orgânica já está consolidada, estudos mostram que o leite orgânico tem pouco ou nenhuma diferença em relação ao convencional, quando se consideram parâmetros como a composição química média do leite (TOLEDO et al., 2002). No entanto, o parâmetro mais amplamente utilizado em comparações entre leite orgânico e convencional é o perfil de ácidos graxos, com alguns trabalhos apontando para uma maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ácido linoleico conjugado (CLA) (FANTI et al., 2008; PRANDINI et al., 2009; BUTLER et al., 2011;) e ômega 3, bem como uma melhor razão n6/n3 no leite orgânico (COLLOMB et al., 2008; ELLIS et al., 2006; PRANDINI et al., 2009).

O comportamento do teor de ácidos graxos saturados é variável entre os estudos, com aparente efeito do país e das características regionais. No trabalho de Collomb et al. (2008) não houve diferença significativa entre os dois sistemas quanto ao teor de ácidos graxos saturados (AGS). O'Donnell et al. (2010) relataram valores mais elevados para todos os AGS, com exceção do C18:0, com Benbrook et al. (2013) obtendo resultados semelhantes, porém sem diferença significativa para C4:0, C10:0 e C18:0, ambos estudos foram realizados nos Estados Unidos da América. Na Inglaterra, Butler et al. (2011) obtiveram menor teor de C12:0 e C16:0 no leite orgânico. No Brasil, Fanti et al. (2008) analisaram leites pasteurizados integrais orgânicos e convencionais oriundos da cidade de São Paulo quanto ao perfil lipídico, os resultados mostram menores teores de ácidos graxos saturados e concentrações superiores (2,8 vezes maior) de CLA nos leites provenientes do sistema orgânico. Em contrapartida, Toledo et al. (2002), analisando leite cru orgânico e convencional durante um ano na Suécia, não observaram diferenças significativas entre os produtos, concluindo que os resultados podem ser diferentes entre os países ou regiões.

É provável que as variações observadas no perfil de ácidos graxos do leite orgânico e convencional esteja diretamente relacionada com a variação observada na pastagem, tanto em quantidade como em qualidade entre os sistemas, além disso há diferenças raciais nos estudos, a qual tem potencial de contribuir para as diferenças observadas, porém é impossível determinar o efeito real da raça nos estudos apresentados, mas o seu efeito não pode ser descartado.

Embora os regulamentos para produção de leite orgânico, em geral, apresentam princípios semelhantes (por exemplo, acesso a pastagem e uso de antibiótico), há uma heterogeneidade entre regulamentos, o que pode contribuir para variação na composição do leite em sistemas orgânicos de países distintos. Essas diferenças se apresentam quando se compara o perfil de ácidos graxos do leite orgânico obtido em diferentes países

(SCHWENDEL et al., 2015), isso sustenta as reivindicações de Schonfeldt et al. (2012), de que os dados sobre leite orgânico sejam específicos para cada país. O que é extremamente válido, pois por mais que os sistemas orgânicos sejam semelhantes entre os países e seus regulamentos, o que os diferencia é o sistema produtivo predominante no modo convencional, principalmente em termos de manejo nutricional das propriedades consideradas convencionais na Europa e América do Norte, pois são distintas do adotado nas propriedades convencionais predominantes no Brasil, por exemplo.

O incremento de ácidos graxos benéficos a saúde no leite orgânico, além de outros fatores relacionados ao manejo e a cultura do consumidor, tornam o produto orgânico mais valorizado no mercado. Ao mesmo tempo, com a maior valorização, aumentam as chances de ocorrerem casos de falsificação de produtos convencionais vendidos como orgânicos. Uma das formas de evitar tais situações é desenvolver ferramentas que permitam monitorar e autenticar esses produtos. Algumas técnicas laboratoriais vêm sendo desenvolvidas com esse objetivo, como análise isotópica multi-elementar, teor de ácido fitânico, de ácido alfa linolênico e de outros ácidos graxos (ácido linoleico conjugado, vacênico e ômega 3), além do perfil de triglicerídeos e compostos antioxidantes (CAPUANO et al., 2014; AONO, 2014). Entretanto, acredita-se que a autenticação dos produtos orgânicos através da mensuração de um único marcador é pouco provável, a abordagem mais promissora está relacionada com a identificação de múltiplos marcadores e/ou complexos químicos ou perfis físicos/impressões digitais, suportadas por uma análise estatística multivariada. Além disso, a quantificação desses marcadores envolve técnicas analíticas por vezes onerosas e demoradas, como espectroscopia de massas de razão isotópica, cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) pode fornecer ampla e rápida informação sobre a amostra, já sendo utilizada para prever parâmetros de qualidade em vários alimentos, porém, poucos trabalhos a utilizam para discriminar amostras. Trocino et al. (2012) investigaram o potencial do NIR para discriminar amostras de robalo orgânico e convencional pelo método SIMCA (Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classe), para amostras frescas e liofilizadas. O modelo foi parcialmente satisfatório para as amostras liofilizadas, com uma classificação de sucesso em 65% das amostras orgânicas e 72,5% das convencionais, mas não foi capaz de classificar corretamente as amostras frescas. Trabalhando com classificação de amostras de leite em pó e desnatado, Inácio et al. (2011) utilizaram espectroscopia NIR e classificação SIMCA, obtendo 100% de acerto na classificação de amostras.

Além do método SIMCA, outra ferramenta quimiométrica que vem sendo relatada com êxito na resolução de problemas biológicos é a máquina de vetores de suporte (DING; DUBCHAK, 2001). A SVM propõe resolver o problema da classificação de padrões assumindo ser possível separar as classes em um espaço de mais alta dimensão, em uma situação na qual os dados não são linearmente separáveis, sendo uma opção aos métodos paramétricos tradicionais.

4 DESENVOLVIMENTO

Os resultados desta tese de doutorado possibilitaram a confecção de dois manuscritos, conforme subdivisão:

- Perfil de ácidos graxos no leite orgânico e convencional, sazonalidade e classificação por espectroscopia infravermelha;
- Quantificação de ácidos graxos em leite in natura e liofilizado através de espectroscopia no infravermelho proximal.

4.1 MANUSCRITO I – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE ORGÂNICO E CONVENCIONAL, SAZONALIDADE E CLASSIFICAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA

Perfil de ácidos graxos no leite orgânico e convencional, sazonalidade e classificação por espectroscopia infravermelha

Resumo – Objetivou-se avaliar o perfil de ácidos graxos do leite produzido em sistema orgânico e convencional, em diferentes estações do ano, testando modelos de classificação com base no espectro infravermelho proximal (NIR). As amostras de leite foram coletadas a cada 2 meses, de julho de 2011 a maio de 2012, oriundas de 20 unidades produtoras orgânicas e 20 convencionais, localizadas na mesma região geográfica no sul do Brasil. Os ácidos graxos do leite foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID). O registro dos dados espectrais das amostras de leite in natura e liofilizado foi obtido no infravermelho proximal. Os resultados não acusaram diferença significativa entre os sistemas de produção (orgânico e convencional) quanto ao teor da maioria dos ácidos graxos, mas sim para estação do ano, decorrentes da semelhança entre as características das unidades produtoras, especialmente quanto ao manejo alimentar adotado. O uso da espectroscopia no infravermelho proximal associada a modelos quimiométricos de classificação possibilitou a diferenciação entre as amostras de leite dos diferentes sistemas, com acurácia de 80,93% para amostras liofilizadas e 59,32% para amostras in natura.

Termos para indexação: análise multivariada, qualidade, quimiometria, sistema produtivo

Fatty acid profile in organic and conventional milk, seasonality and rating infrared spectroscopy

Abstract – It was to evaluate the fatty acid profile of milk produced on organic and conventional systems in different seasons, and develop rating models based on the near infrared spectra (NIR). Milk samples were collected every two months, from July 2011 to

May 2012, coming from 20 organic and 20 conventional farms, located in the same geographic region in southern Brazil. Milk fatty acids were identified and quantified by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) in milk samples in natura and lyophilized, and the record of their NIR spectra. The results did not show significant differences between the production systems (organic and conventional) with the content of most studied fatty acids, but it was significant for the season as a result of the similarity between the characteristics of the production units, especially regarding the adopted feed management. The use of near infrared spectroscopy associated with chemometric classification models made it possible to differentiate between milk samples from different systems, with an accuracy of 80,93% for lyophilized samples and 59,23% for fresh samples.

Index terms: multivariate analysis, milk quality, chemometrics, production system

Introdução

A percepção do consumidor com relação ao leite orgânico está associada com a suposição de que este difere do produzido convencionalmente. Trabalhos vêm investigando se existe diferença entre leite orgânico e convencional, entretanto os resultados até o momento têm sido controversos, devido a gama de fatores que podem influenciar na composição do leite, e a dificuldade em se estudar as interações entre múltiplos fatores. Em consequência desses entraves, não existe evidência de que o consumo de leite orgânico apresente benefícios nutricionais significativos para a saúde humana (FORMAN et al., 2012; ZALENCKA et al., 2014), quando comparado ao consumo de leite produzido de forma convencional.

A composição do leite é influenciada por fatores individuais e ambientais. Elementos como dieta, raça, genética, manejo e estação do ano, bem como suas interações, afetam a composição do leite. O perfil de ácidos graxos do leite vem sendo tema central de diversas pesquisas, pelos efeitos desse constituinte a saúde do consumidor, e por seu perfil responder

rapidamente a mudanças na dieta dos animais. Esses estudos vêm registrando diferenças entre o leite produzido em sistema orgânico e convencional, sendo que a maioria conclui que o leite orgânico possui teores superiores de ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3 e ácido linoleico conjugado (PRANDINI et al., 2009; BUTLER et al., 2011; FANTI et al., 2008; COLLOMB et al., 2008), mas há trabalhos em que essa diferença não é observada (COLLOMB et al., 2008). Tal controvérsia se deve principalmente a forma com que o sistema convencional é caracterizado em cada país ou região. Ao mesmo tempo a estação do ano tem mostrado influência na composição do leite (HECK et al., 2009; VARGAS, 2015), relacionada principalmente à nutrição da vaca, mais especificamente, com a pastagem, tanto em quantidade como na qualidade da espécie forrageira. Existem diferenças marcantes entre os grupos de forrageiras tropicais e temperadas, que podem determinar situações distintas no ambiente ruminal, favorecendo diferentes vias metabólicas e, conseqüentemente, afetando a composição do leite (CHILLIARD et al., 2001).

O interesse por ferramentas analíticas robustas que permitam diferenciar alimentos orgânicos do convencional vem ganhando espaço, à medida que a cobrança pela procedência segura dos alimentos que ingere, aumenta por parte do consumidor. Algumas técnicas laboratoriais vêm sendo desenvolvidas, como a análise isotópica multi-elementar, teor de ácido fitânico, de ácido α -linolênico e de outros ácidos graxos (ácido linoleico conjugado, vacênico e ômega 3), além do perfil de triglicerídeos e compostos antioxidantes (CAPUANO et al., 2013; AONO, 2014). Entretanto, a autenticação dos produtos orgânicos através da mensuração de um único marcador é pouco provável, a abordagem mais promissora está relacionada com a identificação de múltiplos marcadores e/ou complexos químicos ou perfis físicos/impressões digitais, suportadas por uma análise estatística multivariada.

A espectroscopia de infravermelho baseia-se na medição do comprimento de onda e intensidade de absorção da luz infravermelha pela amostra (PUTZIG et al. 1994), sua

utilização é uma alternativa com inúmeros benefícios quando comparada às técnicas laboratoriais tradicionais, dentre eles a rapidez, método não destrutivo, baixo custo, não necessidade de reagentes, resultados de exatidão comparáveis aos de outras técnicas analíticas. Entretanto, essa técnica só tem êxito quando associada a métodos quimiométricos, dentre os quais encontram-se os métodos de classificação, que permitem identificar similaridades e diferenças nas propriedades físicas ou químicas das amostras e/ou variáveis.

O objetivo deste trabalho foi comparar o perfil de ácidos graxos do leite produzido em sistema orgânico e convencional, nas diferentes estações do ano, bem como suas interações, e desenvolver modelos de classificação para amostras de leite, de acordo com o sistema produtivo, com base no espectro infravermelho.

Material e métodos

Amostras de leite in natura foram obtidas de tanques resfriadores de 20 unidades produtoras orgânicas e 20 convencionais, localizadas na região Oeste do Estado de Santa Catarina, de clima subtropical úmido (Cfa), a uma latitude de 26°26'40"S e longitude 52°50'01"O, com altitude abaixo de 800 metros e chuvas bem distribuídas durante o ano, com média de 1500 mm anuais. As unidades produtoras de leite (UPL) de ambos os sistemas possuíam em torno de 10 vacas em lactação, com predomínio de raça pura e cruzamento entre Holandês e Jersey e produção média em torno de 10L/vaca/dia. O base alimentar de ambas propriedades é o pastejo, sendo o rotacionado predominante, com suplementação de silagem de milho e concentrado no cocho. As UPL classificadas como orgânicas foram aquelas em processo avançado de certificação (tempo mínimo de 3 anos envolvidos na atividade/conversão), bem como certificadas pelo padrão da legislação vigente na período das coletas (BRASIL, 2003) e as normas da Rede de Agroecologia Ecovida. Para cada unidade orgânica selecionada, uma unidade de produção convencional da vizinhança foi incluída na

pesquisa para obtenção dos dados comparativos. A fim de caracterizar a produção leiteira de cada sistema produtivo, foram realizadas entrevistas com questões referentes ao manejo produtivo adotado na propriedade.

As coletas foram realizadas de julho de 2011 a maio de 2012, com intervalo de dois meses entre elas. Foram coletadas amostras de aproximadamente 50 mL de leite em frascos de vidro âmbar, conservadas sob congelamento a -22°C até o momento da análise química e leitura dos espectros, quando foram descongeladas em banho-maria a 37°C e homogenizadas. Paralelamente, subamostras de aproximadamente 25 mL de leite foram liofilizadas (Terroni LS300, São Carlos, São Paulo, Brasil), passando inicialmente por congelamento em ultra-freezer (Thermo Scientific 900 series, USA) a -80°C por 48 horas, antes de serem liofilizadas. Para a determinação do perfil de ácidos graxos, realizou-se extração dos lipídios de acordo com Hara e Radin (1978) e esterificação segundo Christie (1982). Os ésteres de ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa, equipamento Agilent (6890N), equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelco SP2560 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm). A temperatura do injetor foi de 250°C e do detector de 280°C, com duração de 58 minutos/corrida. O volume de injeção foi de 1 µL com razão de *split* de 1:50. As áreas dos picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foi determinada através do software Agilent ChemStation®, versão B.04.03. A identificação dos EMAG foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos constituintes das amostras, utilizando-se mistura padrão composta de 37 EMAG (24056, Supelco® 37 Component FAME Mix) e padrão de éster metílico do ácido vacênico (C18:1n7-t11) (46905-U, trans 11-octadecenoic methyl ester) com mistura de isômeros de éster metílico do ácido rumênico (CLA, C18:2n7,c9,t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, C18:2n6,t10,c12) (05632, Linoleic acid, conjugated methyl ester). A quantificação dos ácidos graxos em mg/g de lipídios foi realizada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (T9900, Methyl tricosanoate). Os cálculos foram realizados com equação: $C \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = (A_x \times m_{23:0} \times FRT) / (A_{23:0} \times MA \times FCT)$, em que A_x é a área dos ésteres metílicos dos ácidos graxos; $A_{23:0}$, a área do padrão interno; $m_{23:0}$, a massa do padrão interno adicionado a amostra (em mg); MA , a massa da amostra (em g); FRT , o fator teórico de resposta dos ésteres

1 metílicos de ácidos graxos; FCT, o fator de conversão para expressão dos resultados em miligramas de
2 ácidos graxos por grama de lipídeos.

3 A obtenção dos espectros foi realizada em espectrômetro NIRSystem 5000 (Foss
4 NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA), acoplado ao computador com software Vision[®],
5 os dados foram obtidos no modo transfectância para amostras líquidas e reflectância para
6 sólidas, sendo os dados armazenados como $\log 1/R$ (R = reflectância). As amostras de leite in
7 natura, acondicionadas em cubetas de quartzo, com a temperatura da amostra de 37°C,
8 tiveram seus espectros obtidos em intervalos de 6nm, enquanto as amostras liofilizadas,
9 acondicionadas em células para amostras sólidas, a cada 2nm, num intervalo de 1100 a 2500
10 nm. Assim, de cada amostra de leite in natura e liofilizado se obteve um espectro composto
11 por 234 e 700 variáveis independentes, respectivamente. Cada valor foi oriundo de 32
12 varreduras e cada dado de $\log 1/R$ corresponde a média dessas varreduras.

13 Os espectros obtidos pelo software Vision[®] foram importados para os softwares
14 Unscrambler 9.7[®] Camo S.A e o Statistica 10[®] Statsoft, para análises quimiométricas e
15 estatísticas. Os dados do perfil de ácidos graxos do leite orgânico e convencional foram
16 submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, ao
17 nível de 5% de significância. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para
18 análise exploratória dos dados. Os valores espectrais foram pré-tratados por algoritmo de
19 Savitsky-Golay, empregando-se derivada de primeira ordem, polinômio de segundo grau e
20 janela de 15 pontos. Para a classificação das amostras foram construídos modelos usando a
21 metodologia SIMCA (do inglês, *Soft Independent Modelling of Class Analogy*) e SVM (do
22 inglês, *Support Vector Machines*).

Resultados e discussão

Previamente à análise do efeito do sistema produtivo e da estação do ano sobre o perfil de ácidos graxos do leite, avaliou-se a existência ou não de interação entre esses fatores. A interação entre sistema de produção e estação do ano foi significativa para oito ácidos graxos analisados: C4:0, C13:0, C18:3n6, C20:1n9c11, C18:2t10c12, C20:2n6c, C22:1n9, e para o somatório de ácido graxos de cadeia curta (C4:0, C6:0 e C8:0), cujas médias dessas variáveis estão apresentadas na Tabela 1.

O sistema produtivo, isoladamente, afetou apenas o teor de quatro ácidos graxos (C17:0, C22:0, C20:4n6 e C22:2n6c) (Tabela 2), todos minoritários, diferente do observado para a estação do ano (Tabela 3), demonstrando a importância desta na qualidade do leite produzido, uma vez que influenciou significativamente o teor da maioria dos ácidos graxos estudados.

O estudo multivariado dos dados através da análise de componentes principais (PCA) permite uma melhor visão estatística dos resultados. No gráfico de escores da PCA (Figura 1) não se observa uma separação entre as amostras de leite orgânico e convencional quanto ao perfil de ácidos graxos. Entretanto quando se considera o efeito da estação do ano (Figura 2), é possível visualizar um agrupamento distinto das amostras, principalmente no inverno e verão.

O leite orgânico não diferiu do leite convencional para a maioria dos ácidos graxos, incluindo ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ácido linoleico conjugado (C18:2c9t11) e ácidos graxos n3, resultado contrário ao de COLLOMB et al. (2008), ELLIS et al. (2006) e PRANDINI et al. (2009), no entanto, esses constituintes diferiram entre as estações do ano.

O ácido linoleico conjugado (CLA) consiste em um grupo de ácidos graxos encontrado predominantemente no leite e na carne de ruminantes (PRANDINI et al., 2007), sendo que 90% do CLA presente na gordura do leite deve-se à presença de 9-cis,11-trans (KÜHLSSEN et al., 2005), o qual tem merecido destaque por demonstrar efeitos benéficos à saúde, devido a propriedades anticarcinogênica, redutora da gordura corporal, prevenção da

1 aterosclerose, da caquexia e da diabetes (CAMPBELL et al., 2003; MATTILA-SANDHOLM
2 e SAARELA, 2003). Trabalhos apontam que o leite orgânico apresenta maior teor de CLA
3 (JAHREIS et al., 1997; BERGANO et al., 2003), justificado pela presença maior de ácidos
4 graxos poli-insaturados na dieta de animais manejados nesse sistema. No presente estudo,
5 essa diferença no teor de CLA do leite orgânico para o convencional não foi observada, mas
6 sim uma diferença significativa entre as estações do ano (Tabela 4), com menor teor no
7 outono, estação que se caracteriza pelo vazio forrageiro outonal na região sul do Brasil. Tal
8 resultado vem de encontro com a afirmação de BUTLER et al. (2008), de que a composição e
9 a qualidade nutricional do leite são afetadas pelo sistema de produção por meio de
10 mecanismos provavelmente relacionados à frequência de pastejo, à sazonalidade da forrageira
11 e à composição da dieta, porém, quando esses mecanismos são muito similares entre os
12 sistemas, essa diferença não é observada.

13 A relação n6/n3 não apresentou diferença significativa entre o leite convencional e
14 orgânico, com médias de n6/n3 de 3,36 e 3,20, respectivamente. Uma baixa relação n6/n3 é
15 benéfica para a saúde humana. Dietas ocidentais apresentam uma quantidade de n6 muito
16 elevada, o que traz consequências negativas a saúde, como doenças cardiovasculares, auto-
17 imunes e inflamatórias (SIMOPOULIS, 2002). A relação alvo n6/n3 da dieta é 1/1 ou 2/1,
18 mas mesmo uma proporção de 4/1 tem mostrado efeito benéfico em pacientes com asma e
19 diminuição da mortalidade em pacientes com infarto do miocárdio (SIMOPOULUS, 2002 e
20 2010).

21 O teor de n6/n3 no leite deve-se essencialmente aos teores de ácido linoleico
22 (C18:2n6c) e alfa linolênico (C18:3n3). Plantas forrageiras são ricas em C18:3n3, enquanto
23 que alimentos concentrados contém maiores quantidades de C18:2n6c (KHIAOSA-ARD et
24 al., 2010). Nesse sentido, é de se esperar que uma dieta à base de plantas forrageiras reflita em
25 leite com menor razão n6/n3.

Em pesquisa realizada por O'DONELL et al. (2010) nos Estados Unidos da América (EUA), a relação n6/n3 apresentou valores de 7,12 para o leite convencional e 3,24 para o orgânico. No mesmo país, BENBROOK et al. (2013) encontraram valores de 5,77 e 2,28 respectivamente. No presente estudo, essa variável não diferiu entre os sistemas produtivos, com valor médio de 3,20 para o leite orgânico e 3,36 para o convencional, demonstrando que, para a variável em questão, o leite produzido tanto na forma orgânica como convencional no sul do Brasil é muito semelhante ao produzido de forma orgânica nos EUA.

Com relação à estação do ano, houve diferença significativa para os principais ácidos graxos n6 (ácido linoleico - C18:2n6c) e n3 (α -linolênico - C18:3n3), mas essa variação não foi suficiente para causar mudança significativa na relação n6/n3, a qual apresentou valores médios de 3,77 na primavera, 2,82 no verão, 3,31 no outono e 3,16 no inverno.

A influência da estação do ano está associada, principalmente, a mudança na alimentação das vacas, mais especificamente, com a pastagem, tanto na quantidade como na qualidade da espécie forrageira. Na região em estudo, há uma diferenciação significativa nas espécies forrageiras predominantes em cada estação do ano. No inverno/primavera predominam as gramíneas temperadas, tais como aveia preta (*Avena stringosa* Schreb.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), enquanto no verão/outono predominam as gramíneas tropicais destacando-se o tifton 85 (*Cynodon dactylon* x *Cynodon nlemfuensis*), capim Sudão (*Sorghum sudanense*) e sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor*). As gramíneas de clima temperado são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido linolênico (C18:3) e linoleico (C18:2) que, em geral, totalizam mais de 70% dos ácidos graxos dessas plantas (DEWHURST et al., 2001; ELGERSMA et al., 2003), enquanto as gramíneas de clima tropical possuem menor teor de ácido linolênico, entre 15 a 40% e maior concentração de palmítico (O'KELLY e REICH, 1976). O perfil de ácidos graxos das gramíneas temperadas, com maior proporção de ácidos graxos de 18 carbonos e maior insaturação,

1 refletiu a composição de ácidos graxos do leite produzido, a qual apresentou, para esse grupo
2 de ácidos graxos, valores significativamente superiores no inverno e primavera e inferiores no
3 verão.

4 As propriedades leiteiras convencionais no sul do Brasil são muito similares as
5 orgânicas, tanto em termos de instalações, manejo de ordenha, manejo alimentar, composição
6 e genética do rebanho, isso faz com que a qualidade nutricional do leite produzido seja muito
7 semelhante. A principal diferença observada entre as unidades produtoras dos diferentes
8 sistemas refere-se a aspectos relativos ao manejo sanitário, tanto no âmbito da prevenção
9 como do tratamento das enfermidades, com a utilização de tratamentos alternativos
10 (homeopatia e/ou fitoterapia) e piqueteamento para controle de parasitas nas unidades
11 orgânicas como ação prioritária.

12 O aumento da oferta de pastagem fresca reflete o incremento de ácidos graxos
13 insaturados secretados no leite (BUTLER et al., 2008; EIFERT et al., 2006), esse fato faz com
14 que diversos trabalhos de pesquisa, realizados em países onde o sistema convencional de
15 produção de leite tem como características a alta ingestão de concentrado e manejo em
16 confinamento, ao comparar o leite produzido nesse sistema com o leite oriundo da produção
17 orgânica, com maior oferta de forragem fresca, o leite orgânico, conseqüentemente, apresenta-
18 se com maior teor de ácidos graxos poli-insaturados n3 (ELLIS et al., 2006; BUTLER et al.,
19 2008) e ácido linoleico conjugado (PRANDINI et al., 2009; COLLOMB et al., 2008).

20 Os padrões orgânicos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA
21 Organic) determinam que as vacas em produção orgânica tenham acesso a pastagem 120
22 dias/ano e devem consumir no mínimo 30% da matéria seca proveniente de pastejo, além do
23 acesso a áreas de ar livre, o que, nas propriedades estudadas nessa pesquisa, e em grande parte
24 das propriedades leiteiras do Brasil, é realizado tanto no sistema convencional como no
25 orgânico. Ou seja, o sistema produtivo caracterizado como convencional no Brasil, tem um

1 manejo alimentar muito semelhante, no que se refere a ingestão de volumoso, ao de
2 propriedades classificadas como orgânicas, por uma questão climática, geográfica, econômica
3 e cultural.

4 Devido as diferenças entre países, SCHONFELDT et al. (2012) reivindicam que esses
5 estudos sejam realizados de forma específica para cada país, uma vez que, de forma contrária
6 a isso, resultados inconstantes quanto ao perfil de ácidos graxos no leite orgânico e
7 convencional continuarão a ser debatidos, conforme revisão bibliográfica feita por
8 SCHWENDEL et al. (2015).

9 Na medida em que o comércio de leite orgânico for expandindo, testes para verificar a
10 autenticidade do produto tornam-se necessários. Pesquisas que visam diferenciar produtos
11 orgânicos dos convencionais procuram a identificação de biomarcadores, com esse objetivo
12 pesquisas com leite testaram isótopos estáveis $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (AONO, 2014; MOLKETIN,
13 2009), ácido fitânico (VETTER e SCHRÖDER, 2010), ácido α -linolênico (C18:3n3) e
14 eicosapentaenóico (C20:5n3) (MOLKENTIN e GIESEMANN, 2007) e perfil de triglicerídeos
15 (CAPUANO et al., 2013). Entretanto, a quantificação desses marcadores envolve técnicas
16 analíticas por vezes onerosas e demoradas, como espectroscopia de massas de razão isotópica,
17 cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) e cromatografia gasosa com
18 detector de ionização em chama (GC-FID). Além disso, pelo conhecimento atual sobre os
19 fatores que influenciam a presença desses compostos no leite, é pouco provável que a
20 autenticação do leite orgânico possa ser alcançada através de um único parâmetro, assim
21 como é improvável que esse marcador seja o mesmo para todos os produtos orgânicos.

22 A espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIR) pode fornecer
23 ampla e rápida informação sobre a amostra, já sendo utilizada para prever parâmetros de
24 qualidade em vários alimentos, porém, poucos trabalhos a utilizam para discriminar amostras.
25 TROCINO et al. (2012) investigaram o potencial do NIR para discriminar amostras de robalo

1 orgânico e convencional pelo método SIMCA (Modelagem Independente Flexível por
2 Analogia de Classe), para amostras frescas e liofilizadas. O modelo foi parcialmente
3 satisfatório para as amostras liofilizadas, com uma classificação de sucesso em 65% das
4 amostras orgânicas e 72,5% das convencionais, mas não foi capaz de classificar corretamente
5 as amostras frescas.

6 Antes da construção dos modelos quimiométricos de classificação das amostras,
7 realizou-se o pré-tratamento dos dados. A razão deste procedimento é que os dados espectrais
8 brutos, muitas vezes contêm variações sistemáticas ou aleatórias que não estão relacionadas
9 com a resposta de interesse. Tais variações podem ocorrer devido à instabilidade do
10 instrumento, espalhamento da luz, diferenças de comprimento do caminho óptico durante a
11 realização das medidas, falhas na varredura dos comprimentos de onda e ocorrência de ruído
12 (SIMÕES, 2008). Sendo o ajuste polinomial móvel, através do algoritmo de Savitsky-Golay
13 (1964), o utilizado com maior frequência (SAUER, 2007; RINNAN et al., 2009), considerado
14 um clássico entre os filtros de suavização de sinais analíticos.

15 Os espectros pré-tratados foram utilizados para a análise de PCA para as amostras de
16 leite in natura e liofilizado, a qual não apresentou distinção entre amostras de leite orgânico e
17 convencional no gráfico de escores, dessa forma era de se esperar que a classificação pela
18 metodologia SIMCA não fosse ter êxito, o que se confirmou. O método SIMCA é construído
19 a partir de modelos baseados em componentes principais, no qual cada classe corresponde a
20 um conjunto de treinamento, seu poder de discriminação baseia-se na não existência de
21 sobreposição entre as duas classes diferentes, situação essa que não foi observada nas
22 amostras de leite provenientes do sistema orgânico e convencional. Dessa forma a
23 classificação obtida pela metodologia SIMCA foi insatisfatória tanto para as amostras in
24 natura como liofilizadas de leite orgânico e convencional através do espectro no
25 infravermelho proximal. Em ambas as situações, mais de 80% das amostras foram

1 classificadas nas duas categorias, ou seja, o método não foi capaz de diferenciar as classes
2 (Tabela 4). Em trabalho utilizando espectroscopia NIR e classificação SIMCA, INÁCIO et al.
3 (2011) obtiveram 100% de acerto na classificação de amostras de leite em pó integral e
4 desnatado, no entanto, os dados por eles utilizados apresentavam clara distinção dos grupos
5 no gráfico de escores da PCA, situação essa não observada no presente estudo.

6 A metodologia Máquina de Vetor de Suporte (SVM) (Tabela 5) apresentou melhores
7 resultados que a SIMCA, com acurácia de 80,93% para a classificação das amostras
8 liofilizadas e 59,32% para o leite in natura. Essa performance da SVM sobre as técnicas
9 tradicionais (por exemplo, SIMCA) já vem sendo relatada na resolução de problemas
10 biológicos (DING e DUBCHAK, 2001). A SVM propõe resolver o problema da classificação
11 de padrões assumindo ser possível separar as classes em um espaço de mais alta dimensão,
12 em uma situação na qual os dados não são linearmente separáveis. Pela sua capacidade de
13 aprender em espaço não linear, através da função *kernel*, que aumenta a dimensão dos dados
14 tornando-os separáveis, a MVS apresenta-se como uma opção quando métodos paramétricos
15 não obtém êxito, sendo assim uma ferramenta apropriada para a natureza dos dados desse
16 trabalho.

17 Apesar da acurácia da classificação do leite in natura ter sido abaixo de 80%, o
18 resultado é considerado promissor, tendo em vista que, até então, o melhor resultado de
19 classificação de produtos orgânicos e convencionais utilizando NIR e alimento fresco foi de
20 TROCINO et al. (2012) com amostras de robalo, obtendo de 20-25% de acerto na
21 discriminação destas. Nesse mesmo trabalho as amostras liofilizadas também apresentaram
22 resultados melhores, confirmando a influência negativa da água na informação espectral.

23 Os resultados demonstram a importância de se aplicar pré-tratamento. Nas amostras
24 sólidas esse ganho é ainda mais evidente, com melhora de quase 20% na acurácia dos
25 modelos para as liofilizadas, sendo provável que o pré-tratamento aplicado tenha sido

eficiente em corrigir, dentre outros fatores, as variações no tamanho de partícula, comum nesse tipo de amostra.

Conclusões

O perfil de ácidos graxos, identificados como benéficos à saúde dos consumidores, incluindo poli-insaturados (PUFA), ácido linoleico conjugado (C18:2c9t11), n3 e relação n6/n3 do leite produzido de forma orgânica é semelhante ao leite produzido de forma convencional, quando as vacas em lactação são submetidas a condições de alimentação semelhantes, com pastejo e suplementação com silagem e concentrado ao longo do ano, condições predominantes de produção no sul do Brasil. Entretanto, a estação do ano, em decorrência das variações climáticas que interferem, principalmente, na quantidade e qualidade da pastagem, em ambos sistemas, promove efeitos importantes no perfil de ácidos graxos do leite produzido. Neste sentido, o teor de ácido linoleico conjugado (C18:2c9t11) do leite é superior na primavera e inferior no outono. A aplicação do infravermelho proximal e máquina de vetor de suporte (SVN) para classificação das amostras de leite em sistema orgânico e convencional é uma ferramenta promissora, superior ao método SIMCA, com acurácia de 80,93% para classificação de amostras liofilizadas e 59,32% para amostras de leite in natura.

Referências

- AONO, N.M. **Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes**. 2014. 49p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.
- BENBROOK, C.M.; BUTLER, G.; LATIF, M.A.; LEIFERT, C.; DAVIR, D.R. Organic production enhances milk nutritional quality by shifting fatty acid composition: A United State-Wide, 18-month study. **Plos One**, v.8, p.1-13, 2013.
- BERGANO, P.; FEDELE, E.; IANNIBELLI, L.; MARZILLO, G. Fat soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. **Food Chemistry**, v.82, p.625-631, 2003.
- BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 8, 24 dez. 2003.

- 1 BUTLER, G.; NIELSEN, J.H.; SLOTS, T.; SEAL, C.; EYRE, M.D.; SANDERSON, R.; LEIFERT, C.
- 2 Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional
- 3 and organic systems: seasonal variation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88,
- 4 p.1431-1441, 2008.
- 5 CAMPBELL, W.; DRAKE, M.A.; LARICK, D.K. The impact of fortification with conjugated linoleic
- 6 acids (CLA) on the quality of fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.43-51, 2003.
- 7 CAPUANO, E.; BOERRIGTER-EENLING, R.; Van der VEER, G.; Van RUTH, S.M. Analytical
- 8 authentication of organic products: an overview of markers. **Journal of the Science of Food and**
- 9 **Agriculture**, n.93, p.12-28, 2013.
- 10 CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**. 2^a ed., Oxford: Pergamon Press, p. 155-166, 1982.
- 11 COLLOMB, M.; BISIG, W.; BÜTIKOFER, U.; SIEBER, R.; BREGY, M.; ETTER, L. Fatty acid
- 12 composition on mountain milk from Switzerland: comparison of organic and integrated farming
- 13 systems. **International Dairy Journal**, v.18, p.976-982, 2008.
- 14 DEWHURST, R.J. et al. Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid
- 15 composition of grasses. **Grass and Forage Science**, v.56, p.68-74, 2001.
- 16 DING, C.H.Q.; DUBCHAK, I. Multi-class protein fold recognition using support vector machines and
- 17 neural networks. **Bioinformatics**, v.17, p.349-358, 2001.
- 18 EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LANNA, D.P.D.; TEIXEIRA, M.A.; ARCURI, P.B.; LEAO, M.I.;
- 19 OLIVEIRA, M.V.M.; VALADARES FILHO, S.C. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido
- 20 linoleico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e fontes de
- 21 carboidratos na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1829-1837, 2006.
- 22 ELGERSMA, A. et al. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial
- 23 ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. **Animal Feed Science and**
- 24 **Technology**, v.108, p.191-205, 2003.
- 25 ELLIS, K.A.; INNOCENT, G.; GROVE-WHITE, D.; CRIPPS, P.; McCLEAN, W.G.; HOWARD,
- 26 C.V.; MIHM, M. Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. **Journal of**
- 27 **Dairy Science**, v.89, p.1938-1950, 2006.
- 28 FORMAN, J. et al. Organic foods: Health and environmental advantages and disadvantages.
- 29 **Pediatrics**, v.130, p.1406-1415, 2012.
- 30 HARA, A.; HADIN, N.S. Lipid extraction of tissue of low toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**,
- 31 v.90, p.420-426, 1978.
- 32 HECK, J.M.L.; Van VALENBERG, H.J.F.; DIJKSTRA, J.; Van HOOIJDONK, A.C.M. Seasonal
- 33 variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4745-4755,
- 34 2009.
- 35 INÁCIO, M.R.C.; MOURA, M.F.V.; LIMA, K.M.G. Classification and determination of total protein
- 36 in milk powder using near infrared reflectance spectrometry and the successive projections algorithm
- 37 for variable selection. **Vibrational Spectroscopy**, v.57, p.342-345, 2011.
- 38 JAHREIS, G.; FRITSCH, J.; STEINHART, H. Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation
- 39 depending on production system. **Nutrition Research**, v.17, p.1479-1484, 1997.
- 40 KHIAOSA-ARD, R.; KLEVENHUSEN, F.; SOLIVA, C.R.; KREUZER, M.; LEIBER, F. Transfer of
- 41 linoleic and linolenic acid from feed to milk in cows fed isoenergetic diets differing in proportion and
- 42 origin of concentrates and roughages. **Journal Dairy Research**, v.77, p.331-336, 2010.
- 43 KÜHLEN, N. et al. Trans fatty acids: scientific progress and labeling. **Bulletin of the International**
- 44 **Dairy Federation**, v.393, p.1-25, 2005.
- 45 MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional dairy products**. Boca Raton: CRC Press;
- 46 Cambridge, Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 2003, 395p.

- 1 MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Differentiation of organically and conventionally produced milk
2 by stable isotope and fatty acids analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.388, p.297-305,
3 2007.
- 4 MOLKENTIN, J. Authentication of organic milk using ^{13}C and alpha-linolenic acid content of milk
5 fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.785-790, 2009.
- 6 O'DONNELL, A.M.; SPATNU, K.P.; VICINI, J.L.; BAUMAN, D.R. Survey of the fatty acid
7 composition of retail milk differing in label claims based on production management practices.
8 **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1918-1925, 2010.
- 9 O'KELLY, J.C.; REICH, H.P. The fatty-acid composition of tropical pasture. **The Journal of**
10 **Agricultural Science**, Cambridge, v. 86, p.427-429, 1976.
- 11 PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; TANSINI, G.; BROGNA, N.; PIVA, G. Different level of conjugated
12 linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20,
13 p.472-479, 2007.
- 14 PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; PIVA, G. Conjugated linoleic acid (CLA) and fatty acid composition of
15 milk, curd and Grana Padano cheese in conventional and organic farming systems. **Journal of Dairy**
16 **Research**, v.76, p.278-282, 2009.
- 17 PUTZIG, C.L.; LEUGERS, M.A.; McKELVY, M.L.; MITCHELL, G.E.; NYQUIST, R.A.;
18 PAPENFUSS, R.R. et al., Infrared spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v.66, p.26-66, 1994.
- 19 RINNAN, A.; BERG, F.V.D.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common preprocessing
20 techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, p.1201-1222, 2009.
- 21 SAUER, E. **Desenvolvimento de metodologias multivariadas para análise de queijos por**
22 **espectroscopia drift**. 2007. 134p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 23 SCHÖNFELDT, H.C.; HALL, N.G.; SMIT, L.E. The need for country specific composition data on
24 milk. **Food Research International**, v.47, p.207-209, 2012.
- 25 SCHWENDEL, B.H.; WESTER, T.J.; MOREL, P.C.H.; TAVENDALE, M.H.; DEADMAN, C.;
26 SHADBOLT, N.M.; OTTER, D.E. Invited review: Organic and conventionally produced milk – An
27 evaluation of factors influencing milk composition. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.721-746, 2015.
- 28 SIMÕES, S.S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando**
29 **espectroscopia NIRR e calibração multivariada**. 2008. 98p. Tese (Doutorado) - Universidade
30 Federal da Paraíba, João Pessoa.
- 31 SIMOPOULOS, A.P. The importance of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine &**
32 **Pharmacotherapy**, v.56, p. 365-379, 2002.
- 33 SIMOPOULOS, A. P. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. **Oilseeds & fats**
34 **crops and lipids**, v.17, p.267-275, 2010.
- 35 TROCINO, A.; XICCATO, G.; MAJOLINI, D.; TAZZOLI, M.; BERTOTTO, D. Assessing the
36 quality of organic and conventionally-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Food**
37 **Chemistry**, v.131, p.427-433, 2012.
- 38 VETTER, W.; SCHRÖDER, M. Concentrations of phytanic acid and pristanic acid are higher in
39 organic than in conventional dairy products from the German market. **Food Chemistry**, v.119, p.746-
40 752, 2010.
- 41 ZALECKA, A.; BÜGEL, S.; PAOLETTI, F.; KAHL, J. BONANNO, A.; DOSTALOVA, A.;
42 RAHMANN, G. The influence of organic production on food quality – research findings, gaps and
43 future challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p. 2600-2604, 2014.

1 **Tabela 1.** Médias das variáveis em função do sistema de produção e da estação do ano.

Sistema de produção	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
C4:0 (mg/g de lipídios)					
Orgânico	14,09 ^{a*} (1,4 ^{**})	11,74 ^{Bb} (2,1)	14,18 ^a (2,0)	15,37 ^a (1,6)	13,97 (2,1)
Convencional	15,18 (2,2)	13,35 ^A (1,9)	14,91 (2,0)	14,05 (2,4)	14,50 (2,2)
Média	14,65 (1,9)	12,51 (2,1)	14,6 (2,0)	14,68 (2,2)	
C13:0 (mg/g de lipídios)					
Orgânico	0,46 ^b (0,1)	0,68 ^{Aa} (0,2)	0,45 ^b (0,2)	0,82 ^a (0,2)	0,58 (0,2)
Convencional	0,55 ^{ab} (0,1)	0,54 ^{Bab} (0,1)	0,53 ^b (0,2)	0,71 ^a (0,2)	0,58 (0,2)
Média	0,51 (0,1)	0,61 (0,1)	0,50 (0,2)	0,76 (0,2)	
C18:3n6 (mg/g de lipídios)					
Orgânico	0,24 ^b (0,2)	1,21 ^{Aa} (0,4)	0,22 ^b (0,1)	0,22 ^{Bb} (0,1)	0,42 (0,4)
Convencional	0,42 ^{ab} (0,3)	0,47 ^{Bab} (0,9)	0,21 ^b (0,1)	0,67 ^{Aa} (0,8)	0,43 (0,5)
Média	0,33 (0,3)	0,86 (0,7)	0,22 (0,1)	0,46 (0,6)	
C20:1n9c11 (mg/g de lipídios)					
Orgânico	0,34 ^{ab} (0,1)	0,35 ^{ab} (0,1)	0,29 ^b (0,1)	0,50 ^a (0,3)	0,36 (0,2)
Convencional	0,58 ^a (0,6)	0,35 ^{ab} (0,3)	0,30 ^b (0,1)	0,34 ^{ab} (0,2)	0,38 (0,3)
Média	0,47 (0,4)	0,35 (0,2)	0,29 (0,1)	0,41 (0,3)	
C18:2t10c12 (mg/g de lipídios)					
Orgânico	0,39 ^b (0,1)	0,57 ^{Aa} (0,2)	0,34 ^{Bb} (0,1)	0,40 ^b (0,1)	0,41 (0,2)
Convencional	0,37 (0,1)	0,42 ^B (0,2)	0,42 ^A (0,1)	0,42 (0,1)	0,41 (0,2)
Média	0,38 (0,1)	0,50 (0,2)	0,38 (0,1)	0,41 (0,1)	
C20:2n6c (mg/g de lipídios)					
Orgânico	0,43 ^{bc} (0,2)	0,58 ^{Aab} (0,2)	0,39 ^{Ac} (0,1)	0,60 ^a (0,2)	0,49 (0,2)
Convencional	0,34 ^{bc} (0,1)	0,24 ^{Bc} (0,1)	0,44 ^{Bc} (0,1)	0,54 ^a (0,2)	0,41 (0,2)
Média	0,39 (0,1)	0,41 (0,2)	0,42 (0,1)	0,57 (0,2)	
C20:3n6c (mg/g de lipídios)					
Orgânico	0,56 ^b (0,2)	0,79 ^{Aa} (0,3)	0,45 ^b (0,2)	0,51 ^b (0,1)	0,55 (0,3)
Convencional	0,51 (0,2)	0,43 ^B (0,2)	0,44 (0,1)	0,49 (0,2)	0,46 (0,2)
Média	0,53 (0,2)	0,62 (0,3)	0,44 (0,1)	0,50 (0,1)	
C22:1n9 (mg/g de lipídios)					
Orgânico	0,23 (0,1)	0,37 ^A (0,1)	0,25 (0,2)	0,28 (0,1)	0,28 (0,2)
Convencional	0,25 ^{ab} (0,1)	0,16 ^{Bb} (0,1)	0,25 ^{ab} (0,1)	0,40 ^a (0,3)	0,28 (0,2)
Média	0,24 (0,1)	0,28 (0,1)	0,25 (0,2)	0,34 (0,2)	
ΣC4-C9 (mg/g de lipídios)					
Orgânico	46,00 ^{bc} (6,6)	40,32 ^c (6,5)	47,63 ^b (7,5)	54,95 ^a (7,6)	49,27 (7,7)
Convencional	48,43 ^{ab} (7,9)±	44,39 ^b (6,9)	51,15 ^a (7,8)	50,52 ^{ab} (6,9)	45,56 (8,5)
Média	47,25 (7,3)	42,29 (17,9)	49,45 (7,8)	52,62 (7,5)	

2 ^{*} Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna e por letras minúsculas
3 distintas na mesma linha diferem (p<0,05), pelo teste Tukey.

4 ^{**} \pm Erro padrão.

1 **Tabela 2.** Médias das variáveis em função do sistema produtivo.

Ácido graxo (mg/g de lipídios)	Sistema de produção	
	Orgânico	Convencional
C17:0	7,07 ^{a*} (1,2 ^{**})	6,41 ^b (1,8)
C22:0	0,81 ^a (0,2)	0,75 ^b (0,2)
C20:4n6	0,79 ^a (0,2)	0,71 ^b (0,2)
C22:2n6c	0,49 ^a (0,2)	0,40 ^b (0,7)

2 ^{*} Médias seguidas por letras distintas na mesma linha são estatisticamente diferentes de
3 acordo com o teste Tukey (p<0,05).

4 ^{**} ± Erro padrão.

6 **Tabela 3.** Médias das variáveis em função da estação do ano.

Ácido graxo	Estação do ano			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
C6:0	10,18 ^{b*} (1,4 ^{**})	9,05 ^c (1,2)	10,51 ^{ab} (1,5)	11,21 ^a (1,6)
C8:0	6,79 ^{ab} (1,1)	6,17 ^c (1,0)	7,08 ^b (1,3)	7,78 ^a (1,1)
C10:0	15,62 ^{bc} (4,1)	15,07 ^c (2,8)	17,29 ^{ab} (4,1)	18,95 ^a (3,2)
C12:0	20,11 ^b (4,1)	19,98 ^b (3,8)	21,90 ^{ab} (5,1)	23,62 ^a (3,8)
C14:0	79,81 ^b (11,2)	78,28 ^b (10,6)	84,41 ^{ab} (12,2)	87,64 ^a (10,1)
C15:0	8,96 ^b (2,5)	8,99 ^b (1,1)	8,95 ^b (1,7)	10,18 ^a (1,4)
C16:1n7	10,28 ^a (1,6)	10,37 ^a (1,4)	11,07 ^a (1,7)	9,27 ^b (1,2)
C18:0	110,79 ^a (11,9)	95,11 ^b (13,0)	111,63 ^a (20,4)	112,74 ^a (26,7)
C18:1t11	30,44 ^a (8,6)	25,37 ^b (8,4)	24,74 ^b (5,8)	28,64 ^{ab} (8,2)
C18:1n9c	162,58 ^a (18,3)	141,66 ^b (13,4)	174,53 ^a (32,9)	164,29 ^a (27,9)
C18:2n6c	12,34 ^a (4,1)	8,95 ^b (2,0)	12,05 ^a (4,9)	11,46 ^a (2,6)
C18:3n3	3,88 ^{ab} (0,8)	3,19 ^b (0,6)	3,73 ^b (0,9)	4,45 ^a (1,9)
C18:2c9t11	10,06 ^a (2,2)	8,88 ^{ab} (1,9)	8,05 ^b (1,9)	8,79 ^{ab} (2,5)
C20:4n6	0,67 ^{bc} (0,2)	0,64 ^c (0,2)	0,79 ^{ab} (0,3)	0,84 ^a (0,2)
C22:2n6c	0,39 ^{bc} (0,1)	0,54 ^a (0,2)	0,35 ^c (0,2)	0,50 ^{ab} (0,1)
C24:0	0,78 ^b (0,3)	0,73 ^b (0,3)	0,88 ^b (0,6)	1,29 ^a (0,9)
C20:5n3	0,56 ^b (0,2)	0,47 ^b (0,1)	0,51 ^b (0,2)	0,81 ^a (0,4)
C22:6n3c	0,45 ^b (0,3)	0,82 ^a (1,0)	0,30 ^b (0,2)	0,18 ^b (0,1)
Σ C10-C15	133,59 ^b (19,9)	131,72 ^b (17,7)	141,97 ^{ab} (22,3)	149,78 ^a (18,2)
Σ C16-C22:6n3	582,40 ^a (37,5)	537,02 ^b (41,4)	597,82 ^a (63,3)	590,40 ^a (63,2)
Σ Saturados	500,34 ^{ab} (43,8)	478,13 ^b (45,7)	520,04 ^a (57,2)	528,16 ^a (49,2)
Σ Insaturados	247,28 ^a (24,3)	218,36 ^b (21,1)	251,91 ^a (41,0)	245,68 ^a (37,1)
MUFA	215,27 ^a (21,6)	190,53 ^b (17,9)	222,90 ^a (37,2)	214,68 ^a (32,7)
PUFA	32,00 ^a (4,7)	27,83 ^b (4,9)	29,01 ^{ab} (6,1)	31,01 ^{ab} (5,8)
n3	4,81 ^{ab} (1,2)	4,64 ^b (1,3)	4,60 ^b (1,1)	5,62 ^a (2,0)

7 ^{*} Médias seguidas por letras distintas na mesma linha são estatisticamente diferentes de
8 acordo com o teste Tukey (p<0,05).

9 ^{**} Erro padrão.

Tabela 4. Performance da análise SIMCA do espectro pré-tratado NIR de amostras de leite orgânico e convencional

	Classificação correta (%)	Classificação nas duas classes (%)	Classificação errada (%)	Não classificado (%)
Leite in natura				
Orgânico	-	95,9	-	4,1
Convencional	10,4	84,4	5,2	-
Leite liofilizado				
Orgânico	4,4	93,5	-	2,1
Convencional	2,5	95,0	-	2,5

Tabela 5. Parâmetros e acurácia das SVM obtidas, para classificação das amostras de leite de acordo com o sistema produtivo

Variáveis usadas	C*	Gama	Acurácia (%)			
			Treino	Teste	Validação	Total
Leite in natura						
Espectro bruto	9	0,004	54,84	57,41	39,52	55,62
Espectro bruto pré-tratado**	10	0,004	60,61	55,56	45,45	59,32
Leite liofilizado						
Espectro bruto	6	0,001	61,90	43,40	61,90	55,91
Espectro bruto pré-tratado**	1	0,001	80,75	81,48	80,74	80,93

* Capacidade.

** Algoritmo de Savitsky-Golay, 1ª derivada, polinômio de 2º grau, janela de 15 pontos.

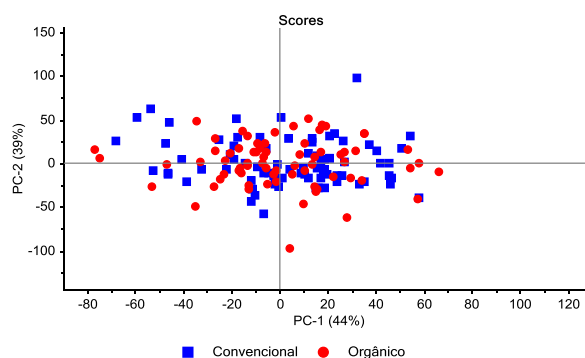


Figura 1. Projeções bidimensionais da análise de componentes principais mostrando a relação entre o perfil de ácidos graxos e o sistema produtivo.

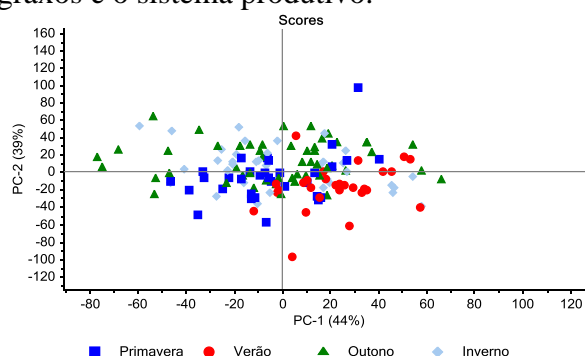


Figura 2. Projeções bidimensionais da análise de componentes principais mostrando a relação entre o perfil de ácidos graxos e a estação do ano.

4.2 MANUSCRITO II – QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM LEITE IN NATURA E LIOFILIZADO ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PROXIMAL

Quantificação de ácidos graxos em leite in natura e liofilizado através de espectroscopia no infravermelho proximal

Resumo –Objetivou-se avaliar o desempenho de diferentes modelos de calibração multivariada para quantificação de ácidos graxos em amostras de leite in natura e liofilizado, com base no espectro infravermelho proximal (NIR). As amostras foram coletadas de tanques de resfriamento (n = 286) e individuais das vacas (n = 135), provenientes de distintos níveis tecnológicos, sistemas produtivos, estações do ano e experimentos que induziram a variação no perfil de ácidos graxos no leite, totalizando 421 amostras. Como método de referência empregou-se a cromatografia gasosa (GC/FID), enquanto os registros dos espectros foram realizados na faixa de 1100 a 2500 nm. Os modelos de calibração testados foram: regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS), regressão por componentes principais (PCR), máquinas de vetores de suporte (SVR) e redes neurais artificiais (RNA). A seleção de comprimentos de onda através do iPLS melhorou a predição do modelo em relação ao uso do espectro inteiro. Dos modelos lineares o PCR apresentou os piores resultados em comparação ao PLS e iPLS. Entre os não lineares destacou-se a rede neural artificial, com resultados superiores aos demais modelos. O teor de água interferiu no desempenho dos modelos, com resultados significativamente superiores com amostras liofilizadas

Termos para indexação: calibração multivariada, qualidade lipídica, quimiometria, NIR

Quantification of fatty acid in milk samples in natura and lyophilized by NIR spectroscopy

Abstract – It was aimed to evaluate the performance of different models of multivariate calibration for quantification of fatty acids in milk samples in natura and lyophilized, based on

1 near infrared spectrum (NIR). The samples were collected from cooling tanks (n = 286) and
2 individual cows (n = 135) from different technological levels, production systems, season and
3 experiments that led to changes in the fatty acid profile in milk, totaling 421 samples. As
4 reference method was employed gas chromatography (GC/FID) while recording the spectra
5 was performed in the range of 1100 to 2500 nm. The calibration models testes were: partial
6 least squares regression (PLS), interval partial last squares (iPLS), principal component
7 regression (PCR), support vector machines (SVR) and artificial neural network (RNA). The
8 selection of wavelengths through iPLS improved prediction model regarding the use of the
9 full spectrum. Linear models PCR showed the worst results compared to PLS and iPLS.
10 Among the non-linear pointed to artificial neural network, with better results than other
11 models. The water content interfere with the performance of the models with significantly
12 superior results with lyophilized samples.

13 Index terms: chemometrics, lipid quality, multivariate calibration, NIR

14

15 **Introdução**

16 A cromatografia gasosa (GC) vem sendo usada como método de referência para
17 identificação e quantificação de ácidos graxos, que requer a prévia preparação da amostra,
18 num processo que envolve a extração e metilação da gordura para posterior separação,
19 interpretação do cromatograma com identificação de picos e áreas referentes a cada analito.
20 Esse processo demanda tempo, destrói a amostra, necessita da utilização de solventes
21 químicos gerando resíduos laboratoriais e apresenta custo elevado. A espectroscopia no
22 infravermelho proximal (NIRS, do inglês *Near Infrared Reflectance Spectroscopy*), vem
23 sendo usada como alternativa a metodologias tradicionais na análise de alimentos, por ser
24 uma técnica mais rápida, não destrutiva, multiparamétrica, dispensando, muitas vezes, o
25 preparo de amostras e com redução considerável na geração de resíduos. Estudos tem

demonstrado a capacidade desse método na quantificação de ácidos graxos em alimentos (STEFANOV et al., 2013; INÁCIO et al., 2011; COPPA et al., 2010; LUCAS et al., 2008), sendo considerada metodologia oficial da AOAC (do inglês, *Association of Official Analytical Chemistry*) para a quantificação de alguns constituintes em gordura vegetal, carnes e produtos cárneos (AOAC Cd 14d-99 e Método 2007-04).

O emprego da espectroscopia no infravermelho com auxílio de ferramentas quimiométricas para quantificação da composição centesimal em amostras de leite foi mostrado em trabalhos de WU e colaboradores (WU et al., 2007; WU et al., 2008; Wu et al., 2008b), todos com resultados satisfatórios. Com relação a ácidos graxos do leite, bons resultados vem sendo relatados, principalmente para aqueles que apresentam de média a alta concentração, como caprílico (C8), cáprico (C10), palmítico (C16), esteárico (C18) e oleico (C18:1n9c) (COPPA et al., 2010). Entretanto, para determinados ácidos graxos, principalmente aqueles presentes em baixas quantidades, as estimativas ainda não são satisfatórias, indicando a necessidade de maiores estudos, principalmente envolvendo métodos de estimativa diferenciados.

A análise de amostras de leite in natura possuem agravantes para seu estudo por infravermelho proximal que dificultam a construção de modelos precisos, sendo eles a temperatura da amostra e o teor de água. Mudanças da temperatura afetam a intensidade da vibração das ligações moleculares, alterando o espectro (HANSEN et al., 2000), enquanto com a presença de água tem-se dois picos dominantes e largos em 1440 e 1930nm, responsáveis por complicações típicas da análise (BÜNING-PFAUE, 2003). Desta forma, para reduzir interferentes, as alternativas seriam padronizar a temperatura da leitura de amostras de leite in natura e reduzir o teor de água da amostra, sem alterar seus constituintes, o que pode ser alcançado pelo processo de liofilização.

1 Entre as ferramentas quimiométricas disponíveis para análises de dados NIR, os
2 métodos paramétricos e dentre eles a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do
3 inglês, *Partial Least Squares*) e a regressão por componentes principais (PCR, do inglês
4 *Principal Component Regression*) são os mais utilizados. A regressão por mínimos quadrados
5 parciais é uma das principais técnicas de análise multivariada encontradas na literatura,
6 ganhando espaço dos modelos de regressão múltipla, por ser mais adequada para analisar
7 dados com alto grau de colinearidade, ruído e alto número de variáveis independentes, como é
8 o caso dos dados NIR. Além disso, para sua otimização podem ser selecionados sub-
9 conjuntos de variáveis com maior grau de interesse por um algoritmo conhecido como iPLS
10 (do inglês, *Interval Partial Least Squares*) que, em geral, supera o PLS em termos de
11 predição, devido a remoção das partes do espectro que não estão relacionadas com o analito
12 de interesse (PEREIRA et al., 2008).

13 Os métodos lineares são os mais utilizados nos processos de calibração. No entanto,
14 modelos testados para quantificação de ácidos graxos no leite demonstram uma tendência
15 para não-linearidade (COPPA et al., 2010). Dessa forma, é importante testar outros métodos,
16 que sejam capazes de combinar relações lineares e não-lineares, buscando melhorar a acurácia
17 da previsão. Dentre os modelos com capacidade de modelar relações não-lineares tem-se as
18 redes neurais artificiais (RNA) e regressão por máquinas de vetores de suporte (SVR, do
19 inglês, *Support Vector Regression*).

20 Objetivou-se avaliar o potencial da espectroscopia no infravermelho proximal para
21 predição de ácidos graxos do leite in natura e liofilizado através de diferentes ferramentas
22 quimiométricas.

Material e métodos

O banco de dados foi composto por 421 amostras de leite in natura, sendo 286 oriundas de tanques de resfriamento das unidades produtoras e 135 amostras individuais de vacas. As amostras individuais foram provenientes de experimentos que induziram a variabilidade na composição de ácidos graxos do leite, através da inclusão de óleo de girassol, grão de arroz integral e suplementação com ácidos graxos de cadeia média. As amostras provenientes de tanques de resfriamento de leite foram obtidas de unidades produtoras, com distintos níveis tecnológicos (altamente especializado, especializado, semi-especializado e não-especializado) e sistema produtivo (orgânico e convencional), distribuídas nas quatro estações do ano. Todas amostras, após coletadas, foram armazenadas a -22°C.

Das 421 amostras, 215 foram liofilizadas (Terroni LS300, São Carlos, São Paulo, Brasil), sendo 135 provenientes de amostras individuais e 80 de tanques de resfriamento. Anterior a liofilização as amostras foram mantidas em ultra-freezer (Thermo Fisher Scientific, model 906, USA) por no mínimo 48 horas a -80°C.

Previamente as análises laboratoriais, as amostras de leite in natura foram descongeladas e mantidas em banho-maria a 37°C sob agitação. Subamostras foram direcionadas a leitura NIR e quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa.

A extração da fração lipídica seguiu as metodologias propostas por Hara e Hadin (1978) (n= 252) e Bligh e Dyer (1959) (n= 169). Os ácidos graxos foram transesterificados e metilados de acordo com Christie (1982).

A análise cromatográfica foi conduzida em cromatógrafo a gás (GC) Agilent Technologies®, modelo 6890 Plus, equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor automático Agilent Technologies®, modelo G4513A e coluna capilar de sílica fundida (Supelco® SP-2560, 100 m x 0,25 mm x 0,20 µm). A rampa de temperatura utilizada foi: 60°C por 1 minuto (min), seguido de aumento de 15°C min⁻¹ até atingir 170°C, mantendo-se por 15

1 minutos, seguido por um incremento de $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 185°C , conservando-se por 6 minutos,
2 seguindo a ascendência de temperatura em $6^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até atingir 210°C , mantendo em
3 isoterma por 9 minutos e, finalizando com acréscimo de $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até atingir a temperatura
4 final de 240°C , que manteve-se por 8 minutos. O tempo total da análise foi de 57,50 minutos
5 à uma pressão de 40 psi. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas em 250°C . A
6 vazão de gases foi de $1,0\text{ mL min}^{-1}$ para o gás de arraste (N_2), 45 mL min^{-1} para o make-up
7 (N_2) e 30 e 300 mL min^{-1} para o hidrogênio e o ar sintético da chama, respectivamente. O
8 volume injetado foi de $1\text{ }\mu\text{L}$ com razão split de 1:50. As áreas dos picos dos ésteres metílicos
9 de ácidos graxos (EMAG) foi determinada através do software Agilent ChemStation[®], versão
10 B.04.03. A identificação dos EMAG foi realizada pela comparação dos tempos de retenção
11 dos constituintes das amostras, utilizando-se mistura padrão composta de 37 EMAG (24056,
12 Supelco[®] 37 Component FAME Mix) e padrão de éster metílico do ácido vacênico (C18:1n7-
13 t11) (46905-U, trans 11-octadecenoic methyl ester) com mistura de isômeros de éster metílico
14 do ácido rumênico (CLA, C18:2n7,c9,t11) e ácido t10,c12 -octadecadienoico (CLA,
15 C18:2n6,t10,c12) (05632, Linoleic acid, conjugated methyl ester). A quantificação dos ácidos
16 graxos em mg/g de lipídios foi realizada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila
17 (T9900, Methyl tricosanoate). Os cálculos foram realizados com equação: $\text{C (mg g}^{-1}) = (\text{Ax} \times$
18 $\text{m23:0} \times \text{FRT})/(\text{A23:0} \times \text{MA} \times \text{FCT})$, em que Ax é a área dos ésteres metílicos dos ácidos
19 graxos; A23:0, a área do padrão interno; m23:0, a massa do padrão interno adicionado a
20 amostra (em mg); MA, a massa da amostra (em g); FRT, o fator teórico de resposta dos
21 ésteres metílicos de ácidos graxos; FCT, o fator de conversão para expressão dos resultados
22 em miligramas de ácidos graxos por grama de lipídeos.

23 A análise espectroscópica foi realizada em espectrofotômetro NIRSystem 5000 (Foss
24 NIRSystem[®] Inc., Silver Spring, MD, USA), acoplado ao computador com software Vision[®].
25 A leitura dos espectros foi realizada no modo transflectância para amostras líquidas e

reflectância para sólidas, sendo os dados armazenados como $\log 1/R$ (R = reflectância). As amostras de leite in natura foram acondicionadas em cubetas de quartzo, e seus espectros obtidos em intervalos de 6 nm, enquanto as amostras liofilizadas, acondicionadas em células de 4 mm, com leituras a cada 2 nm, ambas numa amplitude de 1100 a 2500 nm. Dessa forma, de cada amostras (in natura e liofilizada) obteve-se um espectro composto por 234 e 700 variáveis independentes, respectivamente. Cada valor foi oriundo de 32 varreduras e cada dado de $\log 1/R$ corresponde a média desses valores.

Os espectros obtidos no software Vision[®] foram importados e analisados nos seguintes programas: Unscrambler[®] 9.7 (Camo S.A.); Statistica[®] 10 (Statsoft); Matlab[®] 8.6 (R2015b) (The Mathworks, Natick, EUA), com emprego dos pacotes PLS Toolbox 8.0 Demo e Neural Network Toolbox 8.4 Demo.

Os espectros brutos passaram por pré-tratamentos usando-se duas transformações, a primeira correspondente a variação padrão normal (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*), seguida do algoritmo de Savitzky-Golay (1ª derivada, polinômio de 2º ordem, janela de 15 pontos). As amostras *outliers* foram identificadas por leverage extremo ($H>3$), através da norma ASTM E1655-05, considerando *outlier* 3,8% das amostras de leite in natura e 1,8% das liofilizadas.

As curvas de calibração foram construídas para as amostras líquidas e sólidas de 22 ácidos graxos e 6 agrupamentos destes, utilizando cinco algoritmos, sendo eles: regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), mínimos quadrados parciais por intervalo (iPLS), regressão por componentes principais (PCR), máquinas de vetores de suporte (SVR) e regressão por redes neurais artificiais (RNA), totalizando 280 curvas de calibração. Para validação dos modelos utilizou-se a validação cruzada (*leave-one-out cross validation*). Para definir a quantidade de variáveis latentes (VL) ou componentes principais, calculou-se o erro padrão da validação cruzada (RMSECV, do inglês *Root Mean Standard Error Cross*

1 *Validation*), sendo o número de VL mais adequado aquele cujo valor de RMSECV fosse
2 mínimo. Esse valor é sugerido pelo programa estatístico Unscrambler®, o qual adiciona um
3 pequeno fator de punição a cada variável latente adicionada ao modelo.

4 Previamente a regressão multivariada por rede neural artificial fez-se a redução da
5 dimensionalidade dos dados por PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), sendo que o
6 sinal de entrada da rede são os escores dos componentes principais (PC – *Principal*
7 *Components*), que explicam 99% da variância da matriz original dos espectros. A arquitetura
8 utilizada foi do tipo múltiplas camadas com retropropagação (*feedforward backpropagation*
9 *network*), utilizando a heurística de Levenberg-Marquardt para otimização dos pesos da rede,
10 com função de transferência sigmoideal na camada intermediária e função linear na saída.
11 Optou-se por utilizar uma única camada intermediária com 5 neurônios. As amostras foram
12 divididas em conjunto de teste, treinamento e validação. O conjunto de treinamento recebeu
13 50% do total de amostras existentes, sendo o restante separado de forma igualitária para teste
14 e validação. O subconjunto com os dados de validação foi utilizado durante a fase de
15 treinamento da rede, já o subconjunto de teste é apresentado à rede apenas na fase final, para
16 averiguar a capacidade de generalização da rede. As amostras foram fornecidas a rede de
17 forma aleatória, para estimular a aprendizagem sem ser influenciada por um padrão
18 sequencial (BOÇOIS, 2012). Como critério de parada utilizou-se como parâmetros o número
19 de iterações/épocas (máximo 1000), o erro mínimo ($\leq 1E-07$), tempo máximo (infinito), testes
20 de validação cruzada (10 falhas consecutivas) e gradiente mínimo ($\leq 1E-07$). Todo o processo
21 de treinamento e teste foi desenvolvido e realizado em computador dotado de processador
22 Intel ® Core™ i5-3320M, com 16 GB de memória RAM.

23 Os parâmetros estatísticos utilizados para caracterizar os modelos obtidos foram: raiz
24 quadrada do erro médio da validação cruzada (RMSECV (do inglês, *Root Mean Standard*
25 *Error of Cross Validation*); coeficiente de determinação da validação cruzada (R^2V); Erro

relativo (ER (%), relação entre erro padrão da validação cruzada e a média dos dados referênciados); e a relação de desempenho do desvio (RPD (do inglês, *Residual Prediction Derivation*), calculada a partir da relação entre o RMSECV e o desvio padrão dos valores de referência. Para avaliar e comparar o desempenho dos modelos utilizou-se a análise de variância (ANOVA).

Resultados e discussão

O perfil de ácidos graxos das amostras de leite in natura e liofilizadas que compuseram o banco de dados é apresentado na Tabela 1. A variabilidade nos teores de ácidos graxos das amostras do presente estudo foi maior que o observado por SOYEURT et al. (2006), porém semelhante a base de dados utilizada por COPPA et al. (2010), SOYEURT et al. (2011) e ANDUEZA et al. (2013). A variabilidade deve-se a diferente origem das amostras (individuais e de tanques de resfriamento, sistemas produtivos, localização geográfica, estação do ano e dietas) que contribuíram para a significativa representatividade do banco de dados do presente estudo.

A absorbância média de espectros NIR para leite in natura e liofilizado está apresentada na Figura 1. O espectro no infravermelho proximal das amostras de leite in natura (Figura 1a) é típico de uma mistura complexa, com informações de diversos grupos funcionais, cujos sinais analíticos apresentam-se sobrepostos e com máximas em 1196nm, 1450 nm e 1940 nm, que são características do espectro da água (OSBORNE e FEARN, 1988). No espectro das amostras liofilizadas (Figura 1b), a banda da água livre parece desaparecer, restando apenas traço de absorção detectável, o que permite a visualização de picos até então sombreados.

A presença de duas regiões com dois picos sequenciais em 1734, 1764 e 2300, 2344 nm foram relacionadas por COPPA et al. (2010), como sendo bandas de absorção de ácidos

1 graxos, conforme definem OSBORNE e FEARN (1988). Tais bandas são visíveis no espectro
2 de amostras liofilizadas, sendo que tem como natureza da transição vibracional a presença do
3 estiramento da combinação C-H (2200-2450 nm), e do seu primeiro (1650-1800 nm) e
4 segundo (1100-1225 nm) sobretom. O gráfico da Figura 2 apresenta a frequência com que as
5 regiões espectrais foram selecionados por iPLS para predição dos ácidos graxos estudados.
6 Observa-se que o algoritmo foi capaz de selecionar as regiões já relatadas na literatura como
7 relacionadas a gordura do leite, como o primeiro (1650-1800 nm) e segundo (1100-1225 nm)
8 sobretom do estiramento C-H (OSBORNE e FEARN, 1988; WILLIAMS, 2001; WESTAD et
9 al., 2008). Reduzindo a participação dos comprimentos de onda relacionados a proteína e
10 água, com destaque para a baixa representatividade dada a região entre 2000-2200nm
11 (estiramento da combinação N-H, O-H) nas amostras in natura, e, como era esperado, a região
12 espectral entre 1940-1968nm das amostras liofilizadas, que relaciona-se a água.

13 Os resultados expressos nas Tabelas 2, 3 e 4 mostram que, em geral, os modelos para
14 amostras liofilizadas são mais acurados do que para amostras de leite in natura, tendo em vista
15 que as propriedades da água presente nas amostras líquidas interfere na análise por
16 espectroscopia no infravermelho (THYHOLT e ISAKSON, 1997), consequentemente, a
17 remoção da água levou a uma quantificação mais acurada.

18 Dos métodos lineares (PLS, iPLS e PCR), o pior desempenho foi da PCR
19 desenvolvido para amostras in natura. A PCR reduz a matriz de dados considerando somente
20 a informação das variáveis espectrais, sem interessar a relação destas com o valor obtido pelo
21 método de referência, a qual deve existir. Dessa forma, sua performance foi inferior a PLS, a
22 qual utiliza também a informação de referência, maximizando dessa maneira sua relação com
23 as variáveis latentes calculadas, tornando a técnica mais eficiente quando comparada a PCR.

24 Dos modelos lineares o iPLS apresentou destaque, com R^2V superior ao PLS e PCR.
25 O iPLS é uma extensão do PLS (NORGAARD et al., 2000), sendo um dos algoritmos

determinísticos de seleção de variáveis mais utilizado. Estudos anteriores (LEARDI et al., 1992; SPIELGELMAN et al., 1998) já sugeriam que a seleção de comprimento de onda antes da regressão PLS pode melhorar as equações de calibração e proporcionar bons resultados em diversas situações. Há evidências tanto teóricas (XU e SCHECHTER, 1996; SPIEGELMAN et al., 1998) como experimentais (SPIEGELMAN et al., 1998), indicando que a escolha das regiões espectrais pode melhorar significativamente a eficiência da técnica de calibração. Analisando os resultados do modelo empregando toda a região espectral (PLS) e partes do espectro (iPLS), observa-se que com a seleção das variáveis espectrais houve melhora significativa nos valores de R^2V (0,18 vs 0,28), além de permitir o uso de maior número de variáveis latentes (5,36 vs 12,03) a serem usadas na regressão. No entanto, a escolha de muitas variáveis latentes predispõe a existência de redundância de dados, causando sobreajuste (*overfitting*) do modelo, da mesma forma que um número insuficiente de variáveis latentes causará subajuste (*underfitting*). Para evitar ambas as situações, utilizou-se para definição do número ótimo de fatores a análise da curva de variância residual da validação, acrescida de um fator de punição para cada fator adicionado ao modelo, o que resulta em maior confiabilidade dos resultados.

Observa-se na Figura 2 que as regiões selecionadas pelo algoritmo iPLS são as mesmas relatadas na literatura como provenientes de ácidos graxos, isso justifica o melhor desempenho desse modelo em relação aos com espectro inteiro. A utilização do espectro inteiro acaba por mascarar a informação, tornando o modelo incapaz de capturar variabilidade importante dos dados.

A máquina de vetores de suporte realiza um mapeamento não linear dos dados originais do espaço de entrada para o espaço de elevada dimensão, dessa forma amostras que não podem ser linearmente separadas em um espaço 2D, podem ser separadas por um hiperplano linear de maneira efetiva. A função kernel é a responsável por transformar o

1 espaço de entrada em um espaço característico de alta dimensão onde a solução do problema
2 pode ser representada como sendo linear (LI et al., 2009). O algoritmo SVR foi utilizado por
3 ALVES (2012), em dados de espectroscopia NIR de óleo diesel para obtenção de modelos de
4 calibração para determinação dos parâmetros ponto de fulgor e número de cetano, obtendo
5 uma redução de, aproximadamente, 47% no erro médio de predição em relação ao valor
6 obtido por PLS para o ponto de fulgor, e 20% para o número de cetano. No presente trabalho
7 a metodologia SVR teve desempenho abaixo do esperado, não apresentando melhora na
8 performance do modelo em comparação aos demais.

9 A rede neural tem como principal propriedade a capacidade de aprender a partir do
10 meio e de aperfeiçoar o seu desempenho por meio da aprendizagem. A rede neural aprende a
11 respeito do seu ambiente por meio de um processo iterativo de ajustes aplicados a seus pesos
12 sinápticos e níveis de bias, com o intuito de minimizar gradativamente o erro quadrático
13 médio. Esses ajustes fazem com que a rede torne-se mais instruída sobre seu ambiente após
14 cada iteração do processo de aprendizagem (HAYKIN, 2001; MENDES, 2008).

15 A metodologia utilizada, nesse trabalho, para otimização dos pesos da rede foi o
16 algoritmo Levenberg-Marquardt, a qual é uma variação dos métodos de Gauss Newton e
17 Gradiente Descendente, cujo objetivo é minimizar funções não lineares, proporcionando uma
18 boa relação entre a velocidade do método Gauss-Newton e a garantia de convergência do
19 método do gradiente descendente (OLIVEIRA, 2013). Tal metodologia proporcionou a
20 construção do modelo com estimativas mais acuradas, em especial nas amostras liofilizadas,
21 com valores de RPD e R²V significativamente superiores aos demais. Os resultados mostram
22 o potencial da rede neural do tipo *Multi-layer Perceptron* (MLP) com aprendizagem do tipo
23 *Backpropagation* e heurísticas de Levenberg-Marquardt para quantificação de ácidos graxos
24 no leite mediante análise do espectro infravermelho das amostras.

Nas pesquisas recentes a composição de ácidos graxos em alimentos é prevista usando espectros MIR com regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). COPPA et al. (2010), utilizando NIRS (400 a 2498nm) em leite relatou previsões caracterizadas por R^2CV superiores a 0,80 para os níveis de C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18:1 cis 9; C18:1 trans11, enquanto que LUCAS et al. (2008), utilizando NIRS em amostras de queijo, relatou resultado semelhante, com exceção do C6 e C12, em ambas pesquisas o modelo utilizado foi PLS.

No presente estudo, com uma base de dados distinta a de outras pesquisas desenvolvidas até o presente momento, os melhores resultados foram obtidos com modelos RNA construídos para amostras liofilizadas, os quais tiveram R^2V médio de 0,64 e RPD médio de 1,81, sendo estatisticamente superior aos demais (Tabela 5). Para as amostras in natura o desempenho da RNA foi inferior, com R^2V médio de 0,26 e RPD médio 1,04, nessas condições a RNA não diferiu dos modelos PLS e iPLS.

Os destaques foram os agrupamentos de ômega 6, saturados e insaturados. O modelo RNA para quantificar ômega 6 em amostras liofilizadas obteve R^2V de 0,90 e RPD = 2,8. Para esse mesmo analito, COPPA et al. (2010) obtiveram modelos com R^2CV de 0,39 e RPD de 0,20 para amostras secas, SOYEURT et al. (2011) utilizando MIR e comparando seis pré-tratamentos com aplicação de PLS, obtiveram para todas as simulações $RPD \leq 1,8$ e R^2CV abaixo de 0,70 para quantificar ácidos graxos ômega 6 no leite.

Os modelos obtidos para o somatório de ácidos graxos saturados e de insaturados que, apesar de apresentar R^2V de 0,51 e 0,67, teve erro relativo baixo, 6,5% e 11,7%, respectivamente. Resultados satisfatórios também vêm sendo obtidos para quantificação desses analitos, COPPA et al. (2010) e ANDUEZA et al. (2013) obtiveram erros relativos abaixo de 10%, com R^2CV acima de 0,90, para ambos agrupamentos.

Com relação aos ácidos graxos individuais, destacaram-se os ácidos graxos saturados C14, C16 e C18, os quais apresentaram erros relativos abaixo de 20% para todos os modelos

1 testados para amostras liofilizadas, com exceção do PCR (ER = 20,4%). Os melhores
2 resultados foram obtidos por RNA, com R^2 de 0,43, 0,75 e 0,75 e ER de 13,3%, 12,7% e
3 12,3%, respectivamente. Boas predições para esses ácidos graxos também foram obtidas por
4 SOYEURT et al. (2006) utilizando ácidos graxos expressos em g dl^{-1} em amostras de leite, e
5 por GONZÁLEZ-MARTÍN et al. (2005) em amostras de carne bovina. Trabalhando com leite
6 de ovelha e utilizando NIR (400 a 2498nm), ANDUEZA et al. (2013) obtiveram R^2 CV de
7 0,76, 0,81 e 0,79 com ER de 14,3%, 8,1% e 22,2% para C14, C16 e C18, respectivamente,
8 semelhantes aos obtidos no presente estudo.

9 O mesmo foi observado para outros ácidos graxos, dentre eles o oleico, com erro
10 relativo abaixo de 20% para todos os modelos testados, com melhor resultado obtido pelo
11 modelo RNA para amostras liofilizadas (ER = 11,8%, R^2 V = 0,77 e RPD = 1,9). Para esse
12 mesmo ácido graxos, COPPA et al. (2010) obtiveram um modelo com ER de 8%, R^2 de 0,92 e
13 RPD de 3,83, enquanto ANDUEZA et al. (2013) observaram ER de 11,4%, R^2 de 0,90 e RPD
14 de 3,12. Nota-se que apesar do R^2 representar o ajuste do modelo, representando o quanto a
15 variável dependente consegue ser explicada pelos regressores, ele não deve ser analisado
16 isoladamente, é preciso considerar outros parâmetros, dentre eles o erro relativo, e nesse
17 parâmetro os modelos desenvolvidos nesse estudo apresentaram valores aceitáveis para
18 alguns analitos, dentre eles o oleico.

19 Com relação a quantificação dos isômeros do ácido linoleico conjugado, os resultados
20 do presente estudo ainda estão aquém do desejado, com erros relativos em torno de 50%, com
21 exceção do C18:2n7-t10,c12 predito pelo modelo RNA das amostras liofilizadas, o qual
22 apresentou ER de 27,8% e RPD 1,6, resultado similar ao obtido por Núñez-Sánchez et al.
23 (2016), o qual apresentou ER de 37,5% e RPD 1,7, trabalhando na faixa espectral de 400 a
24 2500 nm.

Conclusões

A espectroscopia no infravermelho proximal, com leituras na faixa de 1100 a 2500 nm, possibilita desenvolver modelos de predição de ácidos graxos em leite para somatório de saturados, insaturados, monoinsaturados, poli-insaturados, ômega 6 e ômega 3, bem como para os ácidos graxos individuais C14 (láurico), C16 (palmítico), C18 (esteárico) e C18:1 (oleico). A predição do perfil de ácidos graxos no leite através de redes neurais artificiais apresenta resultados significativamente superiores aos demais modelos, demonstrando o potencial dessa metodologia para modelar dados espectrais. Os modelos estudados apresentam predição significativamente superior para amostras de leite liofilizado.

Referências

- ALVES, J.C.L. **Máquina de vetores de suporte aplicada a dados de espectroscopia NIR de combustíveis e lubrificantes para o desenvolvimento de modelos de regressão e classificação**. 2012. 247p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- ANDUEZA, D.; ROUEL, J.; CHILLIARD, Y., LEROUX C.; FERLAY, A. Prediction of the goat milk fatty acids by near infrared reflectance spectroscopy. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.115, p.612-620, 2013.
- BOÇOIS, A. **Diagnóstico de doenças dermatológicas usando a rede neural de Kohonen**. 2012. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BÜNING-PFAUE, H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.82, p.107-115, 2003.
- COPPA, M.; FERLAY, A.; LEROUX, C.; JESTIN, C.; CHILLIARD, Y.; MARTIN, B. Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.20, p.182-189, 2010.
- GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; ALVAREZ-GARCÍA, N.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.M. On-line determination of fatty acid composition in intramuscular fat of Iberian pork loin by NIRS with a remote reflectance fibre optic probe. **Meat Science**, v.69, p.243-248, 2005.
- HANSEN, W.G.; WIEDEMANN, S.C.C.; SNIEDER, M.; WORTEL, V.A.I. Tolerance of near infrared calibrations to temperature variations; a practical evaluation. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.8, p.125-132, 2000.
- HAYKIN, S. **Redes neurais: princípios e prática**. Porto Alegre, Ed. Bookman, 2001. 900p.
- INÁCIO, M.R.C.; MOURA, M.F.V.; LIMA, K.M.G. Classification and determination of total protein in milk powder using near infrared reflectance spectrometry and the successive projections algorithm for variable selection. **Vibration Spectroscopy**, v.57, p.342-345, 2011.

- 1 LEARDI, R.; BOGGIA, R.; TERRILE, M. Genetic algorithm as a strategy for feature
2 selection. **Journal of Chemometrics**, v.6, p.267-281, 1992.
- 3 LI, H.; LIANG, Y.; XU, Q. Support vector machines and its application in
4 chemistry. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.95, p.188-198, 2009.
- 5 LUCAS, A.; ANDUEZA, D.; FERLAY, A.; MARTIN, B. Prediction of fatty acids of fresh
6 and freeze-dried cheeses by visible-near-infrared reflectance spectroscopy. **International**
7 **Dairy Journal**, v.18, p.595-604, 2008.
- 8 MENDES, K.B. **O uso de redes neurais artificiais no diagnóstico preditivo dos tipos mais**
9 **frequentes de cefaleia**. 2008. 92p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
10 Curitiba.
- 11 NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J.P.; MUNCK, L.;
12 ENGELSEN, S.B. Interval partial least-squares regression (iPLS): A comparative
13 chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**,
14 v.54, p.413-419, 2000.
- 15 OLIVEIRA, A.A. **Identificação de madeiras utilizando a espectrometria no**
16 **infravermelho próximo e redes neurais com a heurística de Levemberg-Marquardt**.
17 2013. 146p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 18 OSBORNE, B.G.; FEARN, T. **Near infrared spectroscopy in food analysis**. New York:
19 Longman Scientific & Technical, 1988.
- 20 PEREIRA, A.F.C.; PONTES, M.J.C.; NETO, F.F.G.; SANTOS, S.R.B.; GALVÃO, R.K.H.;
21 ARAÚJO, M.C.U. NIR spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils
22 using iPLS and variable selection. **Food Research International**, v.41, p.341-348, 2008.
- 23 SOYEURT, H.; DARDENNE, P.; DEHARENG, F.; LOGNAY, G.; VESELKO, D.;
24 MARLIER, M.; BERTOZZI, C.; MAYERES, P.; GENGLER, N. Estimating fatty acid
25 content in cow milk using mid-infrared spectrometry. **Journal Dairy Science**, v.89, p.3690-
26 3695, 2006.
- 27 SOYEURT, H.; DEHARENG, F.; GENGLER, N.; McPARLAND, S.; WALL, E.; BERRY,
28 D.P.; COFFEY, M.; DARDENNE, P. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids
29 across multiple breeds, production systems, and countries. **Journal of Dairy Science**, v.94,
30 p.1657-1667, 2011.
- 31 SPIEGELMAN, C.H.; McSHANE, M.J.; GOETZ, M.J.; MOTAMED, M.; YUE, Q.L.;
32 COTÉ, G.L. Theoretical justification of wavelength selection in PLS calibration:
33 Development of a new algorithm. **Analytical Chemistry**, v.70, p.35-44, 1998.
- 34 STEFANOV, I.; BAETEN, V.; ABBAS, O.; VLAEMINCK, B.; DE BAETS, B.; FIEVEZ, V.
35 Evaluation of FT-NIR and ATR-FTIR spectroscopy techniques for determination of minor
36 odd- and branched-chain saturated and *trans* unsaturated milk fatty acids. **Journal of**
37 **Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.3403-3413, 2013.
- 38 WESTAD, F.; SCHMIDT, A.; KERMIT, M. Incorporating chemical band-assignment in near
39 infrared spectroscopy regression models. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.16,
40 p.265-273, 2008.
- 41 WILLIAMS, P. Implementation of near-infrared technology. In: WILLIAMS, P.C.; NORRIS,
42 K.H. **Near-infrared technology in the agricultural and food industries**, St Paul, Minnesot:
43 AACC Inc., 2001.
- 44 WU, D.; FENG, S.; HE, Y. Infrared spectroscopy technique for the nondestructive
45 measurement of fat content in milk powder. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.3613-3619,
46 2007.

- 1 WU, D.; HE, Y.; FENG, S. Short-wave near-infrared spectroscopy analysis of major
2 compounds in milk powder and wavelength assignment. **Analytica Chimica Acta**, v.610,
3 p.232-242, 2008.
- 4 WU, D. et al. Study on infrared spectroscopy technique for fast measurement of protein
5 content in milk powder based on LS-SVM. **Journal of Food Engineering**, v.84, 2008b.
- 6 XU, L.; SCHECHTER, I. Wavelength selection for simultaneous spectroscopic
7 analysis. Experimental and theoretical study. **Analytica Chemistry**, v.68, 2392-2400, 1996.

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos (mg g⁻¹) das amostras de leite in natura e liofilizadas, determinado por cromatografia gasosa

Ácido graxo	Amplitude	Média	DP	CV (%)	Intervalo	Média	DP	CV (%)
	In natura				Liofilizadas			
C4:0 (ácido butírico)	6,97-31,71	16,15	4,13	25,57	6,97-31,71	15,52	4,53	29,19
C6:0 (ácido capróico)	5,79-21,17	11,55	2,61	22,60	5,79-21,17	11,35	3,16	27,84
C8:0 (ácido caprílico)	3,97-14,61	7,67	1,84	24,08	3,97-14,61	7,78	2,20	28,28
C10:0 (ácido cáprico)	10,26-37,15	18,30	4,16	22,70	10,26-37,15	19,12	5,85	30,60
C12:0 (ácido láurico)	10,07-48,25	22,59	6,12	27,09	11,69-48,25	23,96	6,98	29,13
C14:0 (ácido mirístico)	42,75-123,56	80,01	13,84	17,30	47,19-123,56	81,17	13,84	17,05
C16:0 (ácido palmítico)	127,08-415,25	223,25	34,28	15,40	122,28-415,25	223,27	47,06	21,08
C16:1n7-c9 (ácido palmitoleico)	3,85-17,71	10,43	2,40	23,01	3,85-15,52	9,95	2,49	25,02
C17:0 (ácido margárico)	3,40-14,78	6,08	1,17	19,20	3,40-14,78	6,04	1,48	24,50
C18:0 (ácido esteárico)	46,37-151,24	97,43	22,21	22,80	46,37-151,24	94,14	23,91	25,40
C18:1n9-t9 (ácido elaídico)	1,23-16,43	3,16	1,45	45,9	1,23-16,43	3,95	2,78	70,38
C18:1n7-t11 (ácido trans vacênico)	6,71-131,98	24,25	12,91	53,20	6,71-131,98	31,23	27,00	86,45
C18:1n9-c9 (ácido oleico)	66,58-283,83	151,32	32,98	21,79	66,58-256,91	144,88	33,04	22,80
C18:2n6-t9t12 (ácido linolelaídico)	0,40-3,39	1,32	0,58	43,80	0,40-3,39	1,42	0,94	66,20
C18:2n6-c9,c12 (ácido linoleico)	0,06-39,07	12,70	6,49	53,50	6,19-39,07	17,37	8,05	46,34
C20:0 (ácido araquídico)	0,56-2,11	1,32	0,33	25,00	0,56-2,11	1,25	0,36	28,80
C18:3n3-c9,c12,c15 (ácido α -linolênico)	1,21-6,38	3,38	0,99	29,3	1,21-5,63	3,37	0,75	22,25
C18:2n7-c9,t11 (ácido rumênico)	0,28-35,58	7,61	3,31	43,50	0,28-35,58	8,30	6,11	73,61
C18:2n6-t10,c12 (ácido t10,c12-octadecadienoico)	0,04-1,38	0,35	0,11	31,40	0,04-1,38	0,36	0,16	44,40
C22:0 (ácido beênico)	0,05-1,46	0,61	0,22	36,10	0,05-1,46	0,60	0,24	40,00
C20:3n3 (ácido dihomo- α -linoleico)	0,06-2,83	0,47	0,47	95,74	0,06-2,83	0,65	0,50	76,92
C20:4n6-c5,c8,c11,c14 (ácido araquidônico)	0,33-1,98	0,79	0,30	38,00	0,33-1,98	0,89	0,40	44,94
Σ saturados	315,61-656,40	498,47	59,74	12,00	315,61-656,40	496,24	66,57	13,41
Σ insaturados	94,29-458,40	327,76	59,35	18,10	94,29-352,01	229,12	57,61	25,14
Σ monoinsaturados	86,10-298,93	201,66	36,13	17,90	86,10-298,93	194,05	45,67	23,53
Σ poli-insaturados	6,58-62,82	28,66	8,20	28,60	6,58-62,82	31,12	12,69	40,78
Σ ômega-3	1,66-7,81	4,20	1,30	31,00	1,66-6,86	3,97	1,07	26,95
Σ ômega-6	1,34-39,99	14,02	6,53	46,60	1,34-39,99	16,26	9,70	59,65

Tabela 2. Parâmetros estatísticos dos modelos para predição dos ácidos graxos saturados em amostras de leite in natura e liofilizada.

		PLS					iPLS					PCR					SVR				RNA			
		RMSECV	R ² V	VL	RPD	ER (%)	RMSECV	R ² V	VL	RPD	ER (%)	RMSECV	R ² V	CP	RPD	ER(%)	RMSECV	R ²	RPD	ER(%)	RMSECV	R ²	RPD	ER (%)
C4:0	In natura	4,31	0,22	8	0,9	26,7	3,55	0,38	14	1,2	22,0	3,75	0,18	5	1,1	23,2	3,78	0,23	1,1	23,4	3,17	0,40	1,3	19,6
	Liofilizado	3,25	0,49	8	1,4	20,9	3,17	0,51	10	1,4	20,4	3,38	0,44	11	1,3	21,8	3,38	0,44	1,3	21,8	2,81	0,56	1,6	18,1
C6:0	In natura	2,19	0,29	7	1,2	19,0	2,30	0,22	7	1,1	19,9	2,56	0,25	6	1,0	22,2	2,24	0,27	1,2	19,4	2,54	0,29	1,0	22,0
	Liofilizado	2,29	0,47	7	1,4	20,2	2,17	0,53	7	1,5	19,1	2,19	0,51	11	1,4	19,3	2,23	0,51	1,4	19,6	2,18	0,53	1,4	19,2
C8:0	In natura	1,44	0,47	11	1,3	18,8	1,51	0,33	14	1,2	19,7	1,67	0,18	3	1,1	21,8	1,62	0,23	1,1	21,1	1,46	0,37	1,3	19,0
	Liofilizado	1,54	0,51	7	1,4	19,8	1,75	0,37	7	1,3	22,5	1,55	0,50	11	1,4	19,9	1,58	0,49	1,4	20,3	1,20	0,77	1,8	15,4
C10:0	In natura	4,18	0,40	11	1,0	22,8	4,00	0,45	13	1,0	21,9	4,35	0,21	6	1,0	23,8	4,53	0,30	0,9	24,8	4,51	0,31	1,2	24,6
	Liofilizado	4,25	0,47	7	1,4	22,2	4,01	0,53	8	1,5	21,0	4,23	0,48	12	1,4	22,1	4,39	0,45	1,3	23,0	4,38	0,45	1,3	22,9
C12:0	In natura	5,23	0,36	12	1,2	23,2	5,25	0,36	10	1,2	23,2	5,46	0,20	6	1,1	24,2	5,41	0,28	1,1	23,9	5,64	0,19	1,1	25,0
	Liofilizado	5,06	0,48	9	1,4	21,1	4,64	0,56	13	1,5	19,4	5,20	0,45	12	1,3	21,7	5,38	0,42	1,3	22,5	3,64	0,78	1,9	15,2
C14:0	In natura	13,07	0,11	5	1,0	16,3	12,33	0,18	9	1,1	15,4	13,13	0,10	6	1,0	16,4	13,12	0,10	1,0	16,4	14,03	0,08	1,0	17,5
	Liofilizado	11,65	0,30	10	1,2	14,4	11,09	0,36	7	1,2	13,7	11,56	0,31	12	1,2	14,2	12,05	0,24	1,1	14,8	10,82	0,43	1,3	13,3
C16:0	In natura	40,36	0,11	4	0,8	18,1	38,75	0,18	13	0,9	17,4	40,04	0,12	6	0,9	17,9	40,7	0,10	0,8	18,2	41,73	0,08	0,8	18,7
	Liofilizado	33,03	0,51	10	1,4	14,8	33,43	0,49	7	1,4	15,0	35,90	0,42	8	1,3	16,1	35,88	0,42	1,3	16,1	28,42	0,75	1,7	12,7
C17:0	In natura	1,37	0,11	4	0,8	22,5	1,34	0,16	10	0,9	22,0	1,36	0,13	6	0,9	22,4	1,34	0,15	0,9	22,0	1,1	0,58	1,1	18,1
	Liofilizado	1,36	0,16	1	1,1	22,5	1,36	0,15	3	1,1	15,9	1,35	0,17	2	1,1	22,4	1,32	0,20	1,1	21,9	1,1	0,58	1,3	18,2
C18:0	In natura	23,35	0,11	2	1,1	24,0	23,27	0,12	3	1,0	23,9	23,14	0,13	4	1,0	23,8	22,78	0,15	1,0	23,4	23,98	0,03	0,9	24,6
	Liofilizado	15,96	0,56	10	1,5	17,0	14,95	0,61	17	1,6	15,9	19,2	0,36	9	1,2	20,4	17,49	0,47	1,4	18,6	11,57	0,75	2,1	12,3
C20:0	In natura	0,35	0,16	5	0,9	26,5	0,32	0,30	16	1,0	24,2	0,38	0,02	1	0,9	28,8	0,37	0,08	0,9	28,0	0,39	0,05	0,8	29,5
	Liofilizado	0,28	0,37	6	1,3	22,4	0,25	0,51	16	1,4	20,0	0,29	0,34	9	1,2	23,2	0,28	0,38	1,3	22,4	0,20	0,55	1,8	16,0
C22:0	In natura	0,23	0,11	3	1,0	37,7	0,21	0,31	15	1,0	34,4	0,23	0,09	4	1,0	37,7	0,22	0,16	1,0	36,1	0,21	0,30	1,0	34,4
	Liofilizado	0,17	0,46	8	1,4	28,3	0,18	0,45	11	1,3	30,0	0,19	0,39	9	1,3	31,7	0,18	0,42	1,3	30,0	0,14	0,69	1,7	23,3

Tabela 3. Parâmetros estatísticos dos modelos para predição dos ácidos graxos insaturados em amostras de leite in natura e liofilizadas.

		PLS					iPLS					PCR					SVR				RNA			
		RMSECV	R ² V	VL	RPD	ER (%)	RMSECV	R ² V	VL	RPD	ER (%)	RMSECV	R ² V	CP	RPD	ER (%)	RMSECV	R ²	RPD	ER (%)	RMSECV	R ²	RPD	ER (%)
C16:1n7-c9	In natura	2,21	0,15	7	1,1	21,2	2,17	0,18	15	1,1	20,8	2,18	0,18	12	1,1	20,9	2,30	0,10	1,0	22,1	2,34	0,06	1,0	22,4
	Liofilizado	1,81	0,47	10	1,3	18,2	1,76	0,50	14	1,4	17,7	2,02	0,34	5	1,2	20,3	1,96	0,38	1,2	19,7	1,40	0,57	1,7	14,1
C18:1n9-t9	In natura	2,17	0,05	1	0,7	68,7	1,96	0,23	14	0,7	62,0	2,17	0,05	1	0,7	68,7	2,15	0,12	0,7	68,0	1,89	0,31	0,8	59,8
	Liofilizado	1,85	0,56	10	1,5	46,8	1,77	0,59	14	1,6	44,8	2,12	0,42	1	1,3	53,7	1,94	0,52	1,4	49,1	1,25	0,86	2,2	31,6
C18:1n7-t11	In natura	20,17	0,04	3	0,6	83,2	18,11	0,23	17	0,7	74,7	20,26	0,03	4	0,6	83,5	20,79	0,02	0,6	85,7	18,41	0,21	0,7	75,9
	Liofilizado	18,63	0,53	11	1,4	59,7	16,81	0,61	11	1,6	53,8	20,11	0,44	16	1,3	64,4	21,85	0,38	1,2	70,0	17,04	0,58	1,6	54,6
C18:1n9-c9	In natura	30,33	0,16	3	1,1	20,0	27,29	0,32	16	1,2	18,0	30,6	0,14	4	1,1	20,2	29,84	0,18	1,1	19,7	29,76	0,19	1,1	19,7
	Liofilizado	21,9	0,56	13	1,5	15,1	20,88	0,60	16	1,6	14,4	24,37	0,45	9	1,4	16,8	23,73	0,49	1,4	16,4	17,15	0,77	1,9	11,8
C18:2n6-t9t12	In natura	0,73	0,05	3	0,8	55,3	0,67	0,19	15	0,9	50,8	0,73	0,05	4	0,8	55,3	0,72	0,07	0,8	54,5	0,60	0,21	1,0	45,5
	Liofilizado	0,76	0,35	5	1,2	53,5	0,76	0,35	6	1,2	53,5	0,77	0,33	5	1,2	54,2	0,77	0,34	1,2	54,2	0,35	0,83	2,7	24,6
C18:2n6-c9,c12	In natura	5,17	0,63	16	1,2	40,7	5,43	0,59	14	1,2	42,8	6,2	0,31	18	1,0	48,8	7,21	0,10	0,9	56,8	4,08	0,67	1,6	32,1
	Liofilizado	4,99	0,62	6	1,6	28,7	4,40	0,70	15	1,8	25,3	4,97	0,62	9	1,6	28,6	5,3	0,58	1,5	30,5	3,97	0,74	2,0	22,9
C18:3n3-c9,c12,c15	In natura	1,33	0,12	3	0,7	39,3	1,31	0,14	7	0,8	38,8	1,33	0,13	6	0,7	39,3	1,31	0,14	0,8	38,8	0,99	0,34	1,0	29,3
	Liofilizado	0,69	0,17	4	1,4	20,5	0,62	0,31	18	1,6	18,4	0,67	0,21	12	1,5	19,9	0,67	0,19	1,5	19,9	0,52	0,48	1,4	15,4
C18:2n7-c9,t11	In natura	5,34	0,01	1	0,6	70,2	4,27	0,20	17	0,8	56,1	5,29	0,02	6	0,6	69,5	5,43	0,02	0,6	71,4	4,11	0,55	0,8	54,0
	Liofilizado	4,87	0,36	12	0,7	58,7	4,40	0,49	14	0,8	53,0	5,30	0,26	8	0,6	63,9	5,18	0,31	0,6	62,4	4,30	0,59	1,4	51,8
C18:2n6-t10,c12	In natura	0,18	0,03	1	0,6	51,4	0,17	0,03	3	0,6	48,6	0,17	0,02	1	0,6	48,6	0,17	0,02	0,6	48,6	0,17	0,02	0,6	48,6
	Liofilizado	0,16	0,08	2	1,0	44,4	0,16	0,03	1	1,0	44,4	0,16	0,05	2	1,0	44,4	0,16	0,08	1,0	44,4	0,10	0,30	1,6	27,8
C20:3n3	In natura	0,38	0,27	6	1,2	80,9	0,31	0,52	14	1,5	66,0	0,37	0,33	9	1,2	78,7	0,39	0,24	1,2	83,0	0,34	0,37	1,3	72,3
	Liofilizado	0,38	0,45	4	1,3	58,5	0,37	0,46	7	1,4	56,9	0,39	0,41	2	1,3	60,0	0,37	0,46	1,4	56,9	0,26	0,59	1,9	40,0
C20:4n6-c5,c11,c14	In natura	0,31	0,12	3	1	39,2	0,29	0,39	12	1,0	36,7	0,31	0,13	4	1,0	39,2	0,32	0,16	1,0	40,5	0,32	0,16	0,9	40,5
	Liofilizado	0,30	0,44	8	1,3	33,7	0,27	0,54	15	1,5	30,3	0,33	0,34	4	1,2	37,1	0,31	0,42	1,3	34,8	0,25	0,61	1,6	28,1

Tabela 4. Parâmetros estatísticos dos modelos para predição de agrupamentos de ácidos graxos em amostras de leite in natura e liofilizadas

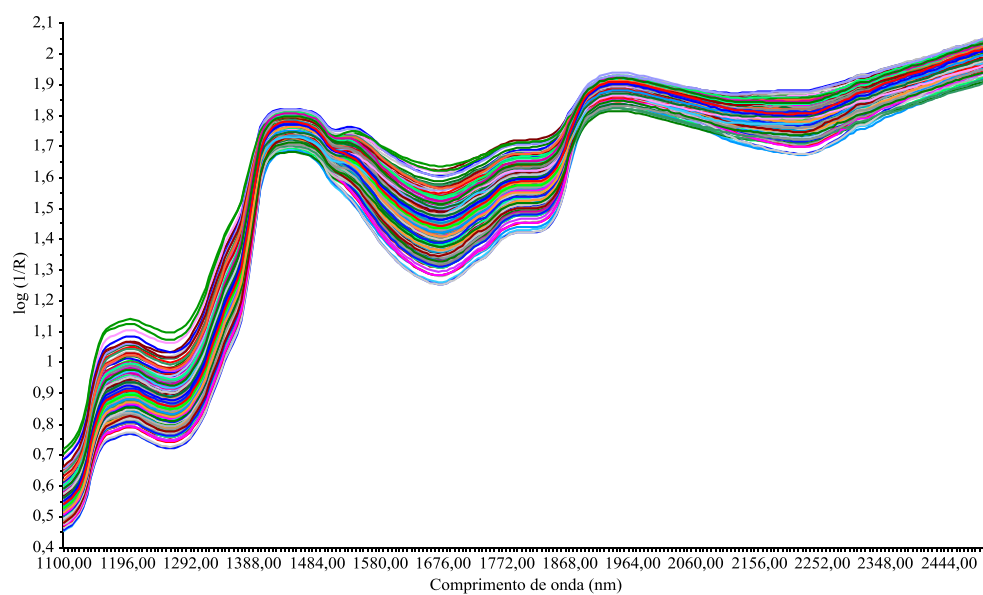
		PLS					iPLS					PCR					SVR				RNA			
		RMSECV	R ² V	VL	RPD	ER (%)	RMSECV	R ² V	VL	RPD	ER (%)	RMSECV	R ² V	CP	RPD	ER (%)	RMSECV	R ²	RPD	ER (%)	RMSECV	R ²	RPD	ER (%)
Saturados	In natura	64,33	0,13	5	1,1	12,9	63,54	0,16	11	1,1	12,7	64,63	0,13	6	1,1	13,0	64,90	0,12	1,1	13,0	71,58	0,08	1,0	14,4
	Liofilizado	55,93	0,30	6	1,2	11,3	54,97	0,32	8	1,2	11,1	56,89	0,28	8	1,2	11,5	57,47	0,26	1,2	11,6	32,40	0,51	2,1	6,5
Insaturados	In natura	47,85	0,13	3	1,1	14,6	45,63	0,32	11	1,1	13,9	47,80	0,13	4	1,1	14,6	47,02	0,16	1,1	14,3	49,70	0,11	1,0	15,2
	Liofilizado	34,28	0,65	10	1,7	15,0	33,99	0,65	10	1,7	14,8	38,32	0,56	8	1,5	16,7	38,65	0,55	1,5	16,9	26,85	0,67	2,1	11,7
Monoinsaturados	In natura	39,24	0,12	3	1,1	19,5	37,62	0,30	12	1,1	18,7	39,17	0,13	4	1,1	19,4	38,81	0,14	1,1	19,2	38,86	0,17	1,1	19,3
	Liofilizado	29,24	0,59	10	1,6	15,1	29,36	0,59	10	1,6	15,1	32,88	0,48	8	1,4	16,9	32,28	0,50	1,4	16,6	26,94	0,72	1,7	13,9
Poli-insaturados	In natura	10,82	0,13	3	1,1	37,8	9,15	0,38	15	1,3	31,9	10,68	0,16	6	1,1	37,3	11,65	0,01	1,0	40,6	9,86	0,21	1,2	34,4
	Liofilizado	7,55	0,65	6	1,7	24,3	6,99	0,70	10	1,8	22,5	7,78	0,63	8	1,6	25,0	7,89	0,62	1,6	25,4	5,74	0,81	2,2	18,4
Ômega-3	In natura	1,17	0,24	3	1,1	27,9	1,20	0,20	4	1,1	28,6	1,14	0,28	6	1,2	27,1	1,15	0,28	1,2	27,4	1,06	0,54	1,3	25,2
	Liofilizado	0,81	0,42	7	1,3	20,4	0,80	0,44	6	1,3	20,2	0,83	0,39	9	1,3	20,9	0,82	0,41	1,3	20,7	0,57	0,63	1,9	14,4
Ômega 6	In natura	6,86	0,35	14	1,2	49,0	6,35	0,45	16	1,3	45,3	7,9	0,15	6	1,1	56,4	7,97	0,13	1,1	56,9	6,9	0,35	1,2	49,3
	Liofilizado	5,44	0,69	6	1,8	33,5	5,21	0,71	10	1,9	32,0	5,46	0,69	10	1,8	33,6	5,86	0,64	1,7	36,0	3,51	0,90	2,8	21,6

Tabela 5. Média \pm desvio padrão dos parâmetros estatísticos obtidos a partir de distintos modelos de calibração e amostras⁽¹⁾

Modelo	In natura	Liofilizada	Média
	RMSECV		
PLS	11,95 (\pm 17,15)	9,59 (\pm 13,74)	10,77 (\pm 15,45)
iPLS	11,37 (\pm 16,59)	9,30 (\pm 13,58)	10,34 (\pm 15,06)
PCR	12,03 (\pm 17,14)	10,30 (\pm 14,69)	11,17 (\pm 15,84)
SVR	12,08 (\pm 17,09)	10,33 (\pm 14,76)	11,21 (\pm 15,83)
RNA	12,13 (\pm 18,24)	7,47 (\pm 10,02)	9,80 (\pm 15,77)
Média	11,91 (\pm 17,00)	9,40 (\pm 13,31)	
Modelo	R ² V		
PLS	0,18 (\pm 0,15) Bcd	0,45 (\pm 0,15) Ba	0,32 (\pm 0,20) BC
iPLS	0,28 (\pm 0,13) Ab	0,49 (\pm 0,16) Ba	0,38 (\pm 0,18) AB
PCR	0,14 (\pm 0,08) Cb	0,40 (\pm 0,14) Ba	0,27 (\pm 0,17) C
SVR	0,14 (\pm 0,08) Cb	0,41 (\pm 0,13) Ba	0,28 (\pm 0,17) C
RNA	0,26 (\pm 0,18) ABb	0,64 (\pm 0,14) Aa	0,45 (\pm 0,25) A
Média	0,20 (\pm 0,14) b	0,48 (\pm 0,17) a	
Modelo	RPD		
PLS	0,98 (\pm 0,21) b	1,37 (\pm 0,22) Ba	1,18 (\pm 0,29) B
iPLS	1,04 (\pm 0,20) b	1,44 (\pm 0,25) Ba	1,24 (\pm 0,30) B
PCR	0,97 (\pm 0,18) b	1,30 (\pm 0,22) Ba	1,14 (\pm 0,26) B
SVR	0,96 (\pm 0,18) b	1,31 (\pm 0,21) Ba	1,13 (\pm 0,26) B
RNA	1,04 (\pm 0,22) b	1,81 (\pm 0,38) Aa	1,42 (\pm 0,50) A
Média	1,00 (\pm 0,20) b	1,45 (\pm 0,40) a	
Modelo	ER		
PLS	35,26 (\pm 20,39)	27,89 (\pm 14,93)	31,57 (\pm 18,09)
iPLS	32,86 (\pm 17,15)	26,71 (\pm 14,05)	29,73 (\pm 15,81)
PCR	35,81 (\pm 20,35)	29,31 (\pm 15,94)	32,56 (\pm 18,40)
SVR	28,76 (\pm 27,56)	25,28 (\pm 22,47)	27,02 (\pm 24,98)
RNA	32,53 (\pm 17,06)	21,28 (\pm 11,45)	26,91 (\pm 15,48)
Média	33,04 (\pm 20,71) a	26,09 (\pm 16,19) b	
Modelo	VL		
PLS	5,36 (\pm 4,02) Bb	7,61 (\pm 2,88) Ba	6,48 (\pm 3,65) B
iPLS	12,03 (\pm 4,09) A	10,39 (\pm 4,32) A	11,21 (\pm 4,25) A
PCR	5,50 (\pm 3,33) Bb	8,21 (\pm 3,62) ABa	6,86 (\pm 3,71) B
Média	7,63 (\pm 4,91)	8,74 (\pm 3,81)	

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

(a)



(b)

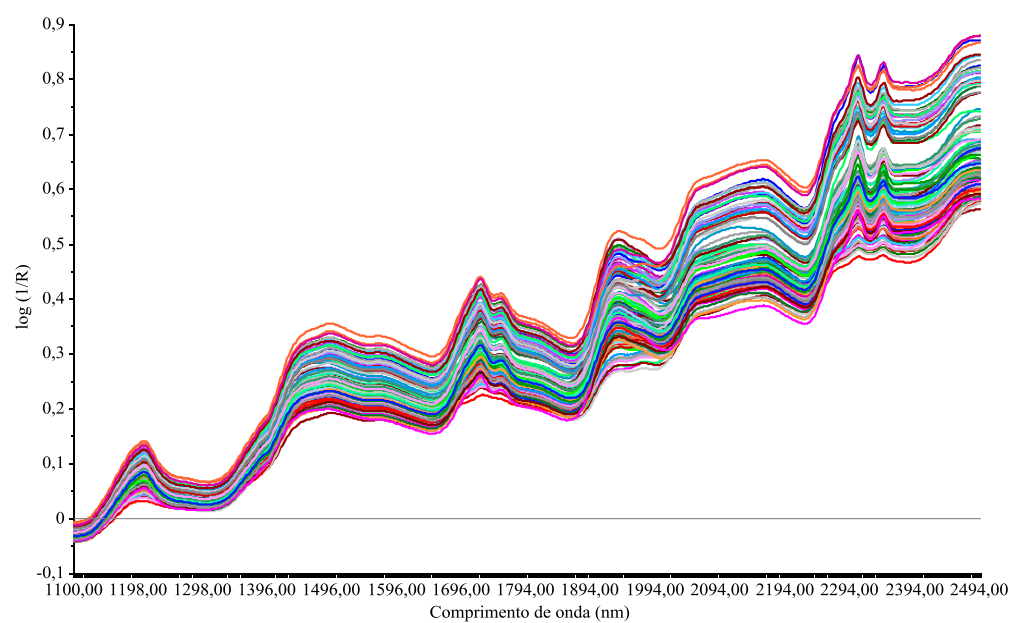


Figura 1. Espectro no infravermelho proximal de amostras de leite in natura (a) e liofilizadas

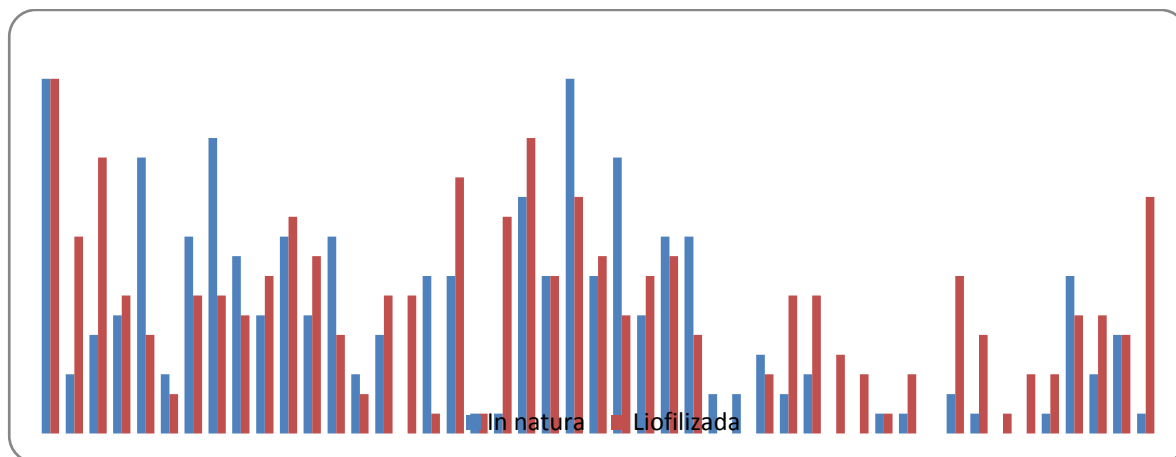


Figura 2. Histograma das regiões espectrais (comprimentos de onda) selecionadas pelo algoritmo iPLS para quantificação de ácidos graxos no leite in natura e liofilizado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de dados de espectroscopia no infravermelho proximal é possível desenvolver modelos de classificação do leite (orgânico e convencional) e quantificação do seu perfil de ácidos graxos. O leite produzido no sistema orgânico sul brasileiro apresenta perfil de ácidos graxos semelhante ao produzido no mesmo sistema em outros países, ao mesmo tempo em que é similar ao leite oriundo do sistema convencional, quando predomina o emprego de pastagens e plantas forrageiras conservadas, com baixo ingresso de alimentos concentrados, com reflexos nos teores de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ácido linoleico conjugado (CLA; C18:2c9t11), ômega 3 e relação n6/n3. A estação do ano influencia no perfil de ácidos graxos, com destaque para o teor superior de CLA (C18:2c9t11) no leite produzido na primavera e inferior no outono, em decorrência da alimentação dos animais.

O modelo de classificação máquina de vetor de suporte (SVM) é superior ao método SIMCA na classificação de amostras de leite em orgânico e convencional.

Com base em dados de espectroscopia NIR é possível desenvolver modelos com boa acurácia para quantificação de ácidos graxos no leite, com destaque para somatório de poli-insaturados, saturados e ômega 6, bem como para os ácidos graxos individuais C14 (láurico), C16 (palmítico) e C18:1 (oleico). O desempenho dos modelos de calibração é afetado pela presença de água na amostra de leite, com predições superiores para leite liofilizado em comparação com in natura. O uso de redes neurais artificiais (RNA) resulta numa predição significativamente superior aos modelos PLS, iPLS, PCR e SVR. Tal metodologia tem potencial para modelar dados espectrais de forma satisfatória.

Melhorias ainda podem ser obtidas em pesquisas futuras, através de inclusão da região de ondas curtas do infravermelho proximal (800-1050nm) a qual se refere a região do terceiro sobretom do estiramento C-H em 880nm. E também, pela otimização da rede neural artificial através do emprego das variáveis latentes como dados de entrada, ao invés dos componentes principais, e/ou utilizar as variáveis latentes geradas em modelos com seleção de comprimento de onda. Tais possibilidades configuram-se como perspectivas futuras de continuidade dessa linha de pesquisa, com o objetivo de obter modelos cada vez mais acurados, precisos e robustos.

REFERÊNCIAS

- ACKMAN, R. G. The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, v. 12, p. 165-284, 1972.
- AERNOUTS, B.; POLSHIN, E.; LAMMERTYN, J.; SAEYS, W. Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: Reflectance or transmittance? **Journal Dairy Science**, v.94, p.5315-5329, 2011.
- AGUIAR, A.C.; COTTICA, S.M.; BOROSKI, M.; OLIVEIRA, C.C.; BONAFÉ, E.G.; FRANÇA, P.B.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Quantification of essential fatty acids in the heads of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with linseed oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, p.643-647, 2011.
- ALBANELL, E.; CAJA, G.; SUCH, X.; ROVAI, M.; SALAMA, A.A.K.; RAMÓN, C. Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. **Journal of AOAC International**, v.82, p.753-758, 1999.
- ALCÁCER, L. **Textos de apoio a química-física. Determinação da estrutura molecular. Métodos espectroscópios**. AEIST, 2007.
- ALMEIDA, F.M.N. **Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) na caracterização de farinhas para alimentação pueril**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica)-Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- ALSBERG, B.K.; WOODWARD, A.M.; KELL, D.B. An introduction to wavelet transforms for chemometricians: A time-frequency approach. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.37, p.215, 1997.
- ALVES, J.C.L. **Máquina de vetores de suporte aplicada a dados de espectroscopia NIR de combustíveis e lubrificantes para o desenvolvimento de modelos de regressão e classificação**. 2012. 247f. Tese (Doutorado em Ciências)-Unicamp, Campinas, 2012.
- AOAC. Association of the Official Analysis Chemists. **Official Methods of Analysis**, 18. ed., AOAC: Gaithersburg, MD, 2007; Method 2007.04.
- AOCS- American Oil Chemists' Society (AOCS). **Official methods and recommended practices**, 5. ed., Firestone, D., E.; AOCS: Champaign, IL. 1999. Official method Cd 14d-99.
- AONO, N.M. **Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análise de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes**. 2014. 39f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.
- ARNOULD, V.M.R.; SOYEURT, H. Genetic variability of milk fatty acids. **Journal of Applied Genetics**, v.50, p.29-39, 2009.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Annual Book of ASTM Standards, Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis – E1655-05**, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2012.

ASTRUP, A. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.99 (suppl), p.1235S-1242S, 2014.

AZEVEDO, F.M.; BRASIL, L.M.; OLIVEIRA, R.C.L. **Redes neurais com aplicações em controles e sistemas especialistas**. Florianópolis: Bookstores, 2000, 401p.

BAER, D.J.; JUDD, J.T.; CLEVIDENCE, B.A.; TRACY, R.P. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.6, p.969-973, 2004.

BALADIN, R.M.; SAFIEVA, R.; LOMAKIN, E.I. Comparison of linear and nonlinear calibration models based on near infrared (NIR) spectroscopy data for gasoline properties prediction. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.88, p.183-188, 2007.

_____. Wavelet neural network (WNN) approach for calibration model building based on gasoline near infrared (NIR) spectra. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.93, p.58-62, 2008.

_____. Neural network (ANN) approach to biodiesel analysis: Analysis of biodiesel density, kinematic viscosity, methanol and water contents using near infrared (NIR) spectroscopy. **Fuel**, v.90, p.2007-2015, 2011.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007, 189p.

BARGO, F.; DELAHOY, J.E.; SCHROEDER, G.F.; BAUMGARD, L.H.; MULLER, L.D. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.226-240, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. Campinas: UNICAMP, 2007, 401p.

BARROS, A.S.; NUNES, A.; MARTINS, J.; DELGAKILLO, I. Determination of oil and water in olive pomace by NIR and multivariate analysis. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v.3, p.180-186, 2009.

BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: Wiley, 1998, 360p.

BENBROOK, C.M.; BUTLER, G.; LATIF, M.A.; LEIFERT, C.; DAVIS, D.R. Organic production enhances milk nutritional quality by shifting fatty acid composition: A United State – wide, 18-month study. **PLOS One**, v.8, p.1-13, 2013.

BERTRAN, E.; BLANCO, M.C.; MASPOCH, S.; ORTIZ, M.C.; SÁNCHEZ, M.S.; SARABIA, L.A. Handling intrinsic non-linearity in near-infrared reflectance spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.49, p.215, 1999.

BIGUS, J.P. **Data mining with neural networks: solving business problems - From application development to decision support**, New York: McGraw-Hill, 1996, 220p.

BLANCO, M.; ALCALA, M. Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy – A contribution to process analytical technologies, **Analytica Chimica Acta**, v.557, p.353-359, 2006.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BOBE, G.; LINDBERG, G.L.; FREEMAN, A.E.; BEITZ, D.C. Short communication: composition of milk protein and milk fatty acids is stable for cows differing in genetic merit for milk production. **Journal Dairy Science**, v.90, p.3955-3960, 2007.

BORREANI, G.; COPPA, M.; REVELLO-CHION, A.; COMINO, L.; GIACCONE, D.; FERLAY, A.; TABACCO, E. Effect of different feeding strategies in intensive dairy farming systems on milk fatty acid profile, and implications on feeding costs in Italy. **Journal Dairy Science**, v.96, p.6840-6855, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003**. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Publicado no Diários Oficial da União em 24/12/2003, Seção 1, p. 8-9, 2003.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011**. Estabelece Regulamento Técnico para os Sistemas de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de substâncias permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, 2011.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2014**. Altera os arts. 1º, 2º, 3º, 8º, 13, 14, 15, 20, 21, 29, 34, 35, 38, 39, 42, 59, 60, 63, 80, 82, 85, 89, 100, 101, 103, 106, 108, da Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011.

BRO, R. Multivariate calibration – What is in chemometrics for the analytical chemist? **Analytica Chimica Acta**, v.500, p.185-194, 2003.

BROWNE, M.W. Cross-validation methods. **Journal of Mathematical Psychology**, v.44, p.108-132, 2000.

BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G. Quimiometria, **Química Nova**, v.8, n.2, p.84-99, 1985.

BÜNING-PFAUE, H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.82, p.107-115, 2003.

BURNS, D.A.; CIURCZAK, E.W. **Handbook of Near-Infrared Analysis**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2001, 816p.

BUTLER, G.; STERGIADIS, S.; SEAL, C.; EYRE, M.; LEIFERT, C. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England. **Journal Dairy Science**, v.94, p. 24-36, 2011.

CAPUANO, E.; RADEMAKER, J.; BIJAART, H. van den; SASKIA, M. van R. Verification of fresh grass feeding, pasture grazing and organic farming by FTIR spectroscopy analysis of bovine milk. **Food Research International**, v.60, p.59-65, 2014.

CARVALHO, A.P.L.F. **Redes neurais artificiais**. Disponível em: <<http://www.icmc.usp.br/pessoas/andre/research/neural/index.htm#topicos>>. Acesso em: 20 abr. 2014.

CHAGAS, I.P. **Desenvolvimento de um fotômetro portátil NIR para determinação do teor de água no álcool combustível e o teor de etanol na gasolina**. 2006. 151f. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CHEN, N.; LU, W.; YANG, J.; LI, G. **Support vector machine in chemistry**. Singapura: Word Scientific Publishing Co. Inc, 2004, 331p.

CHRISTIE, W.W. **Gas chromatography and lipids: A practical guide**. 1. ed. Dundee: The Oil Press Ltd, 1994, 320p.

_____. **Gas chromatography and lipids: A practical guide**. Oily, 1989, 307p.

_____. **Lipid analysis**. 3. ed. Oxford: Pergamon, 1982, 224p.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006, 453p.

COLLOMB, M.; BISIG, W.; BÜTIKOFER, U.; SIEBER, R.; BREGY, M.; ETTER, L. Fatty acid composition of mountain milk from Switzerland: Comparison of organic and integrated farming systems. **International Dairy Journal**, v.18, p.976-982, 2008.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHANEN, E.L. Conjugated linoleic acids milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v.16, p.1347-1361, 2006.

CONZEN, J.P. **Multivariate calibration: a practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry**. 2. ed. Ettlingen: Bruker Optiks GmbH, 2006, 116p.

COPPA, M.; FERLAY, A.; LEROUX, C.; JESTIN, M.; CHILLIARD, Y.; MARTIN, B.; ANDUEZA, D. Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.20, p.182-189, 2010.

COPPA, M.; REVELLO-CHION, A.; GIACCONE, D.; FERLAY, A.; TABACCO, E.; BORREANI, G. Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid composition on fresh and thawed milk. **Food Chemistry**, v.150, p.49-57, 2014.

CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Machine Learning**, v.20, p.273-297, 1995.

COSTA FILHO, P.A. **Estudo comparativo entre técnicas de inteligências artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo**. 2003. 201f. Tese (Doutorado em Química)- Unicamp, Campinas, 2003.

COSTA, F.M.A. et al. Variação do teor de gordura no leite bovino cru. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.5, p.763-769, 1992.

COUVREUR, S.; HURTAUD, C.; LOPEZ, C.; DELABY, L.; PEYRAUND, J.L. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. **Journal Dairy Science**, v.89, p.1956-1969, 2006.

CRASKE, J.D.; BANNON, C.D. Letter to the editor. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, v.65, p.1190-1191, 1988.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 2001, 580p.

DARDENNE, P.; SINNAEVE, G.; BAETEN, V. Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy: which method? **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 8, p.229-237, 2000.

DESPAGNE, F.; MASSART, D. Variable selection for neural networks in multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.40, p. 145-163, 1998.

DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F.; SCOLLAN, N.D. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.168-206, 2006.

DING, C.H.Q.; DUBCHAK, I. Multi-class protein fold recognition using support vector machines and neural networks. **Bioinformatics**, v.17, p.349-358, 2001.

EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LANNA, D.P.D.; LEOPOLDINO, W.M.; ARCURI, P.B.; LEÃO, M.I.; COTA, M.R.; VALADARES FILHO, S.C. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.219-228, 2006.

ELGERSMA, A.; TAMMINGA, S.; ELLEN, G. Modifying milk composition through forage – A review. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.207-225, 2006.

ELLIS, K.A.; INNOCENT, G.; GROVE-WHITE, D.; CRIPPS, P.; McLEAN, W.G.; HOWARD, C.V.; MIHM, M. Comparing of fatty acid composition of organic and conventional milk. **Journal Dairy Science**, v.89, p.1938-1950, 2006.

ETZION, Y.; LINKER, R.; COGAN, U.; SHMULEVICH, I. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. **Journal Dairy Science**, v.87, p.2779-2788, 2004.

FANTI, M.G.N.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M.; SILVA, R.C.; FLORENCE, A.C.R.; GIOELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p. 259-265, 2008.

FERLAY, A.; MARTIN, B.; PRADEL, P.; COULON, J.B.; CHILLIARD, Y. Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbeliard cow breeds. **Journal Dairy Science**, v.89, p.4026-4041, 2006.

FERRAND-CALMELS, M.; PALHIÈRE, I.; BROCHARD, M.; LERAY, O.; ASTRUC, J.M.; AUREL, M.R.; BARBEY, S.; BOUVIER, F.; BRUNSCHWING, P.; CAILLAT, H.; DOUGUET, M.; FAUCON-LAHALLE, F.; GELÉ, M.; THOMAS, G.;

- TROMMENSCHLAGER, J.M.; LARROQUET, H. Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. **Journal Dairy Science**, v.97, p.17-35, 2014.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p. 497-509, 1957.
- FOX, G.; CRUICKSHANK, A. Near infrared reflectance as a rapid and inexpensive surrogate measure for fatty acid composition and oil content of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.13, p.287-291, 2005.
- FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Cork: Springer Science & Business Media, 1998, 478p.
- FREEDMAN, B.; KWOLEK, W.F.; PRYDE, E.H. Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capilar gas chromatography. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.63, p.1370-1375, 1986.
- FUENTE, M.A.; LUNA, P.; JUÁREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, p.917-926, 2006.
- GELADI, P. Some recent trends in the calibration literature. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.60, p.211-244, 2002.
- GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v.185, p. 1-17, 1986.
- GONZAGA, F.B. **Desenvolvimento de um espectrômetro de emissão para a região do infravermelho próximo**. 2006. 106f. Tese (Doutorado em Química)- Unicamp, Campinas, 2006, 106p.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001, 77p.
- GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; ALVAREZ-GARCÍA, N.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.M. On-line determination of fatty acid composition in intramuscular fat of Iberian pork loin by NIRs with a remote reflectance fibre optic probe. **Meat Science**, v.69, p.243-248, 2005.
- GÖRGENS, E.B. **Estimação do volume de árvores utilizado redes neurais artificiais**. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal Dairy Science**, v. 74, p.3228-3243, 1991.
- HALL, J.W.; McNEIL, B.; ROLLINS, M.J.; DRAPER, I.; THOMPSON, B.G.; MACALONEY, G. Near-infrared spectroscopic determination of acetate, ammonium, biomass and glycerol in an industrial *Escherichia coli* fermentation. **Applied Spectroscopy**, v.50, p.102-108, 1996.

HANSEN, W.G.; WIEDEMANN, S.C.C.; SNIEDER, M.; WORTEL, V.A.I. Tolerance of near infrared calibrations to temperature variations; a practical evaluation. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.8, p.125-132, 2000.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v.90, p.420-426, 1978.

HARDING, F. **Compositional quality: milk quality**. Glasgow: Blackie Academic Professional, 1995, 165p.

HART, J.R.; NORRIS, K.H.; GOLUMBIC, C. Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanos extracts. **Cereal Chemistry**, v. 39, p. 94-99, 1962.

HAYKIN, S. **Redes neurais: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2001, 900p.

HOLE, M.; TAYLOR, K.D.A. Methods of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dogfish (*Squalus acanthias*) liver oil. **Food Chemistry**, v.55, p. 215-220, 1996.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de análise intrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056p.

HOLM, T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. **Journal of Chromatography**, v.842, p.221-227, 1999.

HORST, F. **Técnicas em Data Mining aplicadas na predição de satisfação de colaboradores de um hospital na cidade de Guarapuava/PR**. 2013. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

HÖSKULDSSON, A. PLS regression methods. **Journal of Chemometrics**, v.2, p. 211-228, 1988.

HÖSKULDSSON, A. Variable and subset selection in PLS regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.55, p.23-28, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, 2011.

INÁCIO, M.R.C.; MOURA, M.F.V.; LIMA, K.M.G. Classification and determination of total protein in milk powder using near infrared reflectance spectrometry and the successive projections algorithm for variable selection. **Vibrational Spectroscopy**, v.57, p.342-345, 2011.

IVERSON, S.J.; LANG, S.L.C.; COOPER, M.H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v. 36, p. 1283-1287, 2001.

JANIK, L.J.; COZZOLINO, D.; DAMBERGS, R.; CYNKAR, W.; GISHEN, M. The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using vis-NIR spectroscopy and artificial neural networks. **Analítica Chimica Acta**, v.594, n.1, p.107-118, 2007.

JANKOVSKÁ, R.; SUSTOVÁ, K. Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. **Czech Journal of Food Science**, v.21, p.123-128, 2003.

JIANG, J.; BERRY, R.J.; SIESLER, H.W.; OZAKI, Y. Wavelength interval selection in multicomponent spectral analysis by moving window partial least-squares regression with applications to mid-infrared and near-infrared spectroscopic data. **Analytical Chemistry**, v. 74, p.3555-3565, 2002.

JOSÉ, G.E. **Uso de método MDL para filtragem de ruído instrumental empregando a Transformada Wavelet**. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

JOSEPH, J.D.; ACKMAN, R.G. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.75, p.488-506, 1992.

KHANMOHAMMADI, M.; GARMARUDI, A.B.; GHASEMI, K.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Artificial neural network for quantitative determination of total protein in yogurt by infrared spectrometry. **Microchemical Journal**, v.91, p.47-52, 2009.

KUKACKOVÁ, O.; CURDA, L.; JINDRICH, J. Multivariate calibration of raw milk using NIR spectroscopy. **Czech Journal of Food Science**, v.18, p.1-4, 2000.

LaCOUNT, D.W.; DRACKLEY, J.K.; LAESCH, S.O et al. Secretion of oleic acid in milk fat in response to abomasal infusions of canola or high oleic sunflower fatty acids. **Journal Dairy Science**, v.77, p.1372-1385, 1994.

LAPORTE, M.F.; PAQUIN, P. Near-infrared analysis of fat, protein, and casein in cow's milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.2600-2605, 1999.

LARA, D.C. **Monitoramento em linha de reações de copolimerização em emulsão de acetato de vinila e acrilato de butila em um reator contínuo pulsado de pratos perfurados usando espectroscopia NIR**. 2009. 233f. Tese (Doutorado em Engenharia)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LEARDI, R.; GONZÁLEZ, A.L. Genetic algorithms applied to feature selection in PLS regression: how and when to use them. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.41, p.195-207, 1998.

LI, B.; MORRIS, J.; MARTIN, E.B. Model selection for partial least squares regression, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.64, p.79-89, 2002.

LI, X.Y.; WANG, J.H.; HUANG, Y.W.; HAN, D.H. Determination of fat, protein and DM in raw milk by portable short-wave infrared spectrometer. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v.31, p.665-668, 2011.

LIRA, L.F.B. **Desenvolvimento de métodos analíticos para monitoramento da qualidade do biodiesel e suas misturas**. 2010. 124f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

LIU, F.; ZHANG, F.; JIN, Z.; HE, Y.; FANG, H.; YE, Q.; ZHOU, W. Determination of acetolactate synthase activity and protein content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves

using visible/near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, n. 1-2, p. 56-65, 2008.

LIU, Y.; BELLE, R.U.; NACHEDOLFEIZI, M. Chemometric data analysis using artificial neural networks. **Applied Spectroscopy**, v.47, p.12-23, 1993.

LOCK, A.L.; SHINGFIELD, K.J. Optimising milk composition. In: KEBREAD, E.; MILLS, J.; BEEVER, D.E. Dairying - Using Science to Meet Consumers' Needs. **British Society of Animal Science**, v.29, p.107-188, 2004.

LOOR, J.J.; FERLAY, A.; OLLIER, A.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. **Journal Dairy Science**, v.88, p.726-740, 2005.

LORENA, A.C.; CARVALHO, A.C.P.L.F. Uma introdução às *Support Vector Machines*. **Revista de Informática Teórica e Aplicada**, v.14, p.43-67, 2007.

LUCAS, A.; ANDUEZA, D.; FERLAY, A.; MARTIN, B. Prediction of fatty acid composition of fresh and freeze-dried cheeses by visible-near-infrared reflectance spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.18, p.595-604, 2008.

LUCASIUS, C.B.; KATEMAN, G. Understanding and using genetic algorithms. Part 1. Concepts, properties and context. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 19, p.1-33, 1993.

LUCASIUS, C.B.; KATEMAN, G.; Genetic algorithms for large-scale optimization in chemometrics: An application. **Trends in Analytical Chemistry**, v.10, p.254-261, 1991.

LUINGE, H. J.; Van der MAAS, J. H.; VISSER, T. Partial least squares regression as a multivariate tool for the interpretation of infrared spectra. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.28, p.129-138, 1995.

MANCINI-FILHO, J.; TAKEMOTO, E.; AUDED-PIMENTEL, S. Parâmetros de identidade e qualidade de óleos e gorduras. In: ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.V.C. (Eds.) **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, p.81-107.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipiddetermination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.93-100, 2001.

MARETTO, D.A. **Aplicação de máquinas de vetores de suporte para desenvolvimento de modelos de classificação e calibração multivariada em espectroscopia no infravermelho**. 2011. 113f. Tese (Doutorado em Ciências)- Unicamp, Campinas, 2011.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. Chichester: John Wiley & Sons, 1989, 419p.

MARTINS, E.C.; LEONARDI, R.R.; OLIVEIRA, C.R.; MATSUMOTO, F.M.T. Liofilização como alternativa para conservação do leite humano. **Journal Health Science Institute**, v.29, n.2, p.119-122, 2011.

MAURICE-Van EIJNDHOVEN, M.H.T.; SOYEURT, H.; DEHARENG, F.; CALUS, M.P.L. Validation of fatty acid predictions in milk using mid-infrared spectrometry across cattle breeds. **Animal**, v.7, p.348-354, 2013.

McCULLOCH, W.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. **Bulletin of Mathematical Biophysics**, v.5, p.115-133, 1943.

MELFSEN, A.; HARTUNG, E.; HAEUSSERMANN, A. Robustness of near-infrared calibration models for the prediction of milk constituents during the milking process. **Journal of Dairy Research**, v.80, p. 103-112, 2013.

MESSERSCHMIDT, I. **Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada**. 1999. 138f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MEYER, M.; MEYER, K.; HOBERT, H. Neural networks for interpretation of infrared spectra using extremely reduced spectral data. **Analytica Chimica Acta**, v.282, p.407-415, 1993.

MILINSK, M.C. **Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

MILINSK, M.C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V.; OLIVEIRA, C.C.; SOUZA, N.E.; Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p.1475-1483, 2008.

MITSUMOTO, M.; OZAWA, S.; MITSUHASHI, T. The influence of sample temperature on the determination of moisture and fat content in beef longissimus by near infrared spectroscopy. In. DAVIES, A.M.C.; GIANGIACOMO, R. **Proceeding...** Chichester: IX International Conference, Near Infrared Spectroscopy, 2000.

MOUAZEN, A.M. KUANG, B.; BAERDEMAEKER, J.; RAMON, H. Comparison among principal component, partial least squares and back propagation neural network analyses for accuracy of measurement of selected soil properties with visible and near infrared spectroscopy. **Geoderma**, v.158, p.23-31, 2010.

MUNIZ, G.I.B.; MAGALHÃES, W.L.E.; CARNEIRO, M.E.; VIANA, L.C. Fundamentos e estado da arte da espectroscopia no infravermelho próximo no setor de base florestal. **Ciência Florestal**, v.22, p.865-875, 2012.

NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEAM, T.; DAVIES, T. **A user-friendly guide to multivariate calibration and classification**. Chichester: NIR Publications, 2002, 344p.

NAVRÁTILOVÁ, P.; HADRA, L.; DRACKOVÁ, M.; JANSTOVÁ, B.; VORLOVÁ, L.; PAVLATA, L. Use of FT-NIR spectroscopy for bovine colostrum analysis. **Acta Veterinaria Brno**, v.75, p.57-63, 2006.

NAZÁRIO, S.L.S.; BUIOCHI, F.; KITANO, C.; ISEPON, J.S.; ADAWOWSKI, J.C.; HIGUTI, R.T. Caracterização de leite bovino utilizando ultra-som e redes neurais artificiais. **Revista Controle e Automação**, v.20, p.627-636, 2009.

NICOLAI, B.M. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v.46, p.99-118, 2007.

NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J.P.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S.B. Interval Partial Least-Square Regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.54, p.413-419, 2000.

NUNES, P.G.A. **Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectrometrias UV-VIS e NIR**. 2008. 106f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

NÚÑEZ-SÁNCHEZ, N.; MARTÍNEZ-MARÍN, A.L.; POLVILLO, O.; FERNÁNDEZ-CABANÁS, V.M.; CARRIZOSA, J.; URRUTIA, B.; SERRADILLA, J.M. Near infrared spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. **Food Chemistry**, v.190, p.244-252, 2016.

NÚÑEZ-SÁNCHEZ, N.; SERRADILLA, J.M.; ARES, J.L.; GARRIDO-VARO, A. Effect of moisture uptake on the repeatability of near infrared spectroscopy analyses of ewe milk using the DESIR method. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.16, p.381-388, 2008.

O'DONNELL, A.M.; SPATNY, K.P.; VICINI, J.L.; BAUMAN, D.E. Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in label claims based on production management practices, **Journal Dairy Science**, v.93, p.1918-1925, 2010.

OLIVEIRA, F.C.C. **Modelos de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional para análise de misturas diesel-óleos vegetais**. 2006. 108f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

OLIVEIRA, F.C.C.; SOUZA, A.T.P.C.; DIAS, J.A.; DIAS, S.C.L.; RUBIM, J.C. A escolha da faixa spectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. **Química Nova**, v.27, p.218-225, 2004.

OSBORNE, B.G. Near infrared spectroscopy in food analysis. In: MEYERS, R.A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry** Chichester: John Wiley & Sons, 2000, p.1-13.

OSBORNE, B.G.; FEARN, T. **Near infrared spectroscopy in food analysis**. Harlow Essex: Longman Scientific & Technical, 1988, 212p.

OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. New York: Willey, 1999, 332p.

PALMQUIST, D.L.; STELWAGEN, K.; ROBINSON, P.H. Modifying milk composition to increase use of dairy products in healthy diets – preface. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.149-153, 2006.

PARODI, P.W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. **Journal Dairy Science**, v.82, p.1339-1349, 1999.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.14, n.2, p. 198-219, 2003.

PASQUINI, C.; CARNEIRO, C.J.G.; BOMFIM, P.M. Desenvolvimento e validação de modelos multivariados empregando espectroscopia no infravermelho próximo para estimativa de características da madeira de eucalipto. **O Papel**, v.68, p.71-83, 2007.

PÉREZ-JUAN, M.; AFSETH, N.K.; GONZÁLEZ, J.; DÍAZ, I.; GISPERT, M.; FURNOLS, M.F.; OLIVER, M.A.; REALINI, C.E. Prediction of fatty acid composition using a NIRS fibre optics probe at two different locations of ham subcutaneous fat. **Food Research International**, v.43, p.1416-1422, 2010.

PERINI, J.A.L. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v.23, p.1075-1086, 2010.

PLA, M.; HERNÁNDEZ, P.; ARIÑO, B.; RAMÍREZ, J.A.; DÍAZ, I. Prediction of fatty acid content in rabbit meat and discrimination between conventional and organic production systems by NIRS methodology. **Food Chemistry**, v. 100, p. 165-170, 2007.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; PIVA, G. Conjugated linoleic acid (CLA) and fatty acid composition of milk, curd and Grana Padano cheese in conventional and organic farming systems. **Journal of Dairy Research**, v.76, p.278-282, 2009.

PURNOMOADI, A.K.K.; BATAJOO, K.U.; TERADA, F. Influence of feed source on determination of fat and protein in milk by near-infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.9, p.447-452, 1999.

RADIN, N.S. Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. **Methods in enzymology**, v.72, p.5-7, 1981.

REIS, R.B.; GLÓRIA, J.R.; VIEIRA, L.R.; FARIA, B.N. Manipulação da composição do leite pela nutrição da vaca. In: SIMPÓSIO DO AGRONEGÓCIO DO LEITE: produção, gestão e qualidade, 1., 2004, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2004.

RINNAN, A.; BERG, F.V.D.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common preprocessing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.10, p.1201-1222, 2009.

RODRIGUES-OTERO, J.L.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.2815-2818, 1997.

RU, Y.L.; GLATZ, P.C. Application of near infrared spectroscopy (NIR) for monitoring the quality of milk, cheese, meat and fish. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 13, p.1017-1025, 2000.

RUSSELL, S.J.; NORVIG, P. **Artificial intelligence: a modern approach**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1995, 932p.

RUTTEN, M.J.M.; BOVENHUIS, H.; HETTINGA, K.A.; Van VALENBERG, H.J.F.; Van ARENDONK, J.A.M. Predicting bovine milk fat composition using infrared spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer. **Journal Dairy Science**, v.92, p.6202-6209, 2009.

RYHÄNEN, E.; TALLAVAARA, K.; GRIINARI, J.M.; JAAKKOLA, S.; MANTERE-ALHONEN, S.; SHINGFIELD, K.J. Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. **International Dairy Journal**, v.15, p.207-217, 2005.

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

SANTOS-ZAGO, L.F.; FERREIRA, L.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Os efeitos do ácido linoleico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, v.21, p.195-221, 2008.

SARANWONG, S.; KAWANO, S. System design for non-destructive near infrared analyses of chemical components and total aerobic bacteria count of raw milk. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.16, p.389-398, 2008.

SASIC, S.; OSAKI, Y. Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids.1 Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares regression and band assignment. **Analytical Chemistry**, v.73, p.64-71, 2001.

SASIC, S.; OSAKI, Y. Wavelength-wavelength and sample-sample two-dimensional correlation analyses of short-wave near-infrared spectra of raw milk. **Applied Spectroscopy**, v.55, p.163-172, 2001b.

SATO, T.; YOSHINO, M.; FARUKAWA, S.; SOMEYA, Y.; YANO, N.; UOZUMI, J.; IWAMOTO, M. Analysis of milk constituents by near infrared spectrophotometer method. **Japanese Society of Animal Science**, v.58, p.698-706, 1987.

SAUER, E. **Desenvolvimento de metodologias multivariadas para análise de queijos por espectroscopia drift**. 2007. 134f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation by simplified least square procedures, **Analytical Chemistry**, v.36, p.1627-1632, 1964.

SCHÖLKOPF, B.; SMOLA, A.J. **Learning with kernels**. Londres: The MIT Press, 2002, 33p.

SCHONFELDT, H.C.; HALL, N.G.; SMIT, L.E. The need for country specific composition data on milk. **Food Research International**, v.47, p.207-209, 2012.

SCHWENDEL, B.H.; WESTER, T.J.; MOREL, P.C.H.; TAVENDALE, M.H.; DEADMAN, C.; SHADBOLT, N.M.; OTTER, D.E. Invited review: Organic and conventionally milk – An evaluation of factors influencing milk composition. **Journal Dairy Science**, v.98, p.721-746, 2015.

SEÇKIN, G.H.; GURSOY, O.; KINIK, O.; AKBULUT, N. Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products. **Food Science and Technology**, v.38, p.909-915, 2005.

SEKULIC, S.; SEASHOLTZ, M.B. WANG, Z.; KOWALSKI, B.R. Nonlinear multivariate calibration methods in analytical chemistry. **Analytica Chemistry**, v.65, p.835-845, 1993.

SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. **Analytica Chimica Acta**, v.465, p.39-62, 2002.

SHARDA, R.; PATIL, R.B. Connectionist approach to time series prediction: an empirical test. **Journal of Intelligent Manufacturing**, v. 3, p.317-323, 1992.

SIESLER, H.W.; OZAKI, Y.; KAWATA, S.; HEISE, H.M. **Near-infrared spectroscopy: Principles, instruments, applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, 348p.

SILVA, C.B.S. **Processamento de sinais de ressonância magnética nuclear usando classificador neural para reconhecimento de carne bovina**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica)- Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007b.

SILVA, F.E.B. Otimização de métodos de regressão multivariada para quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima em medicamentos. **Revista Produção On Line**, edição especial, p.1-17, 2007.

SILVA, I.N.; SPATTI, D.H.; FLAUZINO, R.A. **Redes neurais artificiais para engenharia e ciências aplicadas**. São Paulo: Artliber, 2010, 399p.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 6. ed. Chichester: John Willey & Sons, 2005, 550p.

SIMIONATO, J.I.; GARCIA, J.C.; SANTOS, G.T.; OLIVEIRA, C.C.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E. Validation of the determination of fatty acids in milk by gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.520-524, 2010.

SIMÕES, S.S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectroscopia NIR e calibração multivariada**. 2008. 98f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

SIRI-TARINO, P.W.; SUN, Q.; HU, F.B.; KRAUSS, R.M. Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. **Current Atherosclerosis Reports**, v.12, p.384-390, 2010.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, 836p.

SMEDES, F.; ASKLAND, T.K. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v.38, p.193-201, 1999.

SOARES, J.P.G.; SALMAN, A.K.D.; AROEIRA, L.M.J.; FONSECA, A.H.; SANAVRIA, A.; SILVA, J.B.; FAGUNDES, G.M. Organic milk production in Brazil: technologies for sustainable production. **ICROFS News**, v.1, p.6-9, 2012.

SOMMERFELD, M. Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. **Progress of Lipid Research**, v.22, p. 221-233, 1983.

SOUSA, E.R. **Determinação de parâmetros de qualidade de gasolina e estudo de contaminantes utilizando espectros do infravermelho próximo na fase vapor.** 2005. 142f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SOUZA, A.P.; MENEZES, J.E. Box-Jenkins e rede neural artificial para previsão de séries temporais: estudo comparativo entre modelos. **Conjuntura Econômica Goiana**, v. 24, p. 89-102, 2013.

SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. **Colesterol da mesa ao corpo.** São Paulo: Livraria Varela, 2006, 85p.

SOYEURT, G.; GENGLER, N. Genetic variability of fatty acids in bovine milk. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v.12, p.203-210, 2008.

SOYEURT, H.; DARDENNE, P.; DEHARENG, F.; LOGNAY, G.; VESELKO, D.; MARLIER, M. et al. Estimation of fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. **Journal Dairy Science**, v.89, p.3690-3695, 2006.

SOYEURT, H.; DEHARENG, F.; GENGLER, N.; McPARLAND, S.; WALL, E.; BERRY, D.P.; COFFEY, M.; DARDENNE, P. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. **Journal Dairy Science**, v.94, p. 1657-1667, 2011.

SPIENGELMAN, C.H.; McSHANE, M.J.; GOETZ, M.; MOTAMED, M.; YUE, Q.L.; COTÉ, G.L. Theoretical justification of wavelength selection in PLS calibration: Development of a New Algorithm. **Analytical Chemistry**, v.70, p.35-44, 1998.

STOOP, W.M.; Van ARENDONK, J.A.M.; HECK, J.M.L.; Van VALENBERG, H.J.F.; BOVENHUIS, H. Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. **Journal Dairy Science**, v.91, p.385-394, 2008.

SVOZIL, D.; KVASNICKA, V.; POSPICHAL, J. Introduction to multi-layer feed-forward neural networks. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 39, n.1., p. 43-62, 1997.

TANAMATI, C.; OLIVEIRA, C.C.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Comparative study of total lipids in beef using chlorinated solvent and low toxicity solvents methods. **JAOAC**, v.82, p.393-397, 2005.

TARLEY, C.R.T.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato sauce. **Food Chemistry**, v.88, p.1-6, 2004.

THISSEN, U.; PEPERS, M.; ÜSTÜN, B.; MELSSSEN, W.J.; BUYDENS, L.M.C. Comparing support vector machines to PLS for spectral regression applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.73, p.169-179, 2004.

THYHOLT, K.; ISAKSSON, T. Near infrared spectroscopy of dry extracts from high moisture food products on solid support – A review. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v.5, p.179-193, 1997.

- TOLEDO, P.; ANDRÉN, A.; BJÖRCK, L. Composition of raw milk from sustainable production systems. **International Dairy Journal**, v.12, p.75-80, 2002.
- TONIAL, I.B.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; PERINI, A.L.; MORAIS, D.R.; BANI, F.A.; VISENTAINER, J.V. Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.59, p.78-81, 2009.
- TROCINO, A.; XICCATO, G.; MAJOLINI, D.; TAZZOLI, M.; BERTOTTO, D.; PASCOLI, F.; PALAZZI, R. Assessing the quality of organic and conventionally-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Food Chemistry**, v.131, p.427-433, 2012.
- TSENKOVA, R.; ATANASSOVA, S.; TOYODA, K.; OZAKI, Y.; ITOH, K.; FEARN, T. Near infrared spectroscopy for dairy management: Measurement of unhomogenized milk composition. **Journal Dairy Science**, v.82, p.2344-2351, 1999.
- TVRZICKÁ, E.; VECKA, M.; STANKOVÁ, B.; ZÁK, A. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: quantitative aspects. **Analysis Chimica Acta**, v.465, p.337-350, 2002.
- UNICAMP, Laboratório de quimiometria em química análítica, LAQQA. Campinas, 2014. Disponível em: <<http://laqqa.iqm.unicamp.br/CalibMultQui.html>>. Acesso em: 19 abr. 2014.
- VAPNIK, V. **Estimation of dependences based on empirical data**. New York: Springer, 1982, 399p.
- VAPNIK, V. **The nature of statistical learning theory**. New York: Springer, 1995, 187p.
- VAPNIK, V.; LERNER, A. Pattern recognition using generalized portrait method. **Automation and Remote Control**, v.24, p.774, 1963.
- VARGAS, D.P. **Efeito da sazonalidade e do nível tecnológico de unidades produtoras na qualidade e potencialidade nutracêutica do leite bovino**. 2015. 115f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- VILLAR, A.; GORRITXATEGI, E.; ARANZABE, E.; FERNÁNDEZ, S.; OTADUY, D.; FERNÁNDEZ, L.A. Low-cost visible-near infrared sensor for on-line monitoring fat and fatty acids content during the manufacturing process of the milk. **Food Chemistry**, v.135, p. 2756-2760, 2012.
- VISENTAINER, J.V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v.35, p.274-279, 2012.
- VISENTAINER, J.V.; IKEGAKI, M.; FRANCO, M.R.B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2006, 128p.
- VISENTAINER, J.V.; NOFFS, M.D.; CARVALHO, P.O.; ALMEIDA, V.V.; OLIVEIRA, C.C.; SOUZA, N.E. Lipid content and fatty acid composition of 15 marine fish species from the Southeast Coast of Brazil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.84, p.543-547, 2007.

WENTZELL, P.D.; BROWN, C.D. **Signal processing in analytical chemistry** Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 36p.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**, 2.ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 2001, 312p.

WOLD, H. **Non linear estimation by iterative least squares procedures**. New York: Wiley, 1966, 271p.

WOLD, S. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.2, p.37-52, 1987.

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

WOODWARD, A.M.; ALSBERG, B.J.; KELL, D.B. The effect of heteroscedastic noise on the chemometric modeling of frequency domain data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 40, p.101-107, 1998.

WORKMAN JR., J.J.; KOWALSKI, B.R.; BRO, B. Review of chemometrics applies to spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.31, p.1985-1995, 1996.

WU, D. et al. Study on infrared spectroscopy technique for fast measurement of protein content in milk powder based on LS-SVM. **Journal of Food Engineering**, v.84, 2008b.

WU, D.; FENG, S.; HE, Y. Infrared spectroscopy technique for the nondestructive measurement of fat content in milk powder. **Journal Dairy Science**, v.90, p.3613-3619, 2007.

WU, D.; HE, Y.; FENG, S. Short-wave near-infrared spectroscopy analysis of major compounds in milk powder and wavelength assignment. **Analytica Chimica Acta**, v.610, p. 232-242, 2008.

WU, W.; GUO, Q.; MASSART, D.L. The robust normal variate transform for pattern recognition with near-infrared data. **Analytica Chimica Acta**, v.87, p.382, 1999.

WU, W.; WALCZAK, V.; MASSART, D.L.; HEUERDING, S.; ERNI, F.; LAST, I.R.; PREBBLE, K.A. Artificial neural networks in classification of NIR spectral data: Design of the training set. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.33, p.35-46, 1996.

XIAOBO, Z.; JIEWEN, Z.; POVEY, M.J.W.; HOLMES, M.; HANPIN, M. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v.667, p.14-32, 2010.

YANG, H.; GRIFFITHS, P.R.; TATE, J.D. Comparison of partial least squares regression and multi-layer neural networks for quantification on nonlinear systems and application to gas phase Fourier transform infrared spectra. **Analytica Chimica Acta**, v.489, p.125-136, 2003.

ZENI, D. **Determinação de cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS)**. 2005. 54f. Dissertação (Mestrado em Química- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

ANEXO

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA

PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA

ISSN 1678-3921

ISSN da versão impressa 0100-204X

Diretrizes para Autores

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

“Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “.....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer:

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

- Não devem conter palavras que compoñham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.

- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.

- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

- Redação das citações fora de parênteses

- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.

- Devem ser auto-explicativas.

- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.

- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

- Notas de rodapé das tabelas

- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

- Devem ser auto-explicativas.

- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.

- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).

- Não usar negrito nas figuras.

- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisões), Referências, tabelas e figuras.

- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- Resumo com 100 palavras, no máximo.

- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.

- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meio de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).
2. O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.
3. O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo; Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.
4. Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.
5. Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.
6. Diante do grande número de trabalhos recebidos para publicação (média de 110 por mês), solicitamos sua concordância com os seguintes procedimentos adotados pela revista PAB:

Os trabalhos são analisados pela Comissão Editorial, antes de serem submetidos à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se os seguintes aspectos, entre outros: escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura; resultados com contribuição significativa; qualidade das tabelas e figuras; e, finalmente, originalidade e consistência das conclusões.

Após a aplicação desses critérios, caso o número de trabalhos aprovados ultrapasse a capacidade de publicação mensal, é aplicado o critério da **relevância relativa**. Segundo esse critério, os trabalhos com contribuição mais significativa para o avanço do conhecimento científico são aprovados. Esse critério é aplicado apenas aos trabalhos que atendam aos requisitos de qualidade, mas que, por excederem a capacidade de publicação mensal da revista, não podem ser todos aprovados. Por esse mesmo motivo, informamos que não aceitamos pedido de reconsideração.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.