



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**

GABRIEL MONTEIRO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU
UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS E QUIMIOMETRIA**

**CAMPINA GRANDE - PB
2020**

GABRIEL MONTEIRO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU
UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS E QUIMIOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química industrial

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Simone da Silva Simões

**CAMPINA GRANDE - PB
2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586i Silva, Gabriel Monteiro da.
Identificação e quantificação de adulterantes em leite cru utilizando imagens digitais e quimiometria [manuscrito] / Gabriel Monteiro da Silva. - 2020.
48 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2020.
"Orientação : Profa. Dra. Simone da Silva Simões, Departamento de Química - CCT."
1. Quimiometria. 2. Photometrix. 3. Calibração multivariada. 4. Química analítica. I. Título
21. ed. CDD 543

GABRIEL MONTEIRO DA SILVA

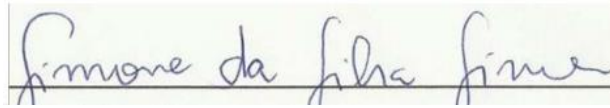
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ADULTERANTES EM LEITE CRU
UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS E QUIMIOMETRIA

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Área de concentração: Química Analítica

Aprovado em: 07/12/2020.

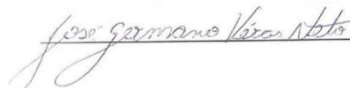
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Simone da Silva Simões (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Me. Newton Carlos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



Prof. Dr. José Germano Veras Neto
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais que sempre foram um porto seguro em minha vida e a Virgem Maria, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida, ter me escolhido como filho amado para estar neste mundo.

Ao meu pai Marcos Rodrigues, pelo exemplo de pai e melhor amigo em minha vida.

À minha mãe Josefa Monteiro, que sempre esteve comigo orando por mim e dando discernimento sobre a minha profissão e agradeço por ela estar sempre comigo sendo uma mãe fiel e pesquisadora junto a mim.

À minha Orientadora Simone da Silva Simões pelas inúmeras conversas e orientações ao longo deste trabalho.

A minha família por ser meu porto seguro.

Aos meus orientadores de pesquisa e amigos Newton Carlos Santos e Raphael Lucas Jacinto Almeida, que são presentes de Deus em minha jornada acadêmica.

À minha querida amiga, professora e irmã Cibele Medeiros pelos longos anos de laboratório na Escola Severino Cabral e na UFCG onde criamos uma linda e frutuosa amizade.

Aos professores do Curso de Química Industrial da UEPB, em especial: Dr^a. Flávia Carolina Alonso Buriti, Dr^a. Eliane Rolim Florentino, Dr^a. Ângela Maria Santiago, Dr^a. Ligia Maria, Dr. Carlos Pereira de Lima, Dr^a. Pablícia Oliveira Galdino, Dr^a. Vandeci Dias dos Santos, que contribuíram ao longo de cinco anos, por meio das disciplinas e orientações em pesquisas.

Ao NUPEA (Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos) pelos cinco anos de pesquisa e colaboração.

Aos meus irmãos de criação: Jefferson Rodrigues e Thiago de Oliveira Sales

À irmã que a UEPB me presenteou: Maria Fernanda

À minha irmã e intercessora: Alijocene Azevedo

Aos meus amigos do Timor Leste em especial, Julia Maria Orleans, Cecília Ximenes Pereira, Gaspar da Costa Martins.

Ao Professor José Germano Veras Neto por aceitar participar da banca desde trabalho, pois para mim Ele sempre será um pesquisador que terei como referencial.

Ao meu laboratório GM-Lab (Gabriel Monteiro Laboratório).

Ao GMAQ (Grupo de Metodologias Analíticas e Quimiometria).

A UEPB, pela formação acadêmica que recebi

“É justo que muito custe o que muito vale”
(Santa Teresa D’Ávila)

RESUMO

A qualidade com que o leite cru chega as plataformas de recepção e distribuição é um dos atributos mais importantes para a indústria de laticínios, visto que o mesmo pode ser facilmente adulterado na etapa de beneficiamento. Desta forma, este trabalho propõe um método rápido utilizando imagens digitais e ferramentas quimiométricas para detectar e quantificar a presença de adulterantes em leite cru. Para isso preparou-se em laboratório amostras adulteradas de leite contendo misturas binárias e ternárias dos adulterantes formol (0,1 a 0,6 m.v⁻¹ %), amido (1 a 6 m.v⁻¹ %) e soro (5 a 30 v.v⁻¹ %). Em seguida, adicionou-se o reagente cromogênico específico para cada adulterante, que serviu para melhorar o contraste da imagem. O reagente cromogênico verde de bromocresol (C₂₁H₁₄Br₄O₅S) foi usado para análise do formol, o vermelho de metila (C₁₅H₁₅N₃O₂) para o soro e a solução de iodolividona a 2% para o amido. As imagens digitais foram capturas utilizando a partir de um aparelho celular e os valores de RGB (*red*, *green* e *blue*) foram extraídos utilizando o aplicativo *Photometrix*®. Foi utilizada uma região de interesse (ROI) de 64 X 64. Os modelos multivariados foram construídos utilizando o *software The Usramble X*® versão 10.4. A análise exploratória utilizando análise em componentes principais (PCA), possibilitou a visualização de agrupamentos distintos do leite puro e adulterado. Exceto para a adulteração com soro devido a este adulterante estar na própria constituição do leite. Em relação aos modelos de calibração multivariada, que foram validados por série de teste, pode-se afirmar que obtiveram resultados satisfatórios visto que foram aplicados a amostras contendo os três adulterantes para simular uma adulteração real. Os modelos construídos para quantificação de amido, formol e soro obtiveram coeficiente de determinação (R²) de 0,9060; 0,8056 e 0,9012 na etapa de validação, respectivamente. Deste modo, o trabalho desenvolvido mostra a viabilidade do uso de imagens digitais e ferramentas quimiométricas para a identificação e quantificação de adulterantes leite estudado.

Palavras-chave: Quimiometria. RGB. Photometrix®. Calibração Multivariada

ABSTRACT

The quality with which raw milk reaches the reception and distribution platforms is one of the most important attributes for the dairy industry, since it can be easily adulterated in the processing stage. Thus, this work proposes a fast method using digital images and chemometric tools to detect and quantify the presence of adulterants in raw milk. For this purpose, adulterated samples of milk containing binary and ternary mixtures of the adulterants formaldehyde (0.1 to 0.6 $\text{mv}^{-1}\%$), starch (1 to 6 $\text{mv}^{-1}\%$) and serum (5 to 30 $\text{vv}^{-1}\%$) were prepared in the laboratory. Then, the specific chromogenic reagent for each adulterant was added, which served to improve the contrast of the image. The bromocresol green chromogenic reagent ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$) was used for the analysis of formaldehyde, methyl red ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) for serum and 2% iodolividone solution for starch. The digital images were captured using a cell phone and the RGB values (red, green and blue) were extracted using the Photometrix® application. A 64 X 64 region of interest (ROI) was used. Multivariate models were built using The Uscramble X® software version 10.4. The exploratory analysis using principal component analysis (PCA), allowed the visualization of different clusters of pure and adulterated milk. Except for adulteration with serum due to this adulterant being in the milk itself. Regarding the multivariate calibration models, which were validated by test series, it can be said that they obtained satisfactory results since they were applied to samples containing the three adulterants to simulate a real adulteration. The models constructed for the quantification of starch, formaldehyde and serum obtained a coefficient of determination (R^2) of 0.9060; 0.8056 and 0.9012 in the validation stage, respectively. Thus, the work developed shows the feasibility of using digital images and chemometric tools for the identification and quantification of the studied milk adulterants.

Keywords: Chemometrics. RGB. Photometrix®. Multivariate Calibration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mecanismo de reação da molécula de amido reagindo com iodo.....	15
Figura 2 -	Mecanismo de reação para identificação de formol a partir do cloreto de ferro em meio ácido.....	16
Figura 3 -	Representação do espaço tridimensional do sistema RGB.....	16
Figura 4 -	Processo de obtenção da matriz dos histogramas de cores.....	18
Figura 5 –	Variáveis estudadas (a) sem planejamento de experimentos e (b) com planejamento de experimentos.....	18
Figura 6 –	Exemplo típico de misturas com três componentes.....	20
Figura 7 –	Representação gráfica de dois grupos de amostras no espaço bidimensional definido por var1 e var2 e as respectivas componentes principais.....	21
Figura 8 –	Aparato para obtenção das imagens.....	24
Figura 9 –	Imagens digitais típicas.....	25
Figura 10 –	Histogramas de cor para amostras de leite puro e leite com formol.....	26
Figura 11 –	Histogramas de cor para amostras de leite puro e leite com soro.....	27
Figura 12 –	Histogramas de cor para amostras de leite puro e leite com amido.....	28
Figura 13 -	Gráfico de escores de PC1 <i>versus</i> PC2 <i>versus</i> PC3 para os dados de adulteração com formol.....	29
Figura 14 -	Gráfico de escores de PC1 <i>versus</i> PC2 <i>versus</i> PC3 para os dados de adulteração com soro.....	30
Figura 15 -	Gráfico de escores de PC1 <i>versus</i> PC2 <i>versus</i> PC3 para os dados de adulteração com amido.....	31
Figura 16 -	Gráfico da concentração medida <i>versus</i> predita para o leite adulterado com formol.....	32
Figura 17 -	Gráfico da concentração medida <i>versus</i> predita para o leite adulterado com soro.....	33
Figura 18 -	Gráfico da concentração medida <i>versus</i> predita para o leite adulterado com amido.....	34
Figura 19 -	Elipse de confiança para as amostras com adulterante amido.....	35
Figura 20 -	Gráfico da concentração medida <i>versus</i> predita para o leite adulterado com amido.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cal	Calibração
CMY	Ciano, magenta e amarelo (do <i>inglês</i> , Ciano, magenta e yellow)
CMYK	Ciano, magenta, amarelo e preto (do <i>inglês</i> , Ciano, magenta, yellow and black)
HSI	Matiz, saturação, intensidade (do <i>inglês</i> , Ciano, magenta, yellow and black)
HSL	Matiz, saturação e luminosidade (do <i>inglês</i> , Hue, Saturation and luminosity)
HSV	Matiz, saturação e valor (do <i>inglês</i> , Hue, saturation and value)
Lab	Luminosidade, coordenada vermelha/verde e coordenada amarelo/azul
Led	<i>light-emitting diode</i>
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais (do <i>inglês</i> , Partial Least Square Regression)
PCA	Análise de Componentes Principais (do <i>inglês</i> , Principal Component Analysis)
PC	Componente principal (do <i>inglês</i> , Principal Component)
R ²	Coefficiente de determinação
RGB	Vermelho, verde, azul (do <i>inglês</i> , Red, green and blue)
RMSEC	Erro Médio Quadrático da Calibração
RMSEST	Erro Médio Quadrático da Calibração e da Validação por Série de Teste
ROI	Região de interesse (do <i>inglês</i> , Region of interest)
Val	Validação
VL	Variáveis latentes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	Leite cru.....	14
3.1.1	Adulteração em leite.....	14
3.1.2	Métodos para detecção de adulterantes em leite.....	14
3.1.2.1	<i>Métodos para detecção de soro.....</i>	<i>15</i>
3.1.2.2	<i>Métodos para detecção de amido.....</i>	<i>15</i>
3.1.2.3	<i>Métodos para detecção de formol.....</i>	<i>15</i>
3.1.2	Imagens digitais.....	16
3.1.3	Histogramas de cores RGB.....	17
3.1.4	Quimiometria.....	18
3.1.4.1	<i>Planejamento e otimização de experimentos.....</i>	<i>18</i>
3.1.4.2	<i>Planejamento de misturas.....</i>	<i>19</i>
3.1.4.3	<i>Reconhecimento de padrões.....</i>	<i>20</i>
3.1.4.4	<i>Análise por componentes principais (PCA).....</i>	<i>20</i>
3.1.4.5	<i>Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....</i>	<i>21</i>
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1	Reagentes e amostras	22
4.2	Preparo das amostras de leite adulteradas.....	23
4.3	Reações cromogênicas para detecção de adulteração.....	23
4.4	Aquisição das imagens digitais.....	24
4.5	Tratamento de dados.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5.1	Conjunto de dados RGB.....	25
5.2	Análise exploratória utilizando PCA.....	28
5.3	Construção dos modelos para quantificação dos adulterantes.....	31
6	CONCLUSÃO.....	38
7	PERSPECTIVAS.....	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	ANEXOS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O leite é um constituinte importante da dieta humana, rico em proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas, essenciais para a saúde humana (HANSEN; FERRÃO, 2018). Seus componentes nutritivos são prontamente absorvidos, tornando o leite um alimento com considerável importância, especialmente para bebês, crianças, lactantes e idosos (POONIA *et al.*, 2017).

Sabendo-se da relevância desse alimento na nutrição dos seres humanos, fica evidente o porquê é tão importante averiguar a presença de adulterantes ou contaminação microbiológica que podem não só diminuir a qualidade nutricional do leite, mas também acarretar riscos à saúde (BURIN *et al.*, 2012). Em sua composição, o leite não deve apresentar agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico, além de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites máximos previstos em normas complementares (BRASIL, 2018).

Apesar desta proibição vários autores já verificaram adulterações em leite a exemplo de: Silva *et al.*, (2017) que encontraram adulterações com água em leite pasteurizado, Mareze *et al.*, (2015) em seus estudos com leite pasteurizado integral, encontraram adulteração com adição de água, conservantes e reconstituintes. Souza *et al.*, (2011) identificaram fraude no leite UHT com adição de formol, urina, peróxido de hidrogênio e cloro.

A análise de imagens digitais associada à análise multivariada permite o desenvolvimento de procedimentos simples, rápidos, não destrutivos e de baixo custo (PHOTOMETRIX, 2020). O uso dessas imagens obtidas por scanners, câmeras digitais e outros, fornece resultados tão precisos quanto os instrumentos associados com análise multivariada. (GRASEL *et al.*, 2016). De tal forma que já existem aplicativos para celulares para a análise multivariada de imagens digitais.

Um desses aplicativos é o *Photometrix*®, que permite a aquisição, processamento e apresentação de resultados de imagens. Este aplicativo usa a câmera principal do dispositivo para adquirir imagens, que são analisadas e decompostas (HELFER *et al.*, 2017). O aplicativo é capaz de realizar calibração de regressão linear univariada com variáveis separadas do vermelho, verde e azul (RGB); matiz, saturação e valor (HSV); matiz, saturação e intensidade (HSI); e matiz, sistemas de cores saturação e luminosidade (HSL). A câmera do smartphone responde a vermelho, verde, e luzes azuis, e também pode executar calibração multivariada (PHOTOMETRIX, 2020).

Diversas aplicações vêm sendo realizadas fazendo o uso do aplicativo *PhotoMetrix* como ferramenta de análises em alimentos, como a caracterização de taninos (GRASEL *et al.*, 2016), quantificação de etanol em cachaça (GUEDES *et al.*, 2020), quantificou o teor de ferro em suplementos vitamínicos e estabilidade térmica do leite (HELPER *et al.*, 2017), monitoramento de flúor em água (BAUMANN *et al.*, 2019) e quantificação de adulterantes em leite usando colorimetria e imagens digitais (COSTA *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo identificar adulteração em leite cru usando diferentes adulterantes como: soro, formol e amido em diferentes concentrações fazendo-se o uso de um aplicativo para *smartphone* e ferramentas quimiométricas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para detecção e quantificação de adulterantes em leite cru utilizando imagens digitais e ferramentas quimiométricas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adulterar amostras de leite cru para simular as adulterações reais realizadas por fraudadores, com base em um planejamento de misturas utilizando amido, formol e soro de queijo
- Utilizar um aparelho celular e o aplicativo photometrix® para obtenção das imagens digitais e dos valores de RGB, respectivamente;
- Analisar os histogramas de cor (RGB) gerados a partir das imagens digitais;
- Utilizar técnicas de reconhecimento de padrões não supervisionados (PCA) para visualização de possíveis agrupamentos entre das amostras autênticas e adulteradas;
- Quantificar os adulterantes formol, amido e soro nas amostras adulteradas utilizando calibração multivariada (PLS).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Leite cru

É o leite produzido em propriedades rurais, refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados sob serviço de inspeção oficial, não deve apresentar resíduos de produtos de uso veterinário além de contaminantes como inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade (BRASIL, 2018).

Os benefícios do consumo de leite são atribuídos à presença de água, eletrólitos (como sódio e potássio), carboidratos (4% a 5%, proporção semelhante à encontrada nos isotônicos), proteínas e ao fato do leite apresentar maior tempo de esvaziamento gástrico. Além disso, o cálcio presente, desempenha papel importante na contração muscular, e a vitamina D na mineralização óssea (PEGORETTI *et al.*, 2015).

3.1.1 Adulteração em leite

A fraude no leite é o ato de reduzir intencionalmente sua qualidade pela mistura ou substituição de produtos perigosos. O mais importante é a adulteração economicamente motivada, que tem como objetivo maximizar as receitas com a adição de água, glicose ou outros açúcares, proteínas não lácteas, como os isolados de soja e ervilha (DU *et al.*, 2018). Uma das formas mais comuns para adulterar o leite é o uso de água, soro ou outros elementos que tem como função o aumento do volume do leite. Amido, sais e açúcares são utilizados como reconstituintes da densidade normal do leite adulterado. Substâncias como formol, hipoclorito ou peróxido de hidrogênio tem como finalidade de aumentar o tempo de armazenamento do leite, pela inibição do crescimento microorgânico. Além desses, hidróxido de sódio, e o bicarbonato de sódio tem a função de mascarar a acidez da fermentação microbiana (ALMEIDA, 2013).

3.1.2 Métodos oficiais para detecção de adulterantes em leite

Alguns métodos têm sido descritos para a detecção de adulteração em leite. No entanto, apesar de eficientes, eles podem ser demorados e não acessíveis a população em geral.

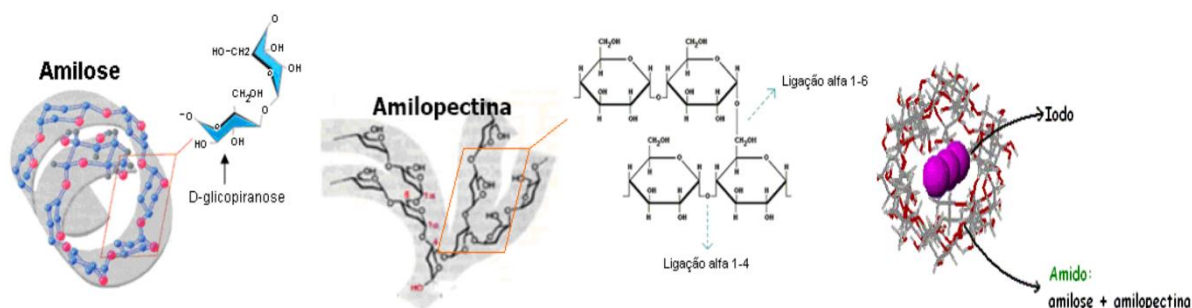
3.1.2.1 Método para a detecção de soro

De acordo com BRASIL (2006), um dos métodos oficiais para detectar adição de soro de queijo no leite é a cromatografia líquida de alta eficiência, (do inglês, *high-performance liquid chromatography*), sendo uma técnica mundialmente aceita para identificar e quantificar o caseinomacropeptídeo (CMP) (Fukuda *et al.*, 2003). Já o teste qualitativo pelo reativo de *Ehrlich* tem o objetivo de identificar o ácido siálico. Vale salientar que para o desenvolvimento dessas técnicas, além de serem dispendiosas devido ao uso de reagentes de elevada pureza, também requerem a disposição de mão de obra especializada para operação dos equipamentos.

3.1.2.2 Método para a detecção de amido

A determinação qualitativa da presença de amido em leite é realizada a partir do aquecimento da amostra para promover uma abertura na cadeia helicoidal da molécula de amido permitindo a adsorção do iodo, como podemos ver o mecanismo dessa reação na Figura 1, essa adsorção irá favorecer a formação do complexo de coloração roxa-azulada, em alguns casos não é necessário levar a amostra ao aquecimento (BRASIL,2006).

Figura 1- Mecanismo de reação da molécula de amido reagindo com iodo

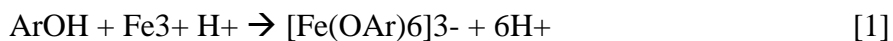


Fonte: BRASIL, 2006.

3.1.2.3 Método para a detecção de formol

Um dos métodos para identificar a presença de formol em leite, descrito por BRASIL (2006) é a adição de ácido clorídrico (HCl) P.A ou ácido sulfúrico (H₂SO₄) P.A ao leite em elevada temperatura, para que ocorra a precipitação dos interferentes (como, carboidratos e proteínas) e fique no sobrenadante o formol. E pela adição do cloreto de ferro a 2,5% (FeCl₃) para que ocorra a reação Figura 2 que irá conferir a coloração roxa na presença do formol e

amarelada na ausência. Mecanismo de reação para identificação de formol a partir do cloreto de ferro em meio ácido está descrito na equação 1 abaixo:

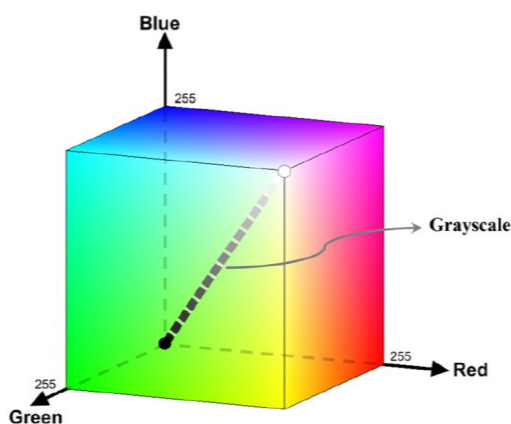


As técnicas apresentadas além de utilizarem reagentes que podem ser prejudiciais ao analista e ao meio ambiente, não estão disponíveis a população em geral. Deste modo, uma alternativa simples e acessível é o uso das imagens digitais aliadas a métodos quimiométricos.

3.1.2 Imagens digitais

Uma imagem (RGB do inglês, *Red, green and blue*), é formada por três planos de cores, vermelho (R), verde (G) e azul (B) conforme apresentado na Figura 3. O modelo RGB é o mais usado em imagens digitais, no entanto, existem outros modelos como o CMY, CMYK, HSI e Lab. O cubo RGB, com três coordenadas, gera uma matriz ($m \times n \times 3$) de 24 bits, com 8 bits para cada elemento. A mistura de RGB, cores aditivas, produzem o CMY (ciano, magenta, amarelo), cores subtrativas. Cada cor é composta por uma célula chamada pixel, variando de 0 a 255 ou 0 a 1 quando normalizado (CAPITAN-VALLVEY *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2013).

Figura 3 – Representação do espaço tridimensional do sistema RGB



Fonte: DINIZ, 2020.

É amplo o uso de imagens digitais associadas ao controle de qualidade, e processos de produção alimentícios. Na literatura diversos autores abordam o uso dessa tecnologia. De Oliveira *et al.* (2017), criaram um método de imagem digital baseado em determinar furfural em cana de açúcar. Fulgêncio *et al.* (2019), desenvolveram um método analítico para determinar a cor em cervejas utilizando imagens digitais. Diniz *et al.* (2012), agruparam corretamente

amostras de chá preto ou verde usando HSB/RGB + tons de cinza + histogramas HSB aplicando PCA. Herrero *et al.*, (2019) detectaram e quantificaram adulterantes em vinhos envelhecidos usando imagens digitais e calibração multivariada. Gisele *et al.*, (2019) classificaram e quantificaram adulteração de amostras de Ketchup com corante Sudan I. Araújo *et al.*, (2020) criou um método quimiométrico rápido e barato para identificar adulteração em açaí usando imagens digitais.

Dispositivos como *scanners*, *tablets*, computadores, *smartphones* e *webcams* são usados para obter as imagens, que são processadas usando *softwares*, como *Photometrix*, *imageJ* e *Chemostat*, para converter os pixels da imagem digital em um sinal analítico adequado (LAMARCA *et al.*, 2019 e RESQUE *et al.*, 2019). O Photometrix foi desenvolvido por um grupo de pesquisa quimiométrica pertencente a Universidade de Santa Cruz do Sul (Brasil), nele estão incluídas as ferramentas de regressão PLS para desenvolver modelos de calibração multivariada. Foi desenvolvido para a plataforma Android usando a linguagem de programação *Java* e está disponível na *Google Play Store* (HELFER *et al.*, 2015).

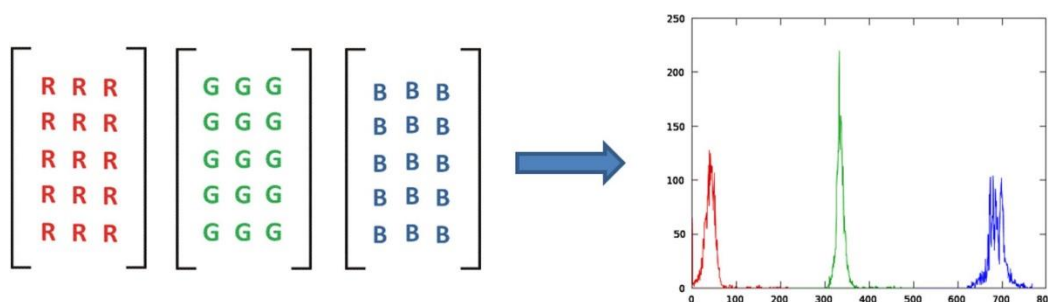
De acordo com Fernández *et al.*, (2017), estes aplicativos permitem a possibilidade realizar calibrações uni ou multivariadas por exportação dos dados para um computador para tratamento em um software convencional. O tratamento desses dados é então utilizado de forma qualitativa ou quantitativa utilizando métodos quimiométricos.

3.1.3 Histogramas de cor RGB

O histograma é caracterizado por ser uma função estatística de uma imagem que para cada nível de tom é calculado quantos pixels existem para determinada cor. Em vários processos de obtenção de imagens se utilizam o histograma como parâmetro para fornecer informações a respeito de uma imagem (SCURI, 2002).

A formação de histogramas é realizada a partir da decomposição das imagens monocromáticas 2D em canais RGB formados a partir do cálculo dos valores médios das cores RGB, obtém-se uma matriz de dados X que contém as informações digitais (DAMASCENO *et al.*, 2015). Conforme ilustrado na Figura 4 abaixo.

Figura 4 - Processo de obtenção da matriz dos histogramas de cores



Fonte: DAMASCENO *et al.*, 2015.

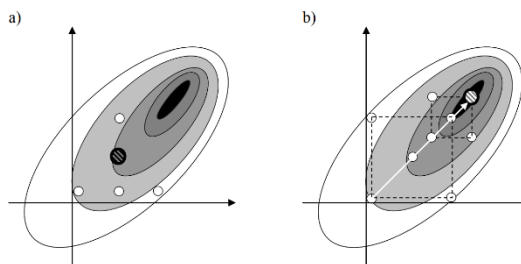
3.1.4 Quimiometria

A quimiometria surgiu a partir da necessidade de extrair informações químicas devido à grande quantidade de dados produzida pela instrumentação moderna (FERREIRA, 2015). A quimiometria pode ser dividida em três grandes áreas: o planejamento e otimização de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada.

3.1.4.1 Planejamento e otimização de experimentos

O planejamento de experimentos (DOE, do inglês *Design of Experiments*) se trata de um método quimiométrico que tem como objetivo determinar a influência de mudanças dos fatores experimentais em um processo, fornecendo informações sobre as possíveis interações, bem como o funcionamento do processo como um todo, o que não pode ser obtido mantendo algumas condições constantes e variando um único fator por vez (Figura 5) (OLSSON, 2006; ANDERSON, 1997).

Figura 5– Variáveis estudadas (a) sem planejamento de experimentos e (b) com planejamento de experimentos



Fonte: OLLSON, 2006

Quando um planejamento experimental é bem realizado acaba se tornando uma técnica de baixo custo que a partir da quantidade de experimentos irá se obter resultados confiáveis, que quando analisados corretamente gera resultados estatisticamente seguros. Uma das principais vantagens na utilização de DOE podemos ter resolução para problemas complexos (BARAD, 2014).

3.1.4.2 Planejamento de misturas

Segundo Neto *et al.* (2010) a soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura deve ser sempre 100%. Podemos escrever para qualquer mistura de q componentes a equação [2]:

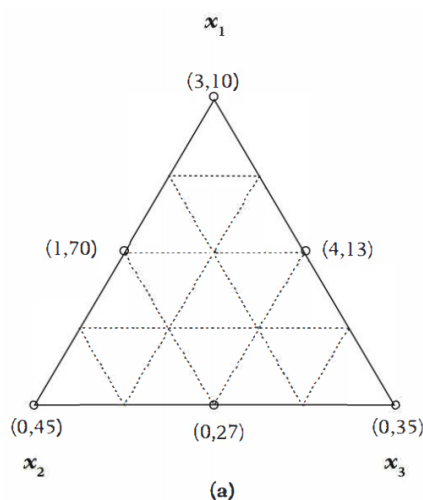
$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad [2]$$

Em que x_i representa a proporção do i -ésimo componente, esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, precisa-se apenas fixar as proporções de q-1 componentes. Com isso a proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%, para uma mistura de dois e três componentes é descrito nas equações [3] e [4] abaixo:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 \quad [3]$$

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 \quad [4]$$

Onde \hat{Y} é um valor experimental, b_1 , b_2 e b_3 são parâmetros do modelo e X_1 , X_2 e X_3 representa os pontos das composições, na Figura 6 podemos observar um triangulo de misturas com três componentes.

Figura 6 – Exemplo típico de misturas com três componentes

Fonte: BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010.

3.1.4.3 Reconhecimento de padrões

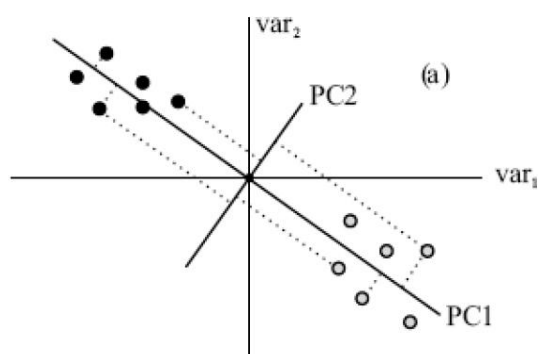
As técnicas de reconhecimento de padrões são divididas em duas classes: as não supervisionadas e supervisionadas (BRERETON, 2009). Das técnicas não supervisionadas, são utilizadas com o objetivo de verificar a tendência em similaridades ou possíveis agrupamentos, as de maior destaque são análise por componentes principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*) (VÉRAS *et al.*, 2012).

3.1.4.4 Análise por componentes principais (PCA)

Um das ferramentas que tem grande importância na análise multivariada é a PCA, é classificada como não supervisionada, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração. Ela permite mostrar a existência ou não de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamentos entre amostras (LIRA *et al.*, 2010).

É um método que projeta os dados multivariados obtidos em um espaço de dimensão menor reduzindo as dimensões do espaço original de um determinado conjunto de dados. Na Figura 7 podemos observar a representação gráfica de uma PCA (FERREIRA, 2015).

Figura 7 - Representação gráfica de dois grupos de amostras no espaço bidimensional definido por var1 e var 2 e as respectivas componentes principais



Fonte: FERREIRA, 2015.

O procedimento da análise de componentes principais é descrito como uma decomposição de uma matriz \mathbf{X} ($I \times J$) em duas matrizes, uma de escores \mathbf{T} e uma matriz ortonormal chamada de (matriz identidade) de pesos \mathbf{L} (*loadings*) a partir dela onde obtemos a seguinte equação [5].

$$\mathbf{X} = \mathbf{TL}^T \quad [5]$$

Onde os escores expressam as relações entre as amostras, enquanto os pesos indicam as relações entre as variáveis.

3.1.4.5 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Segundo Ferreira, (2015) o PLS, do inglês, *Partial Least Squares*) é construído em uma única etapa na qual a informação da matriz \mathbf{X} da propriedade de interesse é considerada durante a decomposição e compressão dos dados, as equações que representam o modelo PLS são descritas nas equações [6] e [7] abaixo.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad [6]$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \quad [7]$$

Onde: \mathbf{T} e \mathbf{U} são as matrizes dos escores; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as matrizes dos pesos das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. O \mathbf{E} representa a matriz de resíduos espectrais, enquanto que, \mathbf{F} representa a matriz dos resíduos de concentração (SIMÕES, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no NUPEA (Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos) localizado na Universidade Estadual da Paraíba e no GM.Lab (Gabriel Monteiro Laboratório) localizado no bairro de bodocongó.

4.1 Obtenção do leite e preparo do soro de queijo.

O leite bovino cru foi obtido em uma propriedade rural (fazenda Nossa Senhora das Neves), localizada na zona rural do município de Campina Grande (7°13'16.1"S 35°58'02.0"W), Paraíba, Brasil. Previamente ordenhado e conduzido sob refrigeração à (4°C) até o laboratório.

O preparo do soro de queijo foi baseado na metodologia descrita por Garcia et al., (2020) obtido da coagulação enzimática onde foi adicionado 1 mL de enzima quimosina Hannilase® em 500 mL de leite cru, em seguida foi colocado em banho-maria a 32 ± 1 °C por 60 minutos. Após este período, a massa obtida foi cortada, agitada com auxílio de uma espátula de inox e dessorada. O soro foi coletado e levado à fervura a uma temperatura de 85 ± 1 °C por 15 minutos para a inativação da enzima quimosina. E o mesmo foi armazenado em refrigerador a uma temperatura de 4 ± 1 °C até o momento do uso.

4.2 Amostras de leite adulteradas

Para compor o conjunto de amostras foi elaborado um planejamento de misturas apresentado na tabela 1, constituída por 20 amostras do leite cru (prova em branco), 20 amostras ternárias (contendo os 3 adulterantes), 15 amostras binárias (contendo 2 adulterantes) e 9 amostras contendo apenas um adulterante.

Tabela 1 – Composição das misturas.

Amostra	Adulterante %		
	Amido (m.v ⁻¹)	Formol (v.v ⁻¹)	Soro (v.v ⁻¹)
X 1.1	2	0,4	10
X 1.2	2	0,4	20
X 1.3	2	0,2	10
X 1.4	2	0,2	20
X 1.5	2	0,4	10
X 1.6	2	0,4	20
X 1.7	2	0,2	20

X 1.8	2	0,2	10
X 2.1	2	0	20
X 2.2	2	0	30
X 2.3	2	0,4	20
X 2.4	2	0,4	30
X 3.1	4	0,2	10
X 3.2	4	0	10
X 3.3	4	0	30
X 3.4	4	0,2	30
X4	6	0	30
X 5.1	6	0,2	20
X 5.2	4	0,2	20
X 5.3	4	0,2	0
X 5.4	6	0,2	0
X 6.1	2	0,4	0
X 6.2	4	0,4	10
X 6.3	6	0,4	10
X 6.4	6	0,4	0
X 7	6	0,6	0
X 8.1	4	0,4	10
X 8.2	4	0,6	10
X 8.3	0	0,4	10
X 8.4	0	0,6	10
X 9.1	2	0,2	20
X 9.2	0	0,2	20
X 9.3	2	0,6	20
X 9.4	0	0,6	20
X 10	0	0,6	30
X 11	1	0	0
X 12	3	0	0
X 13	5	0	0
X 14	0	0,1	0
X 15	0	0,3	0
X 16	0	0,5	0
X 17	0	0	5
X 18	0	0	15
X 19	0	0	25
X 20	0	0	0

Fonte: Autor,2020.

Além destas, foi preparada uma curva de calibração construída a partir de concentrações conhecidas para cada um dos adulterantes. Para a construção da curva analítica de cada adulterante foram preparadas 6 amostras e analisadas em triplicatas, nas seguintes faixas de variações: soro de queijo (5 a 30 % (v v⁻¹)), amido (1 a 6% (m v⁻¹)) e formol (0,1 a 0,6 % (v v⁻¹)).

4.3 Reagentes cromogênicos

Os adulterantes utilizados foram o formol (NEON QUÍMICA®), que variaram a concentração de 0.1 a 0.6 % (v.v⁻¹); amido de milho (Maisena®), na proporção de 1 a 6 % (m.v⁻¹); e soro de leite, na proporção de 5 a 30 % (v.v⁻¹). onde as proporções de adulterantes foram baseadas nos trabalhos de (COSTA et al., 2020) e (SILVA et al., 2012).

A fim de melhorar o contraste do formol, foi utilizado o verde de bromocresol C₂₁H₁₄Br₄O₅S (SYNTH, Diadema, SP, Brasil) preparado na concentração de 0,1% (v.v⁻¹) conforme descreve MORITA E ASSUMPCÃO (1990) pesando 0,1 g de verde de bromocresol C₂₁H₁₄Br₄O₅S e diluindo em álcool etílico (C₂H₅OH) P.A que tem ponto de viragem de 3,8 a 5,4 passando da cor amarela para azul armazenado em frasco âmbar.

Para melhorar o contraste na detecção das misturas com soro foi utilizado o vermelho de metila C₁₅H₁₅N₃O₂ (SYNTH, Diadema, SP, Brasil) na concentração de 0,1% (v.v⁻¹), preparado seguindo o procedimento descrito por BRASIL (1981) que a consiste na pesagem de 0,1 g de vermelho de metila P.A, dissolvidos em 60 mL de álcool etílico (C₂H₅OH) P.A e diluídos para a 100 mL com água destilada armazenado em frasco âmbar. Intervalo de viragem: pH 4,2 a 6,3 passando de vermelho a amarelo. Foi adquirido em uma farmácia local uma solução de iodopolividona (RIODEINE, Rioquímica®) 2% (v.v⁻¹) que é usado para detecção de amido em amostras de produtos lácteos.

4.3 Reações cromogênicas para detecção de adulteração

Os reagentes cromogênicos utilizados na etapa de *spot-test* foram indicadores ácido-base, o verde de bromocresol que cobre uma faixa de pH de 3,6 a 5,2 (em meio ácido apresenta-se com cor amarela e em meio básico cor azul). O vermelho de metila que tem uma faixa de 4,2 a 6,3 (e em meio ácido apresenta cor vermelha e em meio básico amarela). Santos *et al.*, (2012) utilizaram indicadores de pH como reagentes para melhorar o contraste de cor na identificação de adulterantes em leite. Para a identificação de amido seguiu-se a metodologia descrita por Costa *et al.*, (2020) que consistiu em adicionar iodopolividona nas amostras de leite adulteradas, onde o mesmo em presença de amido reage com coloração marrom e ausência de amido coloração amarela.

Para as reações cromogênicas específicas de cada adulterante foram adicionados 3 mL da amostra em uma cubeta circular (2.5 cm de diâmetro e 2 cm de altura) e em seguida

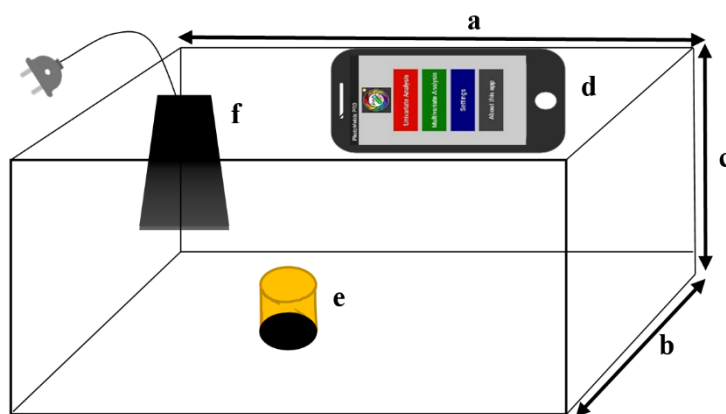
adicionados 4 gotas do reagente cromogênico específico (RC1 verde de bromocresol, RC2 vermelho de metila e RC3 iodopilividona).

Todas as reações foram realizadas em triplicatas. A prova em branco foi realizada para os 3 reagentes cromogênicos utilizados. A cada adição do reagente cromogênico, as amostras foram homogeneizadas com um bastão de vidro e então foram realizados os registros das imagens digitais.

4.4 Aquisição das imagens digitais

O registro das imagens digitais de todas as amostras foram realizadas utilizando um celular, Motorola®, motoG(6), no qual foi instalado o aplicativo Photometrix Pro® versão 1.1.16. (anexo A) é apresentada a interface do aplicativo. Para evitar o espalhamento de luz e diminuir as interferências do ambiente o celular foi fixado dentro de uma caixa com as superfícies claras, equipada com um *led do inglês, light-emitting diode* de 6 W, permitindo a melhor visualização das imagens, com distância focal da amostra de 4 cm, e com uma (ROI) região de interesse de 64 X 64, como mostra a figura 8.

Figura 8 – Aparato para obtenção das imagens



Nota: a: comprimento, b) largura, c) altura, d) celular, e) cubeta e f) fonte de luz

Fonte: Autor, 2020.

A obtenção dos valores RGB para cada imagem foi realizada utilizando o aplicativo Photometrix®. A matriz de dados foi composta por 82 amostras e 768 canais de cor (média dos parâmetros de cor RGB).

4.5 Tratamento de dados

As análises multivariadas foram realizadas utilizando o programa *The Uncramble X*® versão 10.4.

Foram desenvolvidos modelos de reconhecimento de padrões não supervisionado para visualizar os possíveis agrupamentos naturais de acordo com as similaridades e dissimilaridades das amostras. Para isso foram utilizadas as informações da matriz de dados RGB (matriz **X**).

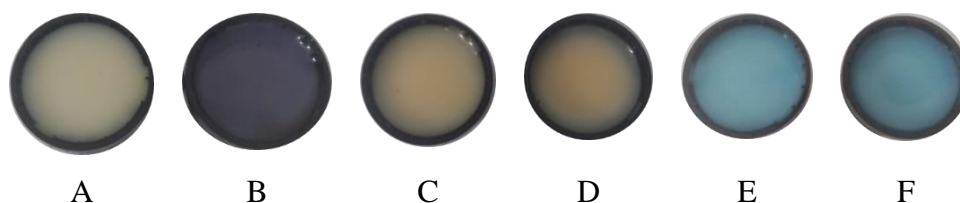
Além disso, foram construídos modelos (individuais) de calibração multivariada para a quantificação dos adulterantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Conjunto de dados RGB

Na Figura 9 é exibida a imagem digital adquirida para a amostra de leite puro e adulterada para cada reagente cromogênico. É possível observar uma distinção da amostra de leite puro (LP) e leite adulterado com amido (LA) na presença de iodopolivona (RC1). Para as demais amostras adulteradas com soro e formol usando seus reagentes cromogênicos somente com a inspeção visual não é nítida a distinção das amostras. Silva et al., (2012) avaliaram adulteração de leite cru utilizando o indicador azul de bromofenol para investigar adulteração de leite com água e ao comparar visualmente as imagens obtidas também não conseguiram distinguir as amostras com e sem adulteração somente com inspeção visual.

Figura 9 – Imagens digitais típicas

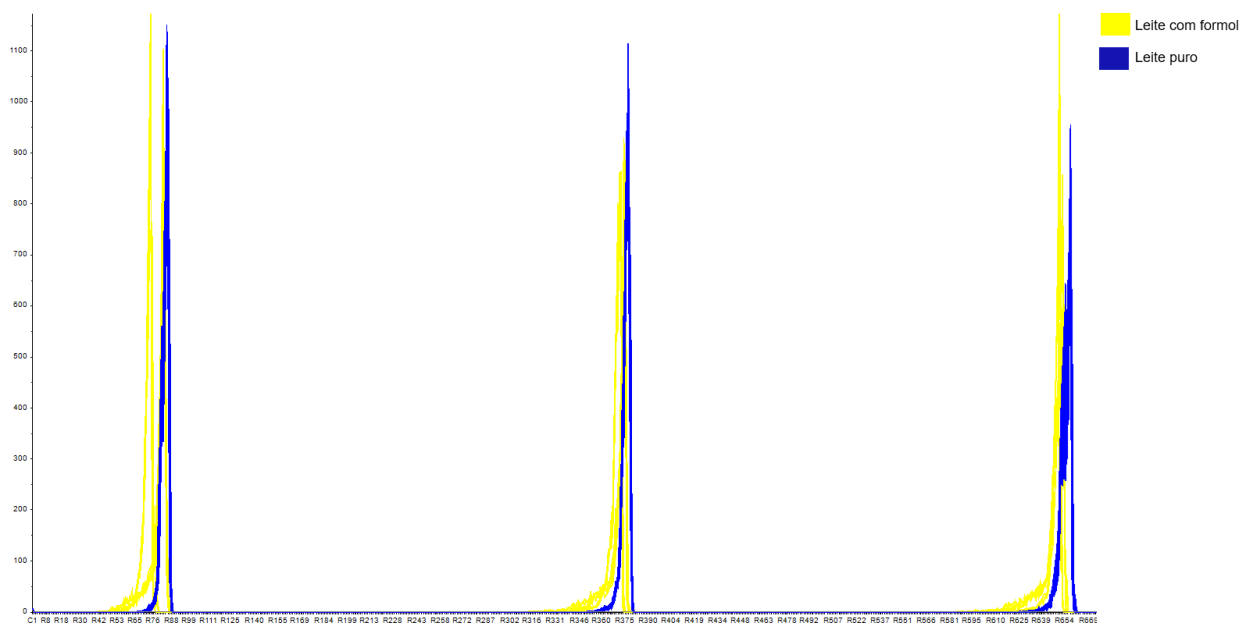


Nota: (A) Leite puro + RC3, (B) leite adulterado com amido + RC1, (C) leite puro +RC2, (D) leite adulterado com soro+ RC2 (E) leite puro +RC3 e (F) leite adulterado com formol + RC1

Fonte: Autor, 2020.

A partir da visualização das imagens partiu-se para a análise de histograma de cores de cada reagente cromogênico e seu respectivo adulterante. Na Figura 10 observa-se os histogramas formados pelas amostras de leite puro e leite adulterado com formol.

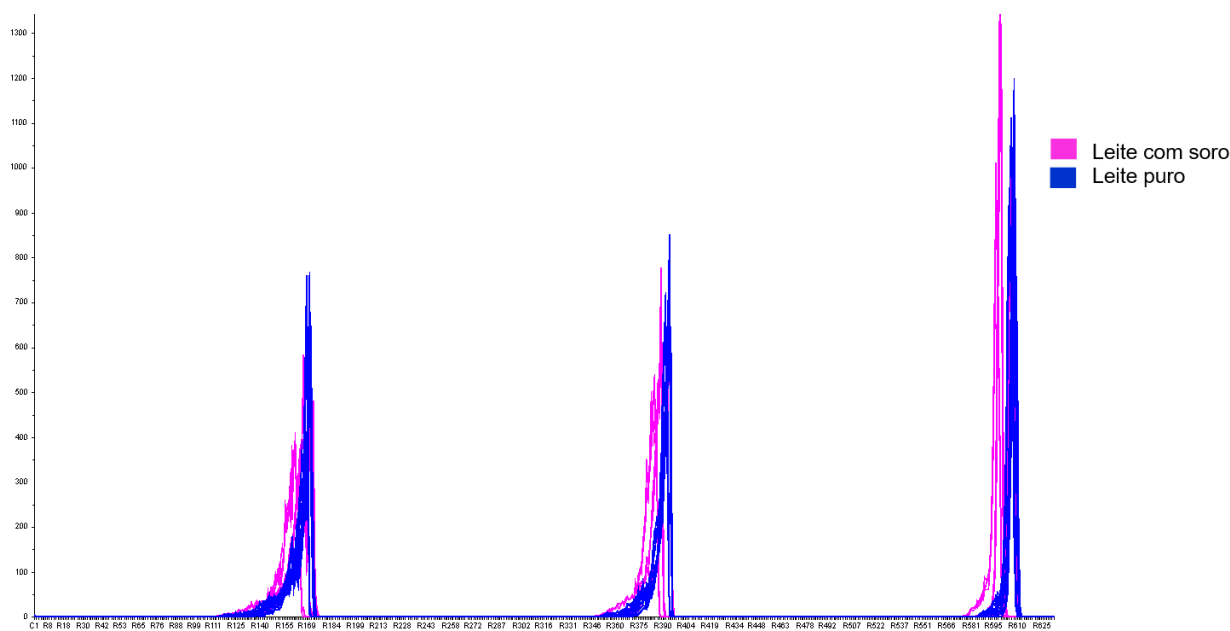
Figura 10 – Histogramas de cor para amostras de leite puro e leite com formol



Fonte: Autor, 2020.

É possível notar que as amostras de leite puro destacadas em (azul) apresentam um deslocamento quando comparadas as amostras de leite com formol em (amarelo). No (anexo B) temos os histogramas para as misturas ternárias de leite com adição de soro + formol + amido (LSFA), e misturas binárias de leite com soro + formol (LSF) e leite com formol + amido (LFA). Observa-se que há uma forte sobreposição dos histogramas de ambas amostras, e isso dificulta a identificação de quais são de leite puro e leite adulterado com formol, os picos das amostras de leite puro (LP), leite com adição de soro e formol (LSF) e leite com adição de formol e amido (LFA) tem histogramas com menor intensidade quando comparadas ao conjunto de amostras de leite adicionadas de soro, formol e amido (LSFA), um fato que pode estar relacionado é que estas amostras tem em sua composição misturas ternárias de adulterantes, e conseqüentemente aumentaram a intensidade do sinal analítico. Na figura 11 é apresentada os histogramas referentes as amostras de leite adulteradas com soro.

Figura 11 – Histogramas de cor para amostras de leite puro e leite com soro



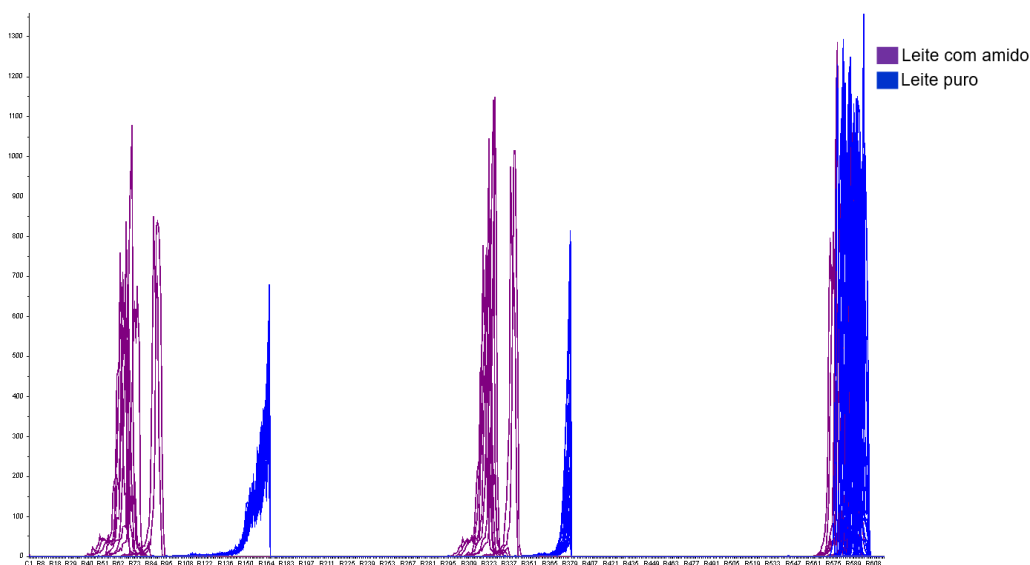
Fonte: Autor,2020.

Ao comparar os histogramas na Figura 11 para as amostras de leite puro (LP) destacadas em azul e leite com soro (LS) em rosa, observa-se que há uma semelhança na intensidade dos picos de ambas amostras, isso pode estar relacionado com a condição que o soro faz parte da composição do leite. Oliveira et al., (2018) destaca que a adulteração de leite com soro de queijo se torna mais delicada pois o próprio soro é um derivado do leite, isso justifica o fato dos picos das amostras de leite com soro (LS) estarem tão próximos aos do leite puro (LP).

Com a avaliação dos histogramas no (anexo C), das amostras de leite adulteradas com misturas binárias e ternárias quando adicionadas o RC 2 que foi um reagente usado para melhorar o contraste das amostras que continham soro, observou-se que não foi possível perceber uma diferença nos histogramas, os picos estão bem próximos e sobrepostos para as misturas de leite + soro + formol + amido (LSFA), leite + soro + amido (LSA), leite + soro + formol (LSF) e leite puro (LP).

Um fato que chama atenção os histogramas referentes a adulteração com amido apresentados na Figura 12, é que há um deslocamento significativo no eixo das abscissas, esse deslocamento é favorável pois as amostras adulteradas com amido (LA) destacadas em roxa estão bem separadas quando comparadas as amostras de leite puro (LP) em azul. Isso acontece devido o indicador ser o ideal para identificar presença de amido em leite.

Figura 12 – Histogramas de cor para amostras leite puro e leite com amido



Fonte: Autor, 2020.

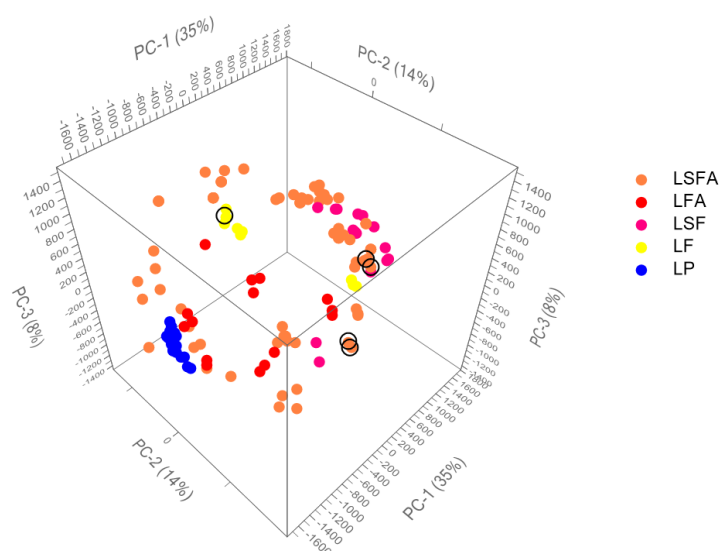
Segundo a instrução normativa N° 76 de 26 de novembro de 2018, a pesquisa do amido trata-se de um teste qualitativo o resultado positivo é indicado quando o iodo reage com a molécula do amido e forma uma coloração roxa - azulada, quando o teste é negativo a coloração é amarelada. Quando avalia-se a interação do iodo com a molécula do amido em presença de outros adulterantes obtem-se os histogramas apresentados no (anexo D). Percebe-se que o leite puro ainda tende a se separar das demais amostras adulteradas, no entanto, quando são adicionadas adulterantes binários e ternários os histogramas se sobrepõem e não fica tão nítida a separação.

5.2 Análise exploratória utilizando PCA

Foi realizada uma análise exploratória usando a técnica de análise por PCA com o conjunto de dados da matriz RGB para cada adulterante e seu reagente colorimétrico específico, a fim de avaliar possíveis sobreposições e tendências na separação do conjunto de amostras.

Na Figura 13 temos o gráfico de escores referente ao verde de bromocresol onde está condensando 57% da informação multivariada, observou-se um agrupamento das amostras de leite puro (LP) e leite com formol (LF).

Figura 13 – Gráfico de escores de PC1 versus PC2 versus PC3 para os dados de adulteração com formol

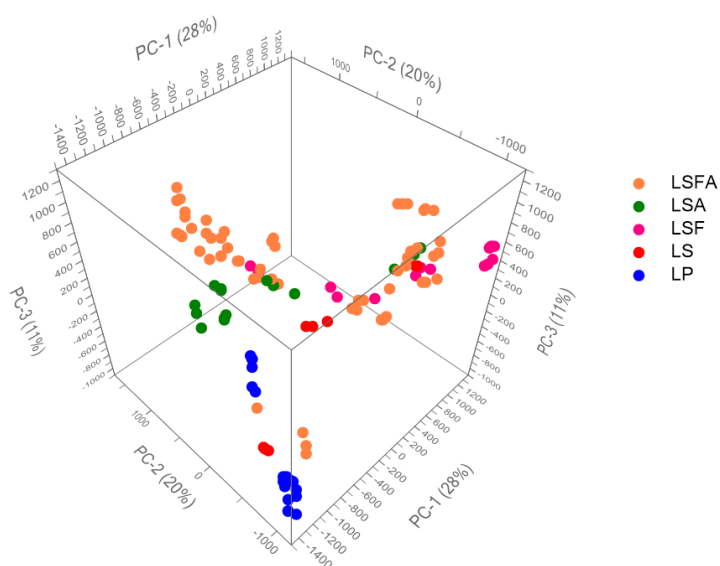


Fonte: Autor, 2020.

Nenhuma separação foi obtida para as misturas de (LSFA), (LFA) e (LSF) havendo uma sobreposição das misturas indicando similaridade entre as mesmas. Foram avaliados também para este conjunto de amostras a elipse de confiança e todas as amostras apresentaram intervalo de 95% de confiança. Apenas as amostras marcadas com preto estão fora da elipse de confiança, no processo de construção dos modelos PLS serão adotadas ferramentas para verificar se estas amostras possuem comportamento anômalo.

Como foi visto nos histogramas do item 4.1 a respeito das misturas que continham soro como adulterante, foi notada a sobreposição dos histogramas e isso dificultou a inspeção visual dos mesmos, impossibilitando de uma discriminação a respeito das amostras com ou sem adulterantes. No gráfico de escores da Figura 14 para o reagente cromogênico vermelho de metila que foi utilizado neste trabalho para melhorar o contraste das amostras adulteradas com soro de leite.

Figura 14 – Gráfico de escores de PC1 versus PC2 versus PC3 para os dados de adulteração com soro

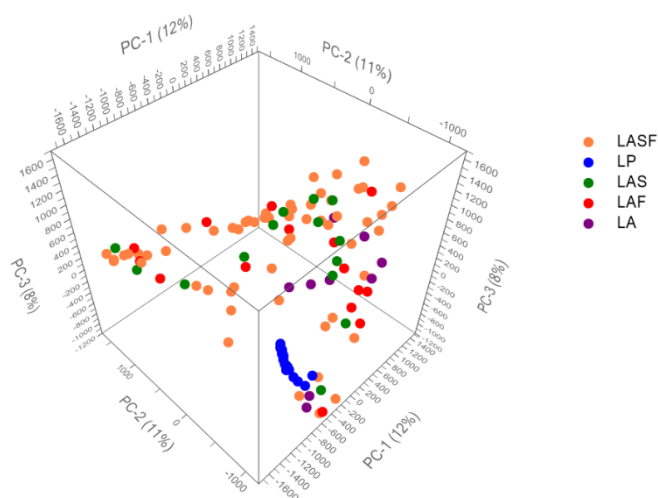


Fonte: Autor,2020.

O gráfico de escores acima representa cerca de 59% dos dados multivariados para esse reagente colorimétrico percebe-se uma leve tendência em separação das amostras de leite puro (LP) e (LSA) no entanto, o grupo as amostras de (LSFA) e (LS) estão muito próximos aos do (LP). Segundo Lenardon, (2016) devido o soro apresentar bastante semelhança com o leite isso facilita o processo de incorporação no leite cru.

No que tange a adulteração de amido é apresentada na Figura 15 que representa 31% dos dados multivariados para o reagente colorimétrico iodopolividona usado para indicar a presença de amido.

Figura 15 – Gráfico de escores de PC1 versus PC2 versus PC3 para os dados de adulteração com amido



Fonte: Autor, 2020.

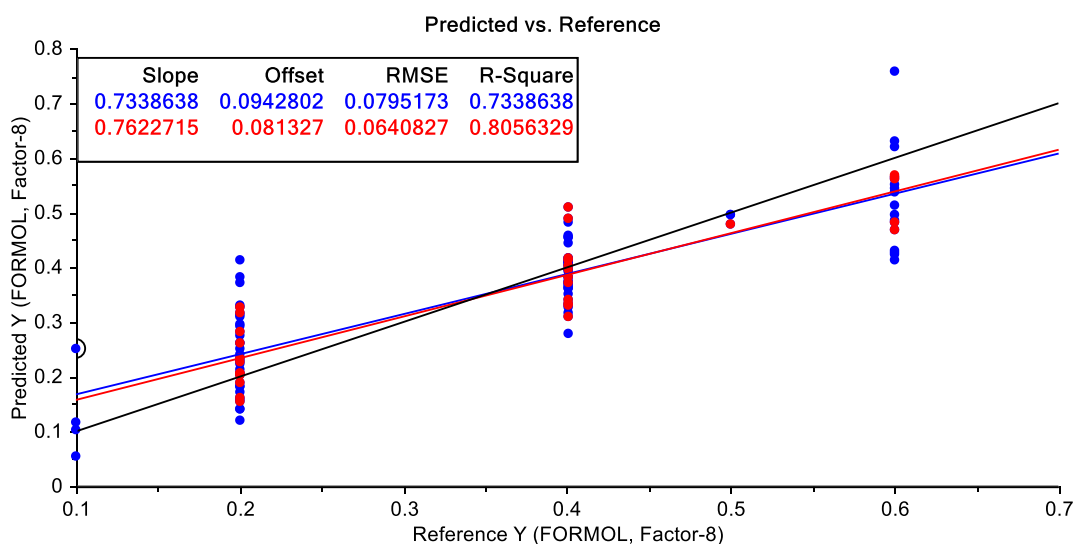
A partir da análise deste gráfico de escores é possível discriminar as amostras de leite puro (LP) das demais amostras, isso acontece devido a coloração da reação em leite puro ser amarelada e em presença de amido a coloração é marrom à roxa. Entretanto para as demais amostras não houve uma tendência em discriminar as que foram adulteradas por formol. Todas as amostras pertencem a região de 95% de confiança.

5.3 Construção dos modelos para a quantificação dos adulterantes

Os modelos da quantificação, utilizando a PLSR foram construídos com base no reagente cromogênico utilizado, já que as amostras eram compostas por leite mais uma mistura de adulterantes e tinha-se como objetivo quantificar o adulterante específico a partir da sua reação colorimétrica com o RC.

Na Figura 16 mostra o gráfico de valores obtidos experimentalmente versus valores preditos pelo modelo nas etapas de calibração e validação cruzada para o contaminante formol, na faixa de 0,1 a 0,6% (v.v⁻¹). A reta em preto representa o comportamento ideal (inclinação de 45°), a reta azul o comportamento na etapa de calibração e a vermelha na etapa de validação cruzada. O modelo foi construído com 94 amostras (sendo 30 da série de teste), utilizando 8 variáveis latentes e validado com série de teste. A Figura 16, mostra o modelo PLS e após a retirada de 6 amostras.

Figura 16 – Gráfico da concentração medida *versus* predita para o leite adulterado com formol

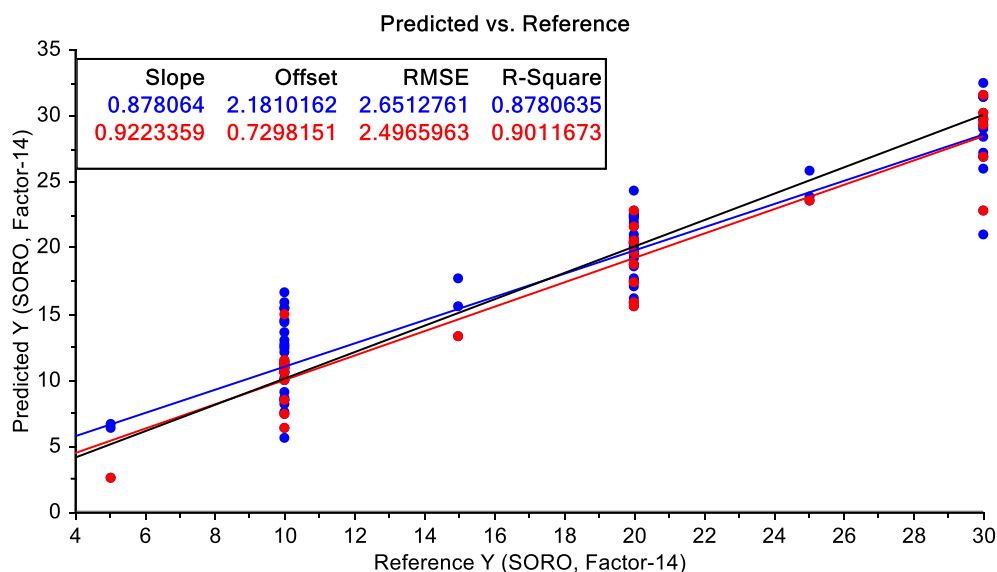


Fonte: Autor, 2020.

Na etapa de validação por série de teste avaliou-se os valores de RMSEC e RMSEST (Erro Médio Quadrático da Calibração e da Validação por Série de Teste, respectivamente) que foi de 0,079% e 0,0640%, respectivamente. Os valores do coeficiente de determinação, R^2 , foi de aproximadamente 0,73 e 0,80 nas duas etapas, mostrando uma boa correlação entre os valores de RGB e concentração de formol.

A Figura 17 mostra o gráfico de valores medidos versus valores preditos pelo modelo nas etapas de calibração e validação por serie de teste para o adulterante soro, na faixa de 5 a 30% (v.v⁻¹).

Figura 17 – Gráfico da concentração medida *versus* predita para o leite adulterado com soro



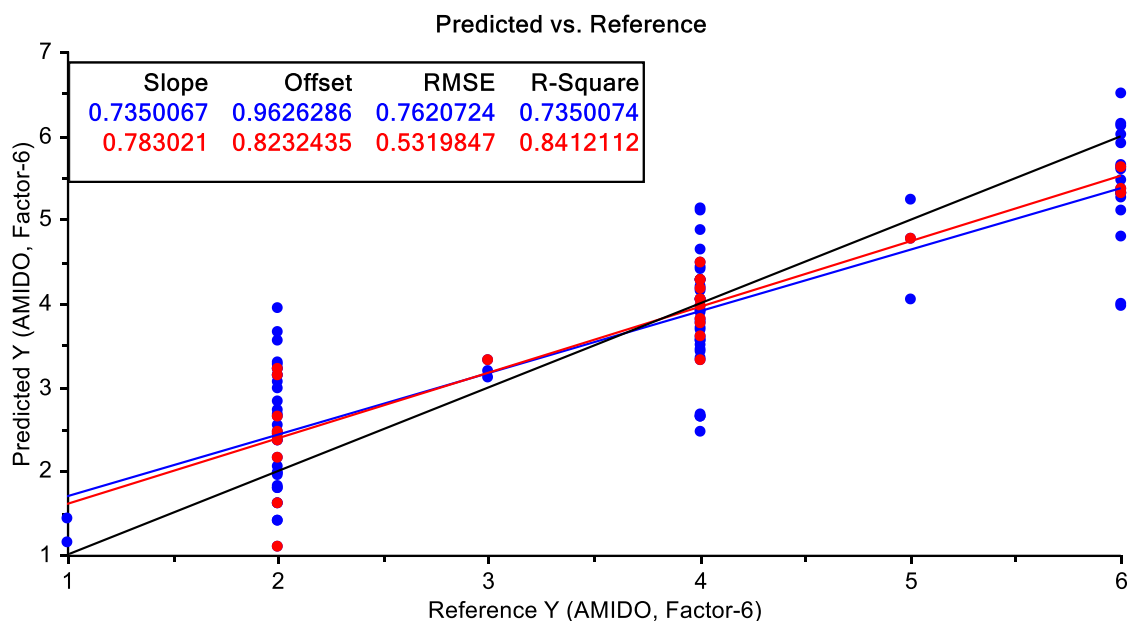
Fonte: Autor, 2020.

O modelo foi construído com 99 amostras (sendo 29 da série de teste) e 14 variáveis latentes. O que mostra a complexidade do modelo devido a similaridade do adulterante (soro) com o leite. Nas etapas de calibração e de validação por série de teste foram obtidos valores de RMSE de 2,65 e 2,49 respectivamente. Os valores de coeficiente de determinação obtidos nestas duas etapas foram de 0,8781 e 0,9012, respectivamente. Oliveira et al., (2018) avaliaram a determinação de fraude em leites UAT por adição de soro pela técnica de infravermelho próximo (NIR) e cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high-performance liquid chromatography*)

Onde obtiveram valores de R^2 de 0,8946, bem próximos ao encontrado neste trabalho, mostrando uma boa correlação entre os valores de RGB e concentração de soro.

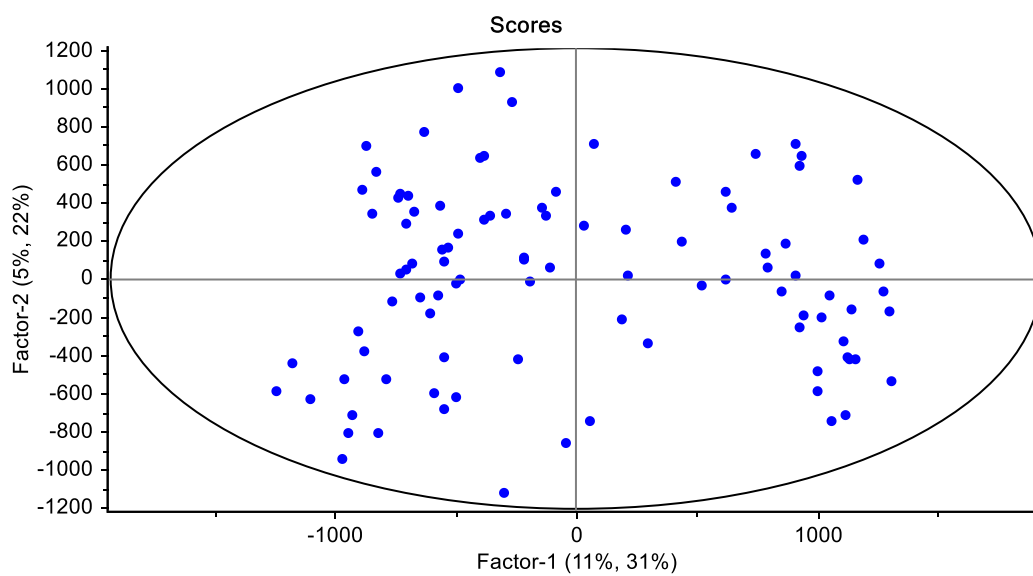
Na Figura 18 temos o gráfico de valores medido *versus* valores preditos pelo modelo nas etapas de calibração e validação por série de teste para o adulterante amido, na faixa de 1 a 6% (m.v^{-1}).

Figura 18 – Gráfico da concentração medida *versus* predita para o leite adulterado com amido



Fonte: Autor,2020.

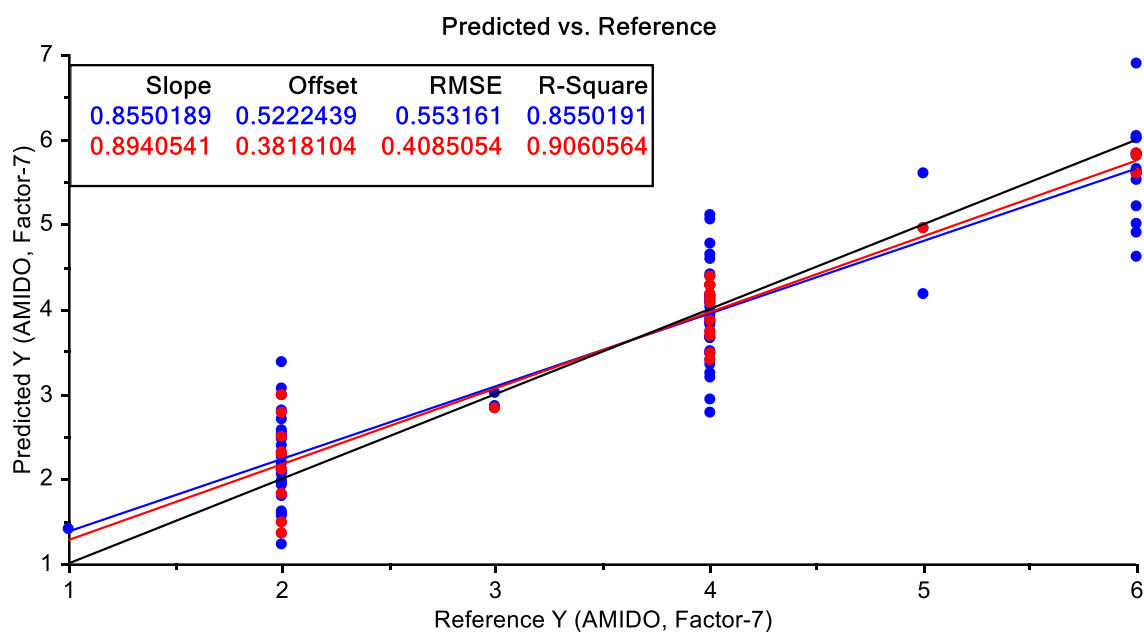
O modelo de calibração foi construído com 6 variáveis latentes. Para avaliar a qualidade do modelo de calibração utilizou-se a validação por série de teste a partir dos valores de RMSEC e RMSEST que foi de 0,76% e 0,53%, respectivamente. Os valores do coeficiente de determinação, R^2 , foi de aproximadamente 0,73 e 0,84 nas duas etapas, mostrando uma boa correlação entre os valores de RGB e concentração de amido. Pode-se observar uma dispersão para as amostras com concentrações iguais de formol devido a diversidade da composição das amostras em relação a variação na composição dos demais adulterantes (formol e soro). No entanto, todas as amostras estão dentro da elipse de confiança do modelo conforme apresentado na (Figura 19). Isso pode influenciar nas intensidades dos canais de cores RGB e consequentemente no comportamento das amostras. É possível notar que os valores de offset que indicam um deslocamento da reta de calibração e validação no eixo dos Y.

Figura 19 – Elipse de confiança para as amostras com adulterante amido

Fonte: Autor, 2020.

Deste modo, a fim de melhorar a qualidade do modelo, as amostras mais dispersas, nas concentrações, foram retiradas. A Figura 20, mostra o modelo PLS construído com 7 variáveis latentes e após a retirada de 6 amostras.

Figura 20 – Gráfico da concentração medida *versus* predita para o leite adulterado com amido



Fonte: Autor, 2020.

Pode-se observar, principalmente, uma melhora nos valores de offset que diminuiram de 0,9626 para 0,5222 na etapa de calibração e 0,8232 para 0,3818 na etapa de validação.

Na Tabela 1 é apresentado o resumo das Figuras de mérito obtidas para os modelos construídos.

Tabela 1 - Figuras de mérito obtidas na construção dos modelos

Contaminante	Figuras de mérito					
	RMSEC	RMSEST	R^2_{cal}	R^2_{val}	nº VL	Faixa dinâmica (%)
Amido(m/v)	0,5531	0,4085	0,8550	0,9060	7	1 – 6 (m/v)
Formol(v/v)	0,0795	0,0641	0,7338	0,8056	8	0,1 – 0,6 (v/v)
Soro(v/v)	2,6512	2,4966	0,8780	0,9012	14	5 - 30 (v/v)

Fonte: Autor,2020.

6 CONCLUSÃO

A partir da análise dos histogramas de cores RGB foi possível observar diferenças entre o leite puro e as adulterações. A análise exploratória mostrou agrupamentos bem definidos para os leites puros e adulterados com formol ou amido, já para os adulterados com soro estes agrupamentos não ficam tão claros. Esta dificuldade pode ser atribuída ao fato do soro fazer parte da composição do leite, o que dificulta a distinção destas adulterações em relação ao leite puro. Em relação ao método utilizado para a quantificação dos adulterantes nas amostras, podemos afirmar que os resultados obtidos representam um bom ponto de partida. Foram obtidos valores de RMSEST de 0,4085; 0,0641 e 2,4966 para o amido, formol e soro respectivamente. E valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9060; 0,8056 e 0,9012 para os modelos destinados a quantificação de amido formol e soro, respectivamente. No entanto a dispersão entre amostras com mesma concentração de adulterante mas composição diferente prejudica a capacidade preditiva do modelo.

7. PERSPECTIVAS

- Utilização de métodos de classificação supervisionada para a identificação de amostras adulteradas;
- Aprimoramento dos modelos de calibração multivariada utilizando métodos de seleção de amostras e/ou variáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. V. **Detecção de adulteração em leite: análises de rotina e espectroscopia de infravermelho**. 123f. Seminário (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

ANDERSON, M. **Design of Experiments: The Industrial Physicist**, ed. 1, 1997.

ARAÚJO, A.; MARINHO, W.; GOMES, A. Um método quimiométrico rápido e barato para identificar adulteração no açaí (*Euterpe oleracea*) utilizando imagens digitais. *Food Analytical Methods. Métodos*, v.11, n. 12, p.1920-1926, 2018.

BARAD, M. Design of Experiments (DOE)-a valuable multi-purpose methodology. *Applied Mathematics*, v. 5, n. 14, p.2120-2129, 2014.

BARROS, N. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, ed. 4. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e Produtos lácteos. Departamento de Inspeção de Produto de Origem Animal. Brasília-DF. 2006.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2018. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A.

BURIN, A. S.; SALVADOR, F. C.; FRIAS, A. A.; OLIVEIRA, T. F. S.; FAILA, N. **Avaliação da Qualidade Microbiológica do Leite Pasteurizado Comercializado em Apucarana-PR e Região**, Apucarana-PR, v. 9, n. 12, p.30-41, 2012.

CAPITAN-VALLVEY, L. F. N.; LOPES, R.; OLMOS, M. M.; ERENAS, A.; PALMA, J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: a tutorial review, *Analytical Chemical. Acta*. v. 899, n.14, p.23-56, 2015.

COSTA, C.; NETO, C. **Análise Orgânica: Métodos e procedimentos para caracterização de organoquímico**. v 1. Rio de Janeiro: Editora da UFRJ, 2004.

COSTA, R A.; MORAIS, C. L. M.; ROSA, T R.; FILGUEIRAS, P. R. M; MONIKE S.; ISABELLY, E. S.; VITTORAZZI, B. V.; LYRA, M. B.; LIMA, K. M. G.; ROMÃO, W. Quantification of milk adulterants (starch, H₂O₂, and NaClO) using colorimetric assays coupled to smartphone image analysis. *Microchemical Journal* . 2020.

DAMASCENO, D.; TOLEDO, G. T.; GODINHO, S. M.; SILVA, P. C.; OLIVEIRA, B. S.; OLIVEIRA, E. A. Análise multivariada de imagens na química: um experimento para determinação do pH de águas potáveis. *Química. Nova*, v. 38, ed 6, p.836-841, 2015.

DINIZ, P. H. G. D. Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems. *Journal of Chemometrics*. 2020.

DINIZ, P. H. G. D. **Novas estratégias para classificação simultânea do tipo e origem geográfica de chás**. 148f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

DU, L. W.; LU, Z.; CAI, L.; BAO, C.; HARTMANN, B.; GAO, L. YU. Detecção rápida de adulteração de leite usando impressões digitais espectrométricas de massa de injeção intacta de fluxo proteico combinadas com quimiometria. *Food Chemistry*. v. 240, p.573 – 578, 2018.

FERNÁNDEZ, C. M.; COBIJA, L. M. J.; CERVERA, M. L.; MORALES, R. A.; GUARDIA, M. Smartphone determination of fat in cured meat products. *Microchemical Journal*. v. 132 p.8–14, 2017.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. 1. Ed. São Paulo: Editora da Unicamp, 2015.

FUKUDA, S. P. **Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite**. 149f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FULGÊNCIO, A. C. C.; ARAÚJO, V. P. T.; PEREIRA, H. V.; BOTELHO, B. G.; SENA, M. M. Desenvolvimento de um Método Simples e Rápido para Determinação de Cor em Cervejas Utilizando Imagens Digitais. *Métodos analíticos de alimentos*. 2019.

GARCIA, S. L. A.; SILVA, G. M.; MEDEIROS, J. M. S.; QUEIROGA, A. P. R.; QUEIROZ, B. B.; FARIAS, D. R. B.; CORREIA, J. O.; FLORENTINO, E. R.; ALONSO, B. F. C. Influence of co-cultures of s and probiotic lactobacilli on quality and antioxidant capacity parameters of lactose-free fermented dairy beverages containing (L.) skeels pulp. *RSC Advances*, v. 10, p.10297-10308, 2020.

GIORDANO, G. F.; VICENTINI, M. B. R.; MURER, R. C.; AUGUSTO, F.; FERRÃO, M. F.; HELFER, G. A.; LIMA, R. S. Plataforma eletroanalítica point-of-use baseada em potenciostato caseiro e smartphone para processamento multivariado de dados. *Electrochimica Acta*, v. 219, p.170-177, 2016.

GRASEL, F.S.; FERRÃO, M. F.; HELFER, G. A.; COSTA, A. B. Análise de componentes principais de extratos de tanino comerciais usando imagens digitais em dispositivos móveis. *Revista da Sociedade Brasileira de Química*, 2016.

GUEDES, W. N.; LUCENA, G. N.; DE PAULA, A. V.; MARQUES, R. F. C.; PEREIRA, F. M. V. Easy Estimation of Endoglucanase Activity Using a Free Software App for Mobile Devices. *Brazilian Journal Analytical Chemistry*, v. 26, n.7, p.27–35, 2020.

HANSEN, L.; FERRÃO, M.F. Identificação de possível adulteração de leite usando dados físico-químicos e análise multivariada *Food Analytical Methods*, v.11 p.1994 – 2003, 2018.

HELPER, G. A.; MAGNUS, V. S.; BÖCK, F. C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M. F.; COSTA, A. B. D. *Journal of Brazilian of Chemistry Societ*, v.28, p.328-335, 2017.

HELPER, G. A.; TISCHER, B.; FILODA, P. F.; PARCKERT, A. B.; SANTOS, R. B.; VINCIGUERRA, L. L.; COSTA, A. B. Uma nova ferramenta para interpretação da estabilidade térmica do leite cru por meio do teste de alizarol usando um modelo PLS em um dispositivo móvel. *Food Analytical Methods*, v.11 ed.7, p.2022–2028, 2018.

KOWALSKI, B. R. *Chemometrics*, Chem. Ind. v. 22 p. 882, 1978.

LAMARCA, R. S.; COSTA, N.; LUCHIARI, A. F.; BONJORNO, J.; PASSARETTI, F.; CARDOSO, A. A.; GOMES, L. C. P. F.; Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader, *Analytical Methods*, v. 11 p.3697–3705, 2019.

LENARDON, L. **Ferramentas quimiométricas aplicadas no desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de adulteração em leite bovino por adição de soro de queijo por ATR-FTIR**. 167f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacéuticas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

LEVIN, S.; KRISHNAN, S.; RAJKUMAR, S.; HALERY, N.; BALKUNDE, P. Monitoramento do flúor em amostras de água por smartphone. *Science of The Total Environment*, p.551-552, 2016.

LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; BARRETO, I. S.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U.; Digital image-based micro-flow-batch analyzer, *Microchemycal Journal*. v.106, p.238–243, 2013.

LIRA, B. L. D. F.; VASCONCELOS, F. V. C.; PEREIRA, C. F.; SILVEIRA, P. A. P.; STRAGEVITCH, L.; PIMENTEL, M. F. Prediction of properties of diesel/biodiesel blends by infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Fuel (Guildford)*, v.89, p.405-409, 2010.

MAREZE, J.; MARIOTO, L.; GONZAGA, N.; DANIEL, G.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* v.36, p.283, 2015.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação**. v.2, São Paulo: Edgard Blucher, p.627.1990.

OLIVEIRA, K. F. M.; SUAREZ, W.T.; SANTOS, V. B. D. Digital Image Method Smartphone-Based for Furfural Determination in Sugarcane Spirits. *Food Analytical Methods* v.10, p.508-515, 2017.

OLIVEIRA, R. R.; SOUZA, M. I. A.; SILVA, C. H.; PRADO, C. S.; REZENDE, C. S. M.; LAGE, M. E. Determinação do caseinomacropéptido em leite UAT por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.70, p.946-956, 2018.

OLSSON, I. M. **Experimental designs at the crossroads of drug discovery**. p. 85. Dissertation (Master Chemistry) – Umea University, Suécia, 2006.

PEGORETTI, C.; ANTUNES, A. E. C.; BARROS, M. G. F.; CAPITANI, C. D. Milk: An Alternative Beverage for Hydration? *Food and Nutrition Sciences*, v.6, p.547-54, 2015.

PHOTOMETRIX. <http://www.photometrix.com.br>, Acessado 08 Junho de 2020.

POONIA, A. J. H. A.; SHARMA, A. R.; SINGH, A. K.; RAI, N. Detecção de adulteração no leite: uma revisão Intern. *J. Dairy Technology*, v.70, p.23 – 42, 2015.

REILE, G. C. S.; RODRÍGUEZ, M. D. S.; FERNANDES, D. A. G. A., DINIZ, P. H. D. G.; VANESA, D. A. C. Qualitative and quantitative analysis based on digital images to determine the adulteration of ketchup samples with Sudan I dye, *Food Chemistry*, (2020).

RESQUE, I. S.; SANTOS, V. B.; SUAREZ, W. T. An environmentally friendly analytical approach based on spot test and digital image to evaluate the conformity of bleaching products, *Chemometrics*, v.73, p.1659–1668, 2019.

SANTOS, P. M.; WENTZELL, P. D.; PEREIRA, F. E. R. Scanner Imagens Digitais Combinadas com Parâmetros de Cor: Um Estudo de Caso para Detecção de Adulterações em Leite de Vaca Líquido. *Food Analytical Methods*, v.5, p. 89–95, 2012.

SCURI, E. A. **Fundamentos da Imagem Digital**, PUC- Rio, Tecgraf p.1-95, 2002.

SILVA, G. W. N.; OLIVEIRA, P. M.; LEITE, D. K.; OLIVEIRA, S. M.; SOUSA, A. A. B. Avaliação físico-química de leite in natura comercializado informalmente no sertão paraibano. *Revista Principia*, João Pessoa, v.35, 2017.

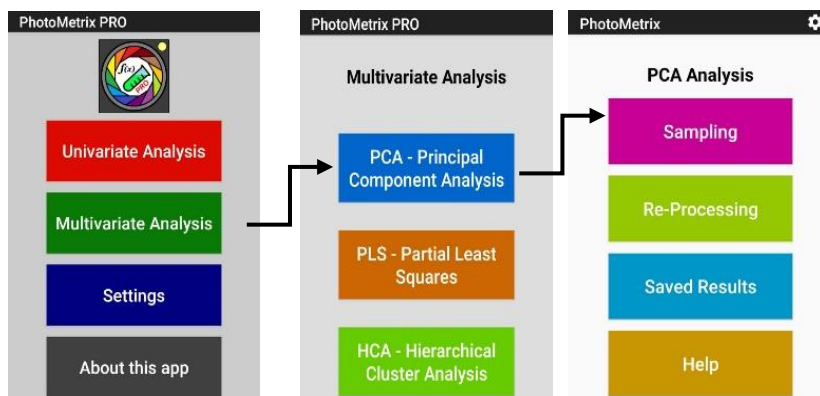
SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento, de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba. 2008.

SOLOMOM, C.; BRECKON, T. **Fundamentals of Dygital Image Processing**:—A practical Approach with Examples in Matlab, v. 1. United States os America, 2011.

SOUZA, F. M.; NOGUEIRA, M. S.; NUNES, F. C. Qualidade microbiológica do leite cru comercializado informalmente na cidade de areia-PB. *Revista Agropecuária Técnica*, v.32, p.168–171, 2011.

VERAS. G.; BRITO, B. L. A.; SILVA, C. A.; SILVA, P.; COSTA, B. G.; FÉLIX, N. C. L. Classificação de biodiesel na região do visível. *Quimica Nova*. v.35, p.315-318, 2012.

ANEXO A- INTERFACE DO APLICATIVO *Photometrix*



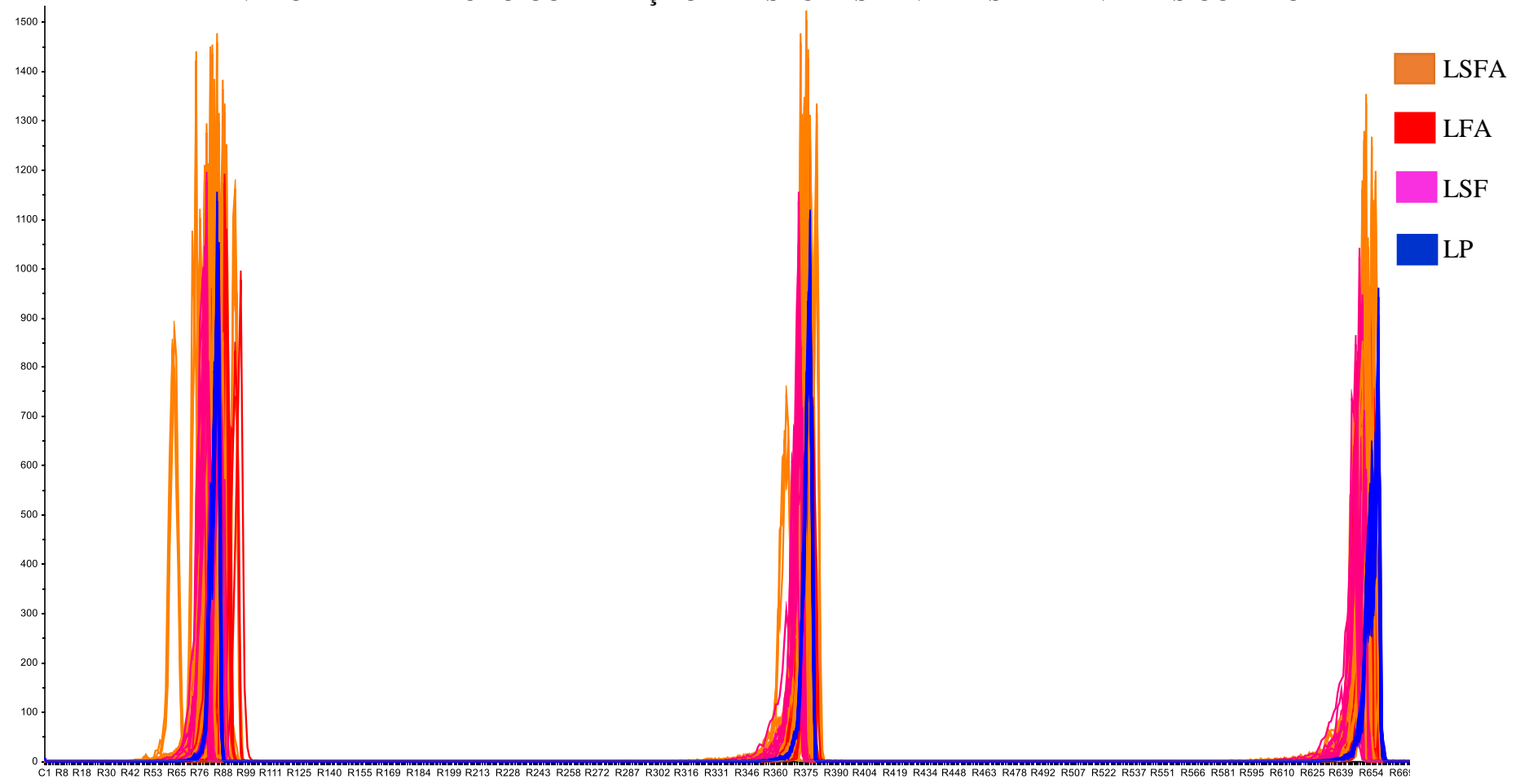
The screenshot shows the application interface during the capture and analysis phase. It is divided into three main sections:

- Left Panel (Settings):**
 - Number of samples: 5
 - Region of interest: 16 x 16
 - Local: _____
 - Date: 21/10/2020
 - Method: Auto Mean
 - Histogram
 - R G B
 - Single channels
 - R G B
 - H S V L I
 - Capture images button
- Center Panel (Image Capture):**
 - Top bar: CAP HERE TO REPLACE LAST PHOTO | 1/5 | sample1
 - Image: A circular sample with a green square ROI.
 - Bottom bar: CAPTURE | SEND EMAIL | SAVE
- Right Panel (Multivariate - PCA Results):**
 - Points/ROI: 5 / 64 x 64
 - Date/Local: 21/10/2020 @
 - Channel: Hist. R - Hist. G - Hist. B
 - Method: Mean-center
 - Send | Sample info | PCA info
 - Component variation table:

Component	EigenValue	Var. (%)	Var-acum. (%)
PC1	1,3146e+07	52,28%	52,28%
PC2	6,4923e+06	25,82%	78,10%
PC3	3,6551e+06	14,54%	92,64%
PC4	1,8508e+06	7,36%	100,00%
PC5	3,6706e-25	0,00%	100,00%

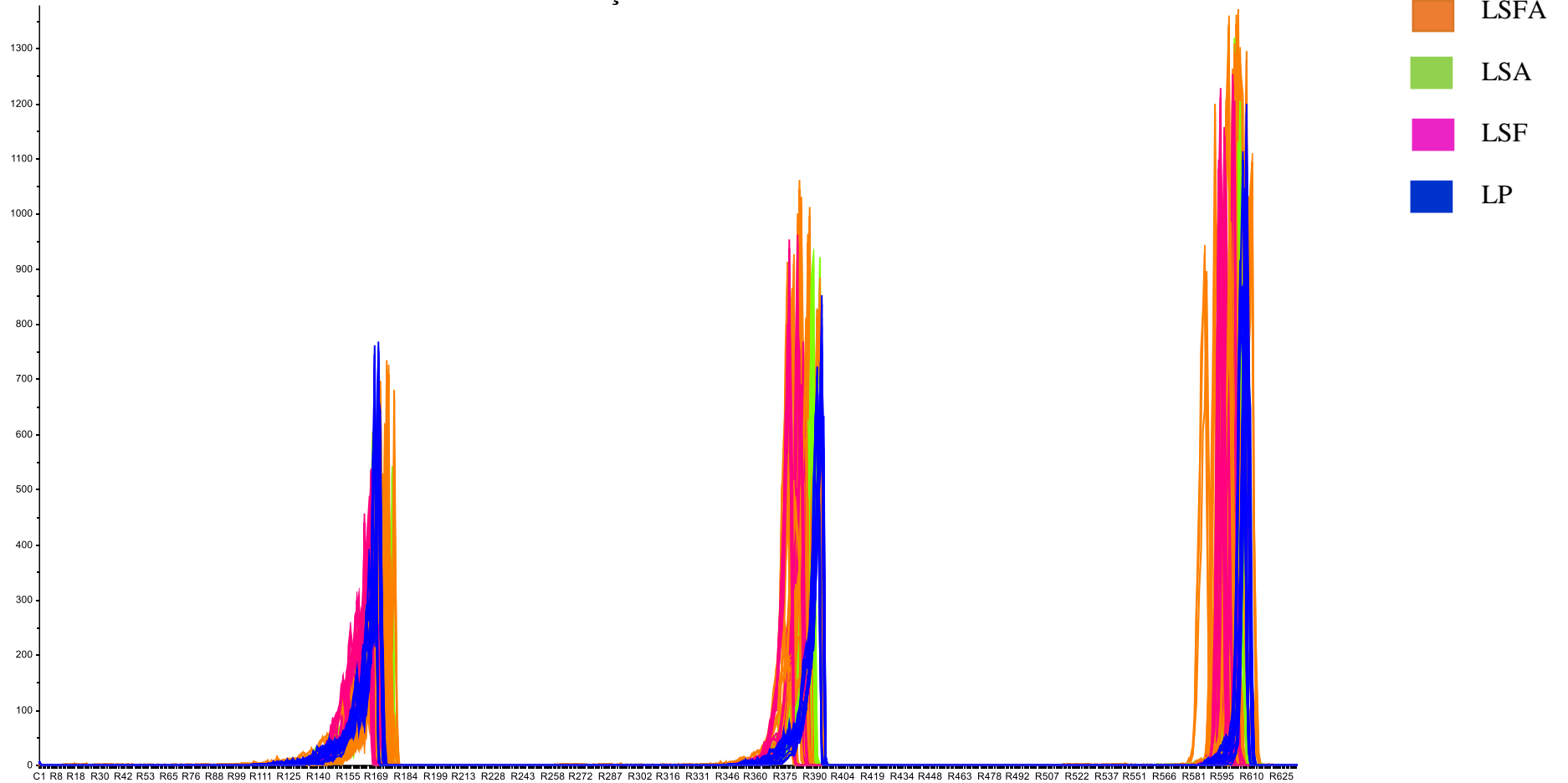
Arrows indicate the flow: 'Capture images' button → Image Capture panel → 'Capture' button → PCA Results panel.

ANEXO B - LEITE PURO COM ADIÇÃO E MISTURAS BINÁRIAS E TERNÁRIAS COM RC1



Nota: (LSFA) = Leite+soro+formol+amido, (LFA) = leite + formol + amido, (LSF) = leite + soro +formol, (LP) = leite puroe RC1 = verde de bromocresol
Fonte: Autor,2020.

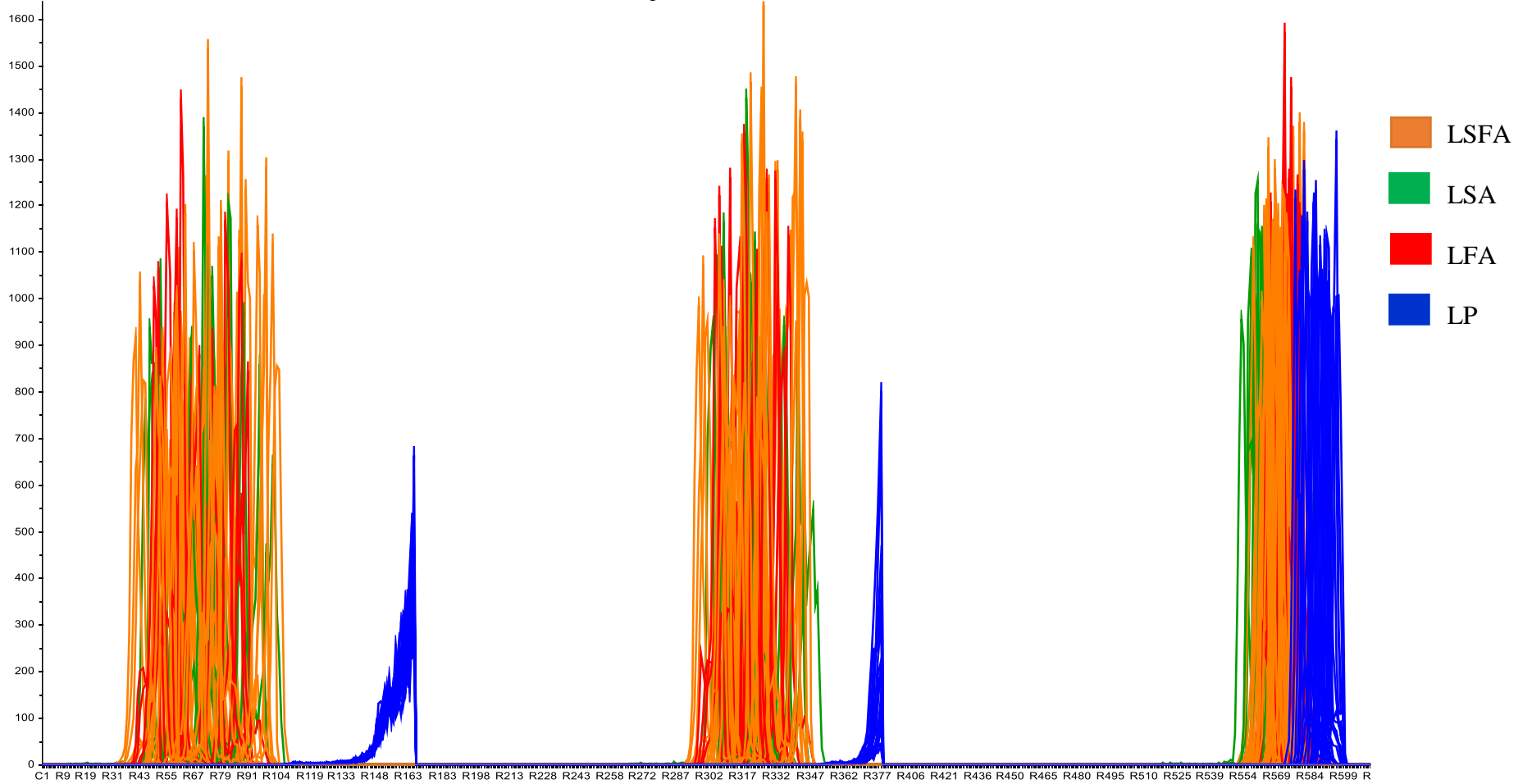
ANEXO C - LEITE PURO COM ADIÇÃO E MISTURAS BINÁRIAS E TERNÁRIAS COM RC2



Nota: (LSFA) = Leite+soro+formol+amido, (LSA) = leite + soro + amido, (LSF) = leite + soro +formol, (LP) = leite puro e RC2 = vermelho de metila

Fonte: Autor,2020.

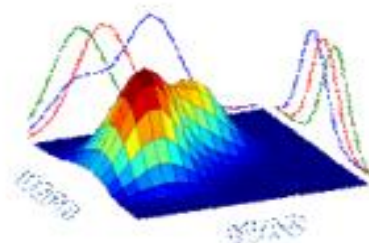
ANEXO D - LEITE PURO COM ADIÇÃO E MISTURAS BINÁRIAS E TERNÁRIAS COM RC3



Nota: (LSFA) = Leite+soro+formol+amido, (LSA) = leite + soro + amido, (LSF) = leite + soro +formol, (LP) = leite puro e RC3 = iodopolividona

Fonte: Autor,2020.

ANEXO E - Resumo aceito no XI Workshop de quimiometria 2020



Uso de imagens RGB e quimiometria para análise de adulteração em leite cru.

Gabriel Monteiro da Silva¹(IC)*, Simone da Silva Simões¹(PQ)

¹Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Química, silvagm839@gmail.com

Palavras Chave: Imagem digital, RGB, adulteração de leite.

Introdução

O leite é um constituinte importante na dieta humana. Nas últimas décadas vários autores investigaram a presença de adulterantes em leite¹. De forma que a busca por tecnologias de baixo custo na área de alimentos é crescente e o uso de aplicativos digitais para realização de análises químicas tem se mostrado uma boa alternativa^{2,3,4}. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo identificar adulteração em leite cru por diferentes adulterantes como formol, soro e amido utilizando imagens digitais e quimiometria.

Material e Métodos

O leite bovino cru foi obtido na Fazenda Nossa Senhora das Neves, no interior da cidade de Campina Grande, (7°13'16.1"S 35°58'02.0"W), Paraíba, Brasil. Para o preparo das amostras foi realizado um planejamento de misturas variando as concentrações de amido (Maisena®) 1 a 6 % (m.v⁻¹), formol (NEON®) 1 a 6 % (v.v⁻¹) e soro de queijo 10 a 30 % (v.v⁻¹) obtido da coagulação enzimática. Para obter um melhor contraste na imagem foi utilizado um reagente colorimétrico: **RC1** (verde de bromocresol), **RC2** (vermelho de metila) e **RC3** (iodopolividona 2%) para cada adulterante. A obtenção das imagens digitais foi realizada com um Smartphone Motorola®, motoG(6). A obtenções das imagens foi realizada em um ambiente controlado de luz. A matriz dos dados RGB foi realizada pelo aplicativo Photometrix® e os dados foram tratados utilizando o software The UnscrambleX® 10.4.

Resultados e Discussão

Por inspeção visual não é possível diferenciar as amostras de leite puro e adulteradas, como mostra a figura 1, onde: (A) leite puro + RC1, (B) leite adulterado com formol + RC1, (C) leite puro + RC2, (D) leite adulterado com soro

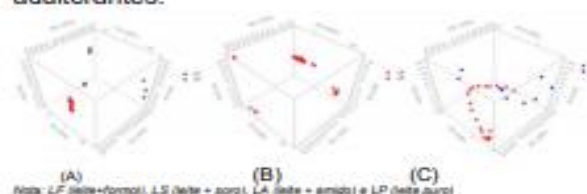
+ RC2, (E) leite puro +RC3 e (F) leite adulterado com amido + RC3.

Figura 1- Imagem digital dos leites puros e adulterados.



Deste modo, foi realizada uma análise exploratória utilizando PCA para identificar a tendência de agrupamentos entre as amostras. A figura 2 apresenta o gráfico dos escores para misturas de (A) leite puro + leite/formol, (B) leite puro + leite/soro e (C) leite puro + leite/amido. Nela é possível notar uma tendência de agrupamento para as amostras de leite puro (destacadas em vermelho).

Figura 2- gráfico de escores para as amostras de leite puro e adulteradas com cada um dos adulterantes.



Nota: LF (leite+formol), LS (leite + soro), LA (leite + amido) e LP (leite puro)

Conclusões

O uso de imagens RGB e análise exploratória (PCA) foi capaz de mostrar a tendência de separação entre as amostras de leite puro e suas adulterações, servindo como prova de conceito para fomentar o seu uso em análises de fiscalização.

¹Silva, G.W.N.Oliveira.P.M.;Leite.D.K.;Oliveira.S.M.;Sousa.A.A. B. Ver Princípios. n 35, 2017.

²L.Hansen.MF.Ferrão.Food.Anal.Methods.11.p.1994-2003.2018.
³Helfer.G.A.;Tischer.B.;Filoda,P.F.et al. Alimentos Anal Métodos,11.2022-2028.2018.

⁴Grasel,F.dos S,de Oliveira, Tiago,E;Netz.P.A.;J.Braz.Chem.Soc 2016.