



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LÊDA MARIA MARINHO SANTOS DE FIGUEIREDO

UM NOVO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE CASEÍNA EM LEITE DE CABRA
POR ESPECTROFLUORIMETRIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

CAMPINA GRANDE

2023

LÊDA MARIA MARINHO SANTOS DE FIGUEIREDO

**UM NOVO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE CASEÍNA EM LEITE DE CABRA
POR ESPECTROFLUORIMETRIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para título de mestre em Ciências Farmacêuticas,

Área de concentração: Desenvolvimento e controle da qualidade de produtos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. José Germano Vêras Neto

CAMPINA GRANDE

2023

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.

F475n Figueiredo, Lêda Maria Marinho Santos de.

Um novo método de determinação de caseína em leite de cabra por espectrofluorimetria e calibração multivariada [manuscrito] / Lêda Maria Marinho Santos de Figueiredo. - 2023.

42 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. José Germano Vêras Neto, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS. "

1. PLS. 2. Quimiometria. 3. Alimentos. 4. Fluorescência. I. Título

21. ed. CDD 615

LÊDA MARIA MARINHO SANTOS DE FIGUEIREDO

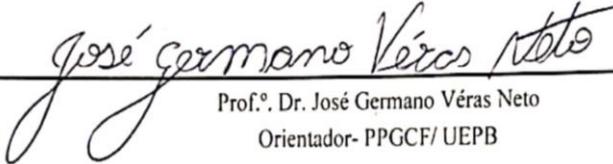
**UM NOVO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE CASEÍNA EM LEITE DE CABRA
POR ESPECTROFLUORIMETRIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

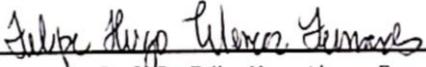
Área de concentração: Desenvolvimento e controle da qualidade de produtos farmacêuticos.

Aprovado(a) em 07/12/2023.

BANCA EXAMINADORA


Prof.º. Dr. José Germano Vêras Neto
Orientador- PPGCF/UEPB


Profa. Dra. Simone da Silva Simões
Examinador Externo – PPGQ/UEPB


Prof.º. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes
Examinador Interno – PPGCF/UEPB

Aos meus pais que sempre me apoiam em todas as etapas da vida e nunca mediram esforços para que eu realizasse mais esse sonho. Ao meu noivo, não soltou minha mão e esteve ao meu lado. Aos meus amigos, que me deram total apoio na minha caminhada. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar comigo nos momentos bons e não tão bons da minha vida, por me dar oportunidade de aprimorar o conhecimento em prol da saúde.

Aos meus pais, Rosalia Marinho e Germano Pinheiro, por sempre ter me incentivado, não medindo esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos, sempre com muito amor e paciência. São minha base.

Ao meu noivo, Iallys Araújo Diniz, por me apoiar e incentivar na minha caminhada acadêmica. Por seu amor e paciência. Obrigada.

À minha melhor amiga, Ericka Garcia, por tudo que passamos durante nossa amizade, tudo que compartilhamos, todo incentivo, amor, conselhos, apoio, conhecimentos, obrigada.

Aos meus amigos, por termos compartilhado a vida, histórias, amor e conhecimentos acadêmicos, sempre nos ajudando. À Mariana Sato, Barbara Lula, Luana Maria, Gisele Jacinto, Antônio Carlos Jr. e Deborah Oliveira, Andrea Trigueiro, obrigada.

Aos meus amigos Hilthon, Vitor e Giovanna, pela paciência e amor, que foi essencial por me auxiliar no minha dissertação.

À Nathalia Cartaxo, que foi minha professora de graduação, supervisora de estágio em docência e se tornou minha amiga, por seu bom humor e incentivo e amizade;

À FAPESQ/CAPES (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa cedida para meu desenvolvimento quanto pesquisadora.

À Fazenda Coruja, que prontamente me cedeu a amostra e se mostrou interessada às pesquisas com leite caprino.

À Elayne Virgínia por ter paciência e carinho para me ajudar na minha dissertação.

Aos meus primos, Lucilo e Amanda, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando nas minhas escolhas e me dando apoio.

Aos meus tios (Helves, Cristiana, Fátima, Lucilo, Armando, Silvio) por sempre me apoiarem.

Ao secretário do PPGCF, Thiago Araújo, por me auxiliar sempre que necessitava sobre as questões da pós.

Ao PPGCF/UEPB e aos docentes envolvidos pelo amor em ensinar e por, mesmo com toda dificuldade, fazer pesquisas acadêmicas de qualidade e formar profissionais qualificados.

Ao meu orientador, José Germano Vêras Neto, por sua compreensão, amor, carinho em orientar-me, ensinar-me e, principalmente, pela sua amizade, sou muito grata por Deus ter colocado ele como meu orientador de mestrado e de vida.

À minha turma de mestrado, pelo companheirismo.

Ao LQAQ, que me proporcionou grandes amizades.

Aos meus colegas de laboratório, por me ajudarem em várias questões acadêmicas.

Ao Prof^o João Oshiro, por sua amizade e por sua presteza ao me auxiliar em alguns momentos da minha trajetória acadêmica.

À banca, nas pessoas da prof^a Simone Simões e do Prof^o Felipe Hugo, pelo carinho que tenho por cada um e por ter aceitado o convite de examinar esse trabalho e ajudar a aprimorá-lo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

A todos, o meu obrigado.

RESUMO

O leite é um alimento essencial à vida devido à sua composição nutricional rica em proteínas, lipídios, carboidratos e vitaminas. A caseína é uma das principais proteínas presentes no leite e desempenha um papel importante na formação de coágulos e estabilidade do produto. A determinação da caseína no leite é relevante para garantir sua qualidade, cumprir regulamentações e controlar processos industriais. Este trabalho teve como objetivo propor método inovador para determinação de caseína do leite de cabra através da espectrofluorimetria aliado à quimiometria. Inicialmente, soluções padrão de caseína foram preparadas para obter curva de calibração a partir de medida espectrofluorimétrica na região de pico 280 nm de excitação e varredura de 324 a 360 de emissão, através de caseína pura (P.A.) na faixa de 8 a 80 ppm (m/v), utilizando Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*). Foi feita a curva, onde foram obtidos os valores da raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC, do inglês *Root Mean Square Error of Calibration*) e do coeficiente de determinação de calibração (R^2_{cal}) com valores de 3,6442 ppm e 0,9779, respectivamente. Para as amostras sintéticas que compõem o conjunto de predição os valores de raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (RMSEP, do inglês *Root Mean Square Error of Prediction*) e do coeficiente de determinação de predição (R^2_{pred}) com valores de 3,9859 ppm e 0,7576, respectivamente. Posteriormente, foi feita a extração da caseína das amostras de leite *in natura*. Os valores do RMSEP, de R^2_{pred} e de *bias* para as amostras reais foram 3,6442 ppm, 0,9779 e $1,447 \cdot 10^{-7}$, respectivamente, indicando que o modelo quimiométrico construído obteve resultados relevantes, mesmo com possíveis interferentes. Neste sentido, apesar dos resultados o método é vantajoso devido à facilidade de execução e à capacidade de quantificação sem tratamento das amostras, sendo uma alternativa viável aos métodos convencionais de determinação de caseína em leite.

Palavras-chave: PLS; Quimiometria; Alimentos; Fluorescência.

ABSTRACT

Milk is an essential food for life due to its nutritional composition rich in proteins, lipids, carbohydrates, and vitamins. Casein is one of the main proteins present in milk and plays a significant role in clot formation and product stability. The determination of casein in milk is relevant to ensure its quality, comply with regulations, and control industrial processes. This study aimed to propose an innovative method for determining goat milk casein using spectrofluorimetry combined with chemometrics. Initially, standard solutions of casein were prepared to obtain a calibration curve through spectrofluorimetric measurements in the 280 nm excitation peak region and emission scanning from 324 to 360, using pure casein (P.A.) in the range of 8 to 80 ppm (w/v). Partial Least Squares Regression (PLS) was applied for analysis. The resulting curve provided values for the Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC) and the calibration determination coefficient (R^2_{cal}), with values of 3.6442 ppm and 0.9779, respectively. For the synthetic samples comprising the prediction set, the Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) and the prediction determination coefficient (R^2_{pred}) were 3.9859 ppm and 0.7576, respectively. Subsequently, casein extraction was performed on raw milk samples. The RMSEP, R^2_{pred} , and bias values for real samples were 3.6442 ppm, 0.9779, and 1.447×10^{-7} , respectively, indicating that the chemometric model achieved relevant results even in the presence of potential interferents. Despite these findings, the method is advantageous due to its ease of execution and the ability to quantify without sample treatment, presenting a viable alternative to conventional methods for determining casein in milk.

Keywords: PLS; Chemometrics; Food; Fluorescence

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	GERAL	11
2.2	ESPECÍFICOS	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	INTRODUÇÃO AO LEITE CAPRINO	12
3.1.1	Caprinocultura no Brasil	12
3.1.2	Caprinocultura no Nordeste	12
3.1.3	Leite caprino e seus elementos	14
3.2	COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICAS E FUNCIONAIS DA CASEÍNA	15
3.2.1	O aminoácido triptofano e sua fluorescência	17
3.2.2	Importância da caseína e sua determinação na indústria	18
3.3	MÉTODOS CONVENCIONAIS PARA DETERMINAÇÃO DE CASEÍNA	19
3.4	ESPECTROFLUORIMETRIA	21
3.5	QUIMIOMETRIA	22
3.5.1	Calibração multivariada	23
3.5.2	Regressão por mínimos quadrados parciais	24
3.6	DETERMINAÇÃO DE CASEÍNA UTILIZANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	LOCAL DOS EXPERIMENTOS	26
4.2	AMOSTRAS DO LEITE DE CABRA	26
4.3	PREPARO DE SOLUÇÕES	26
4.4	QUANTIFICAÇÃO DA CASEÍNA PARA A ANÁLISE DO MÉTODO CLÁSSICO GRAVIMÉTRICO	26
4.5	OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA	27
4.6	SOFTWARES E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS	27
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	28
5.1	CURVA DE CALIBRAÇÃO	28
5.2	MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	30
5.2.1	Predição com amostras sintéticas	32
5.3	DETERMINAÇÃO DA CASEÍNA POR EXTRAÇÃO NO LEITE	33
5.3.1	Predição com amostras reais	34
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O leite, um alimento fundamental devido à sua riqueza em nutrientes essenciais, desempenha um papel crucial na saúde humana e na economia agrícola. Este estudo concentra-se na fração proteica do leite, especialmente na caseína, que constitui a maior parte dessa porção. A caseína é fundamental na estabilidade e propriedades tecnológicas de produtos lácteos e é reconhecida também por suas propriedades nutricionais (Magalhães, 2022; Silva, 2019; Sahariah, Ghosh e Bhattacharya, 2022; Zaia, Zaia e Lichtig, 1998) e seu impacto positivo na recuperação muscular.

A necessidade de quantificação da caseína motiva a busca por métodos analíticos eficientes (Siqueira, 2019; Ribeiro *et al.*, 2022; Aragão *et al.*, 2020; Brasil *et al.*, 2015; Carneiro; Barbosa; Gadelha, 2021; Galdino *et al.*, 2020; Magalhães, 2022; Sahariah; Ghosh; Bhattacharya, 2022). Portanto, devido à necessidade de determinação e quantificação da caseína ser de suma importância podem ser utilizados métodos analíticos rápidos para identificar e quantificar compostos moleculares de forma econômica, não invasiva e não destrutiva da amostra tem ganhado crescente adesão.

Os métodos analíticos para a quantificação da caseína abrangem técnicas como espectroscopia de absorção UV, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês sigla em inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), espectroscopia de infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near InfraRed*) e métodos imunológicos, como o ELISA, além de métodos clássicos partindo de reações específicas como SMITH, Bradford e outros. Cada método possui vantagens específicas, como sensibilidade, especificidade, precisão e rapidez, porém, enfrentam desafios como custos, complexidade operacional e possíveis interferências nas amostras.

A escolha do método adequado depende das necessidades do estudo ou aplicação, considerando as características de cada técnica em termos de precisão, sensibilidade, custo e complexidade, buscando sempre aprimorar e desenvolver métodos mais acessíveis, precisos e eficientes para a quantificação da caseína em diversas áreas (Chen *et al.*, 2021; Villa *et al.*, 2022; Mohamed *et al.*, 2021; Zaia *et al.*, 1998).

A espectrofluorimetria é um método vantajoso, pois atende aos requisitos de qualidade e rapidez, seletividade, sensibilidade e com facilidade de manuseio (Alves, 2019; Oliveira, 2016; Damián; Sacchi, 2020). No entanto, devido à complexidade dos

espectros obtidos, presença de possíveis interferentes e/ou contaminantes nas amostras, ferramentas matemáticas e estatísticas são indispensáveis para determinações suficientemente exatas e precisas na quantificação (Rohman; Man, 2010).

A quimiometria desempenha um papel essencial na quantificação de proteínas, como a caseína. Integrando métodos estatísticos e matemáticos, ela lida com desafios como interferências nas amostras e complexidade dos espectros, permitindo análises mais precisas. Utilizando técnicas como calibração multivariada e análise de componentes principais, a quimiometria extrai informações relevantes dos dados gerados, estabelecendo correlações entre a intensidade da fluorescência e a concentração da proteína. Essa abordagem contribui para a precisão dos resultados, possibilitando a interpretação correta dos dados e suavizando interferências, fundamental para análises confiáveis de proteínas no espectrofluorímetro (Lelis *et al.*, 2022; Sikorska, 2019; Ma; Amamcharla, 2021).

Diante desse contexto, este trabalho visa propor um método para determinação de caseína do leite de cabra através da espectrofluorimetria aliado à quimiometria. Essa abordagem busca aprimorar a eficiência nas análises de proteínas lácteas, fornecendo contribuições valiosas para a aplicação de um método rápido e econômico para na indústria de alimentos lácteos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Propor método inovador para determinação de caseína do leite de cabra através da espectrofluorimetria aliado à quimiometria.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Quantificar a caseína do leite de cabra por espectrofluorimetria;
- b) Realizar análise exploratória para examinar o padrão das amostras
- c) Construir o modelo quimiométrico por métodos de calibração multivariada;
- d) Avaliar modelo quimiométrico construído.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 INTRODUÇÃO AO LEITE CAPRINO

3.1.1 Caprinocultura no Brasil

O leite desempenha um papel vital na construção de uma sociedade saudável e pode ser usado como veículo para o desenvolvimento rural. Seus derivados têm componentes potencialmente promotores de saúde que são exclusivos, como caseína e proteínas do soro do leite. Estas proteínas do soro do leite, de alta qualidade têm diversas propriedades, como exemplo: a β -lactoglobulina, que possui atividade antioxidante e imunestimulante; albumina do soro bovino, que é precursora de síntese da glutatona. O cálcio, que ajuda a manter os ossos saudáveis; vitamina D, que ajuda o sistema imunológico a absorver cálcio; e probióticos, que ajudam a digerir alimentos. Estas ações estimulam pesquisas para estudar bioatividades do leite, principalmente em termos das proteínas (Costa *et al.*, 2021).

A importância do leite de animais não bovinos está aumentando globalmente, devido à quantidade (15% da produção mundial de leite) e a fatores econômicos, culturais e ecológicos. Características nutricionais especiais foram descritas para vários tipos de leite e produtos lácteos não bovinos (Braga, 2020; Costa *et al.*, 2021).

3.1.2 Caprinocultura no Nordeste

O leite de cabra é de extrema importância para o semiárido nordestino do Brasil. A pecuária caprina, incluindo a produção de leite de cabra, tem se mostrado uma atividade econômica viável e sustentável para os agricultores locais devido às condições climáticas difíceis da região, caracterizadas por longos períodos de seca e escassez de recursos hídricos (Maia *et al.*, 2019; Feitosa, Campos e Leite, 2020; Nascimento *et al.*, 2022; Neto *et al.*, 2023).

As comunidades rurais do semiárido valorizam o leite caprino como uma fonte de nutrição e renda. Esse leite é uma alternativa significativa para a subsistência, que ajuda a diversificar a dieta das famílias e fornece nutrientes essenciais, como proteínas, vitaminas e minerais (Maia *et al.*, 2019; Neto *et al.*, 2023).

O rebanho caprino do Brasil apresentou um crescimento de 16% nos últimos dez anos, atingindo um total de 8,2 milhões de animais. Desse aumento, 18,3% contribuíram para a região Nordeste, onde a quantidade de caprinos chegou a 7,6 milhões. Tais dados ressaltam a relevância econômica e produtiva da caprinocultura nas áreas áridas do nordeste brasileiro, além do seu papel essencial na segurança alimentar, na geração de renda e na preservação das tradições rurais. (Feitosa, Campos e Leite, 2020; Nascimento *et al.*, 2022)

A criação de cabras para produção de leite se adapta bem ao clima semiárido. Esses animais conseguem sobreviver alimentando-se de plantas locais, muitas delas resilientes à seca. Isso reduz a dependência de insumos externos, como ração, tornando a prática mais econômica e sustentável para os agricultores. Além de fortalecer a economia local e promover a inclusão social, a produção leiteira caprina também contribui para a fixação de pessoas nas áreas rurais semiáridas. O estabelecimento de cooperativas de produtores de leite de cabra ampliou a comercialização e o valor agregado ao produto, impulsionando ainda mais os benefícios econômicos e sociais. Para além desses aspectos, o leite de cabra desempenha um papel crucial na segurança alimentar e na adaptação às mudanças climáticas na região semiárida, fortalecendo sistemas produtivos e reduzindo a dependência de culturas suscetíveis à seca (Maia *et al.*, 2019; Feitosa, Campos e Leite, 2020; Nascimento *et al.*, 2022; Neto *et al.*, 2023).

A Paraíba ostenta o título de principal produtor nacional de leite de cabra, conforme atestado pelo Censo Agropecuário 2017 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE). Demonstrando uma notável produção anual de 5,627 milhões de litros de leite. O estado se posiciona à frente de competidores significativos, a exemplo da Bahia, segunda colocada, e Minas Gerais, terceira no ranking. Destacam-se, nesse cenário, os municípios paraibanos de Taperoá e Sumé como principais produtores, ocupando respectivamente o primeiro e o terceiro lugar a nível nacional (Elizário, 2018).

No âmbito da comercialização de leite de cabra, a Paraíba mantém sua posição de liderança no cenário nacional. Do montante total produzido, 4,059 milhões de litros foram comercializados, consolidando a Paraíba como referência não apenas em produção, mas também em efetiva distribuição comercial desse produto. Merecem especial destaque os municípios de Amparo, líder em vendas com 652 mil litros, Monteiro, ocupando a segunda posição com 604 mil litros vendidos, e Sumé em terceiro, registrando a comercialização de 476 mil litros (Elizário, 2018). O levantamento conduzido por Duarte,

Occulati e Manfré (2019) confirmam a posição de destaque da Paraíba como o maior produtor nacional de leite de cabra, registrando uma produção anual de 5,627 milhões de litros. Além disso, a média diária de leite produzida por produtores associados na região paraibana é estimada em cerca de 30 litros de leite de cabra por dia, conforme apontado por Feitosa, Campos e Leite (2020). Esses dados respaldam não apenas a relevância econômica da caprinocultura na Paraíba, mas também oferecem subsídios valiosos para estratégias futuras e o desenvolvimento sustentável desse setor em ascensão.

3.1.3 Leite caprino e seus elementos

O leite de cabra possui uma digestibilidade facilitada que o torna indicado para alérgicos. Além de tais benefícios, exhibe propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antidiabéticas, antiplaquetárias, anti-hipertensivas e antiobesidade (Sen *et al.*, 2021). Contudo, a qualidade e composição do leite de cabra depende de uma série de fatores que estão interrelacionados principalmente com as características de raça, fase de lactação, hereditariedade, estado de saúde dos animais.

A baixa alergenicidade é devida a menor quantidade da fração α_1 da caseína, comparada ao leite de vaca (Galdino *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2021). Isto o torna um tipo de leite de consumo cada dia maior. Outro motivo é sua alta digestibilidade e compostos promotores de saúde associados a importantes propriedades funcionais, incluindo uma melhor absorção de cálcio, modulação da microbiota.

O leite de cabra também possui uma composição físico-química diferente além de diferir nas características das micelas de caseína e no tamanho dos glóbulos de gordura em comparação ao leite de vaca. O leite caprino também apresenta elevado percentual de ácidos graxos de cadeia curta e grande potencial mineral e vitamínico. Entre os nutrientes do leite de cabra, temos os principais (proteína, gordura e lactose) e minerais essenciais como o cálcio, o fósforo, o potássio, o magnésio e menor teor de sódio quando comparado ao leite bovino, sendo excelentes fontes de cálcio, fósforo e zinco, além do magnésio e potássio (Teixeira; Pallone, 2021).

Calcio, magnésio e zinco também desempenham importantes funções fisiológicas, onde o cálcio está associado à estrutura dos ossos e dentes, além de compor o plasma sanguíneo, desenvolvimento e contração de músculos, homeostase da pressão arterial e regulação dos batimentos cardíacos. O magnésio se associa à saúde óssea e auxilia na

manutenção dos níveis de cálcio e potássio. Zinco, por sua vez, é um cofator importante por estar associado à mais de 3 mil proteínas, além de atuar na atividade de certas enzimas e outras moléculas que regulam as funções celulares. Por isso, são minerais importantes para as funções orgânicas, seja na forma iônica, seja como constituintes de compostos (hormônios, enzimas e proteínas) (Teixeira; Pallone, 2021).

As proteínas do leite de cabra são de fácil digestão e são formadas de 71% de caseína, 22% de proteínas solúveis e 7% de nitrogênio não proteico, que são classificadas em dois tipos: caseínas e proteínas do soro do leite (Brasil *et al.*, 2015).

De todos os componentes do leite, as proteínas são as mais valiosas para a industrialização. O rendimento representado pelo extrato seco total, bem como a eficiência da transformação do leite em coprodutos e leite fluido, que por sua vez dependem da qualidade da matéria-prima (Brasil *et al.*, 2015).

3.2 COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICAS E FUNCIONAIS DA CASEÍNA

Devido ao fato de que muitas das propriedades essenciais do leite, como a cor branca, a estabilidade ao calor, ao etanol e a coagulação são atribuídas às propriedades das micelas de caseína. Neste sentido, o interesse pela caseína micelar persiste e pesquisas sobre o assunto continuam (Brasil *et al.*, 2015)

No passado, o termo "caseína" foi empregado para categorizar um grupo de proteínas que poderiam ser isoladas quando precipitadas após a acidificação do leite a pH 4,6 e à temperatura de 20 °C. Do ponto de vista estrutural, as caseínas são caracterizadas como proteínas amorfas, com uma estrutura aberta (Silva *et al.*, 2019). Caseínas são descritas como proteínas fosforiladas e flexíveis, que atuam como nanoveículos para transportes de minerais das fêmeas para suas proles, prevenindo a calcificação patológica da glândula mamária. No leite, a caseína está presente na forma de micelas de caseína, que são partículas porosas, altamente hidratadas com diâmetro médio de 200 nm. Essas micelas são constituídas basicamente por moléculas de caseína, água e minerais, principalmente por fosfato de cálcio, sendo que este último atua como cimento na manutenção da estrutura micelar (Silva, N *et al.*, 2019; Freitas, 2019).

As caseínas possuem diferentes composições de aminoácidos e uma grande heterogenicidade devido às duas modificações pós-tradução, chamadas de fosforilação e

glicolização (Silva *et al.*, 2019). Podemos observar a tabela 01 abaixo a diferença de composição média do leite de cabra e o de ovelha, vaca e humano:

Tabela 1 – Composição média do leite de cabra, ovelha, vaca e humano

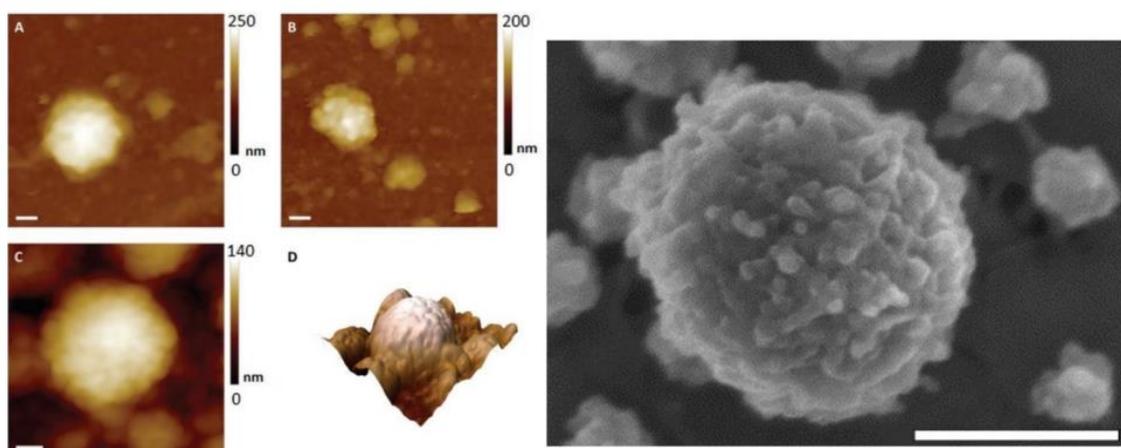
Composição	Cabra	Ovelha	Vaca	Humano
Gordura (%)	3,8	7,9	3,6	4,0
Sólidos não gordurosos (%)	8,9	12,0	9,0	8,9
Lactose (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Proteína (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Caseína (%)	2,4	4,2	2,6	0,4
Albumina, Globulina (%)	0,6	1,0	0,6	0,7
Proteína Não Nitrogenada (%)	0,4	0,8	0,2	0,5
Cinzas (%)	0,8	0,9	0,7	0,3
Calorias/100mL	70,0	105,0	69,0	68,0

Fonte: Mendes, Silva e Abrantes, 2009.

As micelas de caseína, Figura 1, são caracterizadas como estruturas supramoleculares dinâmicas, onde se transformam de acordo com as mudanças das condições físico-químicas do meio, como temperatura, pH, presença de enzimas, etc. A micela de caseína é estruturada pela associação de submicelas formadas pela agregação das unidades α , β e κ por meio de ligações hidrofóbicas e eletrostáticas. As regiões hidrofóbicas das unidades α e β permanecem orientadas para o interior da submicela, enquanto, a unidade κ (unidade mais hidrofílica) permanece nas regiões periféricas, com sua região C-terminal voltada para o exterior, formando uma camada ao redor das micelas de caseína e conferindo-lhes estabilidade coloidal (Silva *et al.*, 2019; Silva, 2020).

Contudo, não há um consenso científico sobre a organização interna das micelas de caseína. A caseína do leite de cabra difere quanto à composição de aminoácidos e é mais digestível do que a caseína do leite de vaca. A principal fração de proteína do leite caprino é a β -caseína. Também contém menos α s-caseína, e muitas vezes apresenta mais α s2 do que α s1- caseína. Já o leite de vaca é rico em α s1- caseína, sendo esta responsável pela alergia observada em algumas pessoas, porém não relatada ao consumir leite de cabra (Mendes, Silva e Abrantes, 2009; Silva, N *et al.*, 2019; Freitas, 2019; Silva *et al.*, 2019; Silva, 2020).

Figura 1 – Micela de Caseína



Fonte: Silva *et al.*, 2019

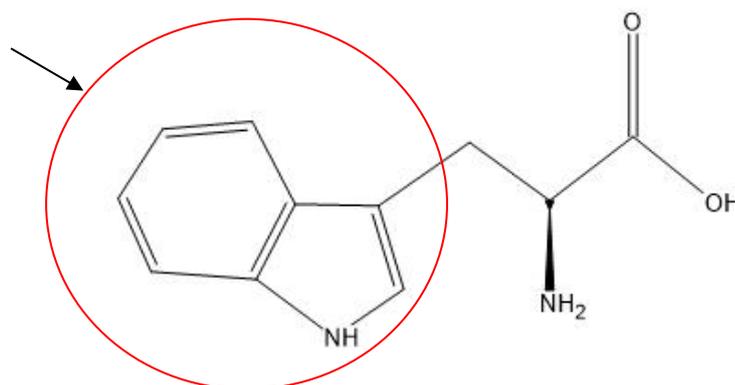
Legenda: (Esquerda) (A), (B) e (C) são imagens de microscopia de força atômica de micelas de caseína; (D) imagem tridimensional da imagem (C). A barra de escala é de 100 nm. (Direita) imagem da micela de caseína . A barra de escala correspondente é de 200 nm.

Caseína atua como fonte de aminoácidos, mas sabe-se que apresenta funções biológicas específicas por atuarem como vetor de cálcio das mães para seus neonatos; como chaperonas, onde evitam a formação de agregados proteicos insolúveis, conhecidos como fibrilas amiloides, que previne o aparecimento de várias doenças.

3.2.1 O aminoácido triptofano e sua fluorescência

Das proteínas presentes no leite, a β -caseína e a κ -caseína possuem um resíduo triptofano (Trp), Trp 143 e Trp 76, respectivamente. α S1 -caseína contém Trp 164 e Trp 199, e α S2-caseína contém Trp 109 e Trp 193. Dentre os aminoácidos presentes na caseína, o triptofano é um dos principais responsáveis pela fluorescência intrínseca da proteína. A presença do grupo indol (Figura 2) em sua estrutura química explica porque o triptofano tem a maior intensidade de absorção, com seu pico máximo de excitação em 280 nm. (Dantas, 2019; Lelis *et al.*, 2022; Menezes, 2022).

Figura 2 – Estrutura do triptofano.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Legenda: Seta destacando o grupo indol.

Estudos utilizaram espectroscopia de fluorescência em leite submetidos à suaves aquecimentos e demonstraram fluoróforos naturais do leite, como os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, e coenzimas, como NADH e FADH. Após a excitação do leite em 250 nm, o espectro de emissão foi registrado entre 280 e 480 nm; a máxima fluorescência foi registrada em 342 nm, e isso foi atribuído à presença do aminoácido triptofano (Moura, 2017).

3.2.2 Importância da caseína e sua determinação na indústria

A determinação da caseína, uma das principais proteínas presentes no leite de cabra, desempenha um papel crucial na indústria e no comércio de produtos lácteos. A utilização de métodos avançados, como a espectrofluorimetria em conjunto com a calibração multivariada, apresenta potenciais aplicações industriais e comerciais promissoras para o setor. A estabilidade das proteínas do leite é estudada devido ao seu valor comercial, pois é um componente essencial para garantir condições de processamento adequadas. Devido à elevada estabilidade térmica das caseínas, os derivados lácteos podem ser fabricados com temperaturas elevadas, aumentando seu prazo de validade e oferecendo uma qualidade superior aos consumidores (Tsujiimoto, 2022). Damián e Sacchi (2020) afirmam que as proteínas do leite são essenciais para produtos tecnológicos, como a produção de queijos artesanais, de grande importância na caprinocultura. Em laboratório, várias técnicas foram desenvolvidas para determinar como a composição, principalmente o teor de proteína do leite e as frações de caseína,

afetam os processos tecnológicos, como o desempenho do queijo. Para isso, foram desenvolvidos alguns métodos para a determinação da caseína.

3.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS PARA DETERMINAÇÃO DE CASEÍNA

Na indústria de laticínios, a determinação da caseína é essencial para a padronização da produção de produtos lácteos, como queijos e iogurtes, onde ela desempenha um papel crucial na textura, viscosidade e capacidade de retenção de água desses produtos, influenciando diretamente sua qualidade. A utilização da espectrofluorimetria e calibração multivariada permite o controle rigoroso da concentração de caseína durante o processo de fabricação, garantindo a consistência e o padrão de qualidade dos produtos lácteos (Lima, 2011).

No estudo conduzido por Damián e Sacchi (2020), uma avaliação comparativa entre alguns métodos de determinação de proteínas e caseína no leite de cabra foi realizada em relação ao método oficial Kjeldahl. Este último, amplamente reconhecido na análise de proteínas, se baseia na digestão das amostras por meio de reação com ácido sulfúrico, liberando o nitrogênio presente nas proteínas, o qual é posteriormente convertido e quantificado.

Os métodos de Lowry e Biureto, utilizados tanto para a quantificação de proteínas totais quanto de caseínas, fundamentam-se em reações colorimétricas. O método de Lowry envolve a formação de complexos coloridos entre o grupo tiol de resíduos de cisteína e reagentes específicos, enquanto o método de Biureto se baseia na formação de complexos de coloração violeta em decorrência da interação entre íons de cobre e peptídeos nas amostras. Já o método Milkoscan, destinado à determinação de proteínas totais, opera por meio de espectroscopia no infravermelho próximo, analisando a absorção de radiação eletromagnética pelas moléculas presentes no leite. Essa técnica permite a quantificação direta das proteínas, proporcionando uma alternativa eficaz e rápida em comparação com métodos tradicionais (Damián; Sacchi, 2020; Spina *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos por Damián e Sacchi (2020) evidenciaram que os métodos de Lowry, Biureto e Milkoscan apresentaram correlação significativa com o método Kjeldahl. Esses métodos revelaram de maneira consistente padrões distintos de teor proteico entre as raças de leite de cabra. Contudo, o método de Bradford, que se baseia

na ligação de corantes às proteínas, não acompanhou o mesmo padrão observado nos demais métodos, sendo desaconselhado para a determinação de proteínas no leite de cabra devido à sua correlação inferior com o Kjeldahl. Essas constatações reforçam a importância de selecionar métodos analíticos adequados, considerando as características específicas da matriz do leite de cabra, para assegurar resultados precisos e confiáveis na quantificação de proteínas.

Uma abordagem analítica comum é o HPLC, que se baseia na separação de componentes presentes na amostra. HPLC de fase reversa também é utilizada e se baseia na separação dos componentes da amostra com base na hidrofobicidade das moléculas, oferecendo uma alternativa eficaz para a quantificação específica da caseína. No entanto, é importante destacar que a implementação da HPLC, independentemente da fase utilizada, pode apresentar desvantagens, como a necessidade de equipamentos especializados e custos associados à manutenção e operação (Bordin *et al.*, 2001; Buzás *et al.*, 2022; Vera-Bravo *et al.*, 2022).

Os métodos espectroscópicos têm sido bastante utilizados devido à facilidade no preparo de amostras, a rapidez nas análises e no baixo custo. As análises espectroscópicas fornecem informações da estrutura da molécula, identificação de grupos funcionais existentes nas amostras e auxilia o entendimento de acordo com o tipo de manejo aplicado (Thiago, 2016).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near InfraRed*) e a espectroscopia UV-VIS, desempenham um papel significativo na determinação de proteínas em produtos lácteos. Embora ofereçam vantagens em termos de velocidade, é importante salientar que esses métodos podem ser suscetíveis a interferências de outros componentes na amostra. Assim, embora a HPLC de fase reversa e as técnicas espectroscópicas proporcionem abordagens eficientes, é crucial considerar suas respectivas desvantagens e desafios ao escolher o método analítico mais apropriado para a análise de caseína em produtos lácteos (Laporte; Paquin, 1999, Gastélum-Barrios *et al.*, 2020; Ayvaz *et al.*, 2021).

A escolha da espectrofluorimetria como uma opção interessante para a determinação da caseína no leite e na indústria se deve à sua capacidade de oferecer resultados precisos e confiáveis.

3.4 ESPECTROFLUORIMETRIA

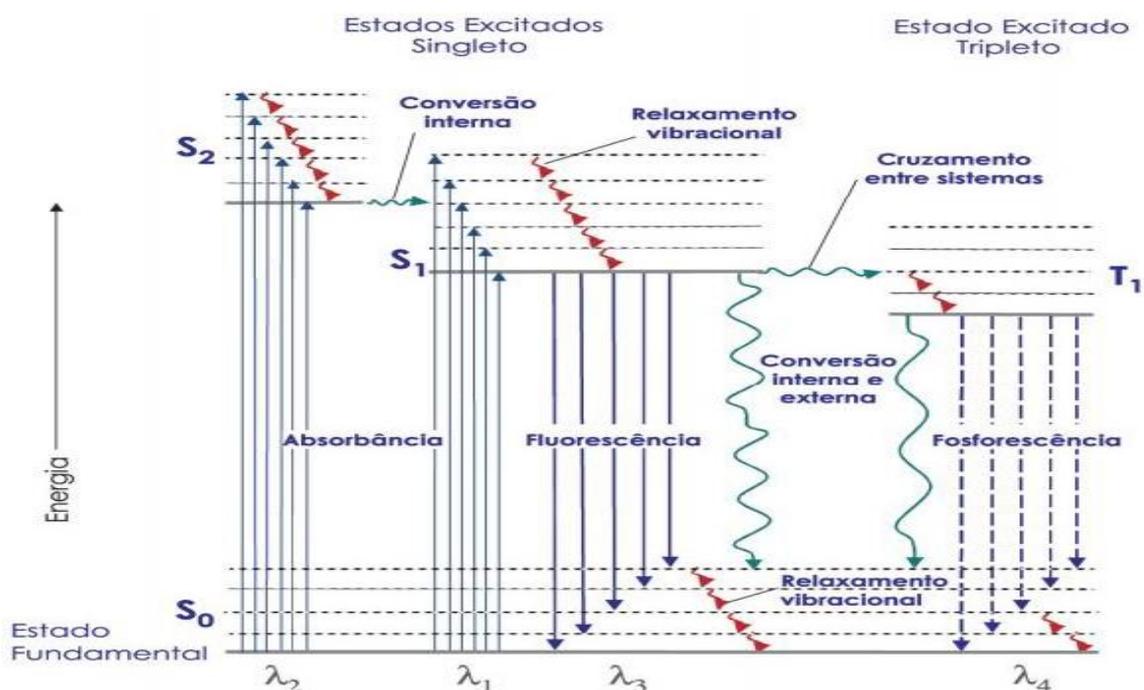
A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que se baseia na instrumentação analítica de grande utilização devido às suas vantagens, como sua rapidez na análise, sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, entre outros. Outro ponto muito vantajoso é a sua característica não destrutiva, pois não causa alteração na composição química da amostra (Gomes, 2020).

Fluorescência é um evento de luminescência. O modo de excitação para esse fenômeno é a absorção de um fóton, que leva a espécie absorvedora para um estado excitado eletrônico. A emissão de fótons que segue a relaxação é chamada de fotoluminescência, que engloba a fluorescência ou a fosforescência. Uma vez que uma molécula é excitada pela absorção de um fóton, ela pode retornar ao estado fundamental com emissão de fluorescência. (Matos, 2022).

A exibição da fluorescência ocorre respeitando as regras de seleção, que limitam o número de transições, segundo o Diagrama de Jablonski, na Figura 3. As moléculas são estimuladas do estado fundamental pela absorção de radiação com comprimento de onda característico e promovidas para um estado excitado singleto. Após as moléculas excitadas se desativam mediante uma série de relaxamentos (transições não radiativas) dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade até atingir o primeiro nível vibracional do estado excitado singleto de menor energia. Esse processo de relaxação é um evento que acontece muito rapidamente (10^{-13} a 10^{-11} s) e sem emissão de radiação (Ranzan, 2021).

Ao combinar a espectrofluorimetria com a calibração multivariada, é possível obter resultados ainda mais confiáveis. A calibração multivariada envolve a construção de modelos matemáticos complexos que correlacionam as medidas espectrofluorimétricas com as concentrações conhecidas de caseína em amostras de referência (Teixeira; Pallone, 2021).

Figura 3 – Diagrama de Jablonski.



Fonte: Ranzan (2021).

3.5 QUIMIOMETRIA

O progresso tecnológico observado recentemente teve impacto significativo em diversas disciplinas científicas, destacando-se, de maneira particular, a química analítica. A demanda por ferramentas matemáticas e estatísticas capazes de processar extensos conjuntos de informações e dados analíticos foi o principal impulsionador do surgimento e rápido avanço de uma nova área de estudo, conhecida como quimiometria (Ferreira, 2015).

A quimiometria possui metodologias que podem ser aplicadas com diferentes finalidades compreendendo desde a análise exploratória de dados, a calibração multivariada para a predição quantitativa das propriedades de uma amostra, bem como a classificação de amostras, de acordo com os critérios de agrupamento (Hashimoto, 2015).

Para Ruschel (2017), “a quimiometria é uma área da química que utiliza conhecimentos de matemática e estatística para a identificação de informações relevantes de um problema em estudo”. Ela pode ser dividida em quatro vertentes: Análise exploratória de dados químicos; calibração multivariada; modelos de classificação e planejamento fatorial para otimizar condições experimentais.

3.5.1 Calibração multivariada

A calibração multivariada tem sido amplamente adotada devido à sua capacidade de lidar com dados complexos e capturar informações valiosas contidas em múltiplas variáveis independentes simultaneamente (Souza, 2019). Essa abordagem estatística permite explorar as relações entre as variáveis e identificar padrões que podem não ser facilmente detectados com métodos univariados tradicionais. A ênfase dos quimiometristas na calibração multivariada decorre da capacidade de considerar simultaneamente múltiplas variáveis, gerando dados que seriam negligenciados pelos métodos univariados. Ao analisar uma variável por vez, a interação entre elas passa despercebida, resultando em perda de informações valiosas. As vantagens da calibração multivariada incluem a redução de ruído, pois a análise simultânea de diversas variáveis permite a identificação das responsáveis por sinais redundantes; medições parcialmente seletivas, livres do efeito de sinais interferentes; e facilidade na detecção de amostras anômalas. (Oliveira, 2018; Domingos, 2019).

No âmbito da espectroscopia, a calibração multivariada está vinculada à elaboração de modelos matemáticos capazes de antecipar concentrações de analitos de interesse a partir de espectros de absorvância, eliminando a necessidade de realizar novos experimentos laboratoriais para determinar amostras desconhecidas. A calibração multivariada emerge como uma das áreas mais atrativas da quimiometria, possivelmente devido à perspectiva de estabelecer relações entre medidas dispendiosas, permitindo que sejam previstas por métodos mais acessíveis e/ou econômicos, resultando em economia de tempo e recursos financeiros. Contudo, é crucial ponderar que a etapa de calibração requer a utilização de amostras da matriz a ser avaliada. Modelos construídos para uma matriz específica não são aplicáveis a outras (Santos *et al.*, 2021).

A calibração multivariada é uma poderosa ferramenta estatística que possibilita a exploração das relações entre múltiplas variáveis e a obtenção de informações valiosas a partir de dados complexos. Sua aplicação tem se mostrado essencial em diversas áreas de pesquisa e tem contribuído para avanços significativos em análises químicas e científicas (Santos *et al.*, 2021; Oliveira, 2018). A calibração multivariada também tem se mostrado eficaz na detecção de outliers e na capacidade de lidar com interferências indesejadas, resultando em modelos mais robustos e precisos (Domingos, 2019). Essa abordagem

também pode ser aplicada em diferentes etapas do processo analítico, desde a pré-processamento dos dados até a validação dos modelos (Oliveira 2018).

3.5.2 Regressão por mínimos quadrados parciais

Como mencionado anteriormente, a calibração multivariada representa uma abordagem estatística avançada amplamente adotada em diversas esferas científicas e industriais, visando analisar e extrair informações valiosas de conjuntos de dados multivariados complexos. Essa metodologia oferece a capacidade de modelar e compreender as relações intrincadas entre múltiplas variáveis independentes e uma variável dependente de interesse. Ao longo dos anos, diversos métodos de calibração multivariada foram desenvolvidos e aplicados com sucesso em diferentes campos de estudo (Chaves *et al.*, 2008).

Um dos métodos preeminentes na calibração multivariada é a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*). Reconhecido por sua robustez, o PLS é habilidoso na gestão da multicolinearidade entre as variáveis independentes e na explicação da variabilidade em ambas as variáveis independentes e dependentes. É frequentemente empregado em aplicações envolvendo a modelagem de dados espectroscópicos, químicos e biológicos (Jiang *et al.*, 2022).

Uma das principais vantagens do PLS também é a sua capacidade de reduzir a dimensionalidade dos dados, ou seja, representar informações relevantes em um espaço de menor dimensão. Isso é especialmente útil quando se lida com um grande número de variáveis e busca-se uma forma eficiente de extrair o máximo de informações a partir delas. Essa técnica é extensivamente aplicada em diversas áreas, como controle de qualidade de medicamentos, controle de qualidade de alimentos e determinação da quantidade de fármacos ou compostos específicos (Macedo *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2018).

3.6 DETERMINAÇÃO DE CASEÍNA UTILIZANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Diversos estudos têm explorado a aplicação de métodos de calibração multivariada para determinar a caseína em amostras de leite de cabra, alcançando resultados altamente precisos e confiáveis (Alves, 2021).

A determinação precisa de componentes específicos em sistemas complexos, como a caseína em produtos lácteos, representa um desafio analítico significativo. A sua quantificação exata é crucial para garantir a conformidade com a qualidade final do produto. Nesse aspecto, a calibração multivariada emerge como uma abordagem promissora, permitindo a análise simultânea de múltiplas variáveis inter-relacionadas. Essa calibração utiliza-se de técnicas estatísticas avançadas para explorar a relação entre as variáveis independentes, como os espectros obtidos por técnicas como a espectrofluorimetria e a variável dependente, neste caso, a concentração de caseína (Ma e Amamcharla, 2021).

Ao ser comparada a métodos univariados, a calibração multivariada destaca-se por sua capacidade de lidar com sobreposição espectral e variações na matriz do produto (Smith *et al.*, 2019). Essa flexibilidade torna-a particularmente valiosa em análises de amostras complexas, como queijos envelhecidos, nos quais a presença de outras substâncias pode interferir nos métodos convencionais (Abbas *et al.*, 2018). A bem-sucedida implementação dessa abordagem na determinação de caseína sublinha não apenas a importância da escolha da técnica analítica apropriada, mas também ressalta a necessidade de uma compreensão aprofundada das propriedades físicas e químicas do sistema em estudo (Ma e Amamcharla, 2021). Essas contribuições consolidam a calibração multivariada como uma ferramenta analítica robusta e eficaz na quantificação precisa de componentes específicos em produtos lácteos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Analítica e Quimiometria (LQAQ). Localizado no prédio das Três Marias (subsolo) do campus I, situado na cidade de Campina Grande, da Universidade Estadual da Paraíba.

4.2 AMOSTRAS DO LEITE DE CABRA

As amostras do leite de cabra foram obtidas da seguinte forma: através da compra de duas amostras pasteurizadas marcas distintas em supermercado e cinco amostras *in natura* de cabras distintas, de 3 raças diferentes: murciana, toggenburg e Saanen, através de duas fazendas da região.

4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES

Foram empregados ácido acético, etanol 95%, éter etílico P.A., caseína P.A. da marca Synth e tampão fosfato com pH 7.5. A metodologia, adaptada de Joshi *et al.* (2021), consistiu em dissolver a caseína padrão no tampão fosfato pH 7,5, seguido pelo aquecimento da solução em banho-maria a 45-50°C até atingir um estado quase transparente.

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas soluções padrão de caseína pura da marca Synth, com concentrações de 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 ppm.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA CASEÍNA PARA A ANÁLISE DO MÉTODO CLÁSSICO GRAVIMÉTRICO

Para a obtenção da caseína, utilizou-se a metodologia de Andrade *et al.* (2012), onde foram aquecidos 150 mL de água destilada a 38°C e em seguida adicionou-se 50 mL de leite. Adicionou-se ácido acético (aproximadamente 3,7mL) gota a gota na solução até o aparecimento de um precipitado abundante. A solução foi deixada em repouso por aproximadamente 20 minutos para a sedimentação da proteína, e a seguir o sobrenadante foi separado. Ao precipitado foram adicionados 20 mL de etanol 95% v/v, misturou-se

bem, efetuou-se a filtração e desprezou-se o filtrado. Ao precipitado foram adicionados 5 mL de éter etílico e, após homogeneização em um bequer com um bastão de vidro, efetuou-se uma nova filtração decantando então o precipitado, e secando-o em papel de filtro e, posteriormente colocado no dessecador para secar o restante. Em seguida, foi pesada a massa caseínica obtida.

4.5 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

Os espectros de fluorescência foram obtidos através do pico de excitação em 280 nm e a emissão de 324 a 360 nm utilizando espectrofluorímetro modelo Jasco FP 8200. Utilizou-se a cubeta de quartzo de 10 mm caminho óptico. Foi utilizado os seguintes parâmetros: Velocidade da medida de 2000 nm/min; modo de medição de emissão com resposta de 0,1 segundos; largura da banda de excitação e emissão de 2,5 nm, com sensibilidade média.

4.6 SOFTWARES E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS

Foi realizado com auxílio do programa The Unscrambler® V. 9.8.

Para se obter melhores resultados foram avaliados a possibilidades de correções e remoção de ruídos nos dados e calibração multivariada, tais como suavização de linha de base, minimização de ruídos e interferências instrumentais.

As soluções de concentração conhecida foram utilizadas para construção do modelo de calibração. Foram avaliados o coeficiente de determinação de calibração (R^2_{cal}), a raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (RMSEC, do inglês *Root Mean Square Error of Calibration*) foram usados para avaliar os modelos de PLS. Em seguida, os modelos de regressão PLS foram usados para predição das amostras sintéticas e das amostras reais de leite de cabra. Foram avaliados o coeficiente de determinação de predição (R^2_{pred}), número de variáveis latentes e a raiz quadrada do erro quadrático médio de predição (RMSEP, do inglês *Root Mean Square Error of Prediction*).

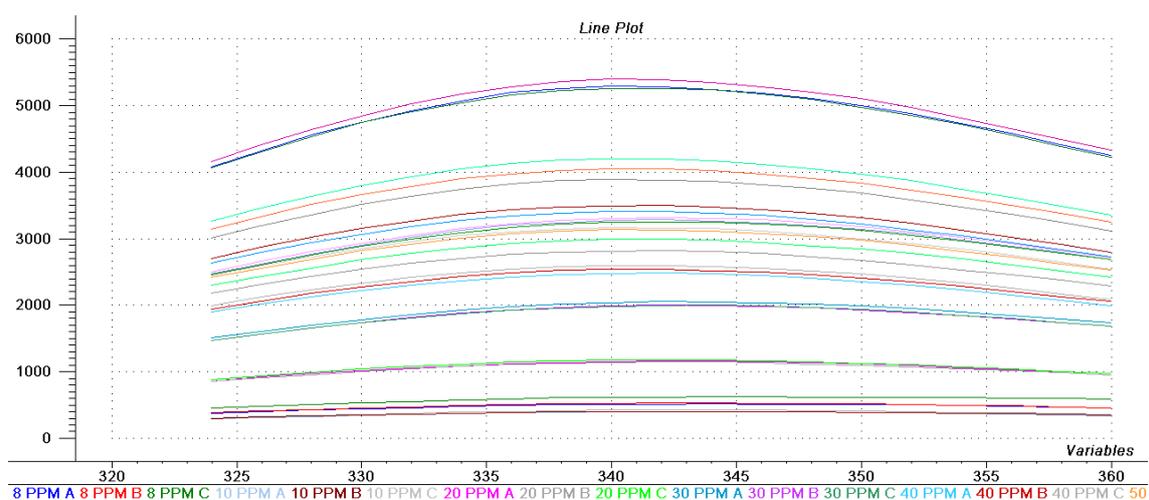
5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

As medidas espectrofluorimétricas das soluções padrão foram feitas na região de 324 a 360 nm para excitação e 280 nm para emissão, Figura 4.

Foi realizada uma Análise por Componentes Principais para comparar os grupos de amostras a partir das variáveis com maior variância. Através do gráfico de scores, Figura 5, é possível observar similaridades entre as amostras que possuem concentrações próximas, foi possível observar também que há uma tendência a separação entre as amostras mais concentradas e menos concentradas, observando baixo resíduo na amostra de 80 ppm.

Figura 4 – Medidas espectrofluorimétricas das soluções padrão de caseína para obtenção da curva de calibração.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

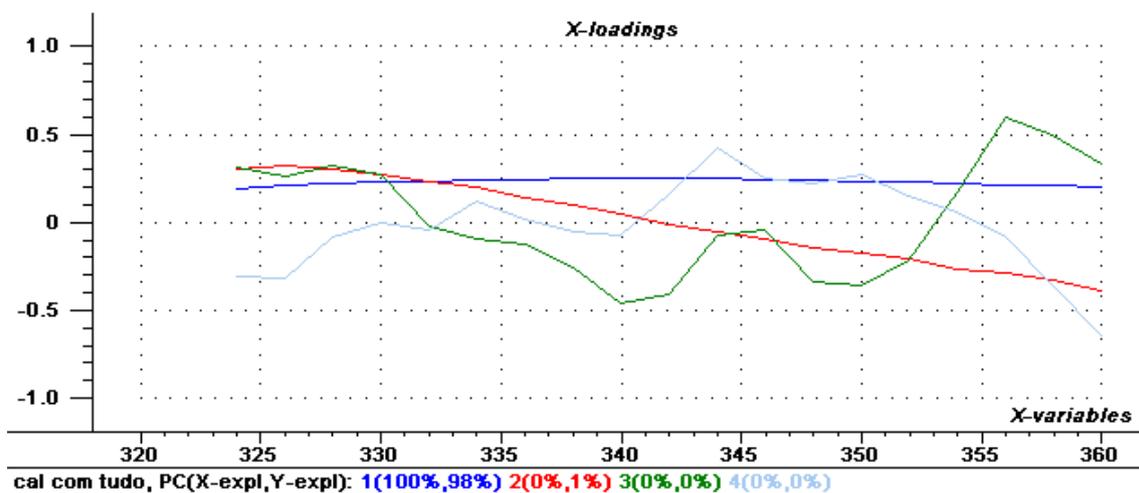
Algumas amostras do reagente padrão (caseína P.A.) possuem comportamento que as agrupam mais próximas a depender da concentração utilizada, do que ao agrupamento de amostras com concentrações superiores. Isso pode indicar que o comportamento da caseína P.A. varia com a concentração, o que é relevante para a calibração do modelo de predição.

Figura 5 – Gráfico de scores do modelo PCA.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 6 – Gráfico de Loadings do modelo de calibração para determinação de caseína.

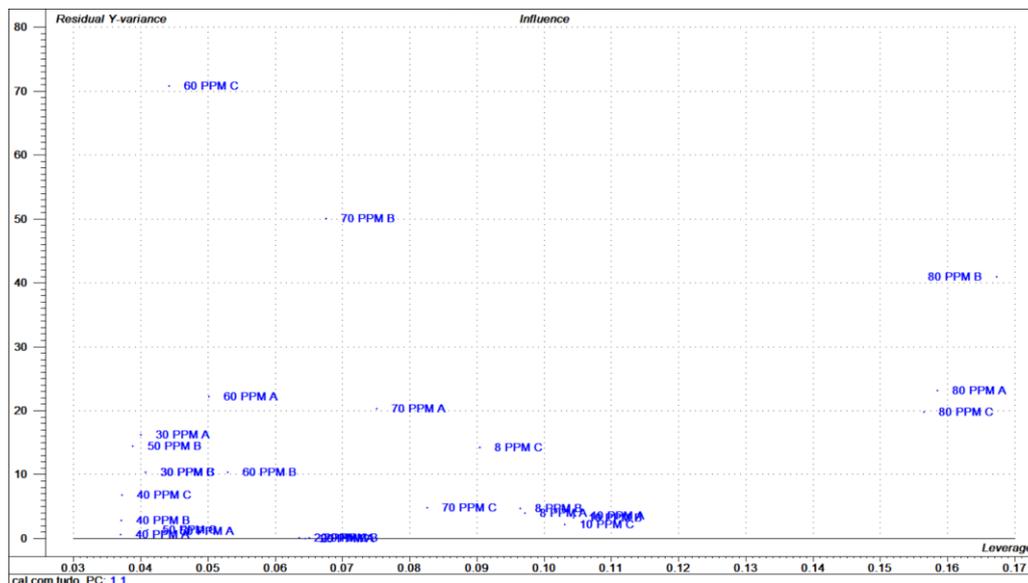


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Como pode-se observar no gráfico de loadings, Figura 6, um componente principal (PC) foi suficiente para elucidar a variação nos espectros, o que é coerente, uma vez que se trata de uma única banda larga. No entanto, para explicar a variação nas concentrações, foram necessários dois componentes principais (PCs), sendo um responsável por 98% e o outro por 1%.

Em seguida, o gráfico de influência, Figura 7, foi idealizado para identificar amostras anômalas no conjunto de dados e foi constatado que nenhuma das amostras apresentou impacto na distribuição dos agrupamentos.

Figura 7 – Gráfico de resíduos estudantizados de influência.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

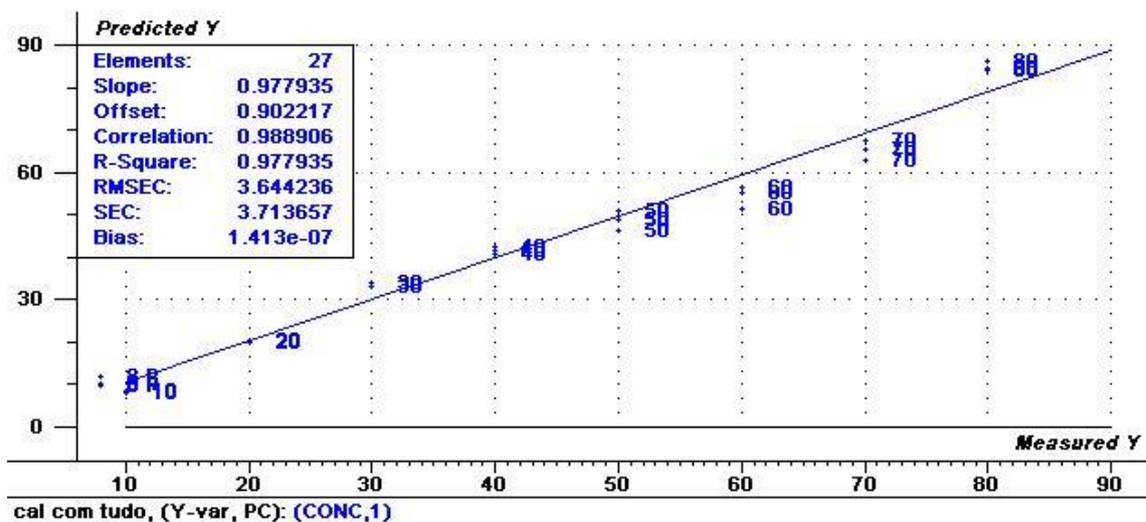
Ao considerar que os resultados apresentem uma tendência a separação entre as amostras com concentrações distintas, e percebendo a distinção desses agrupamentos pela classificação, buscou-se por meio da regressão PLS a construção de modelos para predição da caseína nas amostras, houve uma grande influência relacionada a alta concentração.

5.2 MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Os dados foram separados em conjuntos de calibração e predição. Um conjunto de calibração com 10 amostras de soluções padrão e um conjunto de predição com 3 amostras também de soluções padrão de concentração conhecida. Em seguida, os modelos construídos foram avaliados em termos das figuras de mérito R^2 , RMSEC, RMSEP e bias.

As figuras de mérito mostram que o modelo PLS construído proporcionou bons resultados devido a obtenção de um valor de bias muito baixo, $1,41 \times 10^{-7}$. O bias mede a predisposição do modelo superestimar ou subestimar um valor menor que o observado (Brereton *et al.*, 2018). O R^2 avaliou a linearidade da previsão do modelo com os valores de referência, esse coeficiente de determinação de calibração apresentou-se 0,9779, indicando assim uma linearidade entre os valores de referência, ou seja, é uma medida de ajuste linear. De acordo com Elfadl *et al.* (2010), é possível considerar que os resultados são satisfatórios quando os valores de R^2 são superiores a 0,83. Portanto, o R^2 de calibração mostrou o valor mais próximo ao padrão para esse parâmetro. O RMSEC indica o ajuste do modelo aos dados de calibração, enquanto o RMSEP é utilizado para testar o desempenho final do modelo, foram obtidos os valores respectivos de 3,6442 e 3,9859 ppm. Os valores de RMSE também se mostraram adequados, pois os mesmos são inferiores às concentrações utilizadas para a construção dos modelos, sugerindo um ajuste satisfatório do modelo aos dados de calibração e um desempenho geral aceitável na predição.

Figura 8 – Gráfico de Regressão.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A partir dos gráficos de regressão, Figura 8, foi possível construção de modelos para a determinação da caseína em leite de cabra utilizando a espectrofluorimetria aliada à quimiometria, os parâmetros de qualidade mostraram que os modelos são adequados para essa determinação.

5.2.1 Predição com amostras sintéticas

Foi realizada uma predição com amostras sintéticas contendo três concentrações distintas, com o objetivo de avaliar a eficácia do método. Esses resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação da caseína P.A., concentração calculada, valor predito e seu desvio

Caseína PA	Concentração calculada (ppm)	Valor Predito (ppm)	Desvio (%)
cas. 25 A	25,00	20,03	19,88
cas. 25 B	25,00	22,93	8,28
cas. 25 C	25,00	29,03	16,36
cas. 35 A	35,00	30,23	13,62
cas. 35 B	35,00	29,67	15,22
cas. 35 C	35,00	31,74	9,31
cas. 55 A	55,00	53,34	3,02
cas. 55 B	55,00	53,90	2
cas. 55 C	55,00	53,00	3,64

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados indicam que o método utilizado para quantificar a caseína com valores preditos próximos das concentrações calculadas, destaca resultados favoráveis, com desvios geralmente abaixo de 20%. A caseína com a concentração de 55 ppm obteve resultados com pouco desvio, sugerindo que o método pode ser mais preciso com concentrações mais altas.

Até o presente momento, não foram encontradas informações específicas referentes aos limites de desvio aceitável de caseína e de proteínas totais no leite conforme estabelecido na Instrução Normativa (IN) brasileira, emitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esse é um estudo preliminar das medidas, sem fazer tratamento como ideal.

5.3 DETERMINAÇÃO DA CASEÍNA POR EXTRAÇÃO NO LEITE

Para poder fazer os cálculos, foi feito uma extração da caseína, como método clássico, e, após a extração e secagem, as amostras foram pesadas, obtendo os valores mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Relação massas das amostras pesadas.

AMOSTRAS	MASSA EM 50 mL (g)
Marca 1	0,6322g
Marca 2	1,5398g
Murciana 2	2,2593g
Saanen 1	2,6603g
Saanen 2	1,9989g
Toggenburg 1	1,7804g
Toggenburg 2	1,7489g
Toggenburg 3	2,5018g

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A partir desses valores, foram feitos cálculos para determinar a concentração de caseína em cada leite, utilizando a equação da concentração (1), onde concentração é igual à razão massa e volume, onde esse valor obtido foi transformado em ppm.

$$C = \frac{m}{v} \quad (1)$$

Onde:

C é a concentração;

m é a massa obtida;

v é o volume de leite que foi utilizado para extração, neste caso, 50 mL.

Posteriormente foi realizada a predição dos valores de concentrações calculadas, onde foi alcançado os valores preditos pela curva de calibração e o desvio do valor predito em relação ao valor da concentração calculada.

5.3.1 Predição com amostras reais

Foi realizada, também, uma predição com amostras reais, contendo 7 amostras distintas, em triplicata.

Tabela 4 – Comparação das amostras de leite bruto diluído, concentração calculada, valor predito e seu desvio.

Leite bruto	Concentração calculada (ppm)	Valor Predito (ppm)	Desvio(%)
Marca 1 A	50,58	69,50	37,41
Marca 1 B	50,58	65,49	29,47
Marca 1 C	50,58	66,15	30,78
Marca 2 A	61,59	44,50	27,75
Marca 2 B	61,59	47,40	23,04
Marca 2 C	61,59	48,72	20,90
Murciana 2 A	51,82	40,93	21,01
Murciana 2 B	51,82	43,70	15,67
Murciana 2 C	51,82	35,19	32,09
Saanen 1 A	63,85	46,55	27,09
Saanen 1 B	63,85	40,12	37,16
Saanen 1 C	63,85	45,99	27,97
Saanen 2 A	79,96	45,88	42,62
Saanen 2 B	79,96	43,12	46,07
Saanen 2 C	79,96	45,01	43,71
Toggenburg 2 A	69,96	53,52	23,50
Toggenburg 2 B	69,96	53,45	23,60
Toggenburg 2 C	69,96	50,13	28,34
Toggenburg 3 A	60,04	25,78	57,06
Toggenburg 3 B	60,04	31,83	46,98
Toggenburg 3 C	60,04	32,15	46,45

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A eficácia do método de quantificação depende dos desvios entre os valores preditos e as concentrações calculadas, Tabela 4. Portanto, não obstante dos resultados da marca 1 e da amostra Toggenburg 3 variarem consideravelmente, os demais mantiveram um desvio tolerável, apesar de alto, onde pode ser devido ao método de homogeneização da amostra. Desvios percentuais variados indicam que o modelo pode ter um desempenho diferente em amostras distintas. Ainda assim, os resultados são encorajadores, com

desvios frequentemente abaixo de 30%. O método demonstra eficácia ao lidar com diferentes marcas de leite bruto, onde, apesar do leite ser uma mistura e ter outras proteínas e possíveis interferentes para supressão da fluorescência, os valores estão coerentes. Em algumas amostras, observa-se uma diferença relevante entre as replicatas, indicando a possibilidade de um problema de homogeneização.

Lakowicz (2006) afirma que muitas proteínas encontradas em matrizes biológicas são responsáveis pela supressão de fluorescência, principalmente devido à presença de aminoácidos como tirosina e triptofano. A auto-absorção do sistema tirosina-triptofano e as interações peptídicas entre os fluoróforos são as principais causas. Para Rucker et al. (2012), existem várias técnicas usadas para eliminar ou reduzir o impacto da supressão, reduzindo assim sua influência nas análises. Uma opção é a diluição das amostras; é mais interessante porque não envolve os procedimentos de preparação da amostra mais complexos.

Essa pesquisa destaca a importância crucial da quantificação da caseína no leite, especialmente para a indústria de laticínios e produção de alimentos. Os resultados promissores indicam que o método empregado oferece uma ferramenta valiosa para otimizar processos de produção, assegurar a qualidade dos produtos lácteos e atender a requisitos regulatórios. A capacidade do modelo de lidar com variações entre marcas de leite bruto ressalta sua robustez, enquanto a previsão precisa da concentração de caseína contribui para a eficiência operacional, redução de desperdícios e melhoria da consistência do produto final. Além disso, abre perspectivas para pesquisas futuras, sugerindo a possibilidade de utilizar métodos de homogeneização das amostras para a leitura no espectrofluorímetro, ampliar a análise para outros componentes, adaptar a metodologia a diferentes matrizes lácteas e explorar a integração de técnicas multissensoriais, promovendo inovações contínuas na análise de componentes em produtos lácteos

6 CONCLUSÃO

Foi apresentada uma proposta inovadora para a determinação de caseína no leite de cabra, utilizando a espectrofluorimetria em conjunto com a quimiometria. A eficácia do método foi confirmada por meio da quantificação da caseína, respaldada por uma análise exploratória que evidenciou padrões nas amostras. A cuidadosa escolha dos parâmetros espectrais, como o comprimento de onda de excitação em 280 nm, fortalece a robustez do procedimento experimental.

A construção de modelos quimiométricos, especialmente com o uso da regressão PLS, revelou resultados notáveis. Os modelos foram avaliados com base em métricas como bias, R^2 , RMSEC e RMSEP. A análise de componentes principais e gráficos de regressão contribuiu para uma compreensão mais aprofundada da variação nas concentrações, consolidando a validade do modelo proposto.

A caseína com as concentrações mais altas obteve resultados com pouco desvio, sugerindo que o método pode ser mais preciso com concentrações mais altas. Os resultados obtidos têm implicações práticas significativas para a indústria de laticínios, oferecendo uma ferramenta valiosa para otimizar processos de produção, garantir a qualidade dos produtos e atender a requisitos regulatórios.

A técnica da espectroscopia de fluorescência se mostrou promissora para avaliação e determinação da caseína no leite de cabra.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, O.; ZADRAVEC, M.; BAETEN, V.; MIKUS, T.; LESIC, T.; VULIC, A.; PRPIC, J.; JEMERSIC, L.; PLEADIN, J. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. **Food Chemistry**, v. 246, p. 6–17, abr. 2018.
- ALVES, V. D. Quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários por espectrofluorimetria associada a quimiometria. 2019. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.
- ALVES, R. O. R. A.; TOMÉ, O. C.; PEREIRA, P. C.; VILLANOEVA, C. N. B. C.; SILVA, V. M. Artificial neural networks in the prediction of fraud in integral milk powder by adding whey powder. **Ciência Rural**, v. 52, p. e20210109, 11 out. 2021.
- ANDRADE J.; CALIXTO, C.; GABRIEL, J.; GOMES, L.; SILVA, T.; PALUMBO, M. Extração, Purificação e Determinação do Ponto Isoelétrico da Caseína do Leite. In: 52º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, Recife – PE. 2012.
- ARAGÃO, B. B.; TRAJANO, S. C.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, J. M. B.; SANTOS, A. S.; MELO, R. P. B.; PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A. Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra produzido no estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 2, p. 615–622, abr. 2020.
- AYVAZ, H.; MORTAS, M.; DOGAN, M. A.; ATAN, M.; TIRYAKI, G. Y.; YUCEER, Y. K. Near- and mid-infrared determination of some quality parameters of cheese manufactured from the mixture of different milk species. **Journal of food science and technology**, v. 58, n. 10, p. 3981–3992, 2021.
- BRAGA, S.P. Caseína e seus hidrolisados de pepsina e tripsina do leite de cabra reduzem a hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular em ratos: papel para TNF- α , IL-1 β E IL-10. 2020. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2021.
- BRASIL, R. B.; NICOLAU E.S.; CABRAL, J. F.; SILVA, M. A. P. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 25, n. 2, p. 71-80, jun./set. 2015.
- BRERETON, R. G.; JEROEN, J.; LOPES, J.; MARINI, F.; POMERANTSEV, A.; RODIONOVA, O.; ROGER, J. M.; WALCZAK, B.; TAULER, R. Chemometrics in analytical chemistry—part II: modeling, validation, and applications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 26, p. 6691–6704, 2018.
- BORDIN, G.; RAPOSO, F. C.; CALLE, B.; RODRIGUEZ, A. R. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 928, n. 1, p. 63–76, 2001.
- BUZÁS, H.; SZEKELYHIDI, R.; SZAFNER, G.; SZABO, K.; SULE, J.; BUKOVICS, S.; KOVACS, A. J. Developed rapid and simple RP-HPLC method for simultaneous separation and quantification of bovine milk protein fractions and their genetic variants. **Analytical biochemistry**, v. 658, n. 114939, p. 114939, 2022.

- CAMPOS, A.; QUINTELLA, C.M.; MEIRA, M.; LUNA, S. Prediction of sulfur content in diesel/biodiesel blends using LED-induced fluorescence associated with multivariate calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 7, p. 1367–1372, 2018.
- CARNEIRO, T. S. M.; BARBOSA, P. P. DE S.; GADELHA, T. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de caseínas e do hidrolisado caseínico de leite caprino / evaluation of the antimicrobial activity of caseins and casein hydrolysate from goat milk. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 24829–24844, 2021.
- CHAVES, H. S.; MORAIS, D. G.; DANTAS FILHO, H. A.; DANTAS, K. G. F.; BEIRÃO, A. T. M.; SILVIA, K. P.; SILVIA, J. N.; SILVIA, V. F. A.; SILVA, P.A.; CARVALHO, F. I. M. Aplicação estatística multivariada para a avaliação físico-química na qualidade da água subterrânea na cidade de Parauapebas (Sudeste do Estado do Pará). **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 5, p. 261–272, 5 /jun. 2020.
- CHEN, Y, REN, Y, WANG, L, HUANG, Z. Analysis of A1-type and A2-type β -casein in Maiwa Yak and Pien-niu milk by HPLC-high-resolution MS and tandem. **Journal of Separation Science**, 44: 1913–1922, 2021.
- COSTA, F. R.; MARICATO, E.; DIAS, A. M. N.; BAPTISTA, E. B. Proteínas do soro do leite: propriedades funcionais e benefícios para a saúde humana. **Lecturas: Educación Física y Deportes**, v. 25, n. 272, p. 106–120, 2021.
- DAMIÁN, J. P.; SACCHI, I. Determination of protein in goat milk by different analytical methods. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 19, n. 2, p. 245 - 248, 2020.
- DANTAS, Maria Dayanne de Araújo. Estudos biofísicos do processo de interação da caseína e lactalbumina, proteínas alergênicas do leite, com antibióticos de uso veterinário. 2019. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.
- DOMINGOS, R. C. Aplicação de métodos quimiométricos de calibração multivariada - PLS e iPLS em conjunto com a espectroscopia Raman para análise qualitativa e quantitativa de polimorfos de valsartana. 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.
- DOQ-CGCRE-008 - REVISÃO 03. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. INMETRO, Rio de Janeiro, FEV/2010.
- DUARTE, L. P. B.; OCCULATI, R. M.; MANFRÉ, E. R. Comercialização de leite e derivados de leite de cabra no Brasil. XI SINTAGRO: Simpósio Nacional de Tecnologia em Agronegócio, FATEC – Ourinhos, 2019
- ELFADL, E.; REINBRECHT, C.; CLAUPEINA, W. Development of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibration model for estimation of oil content in a worldwide safflower germplasm collection. **Food Chemistry**, v. 351, p. 129310, 2010
- ELIZARIO, A. Paraíba é o maior produtor de leite de cabra. **Mais PB**. 30 de ago. de 2018. Disponível em: <<https://www.maispb.com.br/274572/paraiba-e-o-maior-produtor-de-leite-de-cabra-do-pais.html>>. Acesso em: 27 nov. 2023

- FEITOSA, J. F. F.; CAMPOS, T. I. L.; LEITE, D. C. Caprinocultura leiteira no semiárido: um estudo acerca do sistema produtivo em uma associação no Cariri paraibano. **Revista Agropampa**, v.1, n. 1., p. 29-49, 2020.
- FERREIRA, M. C. **Quimiometria Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas,SP: Editora da Unicamp, 2015.
- FREITAS, L. I. R. Benefícios do consumo do leite caprino comparado ao leite bovino. 2019. TCC (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama, 2019.
- GALDINO, I. K. C. P. DE O. SALLES, H. O.; SANTOS, K. M. O.; VERAS, G.; BURITI, F. C. A. Proximate composition determination in goat cheese whey by near infrared spectroscopy (NIRS). **PeerJ**, v. 8, p. e8619, 12 fev. 2020.
- GASTÉLUM-BARRIOS, A.; SOTO-ZARAZUA, G. M.; ESCAMILLA-GARCIA, A.; TOLEDANO-AYALA, M.; MACIAS-BOBADILLA, G.; JAUREGUI-VAZQUEZ, D. Optical methods based on ultraviolet, visible, and near-infrared spectra to estimate fat and protein in raw milk: A review. **Sensors**, v. 20, n. 12, p. 3356, 2020.
- GOMES, L. M. S. Desenvolvimento de um procedimento analítico para a determinação espectrofluorimétrica de nitrato e nitrito em leite explorando um composto de coordenação à base de európio (III). 2020. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.
- HASHIMOTO, J. C. Caracterização de amêndoas de cacau produzidas em diferentes estados brasileiros e aplicação de espectroscopia no infravermelho próximo e quimiometria como alternativa para o controle de qualidade. 2015. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- JIANG, Q.; MEI, S.; ZHAN, C.; REN, C.; SONG, Z.; WANG, S. Fast and nondestructive discrimination of fresh tea leaves at different altitudes based on near infrared spectroscopy and various chemometrics methods. **Food Science and Technology**, v. 43, p. e98922, 7 nov. 2022.
- JOSHI, S.; MANSURI, F.; KULKARNI, A.; JAMKHEDKAR, S. A1 and A2 milk caseins-comparative FTIR and spectrofluorimetry analysis. **The Indian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], v. 91, n. 9, p. 765-769, 2021.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3.ed. Boston: Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- 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, n. 7, p. 2600–2605, 1999.
- LELIS, C.A.; GALVAN, D.; TESSARO, L.; ANDRADE, J. C. A.; MUTZ, Y. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. Fluorescence spectroscopy in tandem with chemometric tools applied to milk quality control. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, p. 104515–104515, 1 jun. 2022
- LIMA, I. C. A. Aplicações de métodos de classificação e calibração multivariada acoplados com técnicas espectroscópicas em amostras ambientais e alimentos. 2011.

105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

MA, Y. B.; AMAMCHARLA, J. K. A rapid method to quantify casein in fluid milk by front-face fluorescence spectroscopy combined with chemometrics. **Journal of dairy science**, v. 104, n. 1, p. 243–252, 2021.

MACEDO, R. S.; MORO, L.; LAMBALS, E. O.; LAMBALS, G. R.; BAKKER, A. P. Effects of degradation on soil attributes under caatinga in the brazilian semi-arid. **Revista Árvore**, v. 47, p. e4702, 2023.

MAGALHÃES, Isabela Soares. Hidrólise enzimática assistida por ultrassom da caseína do leite de cabra: efeitos na cinética de hidrólise, solubilidade e atividade antioxidante dos hidrolisados. 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.

MAIA, Á.; SALLES, M. G.; PNTTO, C.; RODRIGUES, I.; NETO, A. V. A implantação da caprinocultura leiteira no assentamento nova assunção, Aracoiaba-CE. **Agrarian Academy**, v. 6, n. 11, p. 1–14, 2019.

MATOS, M. C. Análise da matéria orgânica dissolvida em efluentes de abatedouro bovino utilizando espectroscopia de fluorescência e Parafac. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2022.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. *Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão*. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 1, p. 5–12, 10 set. 2009.

MENEZES, T. M. Potencial reposicionamento de inibidores da tirosina quinase no tratamento da doença de Alzheimer e efeitos no biotransporte associados à glicação de proteínas. 2022. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

MOHAMED, H.; NAGY, P.; AGBABA, J.; KAMAL-ELDIN, A. Use of near and mid infra-red spectroscopy for analysis of protein, fat, lactose and total solids in raw cow and camel milk. **Food Chemistry**, v. 334, p. 127436, 2021.

MOURA, I.N. Caracterização e identificação de adulterações em Whey Protein por espectroscopia de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. 2017. 77 p. Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e derivados, Juiz de Fora, 2017.

NASCIMENTO, M. E. D. L.; SILVA, N. I. S.; MACHADO, F. C. G.; CORDÃO, M. A.; COSTA, T. G. P.; OLIVEIRA, S. C. P. L. Influência das variáveis climáticas sobre parâmetros fisiológicos de cabras leiteiras em confinamento, no sertão paraibano. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 59, n. 2, p. 358, 2022.

NETO, A. S.; PACHECO, C. S. G. R.; NETO, A. S. P.; MOURA, J. A. G.; SANTOS, F. C.; CARVALHO, A. H. H.; FARIAS, E. A.; ROCHA, O. N.; BRITO, M. V. S. G.; SANTOS, R. P. *Laticínio sabor do sertão: beneficiamento do leite de cabra no distrito de poço de fora, em Curaça - BA*. In: **Agroecologia: produção e sustentabilidade em pesquisa - Volume 3**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2023. v. 3p. 312–322.

- OLIVEIRA, A. C. S. Determinação de polifenóis totais em vinhos por espectrofluorimetria. 2016. 49f. TCC (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.
- OLIVEIRA, R. R.; SOUZ, 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 946–956, jun. 2018.
- RAZAN, L. Metodologias para seleção de variáveis explicativas e detecção de inconformidades de predição aplicadas à espectroscopia por fluorescência. 2021. 126 p. Tese (Doutorado em Engenharia química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de engenharia Química. Porto Alegre, 2021.
- RIBEIRO, G. L.; LOURENZANI, W. L.; BANKUTI, F. I.; MAC-LEAN, P. A. B. Dinâmica da atividade leiteira no estado de São Paulo. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 18, n. 3, p. 76–91, 2022.
- ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil, **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 886–892, 2010.
- RUCKER, R.B., ZEMPLIENI, J., SUTTIE, J.W., MCCORMICK, D.B. (Ed). **Handbook of Vitamins**. CRC Press. 4ª ed., 2012.
- RUSCHEL, C. F. C. Aplicação de ferramentas quimiométricas e técnicas espectroscópicas na análise de combustíveis. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- SAHARIAH, B. J.; GHOSH, K.; BHATTACHARYA, K. Determination of Casein in Milk Samples Available in Guwahati, Assam, India. **Indian Journal of Natural Sciences**, v. 13, n. 76, 2022.
- SANTOS, G.; PAULINO, G. S. P.; BORGES, G. P. I.; SANTIAGO, A. F.; SILVA, G. A. *Avanços Analíticos Baseados Em Modelos De Calibração De Primeira Ordem E Espectroscopia Uv-Vis Para Avaliação Da Qualidade Da Água: Uma Revisão - PARTE 1. Química Nova*, 2021.
- SEN, S.; DUNDAR, Z.; UNCU, O.; OZEN, B. Potential of Fourier-transform infrared spectroscopy in adulteration detection and quality assessment in buffalo and goat milks. **Microchemical Journal**, v. 166, p. 106-207, 2021.
- SIKORSKA, E. Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in Analysis of Beverages. **Quality Control in the Beverage Industry**, p. 161–203, 2019.
- SILVA, G. J.; GONÇALVES, B. H. R. F.; JESUS, J. C. D.; CONCEIÇÃO, D. G.; FERRÃO, S. P. B. Efeito do tempo de armazenamento nos grupos funcionais de leite em pó de búfala por meio de FTIR e quimiometria. **Higiene Alimentar**, v. 33, n. 288-289, p. 3062–3066, 2019.
- SILVA, J. L.; DIAS, M. S.; MELO, C. M. T.; ALMEIDA, E. S. Análise do teor de proteína em whey protein pelos métodos de kjeldahl e biureto. In: **Open Science Research IX**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2022. p. 60–69.

SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; GAUCHERON, F. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian journal of food technology**, v. 22, p. e2018185, 2019.

SILVA, R. B. Variações das frações proteicas do leite de cabra e associação com as propriedades de nanofibras de pva/caseína/pluronic. 2020. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

SIQUEIRA, K. B. O. **O mercado consumidor de Leite e derivados**. Juiz de Fora, 2019. (Embrapa. Circular Técnica, 120).

SMITH, S. L.; DENHOLM, S. J.; COFFEY, M. P.; WALL, E. Energy profiling of dairy cows from routine milk mid-infrared analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 11169–11179, dez. 2019

SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2019

SPINA, A. A.; CENITI, C.; TRIMBOLI, F.; BRITTI, D.; LOPREIATO, V. Suitability of protein content measured by MilkoScan FT-plus milk analyzer to evaluate bovine and Ovine colostrum quality. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 11, n. 9, p. 2587, 2021.

TEIXEIRA, J. L. P.; PALLONE, J. A. L. Leite e derivados caprinos. Elementos essenciais, modelos de digestão in vitro e técnica analítica verde para detecção de fraudes: Um referencial teórico. In: VERRUCK, Silvani (org.). **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1. ed. [S. l.]: Científica Digital, 2021. v. 5, cap. 18, p. 209-225. ISBN 978-65-5360-031-7.

THIAGO, N. O. S. Utilização de métodos espectroscópicos para avaliação de ácidos húmicos extraídos de solos de diferentes sistemas produtivos de pastagens. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Carlos, 2016.

TSUJIMOTO, L. R. Hidrólise parcial da caseína e ovoalbumina utilizando a protease vegetal ficina: determinação de atividade antioxidante e quelante de ferro. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2022.

VERA-BRAVO, R.; HERNANDEZ, A. V.; PEÑA, S.; ALARCÓN, C.; LOAIZA, A. E.; CELIS, C. A. Cheese whey milk adulteration determination using casein glycomacropeptide as an indicator by HPLC. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 20, p. 3201, 2022.

VILLA, C.; MOURA, M. B. M.V.; COSTA, J.; MAFRA, I. β -Lactoglobulin versus casein indirect ELISA for the detection of cow's milk allergens in raw and processed model meat products. **Food Control**, v. 135, p. 108818, maio 2022.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, nov. 1998