

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Mariana Ramos de Almeida

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E VARIEDADE DE LEITE EM PÓ E LEITE  
CONDENSADO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE  
MULTIVARIADA**

Juiz de Fora  
2011

Mariana Ramos de Almeida

# Avaliação da Qualidade e Variedade de Leite em Pó e Leite Condensado por Espectroscopia Raman e Análise Multivariada

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários do Programa de Pós-graduação em Química para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Juiz de Fora

10/02/2011

Almeida, Mariana Ramos de.

Avaliação da qualidade e variedade de leite em pó e leite condensado por espectroscopia Raman e análise multivariada / Mariana Ramos de Almeida. – 2011.

95 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Espectroscopia. 2. Quimiometria. 3. Laticínios I. Título.

CDU 543.42



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

UFJF  
Pós-Graduação  
em Química

A presente dissertação, intitulada “**Avaliação da Qualidade e Variedade de Leite em Pó e Leite Condensado por Espectroscopia Raman e Análise Multivariada**” de autoria de Mariana Ramos de Almeida, submetida à Comissão Examinadora abaixo assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA** em 10 de fevereiro de 2011.

Juiz de Fora, 10 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Márcia Laudelina Arruda Temperini  
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Joel Camargo Rubim  
Universidade de Brasília

## Agradecimentos

- Ao prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira pela orientação, oportunidade de trabalho, confiança, paciência e amizade cultivada no decorrer desses anos.
- À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Química, pela possibilidade de realização deste trabalho.
- À CAPES pela bolsa concedida.
- Ao Rodrigo Stephani pelas idéias e acompanhamento do trabalho.
- À Gemacom Tech pelo fornecimento das amostras e pela bolsa de iniciação científica.
- Ao Rafael S. Alves e Kamila de S. Oliveira pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade.
- Ao prof. Dr. Ronei Jesus Poppi e a *MSc.* Laura Barbosa Lima Nascimbem de Godoy pela oportunidade de aprendizagem e utilização das ferramentas quimiométricas.
- Ao professor Dr. Antonio Carlos Sant'Ana pela contribuição didática.
- Aos atuais e ex-colegas do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM): Antonio, Carlos Eduardo, Douglas, Elgte, Felipe, Humberto, Gilson, Harlem, Kamila, Laís, Luciano, Maria Clara, Márcia, Nelson, Renata, Stéphanos, Tatiana, Vanda, Vanessa, Vitor e Weberton. Obrigada pelo convívio e momentos agradáveis.
- A todos os professores do Departamento de Química que contribuíram para a minha formação profissional. Em especial, agradeço a professora Dra. Rosana Colombara por acreditar em minha capacidade e me indicar para a iniciação científica.
- À minha família: meus pais Dionéia e Sebastião e meus irmãos Deives e Malena por todo amor, esforço, compreensão e apoio incondicional. Com o mesmo sentimento agradeço aos meus padrinhos Cândida e Fausto por tudo que fizeram por mim, e aos meus primos Guilherme e Fausto pelo apoio e incentivo nesta trajetória.
- À minha amiga Maria Clara Ramalho Freitas pela convivência agradável, companheirismo e amizade cultivada nestes anos.
- Ao Adilson, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão em todo esse período. Que mesmo distante sempre me estendeu a mão, confortando-me.
- A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

## Resumo

Neste trabalho, a espectroscopia FT-Raman foi explorada como técnica rápida para avaliação da qualidade do leite em pó e leite condensado. A análise exploratória empregando os dados da espectroscopia Raman e a análise por componentes principais (PCA) permitiu a separação das amostras de leite em pó de acordo com a sua classificação. A análise multivariada também foi empregada para classificar as amostras de leite em pó adulteradas. No modelo das componentes principais, as amostras adulteradas com até 5% de soro e/ou amido ficaram bem próximas das amostras sem adição de adulterante. Na análise discriminante por mínimos quadrados parciais, as amostras comerciais foram classificadas corretamente, já as amostras com 1 e 2% m/m de soro foram classificadas como amostras sem adulteração. Nos modelos de regressão, utilizando o PLS, os resultados mostraram-se satisfatórios para concentrações de adulterante acima de 5% m/m. Abaixo dessa concentração e para as amostras sem adição de adulterante o modelo apresentou erros relativos altos, de até 50%. As modificações que ocorrem no leite em pó com o tempo de armazenamento foram acompanhadas pela espectroscopia Raman, as mudanças observadas nos espectros indicam a cristalização da lactose como a principal alteração do leite armazenado. Na avaliação da qualidade do leite condensado de diferentes marcas brasileiras, os espectros Raman forneceram informações dos principais constituintes. A análise dos componentes principais revelou amostras com perfil de espectro Raman diferente das demais. Na análise do gráfico dos pesos da primeira componente principal, as bandas características da sacarose apresentaram grande contribuição. Esses resultados sugerem diferentes concentrações de sacarose para as amostras de leite condensado. O trabalho desenvolvido mostra a espectroscopia Raman como uma ferramenta analítica que pode ser utilizada no controle de qualidade do leite em pó e de leite condensado. Apesar dos modelos multivariados desenvolvidos não serem estritamente quantitativos, principalmente para baixas concentrações, eles podem ser utilizados como metodologia de *screening* para análises de rotina, como demonstrado nesse trabalho.

Palavras chaves: Espectroscopia Raman, quimiometria, leite em pó, leite condensado.

## Abstract

In this work, the FT-Raman spectroscopy was explored as a rapid technique for assessment the quality of milk powder and condensed milk. The exploratory analysis employing data from Raman spectroscopy and principal component analysis (PCA) allowed the separation of samples of milk powder according to its classification. Multivariate analysis was also used to classify adulterated milk powder samples. In the model of principal components, the adulterated samples with up to 5% of whey and / or starch were very close to those of samples without addition of adulterant. Discriminant analysis by partial least squares, the commercial samples were classified correctly, since the samples with 1 and 2% w/w whey samples were classified as unadulterated. In regression models using PLS, the results were satisfactory for contaminant concentrations above 5% w/w, below this concentration and for samples without addition of adulterant the model showed high relative errors of up to 50%. The changes that occur in milk powder during storage were followed by Raman spectroscopy; the changes observed in the spectra indicate the crystallization of lactose as the main alteration of stored milk. In evaluating the quality of condensed milk of different Brazilian brands, the Raman spectra have provided information of the main constituents. The principal components analysis revealed profile of samples with different Raman spectrum from the others. In the analysis of the loadings of the first principal component, the characteristic bands of sucrose showed great contribution. These results suggest different sucrose concentrations for the samples of condensed milk. The work shows the Raman spectroscopy as an analytical tool that can be used in quality control of milk powder and condensed milk. Although the multivariate models developed are not strictly quantitative, especially for low concentrations, they can be used as screening methods for routine analysis, as demonstrated by this work.

Keywords: Raman spectroscopy, chemometrics, milk powder, condensed milk.

## Lista de Figuras

FIGURA 1: Modelo esquemático de um glóbulo de gordura do leite .....	17
FIGURA 2: Modelo de uma micela de caseína segundo WASLTRA <i>et al.</i> (2001), extraído de LEMOS, <i>et al.</i> (2010). .....	17
FIGURA 3: Estrutura química da lactose.....	18
FIGURA 4: Estados brasileiros (em vermelho) que apresentaram resultado positivo para soro em amostras de leite, segundo o MAPA. Os estados em branco ainda não tinham sido analisados (VARGAS, 2009). .....	19
FIGURA 5: Estrutura molecular da amilose (A) e amilopectina (B), principais constituintes do amido. ....	21
FIGURA 6: Estrutura primária da $\kappa$ -caseína mostrando o ponto de clivagem da renina, no processo de coagulação, segundo SGARBIERI (1996). Extraído de LEMOS, <i>et al.</i> (2010)...	22
FIGURA 7: Ilustração esquemática dos espalhamentos Raman e Rayleigh.....	34
FIGURA 8: Organização dos dados multivariados em uma matriz a partir do espectro Raman. ....	39
FIGURA 9: Representação de um treinamento não-supervisionado mostrando a formação de agrupamentos naturais (A); e um treinamento supervisionado mostrando as amostras em classes previamente estabelecidas (B). ....	40
FIGURA 10: Matriz de dados X e a projeção das amostras em um espaço bidimensional (extraído de RIBEIRO, 2007).....	41
FIGURA 12: Esquema de decomposição da matriz X em matriz escore (T), matriz peso (P) e uma matriz dos resíduos (E). ....	42
FIGURA 13: Representação de duas componentes principais, os escores são as projeções das amostras em direção a componente principal e os pesos são os cossenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável original. ....	44
FIGURA 14: Construção de um modelo de calibração multivariada.....	46
FIGURA 15: Decomposição das matrizes X e Y para o modelo PLS .....	47
FIGURA 16: Espectros Raman do leite em pó integral (A), semi-desnatado (B) e desnatado (C).....	62
FIGURA 17: Espectros Raman do leite em pó modificado de diferentes marcas: amostra com 70% (m/m) de carboidratos (A); amostra com 59% (m/m) de carboidratos (B); amostra com 80% (m/m) de carboidratos (C) e amostra com 52% (m/m) de carboidratos (D). ....	66
FIGURA 18: Gráfico de escores CP 1 versus CP 2 dos 4 tipos de leite em pó: integral (●); semi-desnatado (◆), desnatado (▲) e modificado (■). As amostras nomeadas de A, B e C pertencem ao mesmo tipo de leite. ....	67
FIGURA 19: Espectros Raman das amostras de leite desnatado: espectro raman típico de leite em pó desnatado (A); amostra com espectro Raman diferente das demais amostras de leite desnatado (B) e amostra de leite desnatado com a presença de bandas características de lipídeos (C). ....	68
FIGURA 20: Gráfico dos pesos na CP 1 versus os números de onda (variáveis).....	69
FIGURA 21: Espectro Raman do amido (A) e do soro em pó (B), comumente empregados como adulterantes de leite em pó. ....	70
FIGURA 22: Espectro Raman do leite integral comercial (A); com adição de soro nas proporções de 5% m/m (B); 10% m/m (C); e 20% m/m (D). ....	71
FIGURA 23: Espectro Raman do leite em pó desnatado: comercial (A); com adição de 5% m/m (B), 10% m/m (C) e 20% m/m (D) de soro.....	72

FIGURA 24: Espectro Raman do leite em pó integral: comercial (A); com adição de amido nas proporções de 5% m/m (B), 10% m/m (C) e 20% m/m (D). .....	73
FIGURA 25: Espectro Raman do leite em pó desnatado: comercial (A); com adição de amido nas proporções de 5% m/m (B), 10% m/m (C) e 20% m/m (D). .....	74
FIGURA 26: Gráfico de escores PC1 versus PC2 das amostras de leite integrais comerciais (●) e adulteradas com soro (▲); com amido (▼) e com ambos (◆). .....	75
FIGURA 27: Gráfico de pesos do CP 1 versus os números de onda (variáveis). .....	76
FIGURA 28: Gráfico de escores CP 1 versus CP 2 das amostras de leite desnatados comerciais (●) e adulteradas com soro (▲); com amido (▼) e com ambos (◆). .....	77
FIGURA 29: Gráfico de pesos do CP 1 versus os números de onda (variáveis). .....	77
FIGURA 30: Classificação das amostras de leite em pó integral sem adição de soro e/ou amido (● – calibração; ○ – validação); as amostras classificadas como sem adulteração encontram-se acima da linha tracejada. ....	79
FIGURA 31: Classificação das amostras de leite em pó integral adulteradas com soro (▲ – calibração; ▲ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada. ....	80
FIGURA 32: Classificação das amostras de leite em pó integral adulteradas com amido (▼ – calibração; ▼ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com amido encontram-se acima da linha tracejada. ....	80
FIGURA 33: Classificação das amostras de leite em pó integral adulteradas com soro e amido (◆ – calibração; ◆ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada. ....	81
FIGURA 34: Classificação das amostras de leite em pó desnatado sem adição de soro e/ou amido (● – calibração; ○ – validação); as amostras classificadas como sem adulteração encontram-se acima da linha tracejada. ....	82
FIGURA 35: Classificação das amostras de leite em pó desnatado adulteradas com soro (▲ – calibração; ▲ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada. ....	82
FIGURA 36: Classificação das amostras de leite em pó desnatado adulteradas com amido (▼ – calibração; ▼ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com amido encontram-se acima da linha tracejada. ....	83
FIGURA 37: Classificação das amostras de leite em pó desnatado adulteradas com soro e amido (◆ – calibração; ◆ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada. ....	83
FIGURA 38: Valores previstos pelo PLS versus os valores de referência da % (m/m) de soro adicionado no leite em pó. Amostras de calibração (●) e amostras de validação (▲). .....	84
FIGURA 39: Valores previstos pelo PLS versus os valores de referência da % (m/m) de amido adicionado no leite em pó. Amostras de calibração (●) e amostras de validação (▼). .....	85
FIGURA 40: Gráfico dos pesos da VL 1 versus os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do soro. ....	86
FIGURA 41: Gráfico dos pesos da VL 1 versus os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do amido. ....	87
FIGURA 42: Curva de calibração do ácido siálico para o método da ninidrina ácida. ....	89
FIGURA 43: Correlação entre a quantidade de soro adicionada e a leitura em 470 nm pelo método da ninidrina. ....	90
FIGURA 44: Espectro Raman da amostra de leite em pó desnatado armazenado durante quatro meses em dessecador (A) e em embalagem plástica fora do dessecador (B). ....	92
FIGURA 45: Espectro Raman do leite em pó integral armazenado dentro (A) e fora (B) do dessecador em um período de quatro meses. ....	93

FIGURA 46: Espectro Raman da lactose cristalina (A); do leite em pó com adição de 15% m/m de lactose cristalina (B); e do leite em pó com adição de 20% m/m de lactose cristalina (C). .....	94
FIGURA 47: Curvas termogravimétricas TG/DTA para o leite desnatado no dia da abertura da embalagem (A); e durante o período de estocagem de: um (B), dois (C), três (D) e quatro (E) meses. ....	95
FIGURA 48: Curvas termogravimétricas TG/DTA para o leite integral no dia da abertura da embalagem (A); e durante o período de estocagem de: um (B), dois (C), três (D) e quatro (E) meses. ....	96
FIGURA 49: Gráfico de escores dos dois CP's para as amostras de leite condensado. ....	97
FIGURA 50: Espectro Raman das amostras de leite condensado que ficaram separadas no gráfico de escores. ....	98
FIGURA 51: Gráfico de pesos da CP 1, mostrando a contribuição de cada banda Raman para o gráfico de escores da PCA. ....	99
FIGURA 52: Gráfico de pesos da CP 2, mostrando a contribuição de cada banda Raman para o gráfico de escores da PCA. ....	99

## Lista de Tabelas

TABELA 1: Composição do leite condensado (LEMOS, <i>et al</i> , 2010) .....	30
TABELA 2: Teor de elementos químicos encontrados em diferentes cabelos (extraído de OTTO, 1999) .....	43
TABELA 3: Planejamento das amostras de leite em pó com adição de soro e amido.....	52
TABELA 4: Número de espectros Raman dos tipos de leite em pó empregados na construção do modelo PCA. ....	54
TABELA 5: Descrição do conjunto de amostra de leite em pó com soro e amido para análise de reconhecimento de padrões não-supervisionados.....	55
TABELA 6: Conjunto de amostras para a construção dos modelos de classificação por PLS-DA e regressão por PLS. ....	56
TABELA 7: Preparo das amostras de ácido siálico para construção da curva de calibração. .	59
TABELA 8: Preparo das amostras de leite integral com adição de soro .....	59
TABELA 9: Preparo das amostras de leite desnatado com soro.....	60
TABELA 10: Tentativa de atribuição do espectro Raman do leite em pó (LI-CHAN, 1996; BENZERDJEB, <i>et al.</i> , 2007; ZHOU, <i>et al.</i> , 2006).....	63
TABELA 11: Tentativa de atribuição dos espectros Raman do amido e soro em pó. (BENZERDJEB, <i>et al.</i> , 2007; YANG; ZHANG, 2009).....	70
TABELA 12: Valores previstos pelos modelos PLS construídos para as amostras de leite em pó. ....	88
TABELA 13: Medidas de ácido siálico no leite em pó comercial e adulterado com soro pelo método da ninidrina ácida. ....	89
TABELA 14: Previsão das amostras de leite em pó comercial e adulterado com soro empregando a regressão por PLS e a metodologia de ninidrina ácida. ....	91

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATR – Reflexão Total Atenuada

CE – Eletroforese Capilar

CMP - Caseínomacropéptido

CP – Componente Principal

CV – Validação Cruzada

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

DTA - Análise Térmica Diferencial

ESI-MS - Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray

ELISA - Prova Imunoabsorvente ligada à Enzima

ESCA - Espectroscopia Eletrônica para Análise Química (igual à XPS)

FAO - Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GMP – Glicomacropéptido

GP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência –Filtração em gel

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MIR – Espectroscopia no Infravermelho Médio

NIR – Espectroscopia no Infravermelho Próximo

PCA – Análise dos Componentes Principais

PLS – Mínimos Quadrados Parciais

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

PTA – Ácido Fosfotungstíco

RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RMSECV - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada

RMSEP - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

SIMCA – Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes

SVD – Decomposição em Valores Singulares

TCA – Ácido Tricloroacético

TGA – Análise Termogravimétrica

Tg - Temperatura de Transição Vítrea

UHT – Ultra Alta Temperatura

VL – Variável Latente

XPS – Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X

XRD – Difração de Raios X

$\nu$  - estiramento

$\delta$  - deformação

$\tau$ - torção

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 A MATÉRIA-PRIMA: LEITE.....	16
1.2 LEITE EM PÓ .....	20
1.2.1 Métodos de análise empregados no controle de qualidade do leite em pó.....	22
1.2.2 Métodos espectroscópicos aplicados na análise do leite .....	24
1.2.3 Mudanças físicas e químicas no armazenamento do leite em pó .....	26
1.3 LEITE CONDENSADO.....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3 ESPECTROSCOPIA RAMAN</b> .....	32
<b>4 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS</b> .....	39
4.1 RECONHECIMENTO DE PADRÕES .....	40
4.1.1 Análise de Componentes Principais .....	41
4.1.2 Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais .....	45
4.2 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA .....	46
4.2.1 Regressão Por Mínimos Quadrados Parciais.....	47
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
5.1 AMOSTRAS .....	51
5.2 AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ ADULTERADAS .....	52
5.3 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ.....	52
5.4 ESPECTROS RAMAN .....	53
5.5 PRÉ-TRATAMENTO DOS ESPECTROS.....	53
5.6 ANÁLISE MULTIVARIADA .....	54
5.7 MÉTODO DA NINIDRINA ÁCIDA.....	57
5.7.1 Reagentes:.....	57
5.7.2 Equipamentos e materiais:.....	57
5.7.3 Preparo das soluções.....	58
5.7.4 Curva de calibração .....	58
5.7.5 Preparo das amostras de leite adulteradas com soro.....	59
5.7.6 Procedimento .....	60
5.8 ANÁLISE TÉRMICA .....	61

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	62
6.1 ANÁLISE QUALITATIVA DOS DIFERENTES TIPOS DE LEITE .....	62
6.1.1 Espectros FT-Raman .....	62
6.1.2 Análise exploratória.....	66
6.2 ANÁLISE QUALITATIVA DO LEITE EM PÓ COM ADIÇÃO DE ADULTERANTES .....	70
6.2.1 Espectros FT-Raman .....	70
6.2.2 Análise de Componentes Principais .....	74
6.2.3 Análise discriminante com o método dos mínimos quadrados parciais.....	78
6.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE SORO E AMIDO EM AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ.....	84
6.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ ARMAZENADAS .....	92
6.5 AVALIAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS DIFERENTES MARCAS DE LEITE CONDENSADO BRASILEIRO .....	97
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	100
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102
<b>ANEXO</b> .....	109

## 1 INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade dos alimentos vem desde épocas imemoriais. Registros históricos relatam à existência do Código de Massu na China do século XIII a.C., o qual estabelecia sanções aos comerciantes que adulteravam seus produtos. Durante a Idade Média, na França, aquele que vendesse manteiga com pedra para aumentar o peso ou adicionasse água no leite era punido com castigos físicos (FILOMENO, 1991). No entanto, somente no século XIX foram estabelecidas as primeiras leis de caráter alimentar e estabelecidos os primeiros órgãos de fiscalização. A partir desse momento, a química dos alimentos começou a ganhar credibilidade e se iniciou o planejamento dos primeiros métodos de análise para avaliação das características dos alimentos (INMETRO, 2010).

Nos dias atuais, ainda existe uma grande preocupação com a qualidade dos alimentos. Os órgãos de fiscalização, hoje bem estabelecidos, criam regras para o fornecimento de alimentos seguros, que tenham valor nutricional agregado, assegurando ao consumidor um alimento com todas as suas propriedades nutricionais. Dessa forma, o sistema produtivo precisa manter um rigoroso controle de qualidade, para atender os critérios das agências fiscalizadoras e demanda de mercado.

A avaliação da qualidade dos alimentos e a determinação das suas propriedades físico-químicas abrangem as análises convencionais que envolvem testes físicos, químicos, volumetria e gravimetria. Os métodos que necessitam de pessoal e equipamentos especializados também são empregados na análise de alimentos, como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, espectrometria de massa, absorção atômica, entre outros. No entanto, estes métodos consomem muitos reagentes químicos e tempo de análise.

Portanto, a disponibilidade de métodos de análise eficientes e rápidos torna-se prioritária no controle de qualidade dos alimentos, principalmente nos casos em que as metodologias tradicionais mostram-se demoradas, dispendiosas e incompatíveis com as novas diretrizes ambientais (LEAL, *et al.*, 2008).

Desse modo, o emprego de técnicas alternativas, como a espectroscopia vibracional (MIR, NIR e Raman) juntamente com as ferramentas quimiométricas, têm obtido grandes avanços, com diversas aplicações na análise de alimentos oferecendo potenciais vantagens na avaliação da identidade e qualidade dos alimentos.

O leite e seus derivados são alimentos consumidos por todas as camadas da sociedade. Devido à grande demanda e as variações de preços que ocorrem com as flutuações sazonais, esses produtos são alvos de adulterações econômicas, que são praticadas com a adição de ingredientes não permitidos para reduzir os custos do produto final.

Nos últimos anos, novos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a qualidade do leite, principalmente, quanto à presença de fraude. A investigação da autenticidade do leite é extremamente importante, uma vez que, as adulterações que ocorrem comprometem seu valor nutricional. Logo, é importante identificar a introdução de produtos adulterados e de qualidade inferior no mercado, tanto por razões de ordem econômica e/ou de saúde pública.

Neste trabalho, a qualidade dos dois principais produtos de exportação brasileira na área de lácteos, o leite em pó e o leite condensado, foi avaliada empregando a técnica de espectroscopia Raman e ferramentas multivariadas. Os diferentes tipos de leite em pó, presentes no mercado nacional, foram analisados qualitativamente quanto à presença de seus principais nutrientes. As amostras de leite em pó foram adulteradas em laboratório com adição de soro e amido, que são frequentemente utilizados na adulteração de leite. Com base nas informações fornecidas pelos espectros Raman das amostras adulteradas, métodos qualitativos e quantitativos foram desenvolvidos para a identificação da fraude. As modificações físico-químicas que ocorrem com o armazenamento do leite em pó também foram monitoradas e identificadas com o uso da espectroscopia Raman e análise térmica. Os espectros Raman do leite condensado das marcas nacionais foram adquiridos para estabelecer parâmetros de identificação do produto.

## 1.1 A MATÉRIA-PRIMA: LEITE

O consumo de leite de origem animal pelos humanos vem desde épocas remotas, e aconteceu com a domesticação do gado que ocorreu na Revolução Neolítica. O primeiro registro histórico é uma peça datada de 3100 a.C. encontrada no Oriente Médio, conhecida como Friso dos Ordenhadores, esta peça retrata a ordenha do gado e a filtragem do leite (SIMIONATO, 2008). No Brasil, a primeira alusão ao leite é feita em 1552 pelos Jesuítas, numa carta enviada a Portugal.

Segundo as Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), atualmente 10% da população mundial vive da atividade leiteira. Esses dados mostram a importância econômica e social do leite. O Brasil ocupa hoje a sexta posição entre os países produtores de leite, sendo Minas Gerais o estado de maior produção, responsável por cerca de 30% da produção nacional (EMBRAPA, 2010).

Do ponto de vista legal, segundo o RIISPOA (BRASIL, 1997a), o leite é definido como o produto obtido pela ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Os leites obtidos de outros mamíferos são denominados segundo a procedência.

O leite é uma mistura homogênea, constituído basicamente por 87% de água, 3,28% de proteínas, 4,91% de carboidratos, 3,8% de gorduras, 0,6% de vitaminas e sais minerais, sendo seu valor energético igual a 67 kcal/100g (TORRES *et al.*, 2000). Devido essa riqueza de nutrientes, o leite é considerado um alimento completo para o homem e essencial para a vida diária, portanto, é amplamente comercializado e consumido pela população mundial.

A gordura é a componente mais variável do leite, sintetizada a partir dos ácidos graxos voláteis que são originados na fermentação ruminal de forrageiras, é encontrada no leite na forma de glóbulos esféricos, como ilustrado na Figura 1, com diâmetro médio de 3-4  $\mu\text{m}$ . A gordura é composta por uma mistura de triglicerídeos, que correspondem 97 a 99% dos lipídeos totais, nos quais estão distribuídos diferentes ácidos graxos. Os outros 3 a 1% são compostos por carotenóides, responsáveis pela coloração amarelada do leite, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), esteróis, como o colesterol, traços de ácidos graxos livres e os fosfolipídeos que são compostos por ácido fosfórico e base nitrogenada e são eficazes agentes emulsionantes.

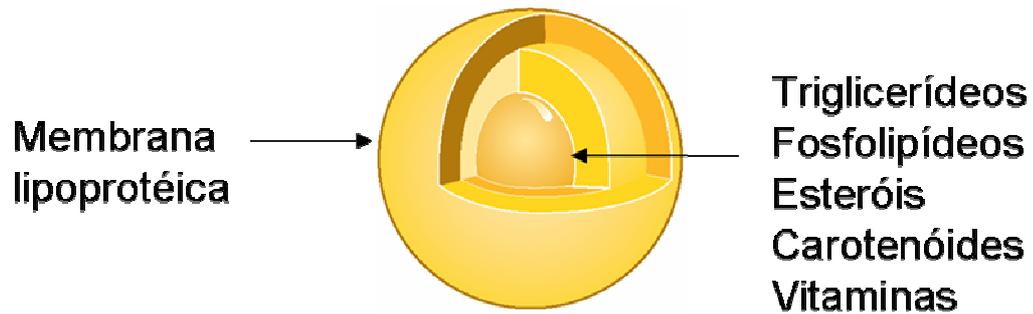


FIGURA 1: Modelo esquemático de um glóbulo de gordura do leite

A caseína é a principal proteína do leite, representa 80% das proteínas totais, as outras 20% são encontradas no soro e denominadas proteínas do soro. A caseína é uma fosfoproteína e apresenta-se na forma de micelas com 20 a 300 nm de diâmetro, são divididas em quatro grupos:  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\gamma$ -caseína e  $\kappa$ -caseína, e dentro de cada grupo ainda existe as variantes genéticas (SGARBIERI, 2005). As micelas de caseínas são formadas por submicelas, como mostrado na Figura 2, com diâmetro que varia de 10 a 20 nm, são mantidas por interações hidrofóbicas, as quais são responsáveis pela integridade das micelas de caseína.

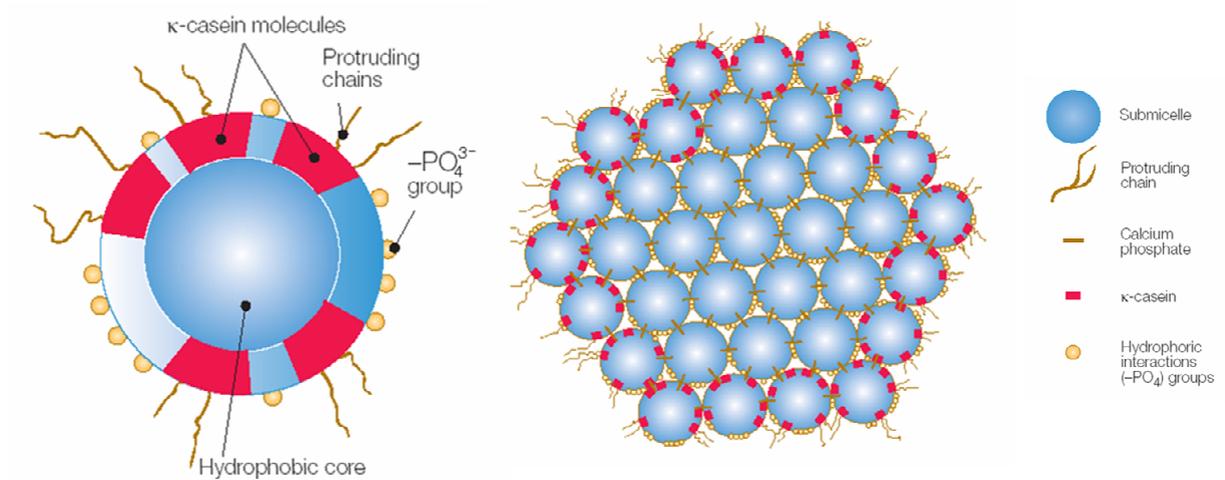


FIGURA 2: Modelo de uma micela de caseína segundo WASLTRA *et al.* (2001), extraído de LEMOS, *et al.* (2010).

A  $\kappa$ -caseína localizada na superfície das micelas, atua como estabilizadora da micela, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A  $\kappa$ -caseína é caracterizada como uma glicoproteína, por apresentar cerca de 6 a 10% de carboidrato em sua molécula, esses carboidratos são o ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), galactose e o N-acetilgalactosamina (SGARBIERI, 2005). A região de natureza apolar da  $\kappa$ -caseína orienta-se para o interior da micela, na qual interage com as caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  por meio de grupos hidrofóbicos. A região que contém o carboidrato, em virtude de sua polaridade, interage com

a água evitando, desta forma, a aglomeração da micela. A importância industrial da caseína está na fabricação de queijos.

As proteínas do soro representam cerca de 20% da proteína do leite. A  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina são as principais representantes desse grupo. As proteínas do soro são um grupo de proteínas não fosforiladas, as quais se mantêm em solução em pH abaixo de 4,6. Apresentam excepcionais propriedades funcionais de solubilidade, emulsificação, geleificação, formação de filmes, estabilidade e formação de espumas, sendo de grande aplicabilidade na indústria de alimentos (SGARBIERI, 2005).

A lactose, carboidrato característico do leite, é um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos galactose e glicose, unidos por ligação  $\beta(1-4)$ , é encontrada nas duas formas: alfa e beta. Estes dois isômeros estão representados na Figura 3.

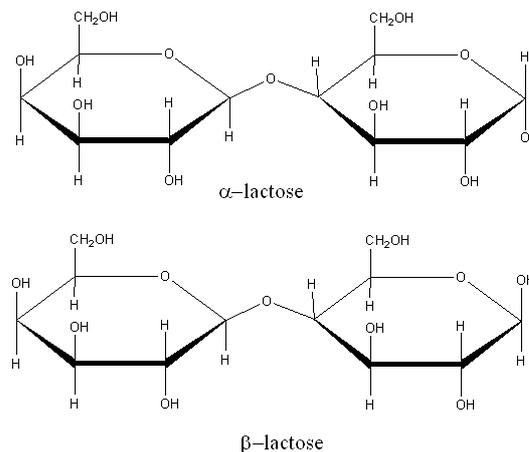


FIGURA 3: Estrutura química da lactose

O carbono anomérico da unidade de glicose está disponível para oxidação; portanto, a lactose é um dissacarídeo redutor. Tratamentos térmicos ocasionam reações de escurecimento a partir da lactose, especificamente a reação de Maillard, com diminuição do valor nutricional (SILVA, 1997). A lactose apresenta sabor pouco adocicado e baixa solubilidade em água, sua solubilidade média é de 20g/100g de água a 20°C, enquanto que, a solubilidade da glicose é de 107g/100g de água.

O leite contém teores notáveis de fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio, formando sais orgânicos e inorgânicos. A combinação desses sais com as proteínas é um dos fatores determinantes na estabilidade da caseína diante de diferentes agentes desnaturantes (SILVA, 1997).

Devido à grande demanda e as variações de preços que ocorrem com as flutuações sazonais, o leite e seus derivados são alvos de adulterações econômicas; essas adulterações

são praticadas com a adição de ingredientes não permitidos para reduzir os custos do produto final. O impacto econômico provocado por esse tipo de fraude é a concorrência desleal entre empresas, prejudicando empresas sérias, principalmente nos casos de licitações públicas, uma vez que o leite é largamente utilizado em programas sociais, na merenda escolar, na suplementação alimentar de gestantes e nutrízes, e na alimentação de convalescentes e idosos (Vargas, 2009).

No Brasil, uma das fraudes mais praticadas é a adição de soro de queijo ao leite. Um levantamento feito pelo MAPA, em 2003, mostrou que de 17 estados brasileiros analisados, 16 deram resultados positivos para soro de queijo em leite (Vargas, 2009), como apresentado na Figura 4.

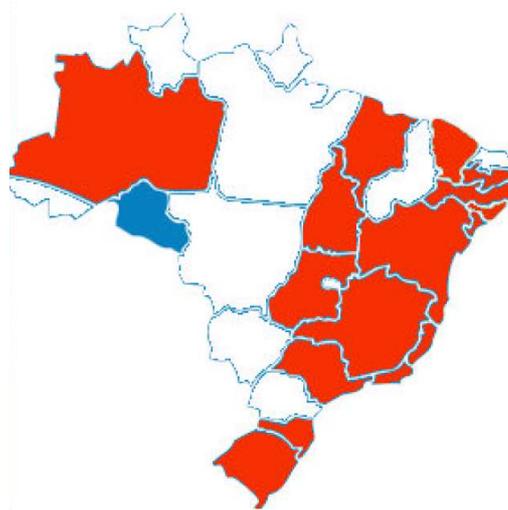


FIGURA 4: Estados brasileiros (em vermelho) que apresentaram resultado positivo para soro em amostras de leite, segundo o MAPA. Os estados em branco ainda não tinham sido analisados (VARGAS, 2009).

O soro é um subproduto da fabricação de queijos, composto por lactose (72g/100g), proteínas solúveis, vitaminas e sais minerais. O descarte de soro no ambiente é proibido pela legislação ambiental, por possuir efeito poluidor devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (ALESI, 2005). Uma alternativa para a industrialização do soro consiste na produção de ricota, bebidas lácteas, soro em pó, leite em pó modificado, ração animal e fertilizante. Devido ao baixo valor comercial, o soro torna-se um atrativo economicamente viável para adulteração do leite e seus derivados.

Outros adulterantes têm sido encontrados no leite, como maltose, sacarose, amido, maltodextrina, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio. A faixa de fraude no leite varia de 20 a 25%, onde o consumidor não percebe diferença no sabor, mas pode chegar até 60% (BORIN, *et al.*, 2006).

## 1.2 LEITE EM PÓ

O leite em pó é definido como o produto obtido pela desidratação do leite integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (BRASIL, 1997b).

Atualmente, o processo de secagem mais utilizado é o *spray-drying*. Este processo é realizado em duas etapas: a primeira etapa é a evaporação da água, até obtenção de um produto com 45 a 55% (m/m) de extrato seco. Na segunda etapa o concentrado é atomizado dentro de câmaras de secagem, secando-o até cerca de 2 a 5% de umidade.

Após a secagem do leite, ocorre a concentração de seus nutrientes. O leite em pó integral apresenta 38% (m/m) de lactose, o semi-desnatado 42% (m/m) e o leite desnatado possui 51% (m/m) de lactose. A quantidade de proteínas totais no leite em pó varia entre 24 a 26 % (m/m) para o integral, 26 a 33% (m/m) para o parcialmente desnatado e entre 33 a 35% (m/m) para o desnatado.

A classificação do leite é feita de acordo com o teor de gordura presente, recebendo a classificação de integral o leite em pó com teor de gordura maior ou igual a 26% (m/m); o leite que apresenta de 1,5 a 25% (m/m) de gordura é classificado como semi-desnatado; e para ser considerado desnatado o leite em pó deve conter um teor de gordura menor que 1,5% (m/m) (BRASIL, 1997b).

A principal finalidade de uma fábrica de secagem de leite é regular o fluxo da produção. Desta forma, volumes excedentes são desidratados nas épocas de safra, possibilitando a estocagem e posterior utilização do produto com qualidade preservada nos períodos de escassez para abastecer os mercados, regulando desta forma a política comercial do produto e o mercado consumidor.

O leite em pó ocupa lugar de destaque na alimentação da população brasileira, sua produção desempenha grande papel econômico no país. Atualmente, existe um investimento na produção do leite em pó, não só para abastecer o mercado interno, mas visando as exportações.

O Brasil produz cerca de 500 mil toneladas de leite em pó por ano, sendo 75 mil toneladas exportadas e 425 mil toneladas são destinadas ao consumo no país (EMBRAPA, 2010), somadas as importações de leite em pó dos países do Mercosul, como Argentina e Uruguai. A ampla comercialização do produto repercute em uma maior exigência da sua qualidade, tanto dos produtos nacionais como dos importados.

Para diminuir custos de produção e aumentar os lucros, o leite em pó está sujeito à adição de produtos não permitidos. Entre as fraudes mais comuns, destaca-se a adição de soro. Como discutido anteriormente, o soro é um subproduto da indústria de queijos, de baixo valor comercial, o que o torna um atrativo para adulteração. Apesar da adição de soro no leite em pó não acarretar problemas diretos à saúde do consumidor, esta prática vai contra o Código de Defesa do Consumidor, constituindo num ato enganoso, uma vez que a presença de determinado componente não está especificada no rótulo. Vale a pena ressaltar ainda, que as crianças são as maiores consumidoras de leite em pó e necessitam de todos os nutrientes presentes no leite para o desenvolvimento saudável.

Outro aditivo não permitido adicionado ao leite em pó é o amido, um polissacarídeo formado por resíduos de  $\alpha$ -D-glicose, composto por duas macromoléculas, a amilose e a amilopectina. A amilose (Figura 5A) é uma molécula essencialmente linear formada por resíduos de D-glicose ligadas em  $\alpha(1-4)$ ; a amilopectina (Figura 5B) consiste de uma molécula ramificada formada por unidades de D-glicose ligadas em  $\alpha(1-4)$  e com ligações  $\alpha(1-6)$  nos pontos de ramificação. O amido é adicionado para ajustar a densidade e a crioscopia do leite adulterado. Este produto é muito utilizado pelas indústrias alimentícias, sendo de baixo valor comercial e fácil acesso.

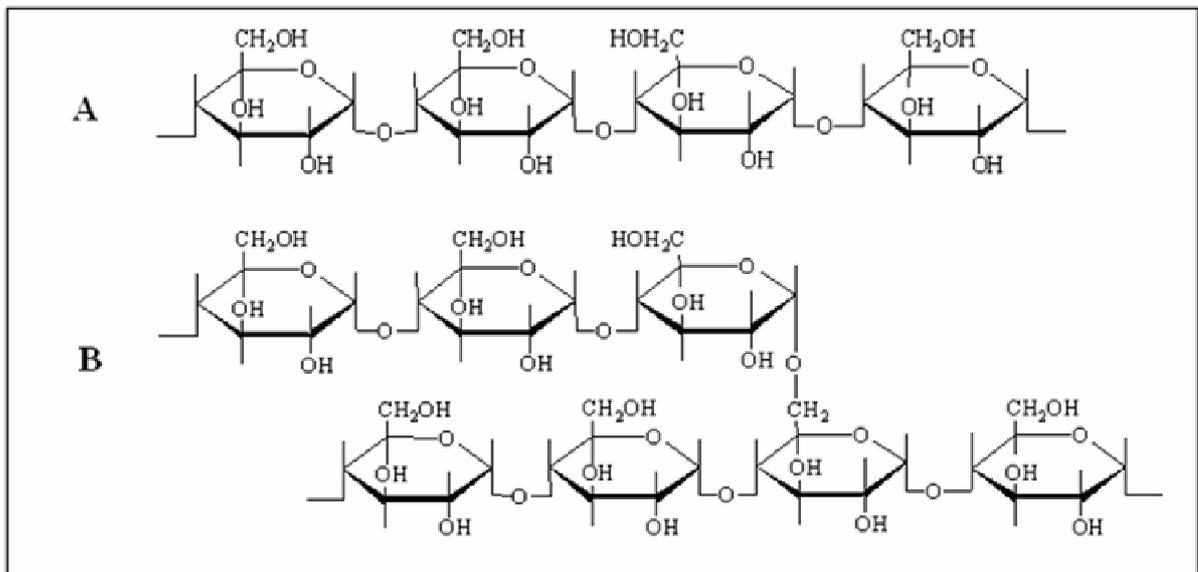


FIGURA 5: Estrutura molecular da amilose (A) e amilopectina (B), principais constituintes do amido.

### 1.2.1 Métodos de análise empregados no controle de qualidade do leite em pó

No Brasil, o MAPA é responsável pela investigação e fiscalização da qualidade do leite. Através de instruções normativas são definidas características mínimas de qualidade que o leite em pó deve apresentar para ser destinado ao consumo humano.

Os métodos de análise usados pelos órgãos de fiscalização monitoram desde os parâmetros nutricionais (proteínas, lipídeos, carboidratos e minerais) através dos métodos físico-químicos tradicionais. Até a investigação de produtos não permitidos, como por exemplo, soro e amido.

A adição de soro de queijo no leite é uma prática antiga, segundo Fukuda (1994), existem relatos na literatura de métodos para identificação de soro no leite desde 1959. A maioria dos métodos descritos é baseado na pesquisa do glicomacropéptido (GMP) da  $\kappa$ -caseína, componente específico do soro e que deve estar ausente no leite. Esse componente é liberado para o soro durante a fabricação de queijos. A produção de queijos é feita pela coagulação enzimática, na qual é empregada a enzima quimosina que hidrolisa a ligação peptídica 105-106 da  $\kappa$ -caseína, como mostrado na Figura 6, gerando dois novos peptídeos, a para- $\kappa$ -caseína, representada pelo resíduo de 1-105 da  $\kappa$ -caseína que fica retido no coágulo de caseína e constitui a massa do queijo. E o outro resíduo formado (fragmento 106-169 da  $\kappa$ -caseína) é o glicomacropéptido (GMP), a parte polar da  $\kappa$ -caseína que vai para o soro. A  $\kappa$ -caseína é heterogênea, apresenta 2 variantes genéticas A e B, onde há a possibilidade de se obter fragmentos com ausência de carboidratos, dessa forma o peptídeo terminal também é chamado de caseinomacropéptido (CMP) (GUINEE, WILKINSON, 1992, citado por FUKUDA, *et al.*, 2004).

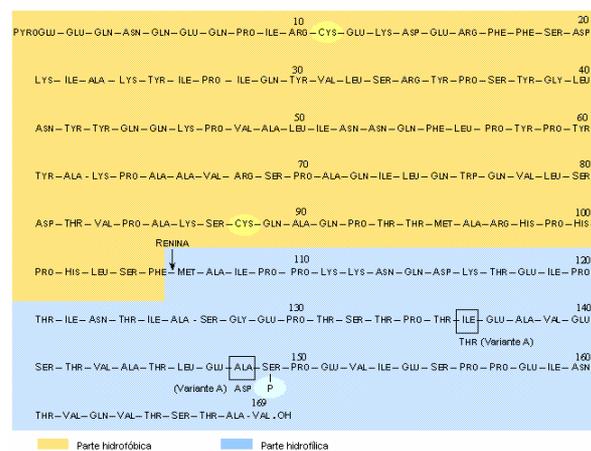


FIGURA 6: Estrutura primária da  $\kappa$ -caseína mostrando o ponto de clivagem da renina, no processo de coagulação, segundo SGARBIERI (1996). Extraído de LEMOS, *et al.* (2010).

A identificação da adição de soro no leite é feita pela determinação do CMP. No entanto, a ação das enzimas proteolíticas de bactérias psicotróficas pode originar a hidrólise da caseína, causando a liberação do CMP. Devido a não especificidade das enzimas proteolíticas, um outro componente pode ser formado, o pseudo-CMP, diferenciando do CMP por apresentar um aminoácido a menos, formado pelo resíduo 107-169 da  $\kappa$ -caseína (RECIO, *et al.*, 2000).

Considerando esses aspectos, a presença de CMP no leite em pó, não implica necessariamente na adulteração com soro. A verificação da presença de CMP serve como um indicador da qualidade do leite comercial e permite avaliar a qualidade microbiológica do leite de partida.

Dessa forma, o MAPA estabelece critérios de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó em relação ao teor de CMP presente. O leite destinado ao abastecimento direto pode conter até 30 mg/L de CMP. Se o índice estiver entre 30 e 75 mg/L, o produto deve ser destinado à produção de derivados lácteos e acima de 75 mg/L este deve ser remetido à alimentação animal ou à indústria química em geral (BRASIL, 2006).

Vários métodos de identificação de soro no leite estão descritos na literatura. A maioria dos métodos é baseada na determinação do CMP e a principal técnica empregada é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Olieman e Van Den Bedem (1983) desenvolveram um método para quantificação de sólidos de soro de queijo em leite em pó desnatado, os autores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência com filtração em gel (GP-HPLC) e detecção no UV em 205 nm. Em outro trabalho, Olieman e Van Riel (1989) acompanharam a proteólise do leite provocada pelas bactérias psicotróficas utilizando RP-HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa) e verificaram que a proteólise causa um aumento do teor de CMP no leite. Recio e colaboradores (2000) estudaram os principais peptídeos provenientes da ação de bactérias psicotróficas sobre a  $\kappa$ -caseína em leite UHT, utilizaram RP-HPLC e eletroforese capilar (CE) como métodos de separação e espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) para identificação. Segundo os autores, as enzimas proteolíticas hidrolisam a  $\kappa$ -caseína e levam a formação do CMP e a presença deste composto não pode ser considerado exclusivo indicador de adulteração de soro em leite.

Em adição, métodos baseados em testes imunoenzimáticos, como ELISA, espectrometria de massa e biosensores têm fornecido bons resultados comparados com os métodos cromatográficos. Bremer e co-autores (2008) desenvolveram um método de inibição imunoenzimático baseado em um anticorpo monoclonal que reconhece o soro bovino, o

método apresentou alta repetibilidade e confiabilidade quando comparado com os métodos cromatográficos impostos pela legislação. As vantagens desse método estão na análise rápida, preparações de amostra simples e curto de tempo de ensaio. Martin-Hernández e colaboradores (2009) desenvolveram um teste de triagem imunocromatográfico de fluxo lateral, onde obteve resultados confiáveis para amostras de leite contendo acima de 4% (m/m) de soro.

No Brasil, dois métodos são utilizados para identificação e quantificação do CMP no leite: a análise quantitativa é feita por GP-HPLC. A separação dos peptídeos do leite ocorre em coluna cromatográfica baseada na exclusão molecular; e a detecção do CMP é feita por espectrofotometria no UV em 205 nm. O método qualitativo empregado consiste na determinação do ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), um componente específico do GMP; o ácido siálico é identificado através da reação com o p-dimetilaminobenzaldeído com o desenvolvimento de um cromóforo púrpura (BRASIL, 1991).

Em 2003, o método espectrofotométrico da ninidrina ácida, adaptado por Fukuda (1994), foi aprovado como método oficial para determinação quantitativa do ácido siálico (BRASIL, 2003). Fukuda e co-autores (2004) correlacionaram o método da ninidrina ácida com o método oficial de cromatografia. Os resultados encontrados foram satisfatórios, levando os autores a considerar a técnica da ninidrina ácida como metodologia de *screening* ou até mesmo de substituição da cromatografia líquida de alta eficiência, uma vez que tal metodologia mostra-se demorada e exige pessoas qualificadas.

### 1.2.2 Métodos espectroscópicos aplicados na análise do leite

Nas últimas décadas, os métodos espectroscópicos, juntamente com as ferramentas quimiométricas, têm sido aplicados para avaliar a qualidade de produtos lácteos como uma alternativa para substituir os procedimentos de referência. Inon e colaboradores (2004) avaliaram os principais componentes (carboidratos, lipídeos e proteínas) de diferentes tipos de leite utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de ATR e calibração multivariada para análise quantitativa. Borin e co-autores (2006) propuseram um método de quantificação de soro, amido e sacarose no leite em pó empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), calibração multivariada e

técnicas de inteligência artificial. Karoui e De Baerdemaeker (2007) em um trabalho de revisão discutiram o potencial de técnicas destrutíveis e não-destrutíveis, como espectroscopia no infravermelho, MIR e NIR, fluorescência e ressonância magnética nuclear acopladas com ferramentas quimiométricas para avaliação da qualidade e autenticidade de produtos lácteos. O emprego da técnica de espectroscopia no infravermelho com o auxílio de ferramentas quimiométricas para quantificação dos principais nutrientes das amostras de leite foi mostrado em vários trabalhos de Wu e colaboradores (WU, FENG e HE, 2007; 2008; WU, HE e FENG, 2008; WU *et al.*, 2008). Todos estes trabalhos apresentaram resultados satisfatórios na avaliação dos principais componentes do leite.

Como mostrado, tanto a espectroscopia no infravermelho médio e no próximo tem sido extensivamente aplicada no estudo do leite e seus constituintes. No entanto, apesar das inúmeras aplicações da espectroscopia Raman, são poucos os trabalhos sobre sua utilização na avaliação da qualidade do leite em pó. Moros e colaboradores (2007) avaliaram os parâmetros nutricionais de fórmulas infantis empregando espectroscopia Raman e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). McGoverin e co-autores (2010) propuseram o uso da espectroscopia Raman e calibração multivariada (PLS) para determinação de lipídeos e proteínas no leite em pó, os resultados obtidos por esses autores foram satisfatórios quando comparados com os resultados de espectroscopia no infravermelho descritos na literatura. Após o incidente dos leites contaminados com melamina na China em 2008, Cheng e colaboradores (2010) propuseram o uso da espectroscopia Raman como um método alternativo na identificação e quantificação rápida da melamina no leite.

A espectroscopia Raman, oferece algumas vantagens para a caracterização de produtos lácteos em relação à espectroscopia no infravermelho: a água não interfere nos espectros, é uma técnica versátil, rápida, determina mais de um componente ao mesmo tempo, as amostras não precisam passar por um pré-tratamento, não usa reagente, não gera subprodutos tóxicos. Além de ser uma técnica não destrutiva, adequada para processos *on-line*. Desta forma, a espectroscopia Raman oferece oportunidades analíticas para muitas áreas de produção e controle de qualidade, principalmente a de matrizes lácteas.

### 1.2.3 Mudanças físicas e químicas no armazenamento do leite em pó

Com o aumento da produção de leite, novos métodos de conservação foram desenvolvidos para prolongar a vida útil do produto. Um dos métodos mais utilizados é a desidratação do leite para a fabricação de leite em pó. A secagem do leite facilita o armazenamento e diminui custos com transportes, uma vez que não necessita de refrigeração. Quando armazenado em condições adequadas, o leite em pó integral tem uma vida útil de 12 meses e o leite desnatado de até dois anos.

O prazo de validade do leite em pó é geralmente estabelecido para garantir a segurança microbiológica e para manter aceitáveis as características sensoriais. Apesar do leite em pó ser microbiologicamente estável, mudanças físicas e químicas, como a cristalização da lactose, aglutinação de partículas, oxidação de gordura, reação de Maillard e reações enzimáticas podem ocorrer durante o armazenamento e estas modificam as propriedades físico-químicas e funcionais do produto (THOMAS, *et al.*, 2004a).

A literatura descreve a mudança de fase da lactose como a principal modificação física do leite em pó, e precursora de outras mudanças durante o período de armazenamento do produto. A lactose é o componente mais abundante do leite, após a remoção da água a lactose encontra-se no estado amorfo; o qual é altamente higroscópico, absorvendo facilmente a água do ambiente. O aumento da umidade relativa, da temperatura e sob escalas de tempo relevante são os fatores predominantes envolvidos na cristalização da lactose, e esta afeta diretamente as propriedades funcionais do leite em pó e outros produtos secos que contêm esse dissacarídeo. A cristalização ocorre acima da temperatura de transição vítrea (THOMSEN *et al.*, 2005a).

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) é definida como a temperatura em que ocorre a transição de um estado sólido vítreo para um estado semi-líquido (gomoso). Abaixo da temperatura de transição vítrea, um material amorfo apresenta alta viscosidade e limitada mobilidade molecular. Na temperatura de transição vítrea e acima dela, a viscosidade diminui drasticamente e o resultado é um aumento significativo na mobilidade molecular dos componentes do sistema, levando a uma série de transformações estruturais, como aderência, colapso e cristalização durante o período de processamento e armazenamento do material.

Vários trabalhos na literatura (THOMSEN *et al.*, 2005, OZKAN *et al.*, 2002; BAECHLER, *et al.*, 2005) mostram que amostras de leite em pó estocadas em umidade relativa alta tiveram seus valores de temperatura de transição vítrea diminuídas e

consequentemente a cristalização da lactose ocorreu em um tempo menor comparado com as amostras estocadas em ambiente com menor umidade relativa. A maioria dos trabalhos citados acima investiga o efeito das condições de armazenamento sobre a composição e propriedades funcionais do leite em pó.

Os efeitos das pressões de vapor relativas e o tempo de estocagem na cristalização da lactose foram estudados por Haque e Roos (2005), as amostras foram obtidas pelos processos de *spray-dried* e *freeze-dried*. Usando difração de raio X, a taxa de cristalização foi determinada em diferentes pressões de vapor relativas mostrando o aumento da taxa de cristalização com o aumento da pressão de vapor.

A composição tem grande influência nas mudanças físico-químicas do leite em pó durante seu armazenamento. Um atraso na temperatura de cristalização da lactose pode ser devido à presença de proteínas do leite. As proteínas são parcialmente hidrofílicas e tem capacidade de hidratação, as proteínas presentes no leite podem atrasar a cristalização da lactose por ocorrer uma competição pela água. O leite em pó integral apresenta tendência de absorver menos água que o leite desnatado. Pelo fato das gorduras serem hidrofóbicas, cria-se uma barreira que limita a difusão de moléculas hidrofílicas e o crescimento de cristais de lactose (THOMAS, *et al.*, 2004a). Como uma baixa quantidade de água é absorvida, a presença de gordura evita a diminuição da Tg abaixo da temperatura de estocagem e consequentemente à cristalização da lactose.

Fitzpatrick e colaboradores (2007b) investigaram a influência da composição e as condições de armazenamento na viscosidade do leite em pó e concluíram que o conteúdo de gordura, lactose amorfa e umidade alta afetam as propriedades de aderência do leite em pó. As amostras que apresentaram maior teor de lactose amorfa foram mais sensíveis à absorção de umidade.

Hogan e O'Callaghan (2010) e Silalalai e Roos (2010) estudaram, separadamente, o comportamento do leite em pó com diferentes razões de proteína/lactose em relação a sua viscosidade e mostraram que o aumento da proporção de proteína diminui a susceptibilidade dos pós a aderência devido a uma modificação na temperatura de transição vítrea.

Thomas e co-autores (2004b) estudaram a interação da lactose e  $\beta$ -lactoglobulina, os dois principais constituintes do soro, em diferentes proporções. Investigaram a influência da quantidade de  $\beta$ -lactoglobulina na cristalização da lactose durante o armazenamento dessas misturas em diferentes atividades de água. O monitoramento foi feito através de DSC e microscopia eletrônica de varredura, os autores concluíram que a interação da lactose com a  $\beta$ -lactoglobulina estabiliza o soro atrasando a cristalização da lactose e sugerem que alimentos

ricos em lactose, podem ter  $\beta$ -lactoglobulina adicionada antes do *spray-dried* para melhorar sua estabilidade.

Thomsen e colaboradores (2005, 2005a, 2005b) publicaram três estudos sobre as mudanças no leite em pó integral, como cristalização da lactose, oxidação de lipídeos, reações de escurecimento em função da temperatura, atividade de água e formação de radicais. Utilizaram como técnica principal a espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS ou ESCA), entre outras. Os autores concluíram que o processo de cristalização da lactose e os produtos das reações de escurecimento estão fortemente associados, mas não encontraram uma relação direta entre a oxidação de lipídeos e esses processos.

A presença de oxigênio atmosférico é responsável por reações de oxidação indesejáveis durante o armazenamento do leite em pó, reduzindo sua vida útil. Os lipídeos insaturados do leite reagem com o oxigênio molecular e formam hidroperóxidos, esses compostos sofrem reações originando aldeídos e cetonas os quais são responsáveis pelos odores e sabores indesejáveis ao leite em pó (ROMEU-NADAL, *et al.*, 2007). Um estudo utilizando XPS, MEV e XRD acompanhou as mudanças na superfície do leite em pó antes e após o armazenamento em temperatura ambiente por 6 meses, o estudo mostrou através de MEV e XRD que não houve a cristalização da lactose durante o período que as amostras ficaram armazenadas, portanto, a superfície do pó não foi significativamente alterada. Porém, os autores observaram a liberação de triglicérides encapsulados para a superfície (KIM, *et al.*, 2009). Um segundo estudo empregando XPS mostrou que os lipídeos apresentam maior tendência em migrar para a superfície do que as proteínas e a lactose (GAIANI, *et al.*, 2009), tornando-se mais exposto ao oxigênio atmosférico. Outro trabalho utilizando MEV mostra que a cristalização da lactose é acompanhada da liberação de lipídeos para a superfície do pó (BAECHLER, *et al.*, 2005), deste modo, a lactose cristalina envolve menos a gordura e esta por sua vez fica com maior contato com o oxigênio atmosférico e mais disponível para a oxidação.

Como observado, vários trabalhos estão descritos na literatura no estudo das mudanças físico-químicas no armazenamento do leite em pó e derivados. Diferentes técnicas são aplicadas, desde teste de sorção, DSC, XPS, MEV, XDR até espectroscopia vibracional, a fim de compreender as mudanças ocorridas em função de fatores como temperatura, umidade relativa e composição.

O emprego da espectroscopia Raman no monitoramento e compreensão das alterações físico-química que ocorrem no armazenamento do leite não foi encontrado na literatura. Norgaard e colaboradores (2005) utilizaram a espectroscopia Raman e NIR juntamente com

ferramentas quimiométricas para quantificar o teor de lactose em soro em pó; outros trabalhos relatam o uso da espectroscopia Raman no estudo da cristalização da lactose, principalmente no uso desse componente em fármacos, sem ênfase na matriz leite (ISLAN e LANGRISH, 2010; MURPHY, *et al.*, 2005; KIRK *et al.*, 2007, TAYLOR e ZOGRAFI, 1998).

Uma vez que a estabilidade é uma característica desejável dos alimentos, as modificações químicas e físicas que ocorrem no leite em pó com o tempo de armazenamento foram acompanhadas neste trabalho por espectroscopia Raman e análise térmica.

### 1.3 LEITE CONDENSADO

O leite condensado, outro produto lácteo estudado, é obtido pela eliminação parcial da água do leite com adição de sacarose, por meio da evaporação a vácuo. São fases de fabricação do leite condensado: seleção do leite, padronização dos teores de gordura e de sólidos totais, pré-aquecimento, adição de xarope (solução de sacarose ou glicose), condensação, refrigeração, cristalização e enlatamento (SILVA, *et al.*, 2008). No Brasil não existe um regulamento técnico de identidades e qualidade do leite condensado, ficando o produto sujeito as várias alterações em sua composição. Com isso, a padronização do produto é feita de acordo com parâmetros americanos ou britânicos, na Tabela 1 são apresentadas as composições dos produtos americanos e britânicos.

TABELA 1: Composição do leite condensado (LEMOS, *et al.*, 2010)

<b>Componentes</b>	<b>Americano</b>	<b>Britânico</b>
<b>Gordura (%)</b>	8	9
<b>Lactose (%)</b>	10,3	11,4
<b>Sacarose (%)</b>	45	43,5
<b>Água (%)</b>	27	25,5

O leite condensado deve satisfazer às seguintes especificações: apresentar características sensoriais próprias; apresentar acidez em ácido láctico, entre 0,08 e 0,16%, quando na diluição de uma parte do produto para 2,5 (duas e meia) partes de água; apresentar na reconstituição, em volume, uma parte do leite para 2,25 (duas e vinte e cinco) partes de água, teor de gordura que atinja o limite padrão de leite de consumo correspondente, tendo 28% (vinte e oito por cento), no mínimo, de extrato seco total do leite e, no máximo, 45% (quarenta e cinco por cento) de açúcar, excluída a lactose (BRASIL, 1952).

O leite condensado, o leite em pó e os queijos representam cerca de 90% das exportações do setor lácteo. Isso repercute em maior exigência da qualidade do produto, não só com os produtos exportados, mas também com o mercado interno, grande consumidor de lácteos. Deste modo, se faz necessário à implantação de métodos de análise rápidos e eficientes para o leite e seus derivados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade da espectroscopia Raman com o auxílio das ferramentas quimiométricas na avaliação da qualidade do leite em pó e do leite condensado comercializados no Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterização dos principais componentes do leite em pó utilizando a espectroscopia Raman.

Além disto, visa o desenvolvimento de metodologias de identificação e quantificação de soro e amido, utilizados como adulterantes, em amostras de leite em pó empregando espectroscopia Raman e análise multivariada.

Outra proposta é a avaliação do perfil espectroscópico do leite em pó em relação ao tempo e condições de armazenamento, usando a espectroscopia FT-Raman.

Por fim, pretende-se propor parâmetros de identidade e qualidade para caracterização de amostras de leite condensado de marcas nacionais, via espectroscopia Raman.

### 3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A interação da radiação eletromagnética com os elétrons e núcleos das moléculas dão origem a uma série de técnicas espectroscópicas, baseadas na absorção, emissão e nos processos de espalhamento. Estas técnicas oferecem a possibilidade de obter informações sobre estrutura molecular, níveis de energia, ligações químicas, identificação e quantificação de elementos químicos e moléculas.

A espectroscopia Raman, técnica empregada no presente trabalho, baseia-se no espalhamento inelástico da radiação eletromagnética monocromática que interage com as moléculas, onde a radiação é espalhada com uma frequência diferente da incidida. Essa variação de frequência corresponde à diferença de energia entre dois estados vibracionais da molécula. Embora, as informações obtidas no espectro Raman sejam as diferenças de energia entre os estados vibracionais, o espectro Raman não coincide com o espectro no infravermelho. Uma vez que, os fenômenos físicos envolvidos são diferentes, espera-se que as regras de seleção também sejam, por isso, a espectroscopia no Infravermelho e a espectroscopia Raman são chamadas de técnicas complementares.

O efeito Raman foi demonstrado experimentalmente pela primeira vez em 1928, pelo cientista indiano Sir Chandrasekhara Venkata Raman, após ter sido previsto por Smekal em 1923 (SALA, 2008). A importância da descoberta de Raman foi reconhecida em 1930 quando foi agraciado com o prêmio Nobel de Física.

A descoberta do efeito Compton em 1923, levou Raman a considerar a possibilidade de um fenômeno similar, o espalhamento inelástico da radiação para a região visível do espectro eletromagnético. Raman imaginou que seria possível a radiação visível interagir com a matéria de modo que houvesse variação na energia do fóton incidente. Raman utilizou a luz solar, um espectrômetro de bolso e o olho humano como detector, a luz solar era focalizada através de uma série de lentes em um recipiente contendo um líquido transparente purificado, um filtro azul era colocado antes da amostra para deixar passar apenas a radiação de maior energia do espectro. Observando a amostra em uma direção perpendicular à direção de iluminação, observou-se um traço luminoso devido ao espalhamento da radiação, estava assim descoberto um novo tipo de fenômeno, o efeito Raman (FARIA, *et al*, 1997).

O espectro Raman é devido ao espalhamento inelástico de uma radiação monocromática que incide na molécula e o sinal está relacionado ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação. O efeito Raman envolve a interação do

campo elétrico da radiação eletromagnética incidente (equação 1) com a distribuição da nuvem eletrônica da molécula:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (1)$$

onde  $E_0$  é a amplitude vibracional e  $\nu_0$  é a frequência da radiação incidente (frequência do laser). O campo elétrico oscilante induz na molécula um momento de dipolo oscilante  $P$  (equação 2), cuja frequência será a mesma do campo elétrico externo:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2)$$

onde  $\alpha$  é a constante de proporcionalidade chamada de polarizabilidade. A polarizabilidade pode ser entendida como uma medida da facilidade de deformação da nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico.

Levando em conta a vibração molecular, os movimentos nucleares irão induzir flutuações na polarizabilidade com frequências que correspondem aos vários modos normais de vibração, ou seja, se a molécula vibra com frequência  $\nu_m$ , o deslocamento do núcleo para uma molécula diatômica pode ser descrito de acordo com a equação 3:

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_m t \quad (3)$$

Na equação anterior  $\nu_m$  é a frequência vibracional da coordenada  $q$ . A polarizabilidade pode ser considerada como uma função linear de  $q$  e expandida numa série:

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 q + \dots \quad (4)$$

O primeiro termo da equação 4 é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e o segundo termo é a variação da polarizabilidade com a coordenada  $q$  em relação à posição de equilíbrio.

Combinando a equação 2, 3 e 4 obtemos:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left( \frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 q_0 E_0 \left\{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \right\} \quad (5)$$

De acordo com a previsão clássica, o primeiro termo contém somente a frequência da radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico), após a interação do fóton com a molécula, esta volta ao mesmo nível de energia inicial e o fóton é espalhado sem modificação de frequência. Somente no segundo termo aparece o espalhamento Raman com frequências  $\nu_0 + \nu_v$  (espalhamento anti-Stokes) nesse caso o fóton encontra a molécula já num estado excitado e após a interação a molécula decai para o estado fundamental, essa diferença de energia é cedida ao fóton que é espalhado com energia  $h\nu_0 + e_v$ . No espalhamento Stokes de frequência  $\nu_0 - \nu_v$ , a molécula no estado fundamental sofre colisão com o fóton de energia  $h\nu_0$ , passa para um estado intermediário (virtual), pois não corresponde a nenhum estado estacionário da molécula, o estado virtual é um auto-estado do sistema molécula-radiação. Em seguida a molécula decai para um estado vibracional excitado de energia  $e_v$ ; o fóton espalhado  $h\nu_0 - e_v$ , tem energia menor que o incidente. Os espalhamentos elástico e inelástico (Stokes e anti-Stokes) podem ser representados esquematicamente de acordo com a Figura 7.

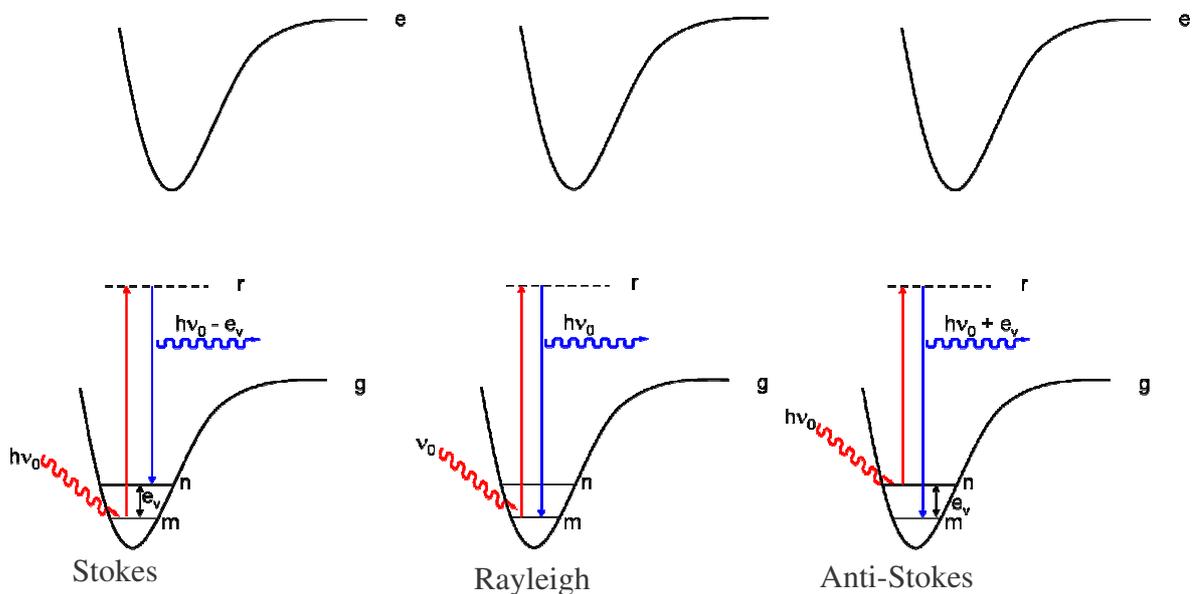


FIGURA 7: Ilustração esquemática dos espalhamentos Raman e Rayleigh.

Para frequências baixas as intensidades Stokes e anti-Stokes são comparáveis, mas para frequências mais altas é difícil observar as bandas anti-Stokes, uma vez que, a população do estado excitado que origina as bandas anti-Stokes, é muito menor que a população do

estado fundamental para energias menores. Essa relação pode ser mostrada com a função de distribuição de Boltzmann, que comprova que as bandas anti-Stokes apresentam menor intensidade do que as bandas Stokes em temperaturas medianas. Isto é verificado experimentalmente e a relação entre as intensidades anti-Stokes (AS) e Stokes (S) é dada por:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left( \frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right) \exp\left( -\frac{e_v}{kT} \right). \quad (6)$$

Na transição entre os estados vibracionais m e n devem ser consideradas as integrais das componentes  $(\alpha_{ij})_{mn}$  em relação ao modo vibracional. Para que a transição vibracional Raman seja permitida, é necessário que uma das componentes do momento de transição (seis componentes no total) seja diferente de zero:

$$\left( \alpha_{ij} \right)_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \quad (7)$$

Combinando a equação anterior com a equação 4, obtém-se:

$$\left( \alpha_{ij} \right)_{mn} = \left( \alpha_{ij} \right)_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left( \frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau \quad (8)$$

Para ser observado o efeito de espalhamento Raman é necessário que pelo menos uma das integrais da equação 8 seja diferente de zero. O primeiro termo da equação é igual a zero, devido a ortogonalidade entre  $\psi_m$  e  $\psi_n$ . Para o segundo termo ser diferente de zero é necessário atender a duas condições. A primeira é:

$$\left( \frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 \neq 0 \quad (9)$$

ou seja, é necessário que ocorra uma variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada q em relação a sua posição de equilíbrio. A polarizabilidade é

uma propriedade tensorial (estabelece uma relação linear entre vetores P e E) que determina a atividade dos modos vibracionais na espectroscopia Raman.

A segunda condição é:

$$\int \psi_m q \psi_n d\tau \neq 0 \quad (10)$$

Para que a segunda condição seja satisfeita é necessário que o produto  $\psi_m q \psi_n$  seja uma função par, como q é uma função ímpar, as duas funções de onda devem ter diferentes paridade. Nestas condições, o modo vibracional é ativo no espectro Raman (SALA, 2008).

O espectro Raman mostra um conjunto de transições vibracionais permitidas de uma molécula. O número de bandas, as frequências e a intensidade relativa dessas bandas estão associados com o modo normal de vibração da ligação química. A intensidade das bandas Raman depende da probabilidade de transição, ou seja, do quadrado do tensor de polarizabilidade e da quarta potência da frequência da radiação espalhada:

$$I_{m,n} = \left( \frac{16\pi^2}{9c^4} \right) I_0 \nu^4 \sum_i \sum_j |(\alpha_{i,j})|^2 \quad (11)$$

Em 1934 foi publicada por G. Placzek a teoria da polarizabilidade do efeito Raman. No tratamento de Placzek a intensidade Raman depende apenas da polarizabilidade do estado eletrônico fundamental, nessa aproximação a energia do fóton de excitação é muito menor que a energia mínima para a transição eletrônica da molécula. Esta condição é satisfeita trabalhando, por exemplo, com excitação no infravermelho próximo ou visível. Desta forma, a intensidade Raman passa a ser uma propriedade apenas do estado eletrônico fundamental. Este tipo de situação corresponde ao efeito Raman normal ou ordinário (OLIVEIRA, 1991). Nesse caso, a polarizabilidade de transição  $\alpha_{m,n}$ , pode ser expressa por:

$$\alpha_{m,n} = \frac{1}{h} \sum_r \left[ \frac{\mu_{nr} \mu_{rm}}{\nu_{rm} - \nu_0} + \frac{\mu_{nr} \mu_{rm}}{\nu_{rm} + \nu_0} \right] \quad (12)$$

Na equação acima, h é a constante de Planck, r descreve um conjunto de estados que pertence a molécula não perturbada,  $\nu_{rm}$  e  $\nu_m$  correspondem as frequências dos estados denotados por

m e n,  $\nu_0$  é a frequência da radiação incidente,  $\mu_{nr}$  e  $\mu_{rm}$  são os momentos de transição. O numerador do primeiro termo entre colchetes corresponde à passagem do estado inicial m para um estado intermediário r, e deste para o estado final n.

Quando a energia do fóton de excitação é próximo da energia de uma transição permitida, o denominador do primeiro termo diminui e o termo aumenta, causando grande aumento de  $\alpha_{m,n}$ , e como consequência, produz uma intensificação do sinal Raman. Esse efeito é conhecido como Raman ressonante. Para o entendimento dessas mudanças torna-se necessário a utilização do formalismo vibrônico para o efeito Raman introduzido por A. C. Albrecht.

Em condições de ressonância, os momentos de transição  $\mu_{n,r}$  e  $\mu_{r,m}$  são descritos utilizando a aproximação de Born-Oppenheimer, onde é feita a separação das funções de onda em vibracionais e eletrônicas. Neste ponto, fica clara a dependência da polarizabilidade de transição e, conseqüentemente da intensidade Raman, com a curva da energia potencial dos estados eletrônicos excitados. A contribuição dos estados excitados é representada pela soma de vários termos, conhecidos como A, B, C e D. A polarizabilidade de transição pode ser representada pela soma de cada um destes termos:

$$\alpha_{mn} = A + B + C + D \quad (13)$$

O termo mais importante é o termo A, também conhecido como termo de Franck-Condon, este termo é responsável pelas intensidades altas dos modos totalmente simétricos (CLARK; DINES, 1986).

No efeito Raman ressonante, a polarizabilidade de transição passa a depender de uma única transição eletrônica (transição permitida), ou seja, de um único estado eletrônico excitado, com isso é possível obter informações sobre os estados eletrônicos da molécula da mesma forma que na espectroscopia eletrônica de absorção.

Outro efeito de intensificação do sinal Raman é o efeito SERS ou espalhamento Raman intensificado pela superfície, que apresenta grande interesse no estudo de espécies adsorvidas em superfícies metálicas, pois apresenta intensificação do sinal da ordem de  $10^6$  vezes. Um trabalho de revisão sobre o assunto pode ser encontrado em Moskovits (2005).

Para obtenção dos espectros Raman foram utilizadas até 1950 lâmpadas de vapor de mercúrio (435 nm) para obtenção da radiação excitante. No entanto, essas lâmpadas emitiam uma série de linhas indesejadas, fazendo-se necessário o uso de filtros para isolar as linhas de

interesse, entretanto, vários compostos absorviam essas linhas ou eram decompostos fotoquimicamente, impedindo a obtenção dos espectros Raman de alguns compostos. Os espectros eram registrados em chapas fotográficas (SALA, 2008).

Os avanços na instrumentação facilitaram a tarefa de obter um espectro Raman, como exemplo, as novas fontes de radiação monocromática, no início eram utilizadas lâmpadas de mercúrio e hoje são empregados lasers como radiação incidente. Os lasers apresentam atributos que os tornam uma excelente fonte de excitação, entre os quais podemos destacar monocromaticidade, direcionalidade e coerência. Novos tipos de detectores, como os detectores multicanal (CCD), uso de microscópio óptico acoplado ao espectrômetro, utilização de fibra óptica para medidas remotas, desenvolvimento da espectroscopia FT-Raman, técnicas de imagem e a minituarização da instrumentação tem tornado a espectroscopia Raman uma técnica cada vez mais popular para a caracterização rápida e fácil de sólidos, líquidos e no controle de qualidade, ganhando assim novos campos de pesquisa e espaço no setor industrial.

A espectroscopia Raman, oferece algumas vantagens em relação à espectroscopia no infravermelho: a água não interfere nos espectros, além de ser uma técnica versátil, rápida, determina mais de um componente ao mesmo tempo, as amostras não precisam passar por um pré-tratamento, não usa reagente, não gera subprodutos tóxicos. Além de ser uma técnica não destrutiva, adequada para processos *on-line*. Desta forma, a espectroscopia Raman oferece oportunidades analíticas para muitas áreas de produção e controle de qualidade.

## 4 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

A quimiometria utiliza métodos matemáticos e estatísticos para a análise de dados multivariados com o objetivo de extrair informação, melhorar e otimizar medidas de processos químicos. Nos dados multivariados, diversas variáveis são analisadas simultaneamente. O uso das ferramentas quimiométricas tornou possível o processamento e interpretação de dados que antes seriam impossíveis de serem analisados, isso se deve ao aumento da capacidade de processamento dos computadores, da instrumentação analítica e da habilidade de adquirir dados rapidamente. Dentre as ferramentas quimiométricas mais utilizadas estão: calibração multivariada, reconhecimento de padrões e planejamento e otimização de experimentos (BARROS NETO, *et al.*, 2006). No presente trabalho foi empregado os métodos de reconhecimento de padrões e calibração multivariada.

Para utilização das ferramentas quimiométricas os dados químicos são, geralmente, arranjados na forma de tabelas ou matrizes de dados, como mostrado na Figura 8, as linhas representam as amostras e as colunas referem-se as variáveis (exemplo, intensidade Raman em diferentes números de onda). Durante uma análise química, uma grande quantidade de dados pode ser obtida, um espectro Raman coletado para 50 amostras na faixa de 3500 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  produz uma matriz de dados de dimensões  $50 \times 1609 = 80450$  números. Desta forma, se faz necessária uma maneira de extrair informações importantes de matrizes de dados com tais dimensões.

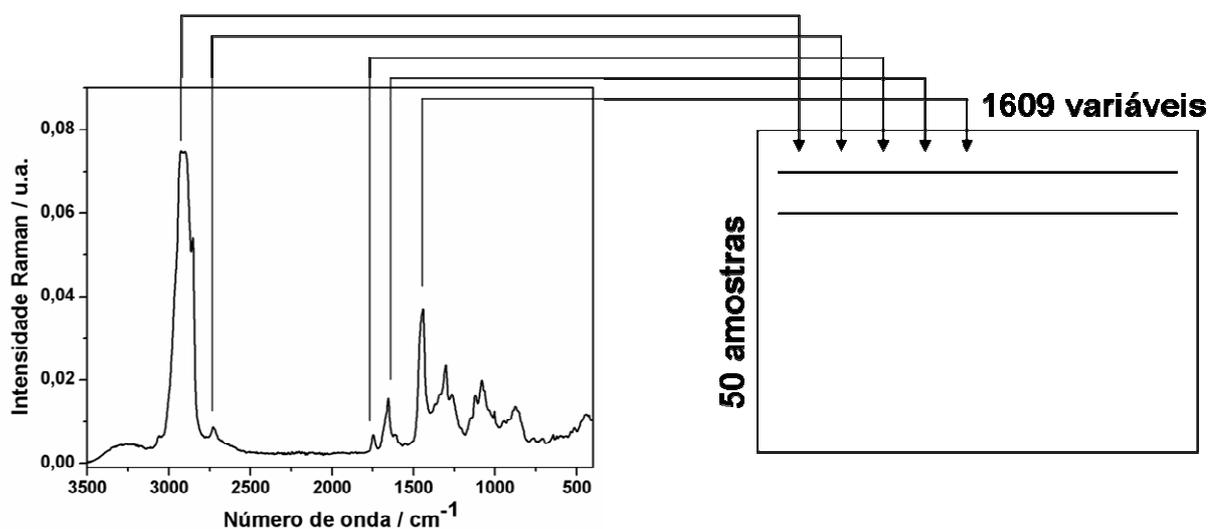


FIGURA 8: Organização dos dados multivariados em uma matriz a partir do espectro Raman.

#### 4.1 RECONHECIMENTO DE PADRÕES

Os métodos de reconhecimento de padrões permitem identificar similaridades e diferenças nas propriedades das amostras e/ou variáveis e classificá-las de acordo com tais características. O objetivo do reconhecimento de padrões é extrair a informação útil de um conjunto de dados complexos. Existem várias ferramentas disponíveis para conseguir informação de um conjunto de dados, estas são divididas em dois segmentos, ilustrados na Figura 9: treinamento não-supervisionado e supervisionado.

Os treinamentos não-supervisionados são métodos que não requerem nenhuma suposição inicial sobre a estrutura dos dados, o objetivo é encontrar agrupamentos naturais. A Análise por Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) é um dos métodos mais utilizados e difundidos para esse tipo de estudo (BRERETON, 2003).

Os métodos supervisionados são aqueles que necessitam de alguma suposição inicial sobre o sistema em estudo, são empregados para prever se uma amostra pertence a uma determinada classe previamente estabelecida, exemplo: SIMCA (do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogy*) e mais recente a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) (BARKER; RAYENS, 2003).

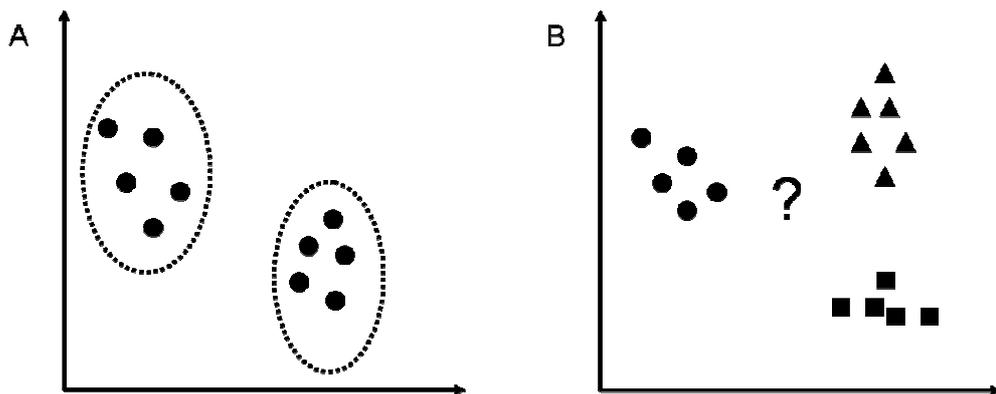


FIGURA 9: Representação de um treinamento não-supervisionado mostrando a formação de agrupamentos naturais (A); e um treinamento supervisionado mostrando as amostras em classes previamente estabelecidas (B).

Existem várias ferramentas disponíveis para os treinamentos supervisionado e não-supervisionado, trataremos somente da PCA e PLS-DA, que foram utilizadas nos tratamentos dos dados apresentados nesse trabalho.

#### 4.1.1 Análise de Componentes Principais

O objetivo da PCA é transformar grandes matrizes de dados em matrizes menores que podem ser facilmente interpretadas, permitindo extrair o máximo de informação. A PCA converte as informações obtidas em gráficos que mostram a relação entre as amostras e entre as variáveis do sistema em estudo.

Para representação de duas ou três variáveis é possível representar as amostras graficamente sem a utilização da PCA, mas acima de 3 variáveis torna-se necessário o uso da ferramenta quimiométrica para obter a correlação entre as variáveis e as amostras. A Figura 11 ilustra a matriz de dados e a projeção das amostras em um espaço bidimensional.

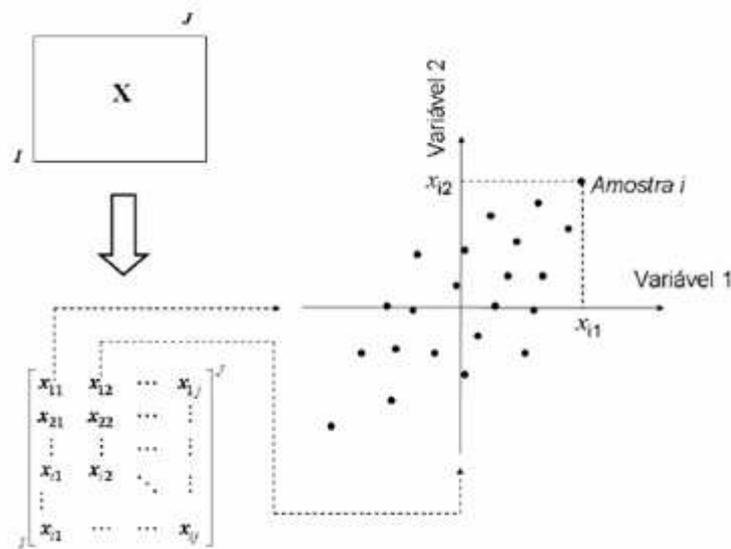


FIGURA 10: Matriz de dados  $X$  e a projeção das amostras em um espaço bidimensional (extraído de RIBEIRO, 2007).

Geometricamente a PCA pode ser definida como uma técnica de projeção, na qual a matriz  $X$  é projetada num subespaço de dimensões reduzidas. A PCA faz uma decomposição da matriz de dados em termos da soma de várias matrizes de posto 1, na qual posto significa um número que expressa a dimensionalidade da matriz, como mostra a Figura 12.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_1 \mathbf{P}_1^T + \mathbf{T}_2 \mathbf{P}_2^T + \dots + \mathbf{T}_a \mathbf{P}_a^T$$

FIGURA 11: Representação da decomposição da matriz X pela PCA

A matriz pode ser escrita como produto de dois vetores, escore  $\mathbf{t}$  e peso  $\mathbf{p}$ .

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_a p_a^T + E \quad (13)$$

para “a” componentes principais. Outra maneira de representar e escrever a equação anterior são mostrados a seguir, na equação 14 e Figura 13:

$$X = TP^T + E \quad (14)$$

$$\begin{array}{c} \mathbf{X} \\ \begin{array}{l} \mathbf{n} \\ \mathbf{m} \end{array} \end{array} = \begin{array}{c} \mathbf{T} \\ \begin{array}{l} \mathbf{n} \\ \mathbf{a} \end{array} \end{array} \begin{array}{c} \mathbf{P} \\ \begin{array}{l} \mathbf{a} \\ \mathbf{m} \end{array} \end{array} + \begin{array}{c} \mathbf{E} \\ \begin{array}{l} \mathbf{n} \\ \mathbf{m} \end{array} \end{array}$$

FIGURA 12: Esquema de decomposição da matriz X em matriz escore (T), matriz peso (P) e uma matriz dos resíduos (E).

onde  $\mathbf{X}$  é a matriz original dos dados com  $\mathbf{n}$  linhas (amostras) e  $\mathbf{m}$  colunas (variáveis);  $\mathbf{T}$  é a matriz dos escores com  $\mathbf{n}$  linhas e  $\mathbf{a}$  colunas (número de componentes principais, novas coordenadas no novo sistema de eixos),  $\mathbf{P}$  é a matriz dos pesos (informação da contribuição de cada variável original na formação dos novos eixos) com  $\mathbf{a}$  linhas e  $\mathbf{m}$  colunas.

O novo conjunto de variáveis é a combinação linear das variáveis originais. A PCA tenta agrupar aquelas variáveis que estão altamente correlacionadas numa nova variável chamada de componente principal. Usualmente a grande fração da variância é descrita nos primeiros componentes principais, sendo possível visualizar os dados pelo gráfico dos escores de um componente contra o outro. O gráfico de escores mostra similaridade e as diferenças

entre as amostras e o gráfico dos pesos mostra a contribuição de cada variável original para o modelo das componentes principais.

Considerando o conjunto de dados representado na Tabela 2 com 8 amostras de cabelos e 4 variáveis que corresponde o conteúdo de elementos químicos encontrados em cada amostra podemos ilustrar os escores  $t_a$  e os pesos  $p_a^T$  em um espaço bidimensional para a relação entre o teor de Cu e Mn.

TABELA 2: Teor de elementos químicos encontrados em diferentes cabelos (extraído de OTTO, 1999)

<b>Cabelo</b>	<b>Cu (ppm)</b>	<b>Mn (ppm)</b>
<b>1</b>	9,2	0,30
<b>2</b>	12,4	0,39
<b>3</b>	7,2	0,32
<b>4</b>	10,2	0,36
<b>5</b>	10,1	0,50
<b>6</b>	6,5	0,20
<b>7</b>	5,6	0,29
<b>8</b>	11,8	0,42

Cada linha da matriz de dados é representada por um ponto no gráfico da Figura 14. Observe que a primeira componente principal é a reta que aponta na direção de maior variabilidade das amostras, a segunda componente principal é ortogonal a primeira e, portanto, não estão correlacionadas. A projeção de cada ponto, representado pelas amostras, na direção das retas que representam as componentes principais resulta nos escores  $t_a$ . Os coeficientes da combinação linear entre os eixos originais e os novos eixos são denominados pesos, que mostram a contribuição de cada variável original para o modelo das componentes principais. Os pesos são, na realidade, os cossenos dos ângulos formados entre a CP (componente principal) e cada variável original (SENA, *et al.*, 2000). Para obter a relação entre as quatro amostras de cabelo que constituem um espaço m-dimensional (m=4), a primeira e a segunda componente vão definir um plano no espaço m-dimensional e será possível visualizar o espaço de dimensão 4 como uma imagem bidimensional através do gráfico de escores.

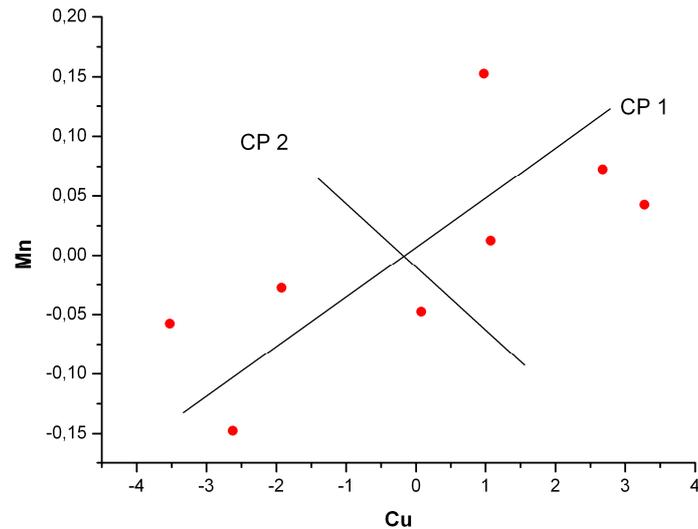


FIGURA 13: Representação de duas componentes principais, os escores são as projeções das amostras em direção a componente principal e os pesos são os cosenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável original.

Existem vários métodos para o cálculo dos pesos e escores, entre eles, a decomposição de valores singulares, SVD (do inglês, *Singular Value Decomposition*). No SVD a matriz de dados é escrita como:

$$X = USV^T \quad (15)$$

a matriz  $V$  corresponde a matriz de pesos, que contém os coeficientes dos autovetores da matriz de covariância  $X^T X$ .  $US$  corresponde a matriz dos escores,  $S$  é a matriz diagonal que contém informação da quantidade de variância explicada por cada CP. Os elementos da diagonal da matriz  $S$  fornecem os valores singulares, cujo quadrado resulta nos autovalores ( $\lambda$ ) associados a cada componente principal e que representam a variância descrita em cada uma delas.

A matriz  $S$  é importante na dimensionalidade do modelo, cada valor  $s_{ij}$  representa uma fração da variância total, a expressão abaixo (Equação 16) mostra a relação entre o valor singular e a variância contida na  $j$ -ésima CP (FERREIRA, *et al*, 1999):

$$\text{Variância } CP_j (\%) = \frac{s_{ji}}{\sum_{j=1}^p s_{ij}^2} \quad (16)$$

onde o denominador fornece a variância total. Dessa forma pode-se determinar quanto da informação original está contida em cada componente principal:

A escolha do número de CP's é uma etapa importante no processo de construção de modelos multivariados. Geralmente essa escolha é feita pela análise do gráfico de autovalores versus CP, as componentes são selecionadas quando a % variância explicada é maior que o nível de ruído.

A escolha de poucos CP's não consegue descrever os dados do modelo completamente, alguma variação deixa de ser descrita. Se muitos CP's são escolhidos, o modelo não será robusto quando aplicado a novos dados e o ruído será modelado. A análise de componentes principais pode ser utilizada tanto para fins exploratórios como para classificação e é a base fundamental da maioria dos métodos multivariados.

#### 4.1.2 Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais

A PLS-DA é uma técnica que combina as propriedades da regressão por mínimos quadrados parciais (item 4.2.1) com o poder de uma técnica de classificação (BARKER; RAYENS, 2003). A principal vantagem dos modelos PLS-DA é que as principais fontes de variabilidade dos dados são modeladas pelas variáveis latentes e seus escores e pesos associados, permitindo a visualização e entendimento de diferentes padrões e associações dos dados.

A PLS-DA segue o mesmo princípio do PLS, neste método a variável simulada (matriz  $\mathbf{Y}$ ) descreve a classe da amostra empregando valores zero ou um. A classe de uma nova amostra é determinada através do valor previsto (0 ou 1) pelo PLS-DA. Os valores previstos pelo modelo PLS-DA são zero e um; entretanto, observa-se que os valores se aproximam destes. É calculado um valor limite entre os valores previstos, onde amostras acima deste valor indicam que estas pertencem à classe modelada. O modelo permite ainda o cálculo da probabilidade de uma amostra pertencer à classe que está sendo modelada, este cálculo é feito com base no teorema de Bayes (RIBEIRO, *et al.*, 2010).

## 4.2 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Nos métodos de calibração multivariada, mais de uma resposta instrumental está relacionada com a propriedade de interesse, como representado na Figura 10.

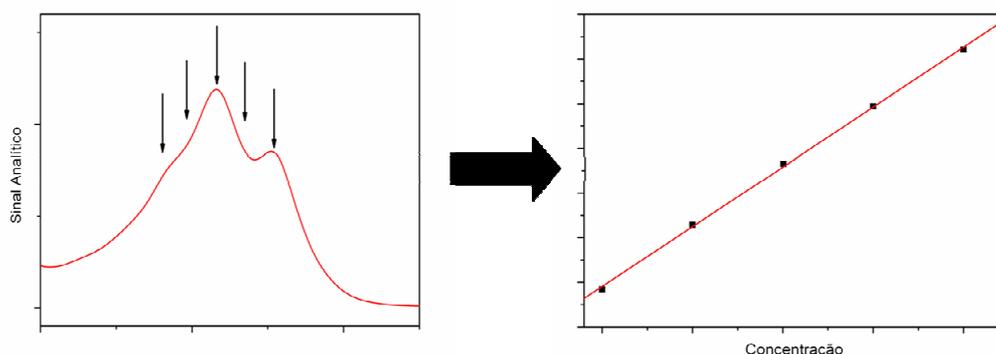


FIGURA 14: Construção de um modelo de calibração multivariada

Nos métodos de calibração de primeira ordem tem-se uma matriz coluna como resposta instrumental para cada amostra. Esses métodos possibilitam a análise mesmo na presença de interferentes, desde que estes estejam presentes nas amostras utilizadas para a construção do modelo de calibração. A calibração multivariada permite o uso de um maior número de variáveis, com diminuição de erros, as análises podem ser realizadas mesmo sem resolução e apresenta a possibilidade de determinações simultâneas. São vários os métodos de regressão empregados para a construção de modelos de calibração multivariada. O PLS (do inglês, *Partial Least Squares*) (BRERETON, 2003) é o método mais utilizado e difundido, logo, foi o empregado no presente trabalho.

Para reduzir fontes de variações irrelevantes e obter uma melhor eficiência na construção dos modelos multivariados, é necessário que se faça um pré-processamento dos dados. Os tipos de pré-processamentos mais aplicados a dados de espectroscopia vibracional são: normalização, aplicada para remover variações sistemáticas; suavização, este tipo de tratamento melhora a relação sinal ruído, e ainda os métodos derivativos, comumente aplicados quando deseja-se corrigir problemas relacionados com a variação da linha base, além disso, permitem melhor visualização das bandas existentes.

#### 4.2.1 Regressão Por Mínimos Quadrados Parciais

O método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*) (BRERETON, 2003) é o método mais utilizado e difundido entre as técnicas de calibração multivariada devido ao seu bom desempenho. Todas as variáveis relevantes são incluídas no modelo PLS, desta forma, a calibração pode ser realizada na presença de interferentes.

O PLS é baseado em uma relação linear entre as variáveis  $\mathbf{X}$  (respostas instrumentais) e as variáveis de interesse,  $\mathbf{Y}$ . As informações da matriz  $\mathbf{X}$  e da matriz  $\mathbf{Y}$  são utilizadas ao mesmo tempo na fase de calibração. A matriz dos espectros é decomposta em matrizes de variações dos espectros (pesos) e a posição das amostras (escores). As matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  podem ser representadas pela Análise de Componentes Principais:

$$\begin{array}{c} \boxed{\mathbf{X}} = \boxed{\mathbf{T}} \cdot \boxed{\mathbf{P}} + \boxed{\mathbf{E}} \\ \boxed{\mathbf{Y}} = \boxed{\mathbf{U}} \cdot \boxed{\mathbf{Q}} + \boxed{\mathbf{F}} \end{array}$$

FIGURA 15: Decomposição das matrizes X e Y para o modelo PLS

$$\begin{array}{l} X = TP^T + E \\ Y = UQ^T + F \end{array} \quad (17)$$

onde  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{U}$  são as matrizes escores de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente;  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{Q}$  são as matrizes pesos de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ ;  $\mathbf{E}$  e  $\mathbf{F}$  são os resíduos. Uma relação linear entre os dois blocos é estabelecida correlacionando os escores para cada componente de cada vez, utilizando o modelo linear.

$$U_a = b_a T_a \quad (18)$$

$$b = \frac{U^T T}{T^T T} \quad (19)$$

onde “a” é o número de componentes principais. Para que a covariância de **T** e **U** seja maximizada deve-se buscar uma relação linear ótima entre **t** e **u**. No PLS isto é obtido por uma leve mudança nos valores dos escores, de forma a produzir a melhor relação possível. Nesta etapa as componentes principais passam a ser nomeadas de variáveis latentes. Dessa forma uma relação entre o bloco X e o bloco Y é obtida:

$$Y = TBQ^T + f \quad (20)$$

O modelo final consiste das matrizes U e T que são linearmente relacionados por um coeficiente B.

Para a determinação do número correto de variáveis latentes, o método mais utilizado consiste na validação cruzada, onde cada amostra de um conjunto de dados é utilizada para validação, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido retiradas e testadas. A raiz quadrada da soma do quadrado dos erros da validação cruzada (RMSECV – do inglês, *Root Mean Square Error of Cross validation*) é calculada de acordo com a equação abaixo (OTTO, 1999):

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (y_p - y_r)^2}{n}} \quad (21)$$

onde  $y_p$  e  $y_r$  são, respectivamente, os valores previstos e de referência para a propriedade de interesse e n os números de amostra da calibração. Escolhe-se, então, o número de variáveis latentes que apresenta o valor mínimo do RMSECV.

Na construção do modelo de calibração multivariada, as amostras são divididas em dois conjuntos de dados, um conjunto de calibração e outro conjunto chamado de validação. As amostras de calibração precisam ser escolhidas de forma que sejam representativas, ou seja, apresente maior variabilidade dos dados. No presente trabalho foi utilizado o algoritmo de Kennard-Stone (1969), este algoritmo seleciona as amostras de calibração com base nas suas distâncias. Dois espectros são selecionados, o primeiro mais próximo do ponto central e o segundo é escolhido de forma que apresente maior distância euclidiana em relação ao primeiro. Essas duas amostras são então removidas do conjunto de calibração e alocadas em um subconjunto. Para cada espectro do conjunto de calibração, as distâncias euclidianas entre

o espectro selecionado do subconjunto e os espectros restantes são computadas. O procedimento segue até a obtenção do número desejado de amostras para o conjunto de calibração.

Durante a construção do modelo de calibração é importante identificar amostras que possuem comportamento diferente das demais. Pode-se ter amostras com alta ou baixa concentração, com erro na medida, problema em uma determinada região do espectro, uma determinada amostra pode apresentar ruído durante a medida. Esse tipo de amostra é chamado de anômala. É necessário eliminar ou corrigir as anomalias para que o modelo possa ter boa habilidade de previsão. Uma maneira de se detectar as amostras anômalas é a análise do gráfico dos resíduos versus *leverage* (FERREIRA, *et al.*, 1999). A *leverage* é uma medida da importância de uma amostra para o modelo, é a posição dessa amostra em relação as outras no espaço das variáveis latentes. Se uma amostra é diferente das outras amostras do conjunto de calibração, ela terá alto valor de *leverage* e pode ter uma influência negativa no modelo. O valor de *leverage* é calculado segundo a equação:

$$h_i = \mathbf{t}_{a,i}^T (\mathbf{T}_a^T \mathbf{T})^{-1} \mathbf{t}_{a,i} \quad (22)$$

onde  $\mathbf{T}$  são os escores das amostras de calibração,  $\mathbf{t}_i$  é o escore de uma determinada amostra  $\mathbf{i}$  e  $\mathbf{a}$  é o número de variáveis latentes. Os resíduos correspondem a desvios entre os dados de referência e os dados estimados pelo modelo. A influência de cada amostra pode ser obtida pelos resíduos de Student, dado por:

$$L_{resc_i} = \sqrt{\frac{(y - y_i)^2}{(n-1)(1-h_i)}} \quad (23)$$

$$resíduo\ de\ Student = \frac{(y - y_i)}{L_{resc_i} \sqrt{1-h_i}}$$

onde  $L_{resc_i}$  é o resíduo de uma determinada amostra corrigido pela *leverage*. Uma amostra com *leverage* e resíduo alto deve ser excluída do modelo e este reconstruído. Amostra com *leverage* baixo e resíduo alto indica previsão ruim da propriedade a ser determinada. Amostra que apresenta resíduo baixo e *leverage* alta revela amostras diferentes das demais, onde o modelo não consegue descrever a amostra.

A parte fundamental da regressão é a verificação de sua validade, ou seja, se o modelo construído é capaz de prever corretamente ou com pequena margem de erro os valores das concentrações de novas amostras. A partir dos parâmetros obtidos na etapa de calibração, pode-se realizar a estimativa da propriedade de interesse da seguinte forma:

$$Y = \sum_{a=1}^A t_a b_a q_a^T \quad (24)$$

para  $A$  variáveis latentes determinadas na etapa de modelagem (BARTHUS, 1999).

Existem algumas maneiras de determinar a habilidade de previsão do modelo: através da determinação dos valores previstos pelo modelo, dos seus respectivos erros relativos e da raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP – do inglês, *Root Mean Squares Error of Prediction*).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (y_r - y_p)^2}{n}} \quad (25)$$

onde  $n$  é o número de amostras do conjunto de validação,  $y_r$  e  $y_p$  correspondem aos valores de referência e aos previstos pelo modelo, respectivamente. A equação acima expressa o grau de concordância entre o valor estimado pelo modelo multivariado e o valor tido como verdadeiro ou de referência.

Uma vez validado o modelo, este está apto para previsão de novas amostras. É importante ressaltar que todas as novas amostras estejam na mesma faixa de concentração das amostras usadas na etapa de calibração.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 AMOSTRAS

As amostras de leite em pó utilizadas nesse trabalho foram adquiridas no comércio da cidade de Juiz de Fora (MG), Montevideú (Uruguai) e Buenos Aires (Argentina). As amostras brasileiras foram provenientes dos estados de Goiás, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, este representando a maioria das amostras. Um total de 40 amostras comerciais foram analisadas, sendo 23 amostras de leite integral, 10 amostras de leite desnatado, 3 amostras de leite semi-desnatado e 4 amostras de leite modificado.

O soro em pó e o amido, utilizados para adulterar as amostras de leite em pó, foram cedidos pela empresa de produtos alimentícios Gemacom Tech, sediada na cidade de Juiz de Fora.

Nesse trabalho, um total de 22 amostras de 9 diferentes marcas nacionais de leite condensado foram estudadas, estas foram fornecidas pelo Instituto Cândido Tostes.

## 5.2 AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ ADULTERADAS

Para a identificação de adulterante nas amostras de leite em pó, uma determinada marca de leite foi selecionada. As amostras foram contaminadas em laboratório com soro em pó e/ou amido, em níveis de concentração de 1 até 50% (m/m). Na Tabela 2 é apresentada as faixas de concentrações (% m/m) de cada componente nas misturas preparadas.

TABELA 3: Planejamento das amostras de leite em pó com adição de soro e amido.

<b>Leite em pó integral</b> %(m/m)	<b>Soro</b> %(m/m)	<b>Amido</b> %(m/m)	<b>Número de</b> <b>amostras</b>
99-50	1-50	-	67
99-70		1-30	24
95-71	3-20	2-9	15
<b>Leite em pó desnatado-</b> %(m/m)	<b>Soro-</b> %(m/m)	<b>Amido-</b> %(m/m)	<b>Número de</b> <b>amostras</b>
99-50	1-50		69
99-70		1-30	33
95-76	3-15	2-9	12

Todas as amostras foram pesadas em uma balança analítica Marte Shimadzu AY 220 e a homogeneização das amostras foi realizada através de mistura física utilizando almofariz e pistilo de ágata.

## 5.3 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ

As amostras de leite em pó integral e desnatado foram estocadas a temperatura ambiente. O armazenamento ocorreu de duas formas: em frascos plásticos na temperatura e umidade ambiente, simulando o uso pelo consumidor e em dessecadores de vidro. Os espectros Raman das amostras foram coletados no dia da abertura da embalagem, um mês depois e as medidas foram feitas mensalmente durante um período de oito meses. As amostras selecionadas para este estudo foram fabricadas dois meses antes do início da análise.

## 5.4 ESPECTROS RAMAN

Os espectros Raman das amostras estudadas foram obtidos em um espectrômetro RFS 100 FT-Raman Bruker equipado com detector de Ge, refrigerado com nitrogênio líquido e linha de excitação em 1064 nm, empregando laser Nd:YAG. As medidas foram feitas com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , potência do laser de 200 mW, tempo de aquisição de aproximadamente 15 minutos, correspondendo a 512 acumulações, a faixa espectral utilizada foi de 3500 a  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram coletados em duplicatas para verificação da não destruição da amostra na região de impacto do laser. Em todos os espectros Raman obtidos nesse trabalho, as amostras não passaram por nenhum preparo prévio.

## 5.5 PRÉ-TRATAMENTO DOS ESPECTROS

Para a aplicação dos métodos multivariados utilizou-se o software MATLAB 7.5. Primeiramente, os espectros Raman foram dispostos em forma de matriz, onde as linhas representam as amostras e as colunas exibem as intensidades Raman em cada número de onda. Antes da realização de qualquer análise os espectros foram normalizados, conforme a equação abaixo:

$$x_{i,norm} = \frac{x_i}{\sum_{j=1}^n |x_{i,j}|} \quad (26)$$

Obteve-se a segunda derivada dos espectros usando o algoritmo de suavização Savitzky-Golay (1964) com uma janela de 15 pontos e polinômio de ordem 2. As derivadas são muito úteis para melhorar a resolução visual dos picos, entretanto, podem aumentar os ruídos. Dessa forma, o algoritmo de Savitzky-Golay foi aplicado para suavizar e melhorar a relação sinal-ruído após derivação. Os dados foram centrados na média, esta operação faz a subtração de cada valor da variável pela média das variáveis:

$$x_{(i,j)cm} = x_{i,j} - \bar{x}_j \quad (27)$$

## 5.6 ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise exploratória dos dados foi feita através da PCA, o número de CP's foi decidido pela análise do gráfico de autovalores versus o número de CP's. A PCA foi empregada para o conjunto de amostras de diferentes tipos de leite em pó, como mostrado na Tabela 3, com o objetivo de averiguar se as amostras se dividiriam em grupos distintos, de acordo com a classificação do leite.

TABELA 4: Número de espectros Raman dos tipos de leite em pó empregados na construção do modelo PCA.

<b>Número de amostras</b>	<b>Tipo de leite em pó</b>
23	Integral
10	Desnatado
3	Semi-desnatado
4	Modificado

No conjunto de dados das amostras com e sem adulterante foi realizado um treinamento não-supervisionado através da PCA e um treinamento supervisionado feito pela PLS-DA. A PCA nos espectros das amostras de leite em pó, com e sem adulterante, foi executada para verificar se as amostras seriam separadas em grupos de acordo com o tipo de adulterante presente. Foram construídos dois modelos, um empregando as amostras de leite integral e outro as amostras de leite desnatado. O conjunto de amostra empregado encontra-se descrito na Tabela 4.

TABELA 5: Descrição do conjunto de amostra de leite em pó com soro e amido para análise de reconhecimento de padrões não-supervisionados.

<b>Leite em pó integral</b>	<b>Leite % (m/m)</b>	<b>Soro % (m/m)</b>	<b>Amido % (m/m)</b>	<b>Mistura ternária<sup>a</sup> % (m/m)</b>	<b>Número de amostras</b>
Comercial	100				23
		1-30			25
Adulterado	99-70		1-30		24
				5-29	15
<b>Leite em pó desnatado</b>	<b>Leite % (m/m)</b>	<b>Soro % (m/m)</b>	<b>Amido % (m/m)</b>	<b>Mistura ternária<sup>a</sup> % (m/m)</b>	<b>Número de amostras</b>
Comercial	100				10
		1-30			21
Adulterado	99-70		1-30		19
				5-24	12

<sup>a</sup> conforme descrito na Tabela 2.

A PLS-DA foi empregada para classificação e previsão das amostras adulteradas de leite. Para a construção do modelo de classificação, os dados obtidos pelos espectros Raman formaram a matriz X e a matriz Y indicou a classe ao qual a amostra pertencia, sendo 1 para as amostras comerciais e 2 para as amostras adulteradas em laboratório com soro, 3 para as amostras com adição de amido e 4 para as misturas ternárias (leite, soro e amido). Os conjuntos de amostras empregados nos modelos PLS-DA estão descritos na Tabela 5. O desempenho do modelo foi avaliado com base na classificação correta das amostras, expresso em termos de porcentagem; na sensibilidade, que é a capacidade do modelo de reconhecer as amostras de uma determinada classe como pertencentes a esta classe, e na especificidade, que é a capacidade de reconhecer amostras que não são de determinada classe como não pertencentes a esta classe (ALVAREZ-GUERRA, *et al*, 2010).

A construção dos modelos de calibração multivariada foi feita empregando o método dos mínimos quadrados parciais (PLS); neste caso a matriz X foi formada pelos espectros Raman e a matriz Y pelos valores das concentrações de adulterante adicionadas a cada amostra.

Para o desenvolvimento e avaliação do modelo de classificação e regressão utilizaram-se dois conjuntos de dados: amostras de treinamento ou calibração e amostras de validação. Na separação destas amostras para os modelos PLS e PLS-DA empregou-se o algoritmo de

Kennard-Stone (1969) este algoritmo procede à seleção das amostras de maior variabilidade para compor o conjunto de treinamento. Na Tabela 5 é apresentado o número de amostras e a faixa de concentração de cada adulterante para os conjuntos de calibração e previsão das regressões construídas.

TABELA 6: Conjunto de amostras para a construção dos modelos de classificação por PLS-DA e regressão por PLS.

<b>Amostras</b>	<b>Faixa de concentração % (m/m)</b>	<b>Integral</b>	<b>Desnatado</b>
<b>Comercial</b>		23	8
<b>Soro</b>	1-50	68	60
<b>Amido</b>	1-30	24	28
<b>Mistura</b>	5-29	15	12

A escolha do número de variáveis latentes foi feita através do gráfico de RMSECV versus o número de variáveis latentes, sendo escolhido o número de variáveis latentes que apresentasse menor RMSECV. Os parâmetros utilizados para avaliar os modelos de regressão foram os valores previstos pelo modelo, seus respectivos erros relativos e o valor da raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão, RMSEP.

## 5.7 MÉTODO DA NINIDRINA ÁCIDA

O método da ninidrina ácida (FUKUDA, 1994) foi empregado para quantificar o conteúdo de ácido siálico presente nas amostras de leite em pó com e sem adição de soro.

### 5.7.1 Reagentes:

- Etanol P.A. absoluto, reagente ACS, Proquimios;
- Ninidrina, reagente ACS, Sigma-Aldrich;
- Ácido N-Acetilneuramínico, Tipo IV-S 95% Sintético, Sigma-Aldrich;
- Ácido Fosfotúngstico cristalino, Sigma-Aldrich;
- Ácido Tricloroacético, reagente ACS, Sigma-Aldrich.

### 5.7.2 Equipamentos e materiais:

- Espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu;
- Células de quartzo com caminho óptico de 1 cm;
- Banho de aquecimento do evaporador rotativo, Quimis;
- Banho ultrassônico, Quimis;
- Agitador magnético, Fisaton;
- Balança AY 220, Marte Shimadzu;
- Centrífuga para tubos, Quimis.

### 5.7.3 Preparo das soluções

- Ácido tricloroacético – TCA (240 g/L): 24 g de TCA foram pesadas, a massa foi diluída em água destilada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, aferindo o volume com água destilada.
- Ácido fosfotúngstico – PTA (200 g/L): Pesou-se 10g de PTA, diluiu-se com água destilada e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL aferindo seu volume com água destilada.
- Ninidrina ácida: Pesou-se 2g de ninidrina, adicionou-se 32 mL de ácido clorídrico P.A. e 48 mL de ácido acético glacial, a mistura ficou sob agitação por aproximadamente 1 hora para total solubilização.
- Reconstituição do leite em pó: Pesou-se 2,6 g de leite em pó integral e reconstituiu-se em 20 mL de água destilada. Na reconstituição do leite desnatado usou-se 2,0 g em 20 mL de água destilada.

### 5.7.4 Curva de calibração

Preparou-se uma solução estoque de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de ácido siálico em água destilada, para tal concentração foram pesados 25 mg de ácido siálico e diluídos para 25 mL. A partir da solução estoque, as amostras para a curva de calibração foram preparadas em duplicatas de acordo com a Tabela 6:

TABELA 7: Preparo das amostras de ácido siálico para construção da curva de calibração.

<b>Amostra</b>	<b>Volume da Solução estoque de ácido siálico(mL)</b>	<b>Volume de ácido acético glacial (mL)</b>	<b>Volume de ninidrina ácida (mL)</b>	<b>Volume de água (mL)</b>	<b>Volume final da solução (mL)</b>
1	0,1	1	1	0,9	3
2	0,2	1	1	0,8	3
3	0,3	1	1	0,7	3
4	0,4	1	1	0,6	3
5	0,5	1	1	0,5	3
branco	0	1	1	1	3

As amostras foram levadas a banho-maria fervente por 10 min. Após resfriamento obteve-se o espectro eletrônico na região do visível da amostra 5 para verificação do comprimento de onda de absorção máxima. Após essa etapa, procedeu-se à leitura para as demais concentrações.

### 5.7.5 Preparo das amostras de leite adulteradas com soro

As amostras de leite em pó adulteradas com soro foram preparadas de acordo com a Tabela 7 e 8.

TABELA 8: Preparo das amostras de leite integral com adição de soro

<b>Amostras</b>	<b>Massa de Leite em pó (g)</b>	<b>Massa de Soro (g)</b>
1	2,6	0
2	2,6	0
3	2,574	0,026
4	2,548	0,052
5	2,47	0,13
6	2,34	0,26
7	2,21	0,39
8	2,08	0,52

TABELA 9: Preparo das amostras de leite desnatado com soro.

Amostras	Massa de Leite em pó (g)	Massa de Soro (g)
1	2,0	0
2	2,0	0
3	1,98	0,02
4	1,96	0,04
5	1,90	0,10
6	1,80	0,20
7	1,70	0,30
8	1,60	0,40

Após a pesagem das massas, as misturas de leite e soro foram reconstituídas em água destilada, conforme descrito no item 5.7.3.

#### 5.7.6 Procedimento

Adicionou-se 20 mL de leite em pó reconstituído e 10 mL de TCA (240 g/L), a mistura foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 30 minutos. Após esse tempo realizou-se uma filtração, tomou-se 10 mL do filtrado em tubos de centrífuga e adicionou-se 1 mL PTA (200 g/L). A nova mistura foi submetida a uma centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente evitando a perda do sedimento. Adicionou-se 4 mL de etanol 95% com o auxílio de um bastão, o bastão foi lavado com 2 mL de etanol. Uma nova centrifugação foi realizada durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou ao precipitado 2 mL de ácido acético glacial e 1 mL de ninidrina ácida. A mistura foi homogeneizada e submetida a banho-maria fervente por 10 minutos. Nessa etapa ocorreu o desenvolvimento de cor variando do amarelo claro ao marrom amarelado. Após o resfriamento da solução, realizou-se leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm.

## 5.8 ANÁLISE TÉRMICA

O monitoramento das mudanças físicas e químicas das amostras de leite em pó, durante o armazenamento, foi feito através da TGA e DTA em um equipamento TGA-60 Shimadzu. A quantidade de umidade absorvida pela amostra durante o armazenamento também foi acompanhada pelas curvas TG/DTA. As massas das amostras pesadas ficaram na ordem de 7 mg, estas foram analisadas em cadinho de platina sob atmosfera de nitrogênio com vazão de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . A faixa de temperatura empregada foi de 25 a  $300^\circ\text{C}$  utilizando uma razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 ANÁLISE QUALITATIVA DOS DIFERENTES TIPOS DE LEITE

#### 6.1.1 Espectros FT-Raman

A Figura 16 mostra os espectros Raman do leite em pó integral, semi-desnatado e desnatado. As diferenças observadas no perfil do espectro Raman dos tipos de leite em pó estão relacionadas com as quantidades dos principais nutrientes: carboidratos, lipídeos e proteínas. A Tabela 9 descreve as principais bandas do espectro Raman com a tentativa de atribuição dos modos vibracionais baseada na literatura (LI-CHAN, 1996; BENZERDJEB, *et al.*, 2007; ZHOU, *et al.*, 2006).

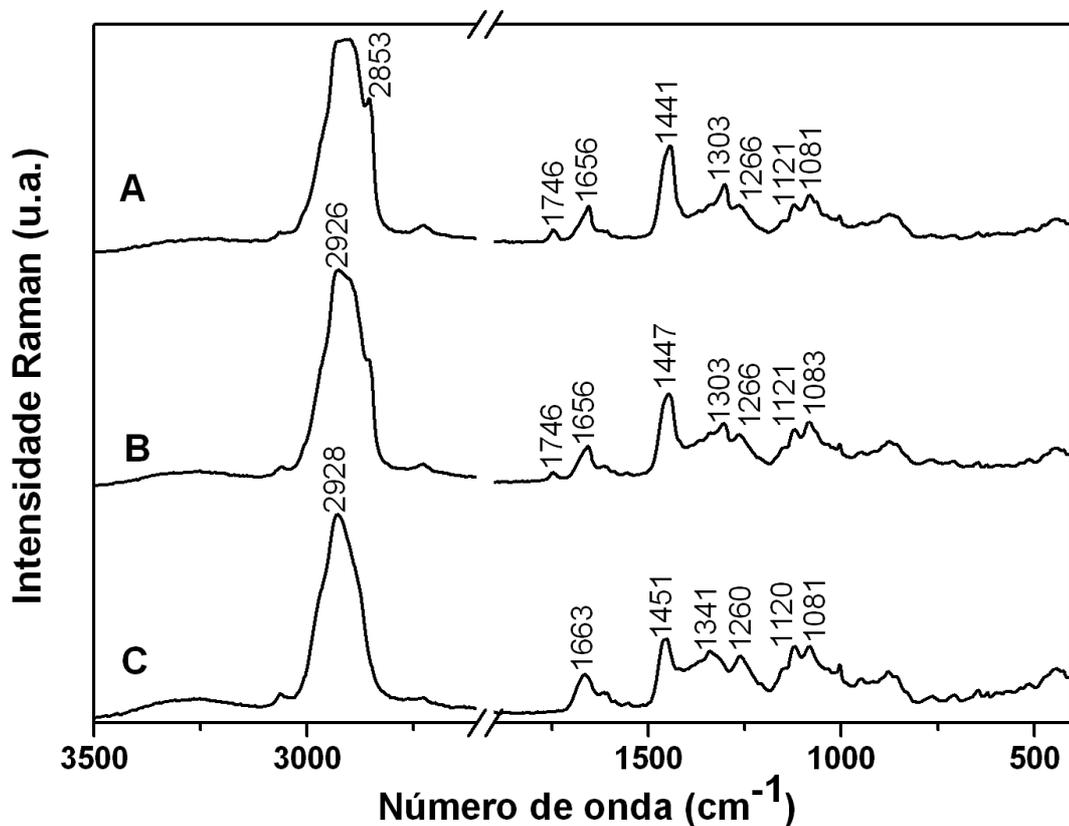


FIGURA 16: Espectros Raman do leite em pó integral (A), semi-desnatado (B) e desnatado (C).

TABELA 10: Tentativa de atribuição do espectro Raman do leite em pó (LI-CHAN, 1996; BENZERDJEJ, *et al.*, 2007; ZHOU, *et al.*, 2006).

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tentativa de atribuição
2926	$\nu_{\text{ass}}(\text{CH}_2)$
2899	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2855	$\nu_s(\text{CH}_2)$
1748	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ester}}$
1656	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amida I; $\nu(\text{C}=\text{C})$
1555	$\delta(\text{N-H})$ ; $\nu(\text{C-N})$ Amida II
1442	$\delta(\text{CH}_2)$
1340	$\delta(\text{C-H})$ ; $\nu(\text{C-O})$
1303	$\tau(\text{CH}_2)$
1266	$\gamma(\text{CH}_2)$
1122	$\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$
1082	$\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$
1064	$\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$
1004	Respiração do anel (Phe)
950	$\delta(\text{C-O-C}) + \delta(\text{C-O-H}) + \nu(\text{C-O})$
877	$\delta(\text{C-C-H}) + \delta(\text{C-O-C})$
763	$\delta(\text{C-C-O})$
711	$\nu(\text{C-S})$
645	$\delta(\text{C-C-O})$
598	$\delta(\text{C-C-O}) + \tau(\text{C-O})$
447	$\delta(\text{C-C-C}) + \tau(\text{C-O})$

A classificação do leite em integral, semi-desnatado e desnatado é baseada na quantidade de lipídeo presente. O leite semi-desnatado e desnatado passam por processo físico para a retirada parcial ou total da gordura. Nos espectros Raman, os modos vibracionais característicos dos lipídeos podem ser identificados através da comparação do espectro do leite integral com o do leite desnatado. Confrontando os espectros, observa-se na região de 2930 cm<sup>-1</sup> uma banda larga para o leite integral, com a diminuição do teor de gordura essa banda fica mais definida, como verificado nos espectros Raman do leite semi-desnatado e desnatado. Essa banda pode ser atribuída ao estiramento assimétrico CH<sub>2</sub> e pode ser relacionada a modos de proteínas e carboidratos; tal banda aparece melhor resolvida no leite semi-desnatado e desnatado devido à menor contribuição dos modos vibracionais relacionados a lipídeos. Ainda na região de estiramento da ligação CH, nota-se a presença de

uma banda com fraca intensidade na região de  $2850\text{ cm}^{-1}$  no espectro do leite integral, esta aparece suavemente no espectro do leite semi-desnatado e está ausente no leite desnatado. Tal banda pode ser atribuída a um modo vibracional característico da presença de lipídeos e pode ser utilizada como banda marcadora para diferenciar os tipos de leite; esta região do espectro é atribuída ao estiramento simétrico  $\text{CH}_2$ . (LI-CHAN, 1996).

A região do espectro Raman de  $1800$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  apresenta grande quantidade de bandas e é rica em informação estrutural. No espectro Raman do leite em pó integral e semi-desnatado observa-se a presença de uma banda com fraca intensidade na região de  $1750\text{ cm}^{-1}$ . A banda em questão não aparece no espectro do leite desnatado, indicando ser procedente de modo vibracional de lipídeos, sendo atribuída ao modo vibracional de estiramento  $\text{C}=\text{O}$  dos ácidos graxos presentes no leite (ZHOU, *et al.*, 2006). Na região de  $1660\text{ cm}^{-1}$ , aparece uma banda com intensidade média nos espectros dos três tipos de leite, esta região é caracterizada pelo modo amida I, referente ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  das moléculas de proteínas. Nos espectros do leite integral e semi-desnatado, essa região apresenta ainda contribuição do estiramento da ligação  $\text{C}=\text{C}$  dos ácidos graxos insaturados presentes no leite (MOROS, *et al.*, 2007; ZHOU, *et al.*, 2006). O modo vibracional amida II, referente aos modos acoplados de deformação  $\text{N}-\text{H}$  e estiramento  $\text{C}-\text{N}$  das moléculas de proteínas, aparece na região de  $1550\text{ cm}^{-1}$  nos espectros Raman dos três tipos de leite. A variação de intensidade verificada para tal banda está relacionada com a quantidade de proteína presente em cada tipo de leite, uma vez que há um aumento de 9% (m/m) de proteína do leite integral para o desnatado. Na região de  $1440\text{ cm}^{-1}$  é observada uma intensa banda nos três tipos de leite; nesta região aparecem os modos de deformação da ligação  $\text{CH}$ , tendo contribuição das moléculas de lipídeos, carboidratos e dos aminoácidos alifáticos presentes nas proteínas do leite (LI-CHAN, 1996; ZHOU, *et al.*, 2006). No caso do leite desnatado tal banda apresenta um deslocamento de  $11\text{ cm}^{-1}$ , aparecendo em  $1451\text{ cm}^{-1}$ , estas mudanças podem ser atribuídas a ausência de lipídeos neste tipo de leite.

No espectro Raman do leite integral e do semi-desnatado nota-se uma banda em  $1303\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída à presença de lipídeo, essa região é referida na literatura como torção da ligação  $\text{CH}_2$  (HERRERO, 2008). Da mesma forma que as bandas nas regiões de  $2850$  e  $1750\text{ cm}^{-1}$ , a banda em  $1300\text{ cm}^{-1}$  é característica da presença de lipídeo no leite e o emprego dessas três bandas pode ser utilizado na identificação do leite em pó integral. No espectro Raman do leite desnatado verifica-se uma banda de média intensidade em  $1341\text{ cm}^{-1}$ , que aparece com fraca intensidade para os outros tipos de leite, tal banda é atribuída ao modo de deformação  $\text{CH}$ ; pode-se inferir que a intensidade da banda está relacionada com a

presença de um maior teor de carboidrato no leite desnatado. Na região de  $1260\text{ cm}^{-1}$  aparece uma banda nos espectros Raman dos três tipos de leite, sendo mais intensa no espectro do leite desnatado; a região em questão apresenta contribuição dos modos de deformação  $\text{CH}_2$ , a intensidade de tais modos tem contribuição do acréscimo da quantidade de carboidrato que ocorre do leite integral para o desnatado.

A região de  $1200$  a  $800\text{ cm}^{-1}$  é dominada por bandas que envolvem os modos vibracionais dos carboidratos. Os principais modos vibracionais são os estiramentos C-O, C-C e deformação C-O-H na região entre  $1120$  e  $1060\text{ cm}^{-1}$ ; deformação C-O-C entre  $950$  e  $870\text{ cm}^{-1}$ , referente o modo vibracional da ligação glicosídica  $\beta$ -1-4 da lactose (LI-CHAN, 1996; BENZERDJEB, *et al.*, 2007). Nessas regiões são observadas mudanças nas intensidades das bandas Raman para os diferentes tipos de leite.

As diferenças observadas em toda a faixa dos espectros Raman para os três tipos de leite mostram a possibilidade de empregar a técnica de espectroscopia Raman para identificação e classificação rápida do tipo de leite em pó.

Outro tipo de leite estudado foi o leite em pó modificado. Neste tipo de alimento é permitida a adição de ingredientes, como sacarose, maltose, soro em pó, entre outros, desde que especificados no rótulo do produto e respeitando as quantidades permitidas pela Legislação (MAPA, 1997b). O leite em pó modificado é encontrado no comércio com preços inferiores ao leite em pó convencional, tornando-se um atrativo para o consumidor de baixa renda, que muitas vezes não percebe a escassez dos nutrientes essenciais. A Figura 17 apresenta os espectros Raman de quatro amostras de leite em pó modificado, que apresentam perfis diferentes um dos outros, estas diferenças estão relacionadas com o tipo de ingrediente adicionado a cada marca. A marca A apresenta teor carboidrato em torno de 70% (m/m), a marca B contém 59% (m/m) de carboidratos, enquanto que a amostra C apresenta teor de carboidrato em torno de 80% (m/m) e a marca D contém 52% (m/m) de carboidrato e adição de azeite refinado de canola. Como pode ser observado na Figura 17, os espectros Raman mostram bandas características de carboidratos bem definidas. Nota-se também que as bandas típicas de lipídeos e proteínas aparecem com baixa intensidade, principalmente no espectro da marca C.

Mais uma vez, o uso da espectroscopia Raman mostrou-se eficiente na caracterização dos principais constituintes encontrados nos diferentes tipos de leite em pó.

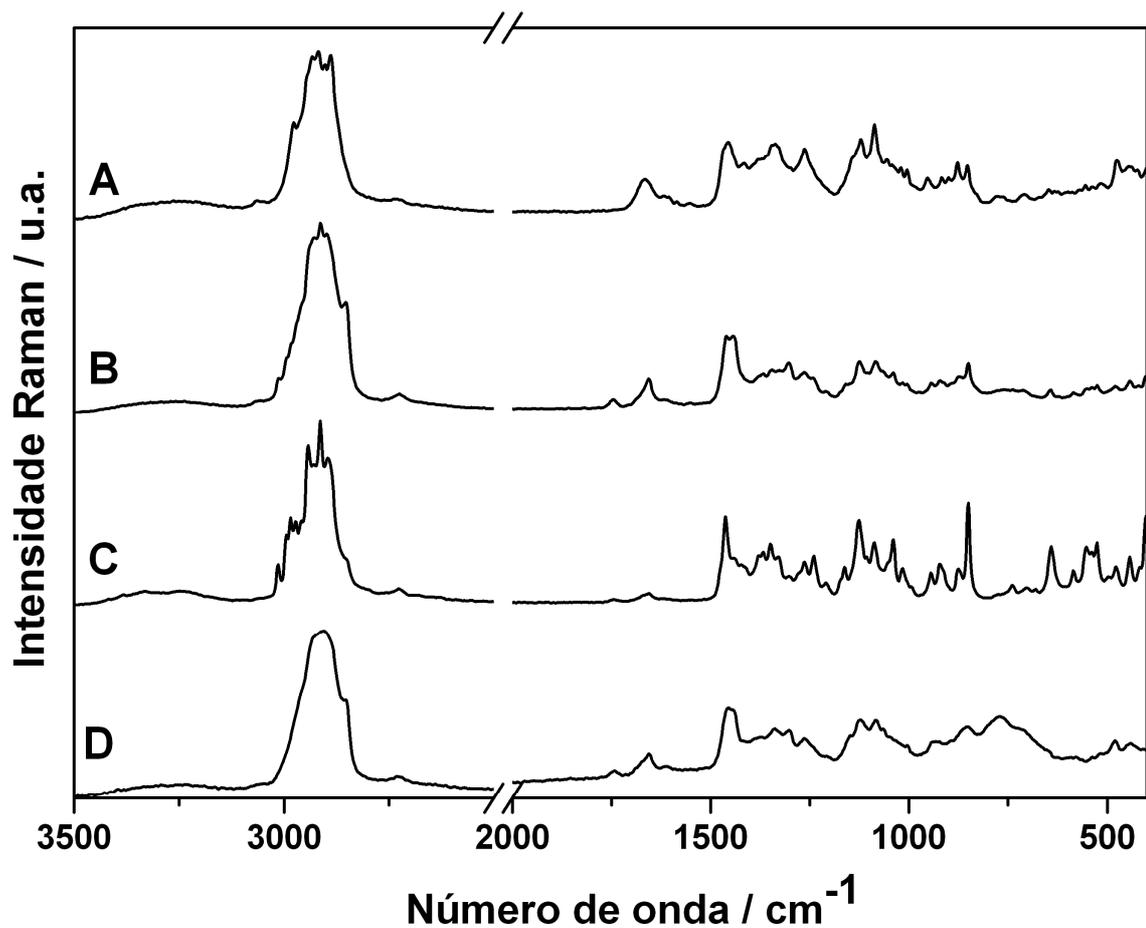


FIGURA 17: Espectros Raman do leite em pó modificado de diferentes marcas: amostra com 70% (m/m) de carboidratos (A); amostra com 59% (m/m) de carboidratos (B); amostra com 80% (m/m) de carboidratos (C) e amostra com 52% (m/m) de carboidratos (D).

### 6.1.2 Análise exploratória

Para verificar se todas as amostras de leite em pó empregadas no presente estudo apresentavam espectros com as mesmas características, de acordo com sua classificação comercial, realizou-se uma análise exploratória empregando a PCA. No modelo construído pela PCA foram escolhidos 4 componentes principais, com 95,82% da variância total capturada. A escolha das CP's foi baseada no gráfico de autovalores versus o número de componentes principais. A Figura 18 mostra o gráfico de escores dos dois primeiros componentes, onde é possível notar a formação de agrupamentos. As amostras de leite integral e as amostras de leite semi-desnatado ficaram agrupadas de acordo com tipo de leite,

mostrando que todas as amostras apresentam espectros com mesmas características, não mostrando variação com diferenças de marcas, época de produção e local de origem do leite.

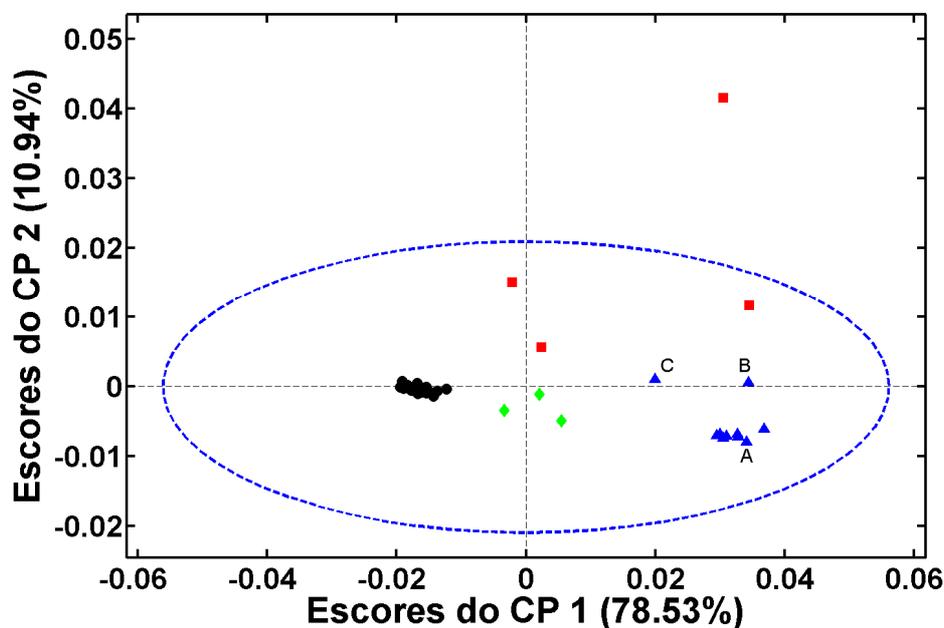


FIGURA 18: Gráfico de escores CP 1 versus CP 2 dos 4 tipos de leite em pó: integral (●); semi-desnatado (◆), desnatado (▲) e modificado (■). As amostras nomeadas de A, B e C pertencem ao mesmo tipo de leite.

Para o leite em pó desnatado observa-se o afastamento de duas amostras do grupo, tais amostras pertencem a uma mesma marca, porém, provenientes de lotes distintos. Estas amostras apresentam espectros Raman com perfis diferentes das demais amostras do grupo. A Figura 19 compara os espectros Raman das amostras afastadas do grupo, nomeadas de B e C, com o espectro Raman de uma amostra do grupo, nomeada de A. As diferenças entre os espectros são bem evidentes, as amostra B e C apresentam espectros com perfis semelhantes, exceto pela presença da banda em  $1742\text{ cm}^{-1}$  na amostra C. Tal banda é atribuída à presença de lipídeo, sugerindo que o desnate do leite ocorreu de forma parcial. O que distingue os espectros, das amostras B e C do espectro da amostra A, são as bandas características da lactose que aparecem de forma mais evidente nos espectros B e C. Essas alterações nos espectros Raman podem indicar um processo de cristalização da lactose (NORGAARD, *et al.*, 2005) que pode ocorrer durante o processamento e armazenamento do leite em pó diminuindo sua vida útil. As mudanças observadas também podem indicar a adição de soro em pó ao leite, uma vez que o soro em pó apresenta cerca de 70% m/m de lactose, e foi observado aumento nas intensidades das bandas Raman da lactose.

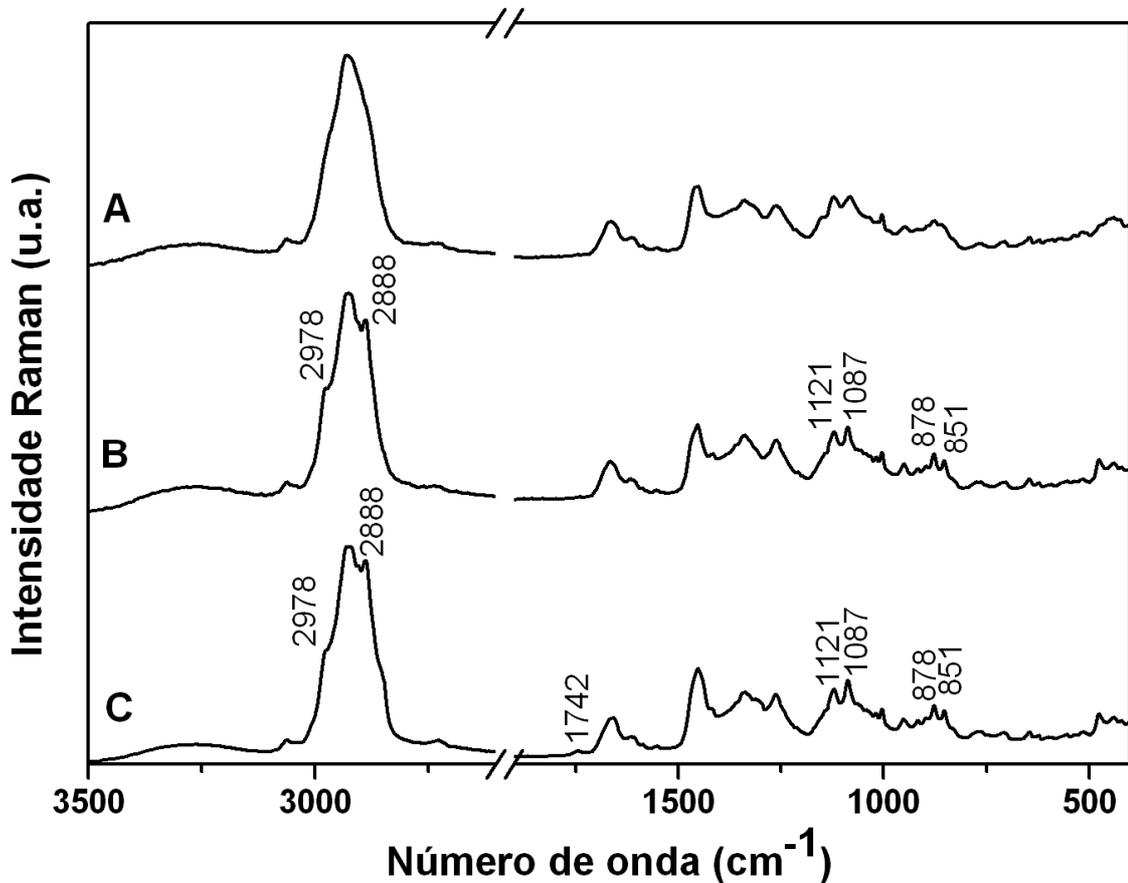


FIGURA 19: Espectros Raman das amostras de leite desnatado: espectro raman típico de leite em pó desnatado (A); amostra com espectro Raman diferente das demais amostras de leite desnatado (B) e amostra de leite desnatado com a presença de bandas características de lipídeos (C).

No modelo da PCA, as amostras de leite em pó modificado também foram incluídas. Como as quantidades dos modificadores variam de marca para marca, não observou-se o agrupamento das amostras, mas a separação destas dos outros tipos de leite. Este resultado é relevante, pois permite identificar que a amostra em questão apresenta componentes diferentes dos demais tipos de leite.

A Figura 20 mostra o gráfico dos pesos para a primeira componente principal, mostrando os deslocamentos Raman que são responsáveis pela separação das amostras no gráfico de escores. As variáveis que apresentam maior contribuição são as que possuem maior peso na separação e agrupamento das amostras estudadas. Neste caso, as regiões que possuem contribuição dos modos vibracionais de lipídeos (2850, 1440 e 1300 cm<sup>-1</sup>) são as que apresentam maior peso na separação das amostras. O resultado obtido na PCA contribui com a análise anterior feita para os espectros Raman dos diferentes tipos de leite.

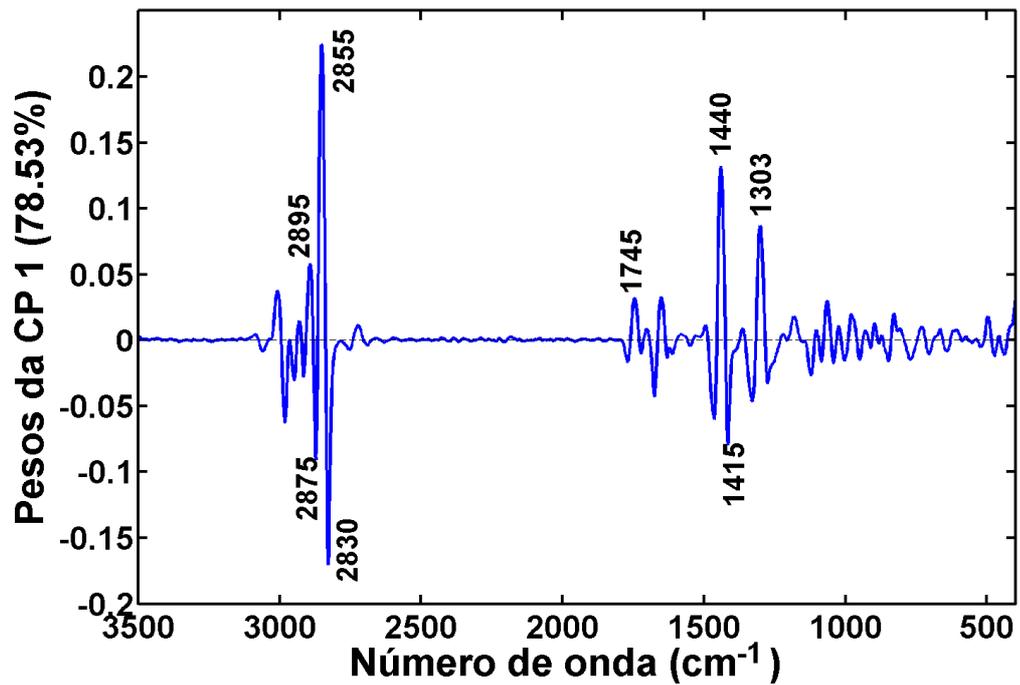


FIGURA 20: Gráfico dos pesos na CP 1 versus os números de onda (variáveis).

Dessa forma, a análise exploratória empregando a PCA com os dados da espectroscopia Raman permite a separação das amostras de leite em pó quanto a sua classificação comercial, bem como a identificação de amostras diferentes dentro de um mesmo grupo.

## 6.2 ANÁLISE QUALITATIVA DO LEITE EM PÓ COM ADIÇÃO DE ADULTERANTES

## 6.2.1 Espectros FT-Raman

A presença de soro e amido foi avaliada no leite em pó, os espectros Raman das amostras modificadas em laboratório com tais componentes foram obtidos. A Figura 21 mostra os espectros Raman do amido e do soro em pó e a Tabela 10 apresenta as atribuições dos principais modos vibracionais destes adulterantes.

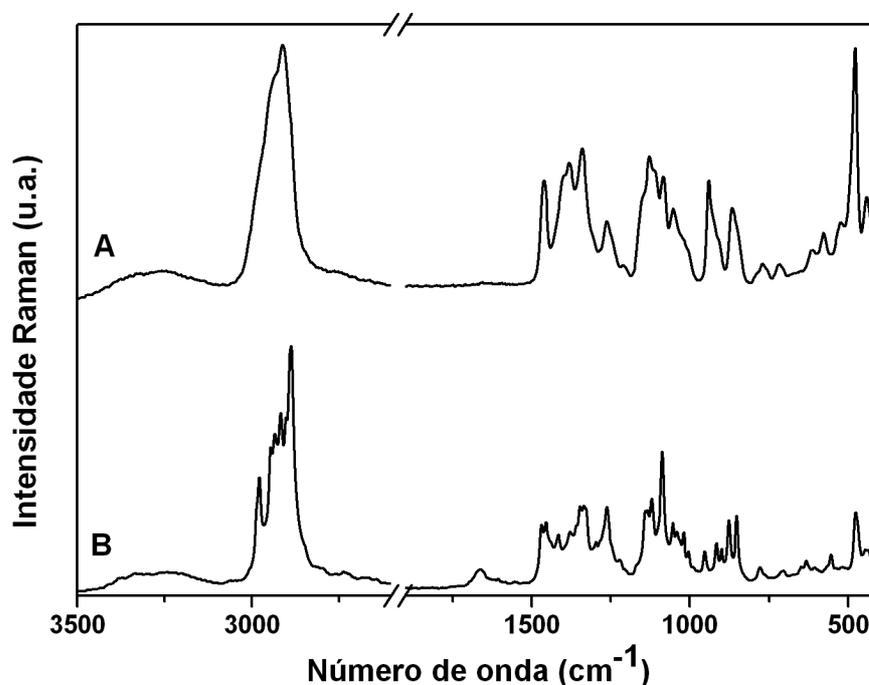


FIGURA 21: Espectro Raman do amido (A) e do soro em pó (B), comumente empregados como adulterantes de leite em pó.

TABELA 11: Tentativa de atribuição dos espectros Raman do amido e soro em pó. (BENZERDJEB, *et al.*, 2007; YANG; ZHANG, 2009)

Soro em pó	Amido	Tentativa de atribuição
2980 - 2880	2910	$\nu(\text{C-H})$
1659		$\nu(\text{C=O})$ Amida I
1457	1460	$\delta(\text{C-H})$
	1384	$\delta(\text{C-O-H})$
1335	1343	$\nu(\text{C-O}) + \delta(\text{C-O-H})$
1262	1266	$\tau(\text{CH}_2)$
1120 - 1087	1129 - 1050	$\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$
950 - 850	940 - 860	$\nu(\text{C-O-C}) + \delta(\text{C-O-H}) + \nu(\text{C-O})$
477	477	$\delta(\text{C-C-C}) + \delta(\text{C-C-O})$

O soro em pó é constituído por lactose (70% m/m) e proteínas, devido a grande quantidade desse dissacarídeo, o espectro Raman do soro é marcado por bandas que caracterizam a presença deste açúcar, as principais bandas estão localizadas em 2978, 2888, 1087 e 850  $\text{cm}^{-1}$ . Modificações nestas regiões do espectro do leite em pó indicam um maior teor de lactose que pode estar associado com a presença de soro.

A Figura 22 exhibe os espectros Raman do leite integral com e sem adição de soro, com quantidades equivalentes a 5, 10 e 20% m/m. Na amostra com 5% (m/m) não é possível identificar mudanças no perfil do espectro Raman, mas com a adição de 10% (m/m) começam a aparecer variações nas intensidades das bandas que possuem contribuição de modos vibracionais do soro. As principais mudanças ocorrem em 2900, 1260, 1087, 876 e 855  $\text{cm}^{-1}$ . Neste caso, o aumento da intensidade é devido ao acréscimo da quantidade de lactose presente.

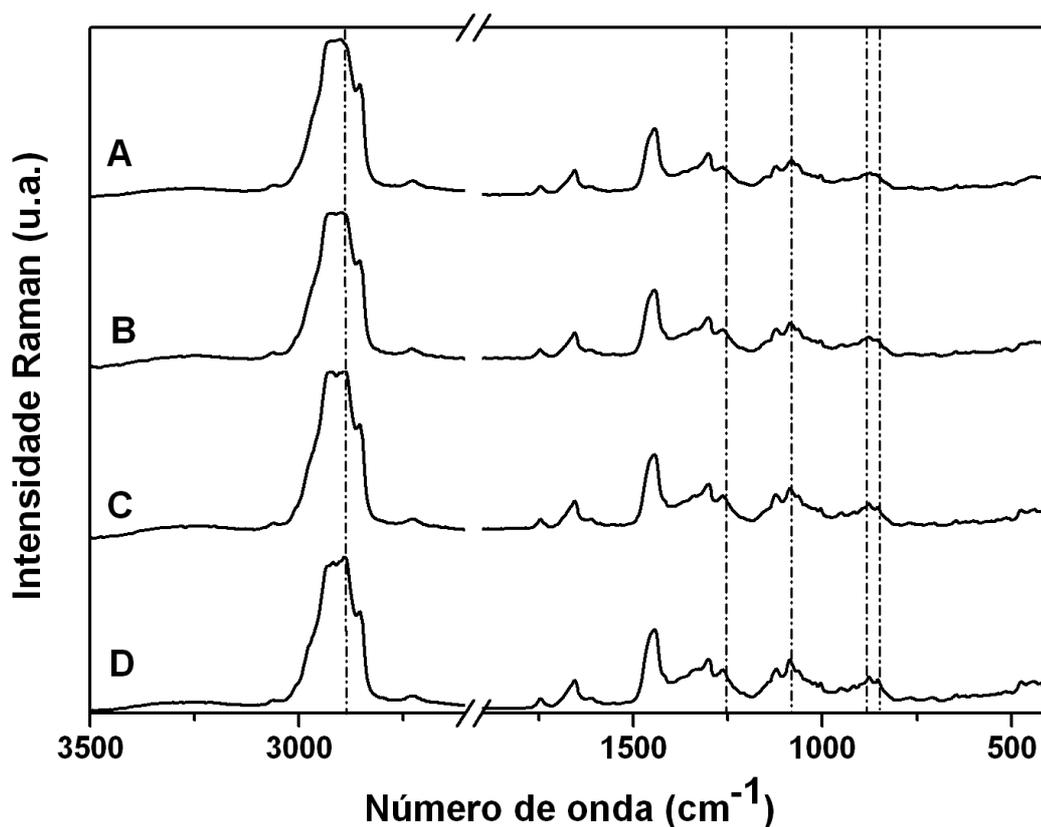


FIGURA 22: Espectro Raman do leite integral comercial (A); com adição de soro nas proporções de 5% m/m (B); 10% m/m (C); e 20% m/m (D).

O espectro Raman do leite desnatado com adição de soro nas proporções de 5, 10 e 20% (m/m) é apresentado na Figura 23. Para o leite desnatado com a adição de 5% (m/m) de soro observa-se modificação no perfil do espectro Raman; neste caso, a modificação com uma

quantidade menor de soro pode ser atribuída à maior quantidade de lactose presente nesse tipo de leite (51% m/m). As mudanças ocorrem nas regiões características dos modos vibracionais da lactose com o aumento das intensidades das bandas, como destacado na Figura 23.

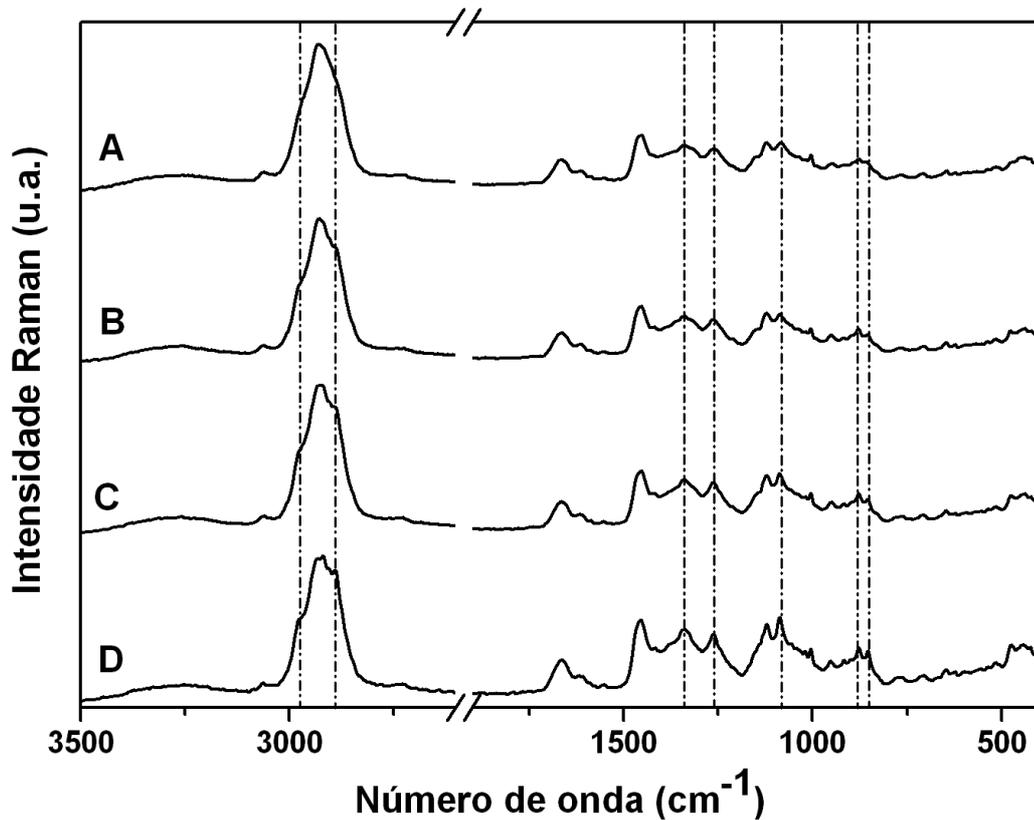


FIGURA 23: Espectro Raman do leite em pó desnatado: comercial (A); com adição de 5% m/m (B), 10% m/m (C) e 20% m/m (D) de soro.

Outro adulterante que pode ser facilmente identificado é o amido; seu espectro Raman apresenta bandas que o distingue dos demais componentes presentes no leite, e que podem ser utilizadas para a identificação desse adulterante nas amostras de leite em pó. A literatura mostra a banda em  $477\text{ cm}^{-1}$  como marcadora na identificação de amido em vários produtos, como cenouras (BARANSKA, *et al.*, 2005) e substâncias farmacêuticas (VEIJ, *et al.*, 2009). Fortes acoplamentos entre os modos vibracionais são encontrados nessa região, tais modos estão relacionados principalmente com a deformação do esqueleto do anel glicosídico [ $\delta(\text{C-C-C} + \text{C-C-O})$ ]. Mudanças nas intensidades das bandas Raman nos espectros do leite em pó podem indicar a presença de amido. A Figura 24 mostra o espectro do leite integral comercial e das amostras de leite integral contendo 5, 10 e 20% (m/m) de amido; na amostra com 5% de amido observam-se pequenas modificações no espectro Raman em relação ao da amostra comercial, estas modificações ocorrem na região de  $1340\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C-O}) + \delta(\text{C-O-H})$ ], e

principalmente em  $477\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{C-C-C}) + \delta(\text{C-C-O})$ ], esta última utilizada como marcadora da presença de amido. Com o aumento do teor de amido no leite as mudanças tornam-se mais perceptíveis, como observado nos espectros das amostras de leite com 10 e 20% de amido. As modificações ocorrem nas regiões citadas anteriormente e na região de  $1080\text{ cm}^{-1}$ , que envolve o modo acoplado  $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$ . A adição de amido no leite em pó desnatado também provoca mudanças nas regiões mencionadas anteriormente, como pode ser verificado na Figura 25.

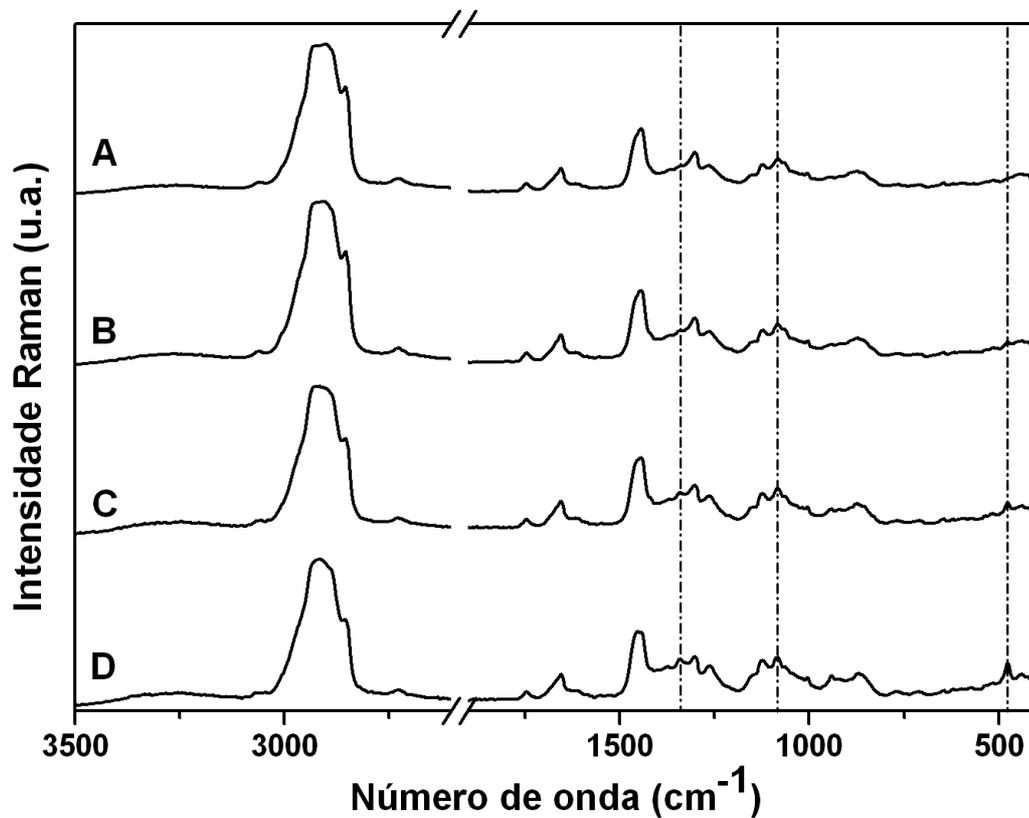


FIGURA 24: Espectro Raman do leite em pó integral: comercial (A); com adição de amido nas proporções de 5% m/m (B), 10% m/m (C) e 20% m/m (D).

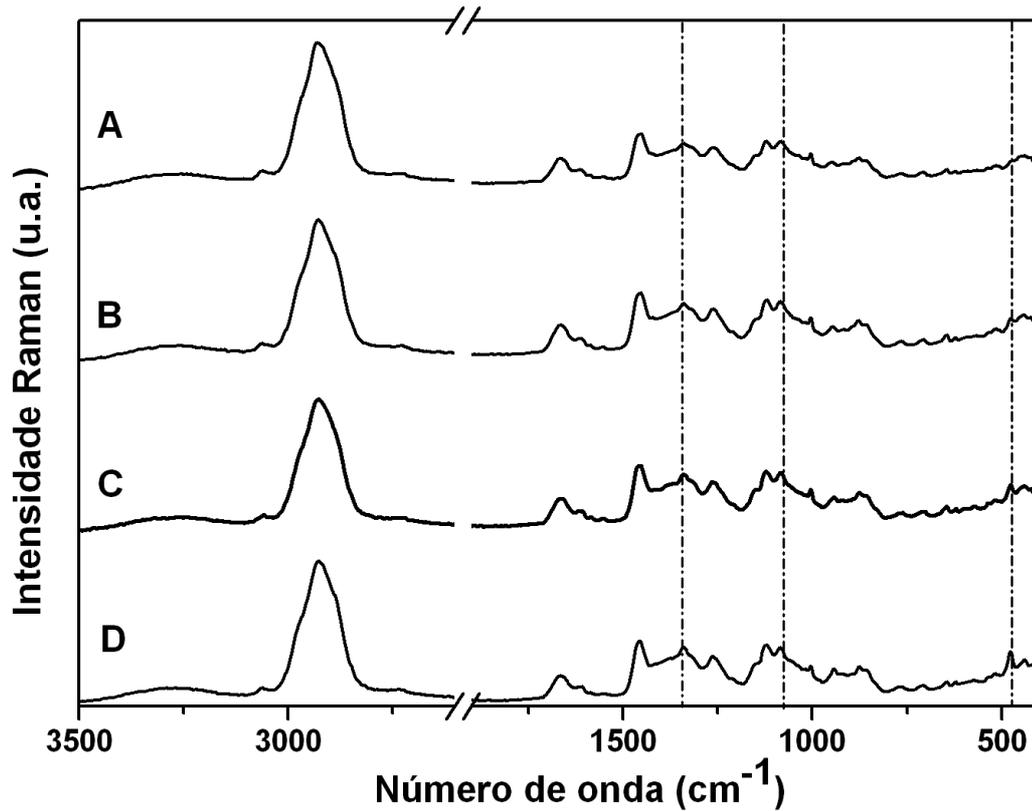


FIGURA 25: Espectro Raman do leite em pó desnatado: comercial (A); com adição de amido nas proporções de 5% m/m (B), 10% m/m (C) e 20% m/m (D).

Como observado, a presença de mais de 5% (m/m) de soro ou amido no leite em pó provocam modificações no perfil do espectro Raman, principalmente nas regiões que possuem modos característicos desses componentes, as amostras adulteradas podem ser identificadas comparando os espectros de uma amostra suspeita de fraude com o de uma amostra considerada padrão.

### 6.2.2 Análise de Componentes Principais

No intuito de verificar a formação de agrupamentos entre as amostras de leite em pó comerciais e as amostras adulteradas no laboratório, realizou-se a análise de componentes principais. Foram construídos dois modelos de PCA, um para as amostras de leite integral e outro para as amostras de leite desnatado, uma vez que, no modelo construído para os diferentes tipos de leite (item 7.1.2) observou-se a separação das amostras de acordo com sua classificação.

No modelo construído para as amostras de leite em pó integral foram escolhidas 6 CP's, que representam 94,31% da variância total. Através do gráfico de escores da CP 1 versus a CP 2, Figura 26, nota-se que as amostras comerciais ficaram bem agrupadas, já as amostras adulteradas com soro, com amido e com ambos, não formaram grupos distintos. As amostras com adição de soro e/ou de amido com quantidades menores que 5% (m/m) ficaram próximas das amostras de leite comercial. Na região central do gráfico dos escores observa-se a presença das amostras modificadas com soro, amido e com ambos nas proporções de 5 a 15% (m/m). Somente a partir de 15% (m/m) de adulterante verificou-se a separação das amostras adulteradas de acordo com o tipo de fraude cometida. Os resultados obtidos mostram que o modelo das componentes principais não consegue distinguir as amostras contendo adição de adulterante menor que 5% (m/m), indicando que as informações fornecidas pelo espectro Raman não apresentam sensibilidade para distinguir amostras adulteradas com baixas quantidades de adulterante.

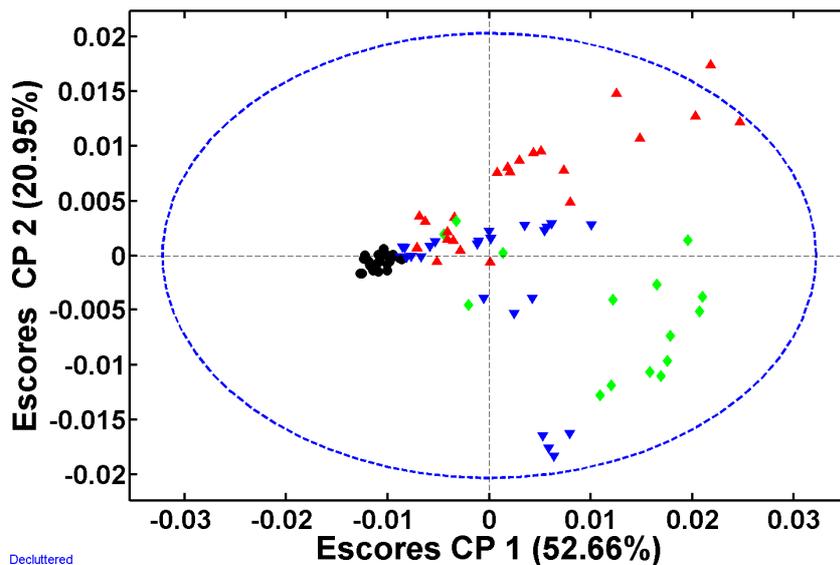


FIGURA 26: Gráfico de escores PC1 versus PC2 das amostras de leite integrais comerciais (●) e adulteradas com soro (▲); com amido (▼) e com ambos (◆).

O gráfico dos pesos da primeira componente principal, Figura 27, mostra as regiões do espectro Raman que possuem importância na separação das amostras. As modificações de intensidade que ocorrem na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$ ,  $2800\text{ cm}^{-1}$ , bem como nas bandas em  $1441\text{ cm}^{-1}$  e  $477\text{ cm}^{-1}$  são as que mais contribuem para a distribuição das amostras no gráfico de escores. Ou seja, são nestas regiões do espectro Raman do leite em pó que ocorrem as maiores variações com a adição de soro e amido.

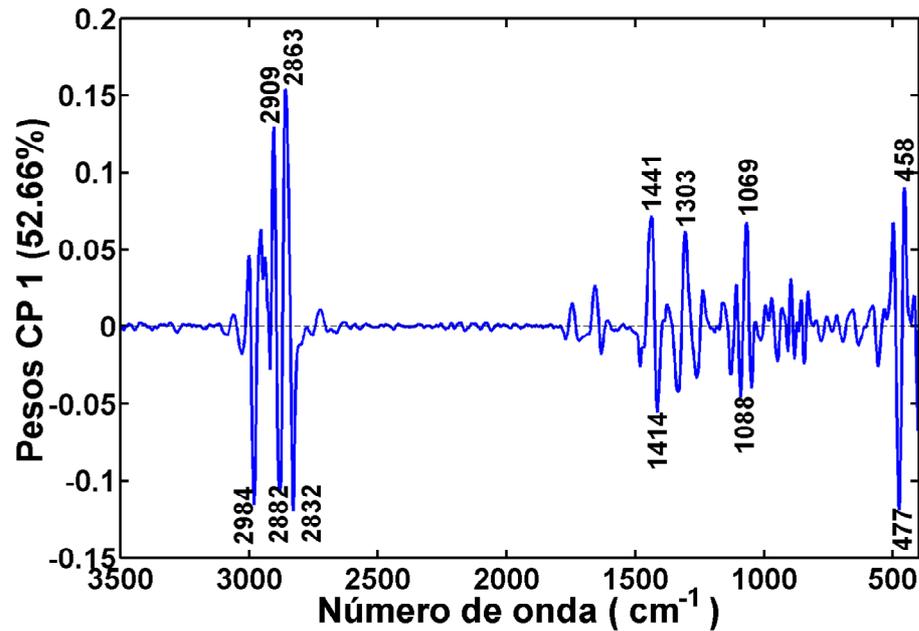


FIGURA 27: Gráfico de pesos do CP 1 versus os números de onda (variáveis).

Na análise dos componentes principais para as amostras de leite desnatado foram utilizadas 5 CP's que representam 92,19% da variância dos dados. No gráfico dos escores verifica-se a separação das amostras comerciais das adulteradas. As amostras localizadas na região central do gráfico de escores referem-se às amostras de leite desnatado que apresentaram espectros Raman diferente das demais, como discutido na sessão 6.1.2. As amostras adulteradas com soro em quantidades menores que 5% (m/m) ficaram próximas das amostras comerciais; como mostrado anteriormente, pequenas modificações ocorrem com adições de 5% (m/m) de soro ou amido nos espectros das amostras de leite. Para as amostras de leite com teores de amido acima de 15% e para as misturas ternárias não conseguiu-se uma boa distinção entre as amostras, esses resultados são mostrados na Figura 28.

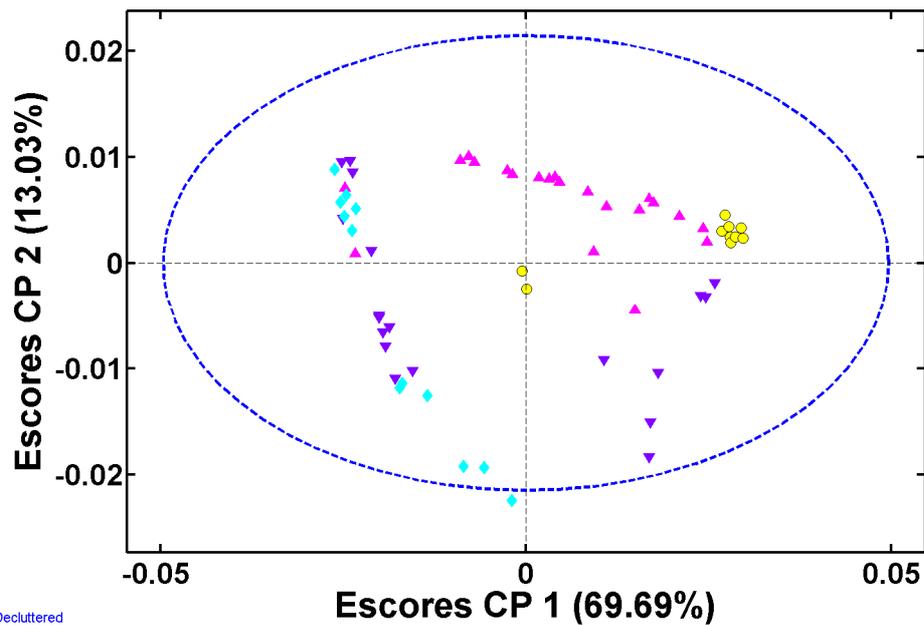


FIGURA 28: Gráfico de escores CP 1 versus CP 2 das amostras de leite desnatados comerciais (●) e adulteradas com soro (▲); com amido (▼) e com ambos (◆).

Analisando o gráfico dos pesos (Figura 29) observa-se a contribuição das bandas que separam as amostras; dentre elas destacam-se a região entre  $1200$  a  $800\text{ cm}^{-1}$ , região tipicamente atribuída a modos vibracionais de carboidratos. As bandas na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  sofrem aumento de intensidade devido à adição de soro e o aumento da intensidade da banda em  $477\text{ cm}^{-1}$ , pode ser atribuída à presença de amido. Este resultado contribui para a utilização de tal banda como marcadora na identificação de amido em leite em pó.

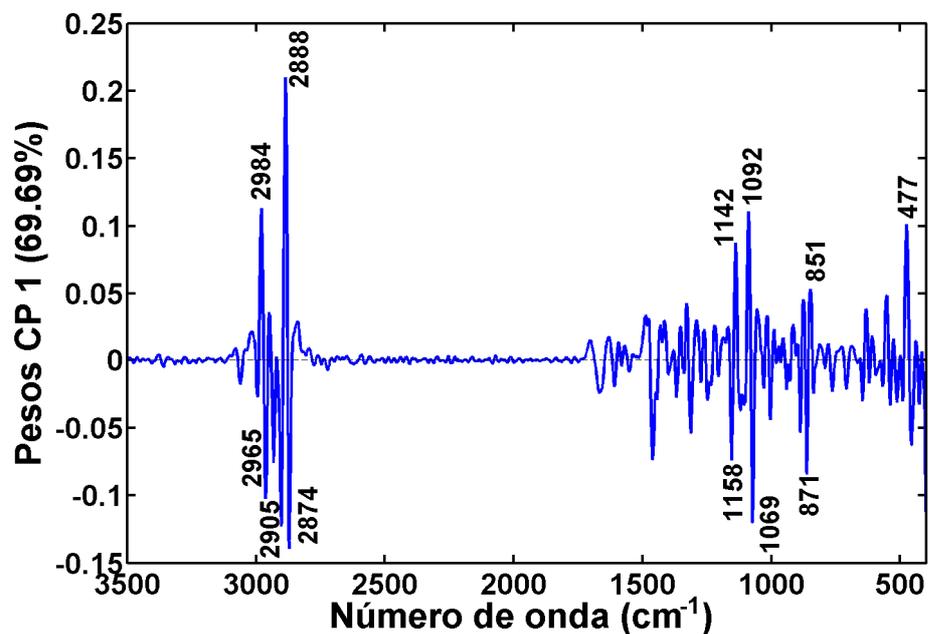


FIGURA 29: Gráfico de pesos do CP 1 versus os números de onda (variáveis).

Os modelos construídos empregando a PCA, não conseguiram separar de forma satisfatória as amostras de leites comerciais das amostras de leites com pequenas quantidades de soro ou amido. Os resultados foram satisfatórios para quantidade de adulterantes acima de 5% (m/m) e a separação das amostras de acordo com o tipo de fraude praticada aconteceu somente acima de 15% de adição de soro e/ou amido.

### 6.2.3 Análise discriminante com o método dos mínimos quadrados parciais

O método de classificação PLS-DA foi empregado com o objetivo de distinguir melhor os espectros Raman dos leites comerciais dos espectros das amostras adulteradas em laboratório. Um modelo de treinamento foi construído por meio do uso de amostras alocadas em classes previamente conhecidas. Uma vez validado, o modelo pode ser utilizado para prever se uma amostra nova contém ou não adulterante e qual adulterante está presente.

Os valores previstos pelo modelo PLS-DA são 0 para as amostras que não pertencem à classe que está sendo modelada, e 1 para as amostras que pertencem a esta classe; entretanto, observa-se que os valores se aproximam de 1. É calculado um valor limite entre os valores previstos, onde as amostras acima deste valor indicam que estas pertencem à classe modelada.

O desempenho do modelo foi avaliado com base na classificação correta da amostra, expresso em termos de porcentagem; na sensibilidade, que é a capacidade do modelo de reconhecer uma amostra de uma determinada classe como pertencente a esta classe, e na especificidade, que é a capacidade de reconhecer amostras que não são de determinada classe como não pertencente a esta classe.

Para as amostras de leite integral empregou-se o PLS-DA com 5 variáveis latentes. A classe 1 do modelo representa as amostras comerciais, ou seja, sem adição de soro e/ou amido; a classe 2 descreve as amostras de leite em pó com soro (1-50% m/m); a classe 3 representa as amostras de leite em pó com amido (1-30% m/m) e as amostras com adição de soro e amido são representadas pela classe 4.

Os resultados obtidos para classe 1 encontram-se na Figura 30. As amostras acima da linha tracejada foram classificadas como amostras sem adulteração de soro e/ou amido. O modelo foi capaz de prever corretamente 96,25% das amostras na etapa de validação. Todas

as amostras comerciais do conjunto de previsão foram classificadas corretamente, sendo a sensibilidade do modelo de 100%. No entanto, observou-se que amostras de leite em pó com 1, 2 e 3% m/m de soro foram classificadas como amostras sem adição desse componente, assim como as amostras de leite em pó com 1 e 2% m/m de amido. A especificidade do modelo para as amostras de previsão foi de 92,5%.

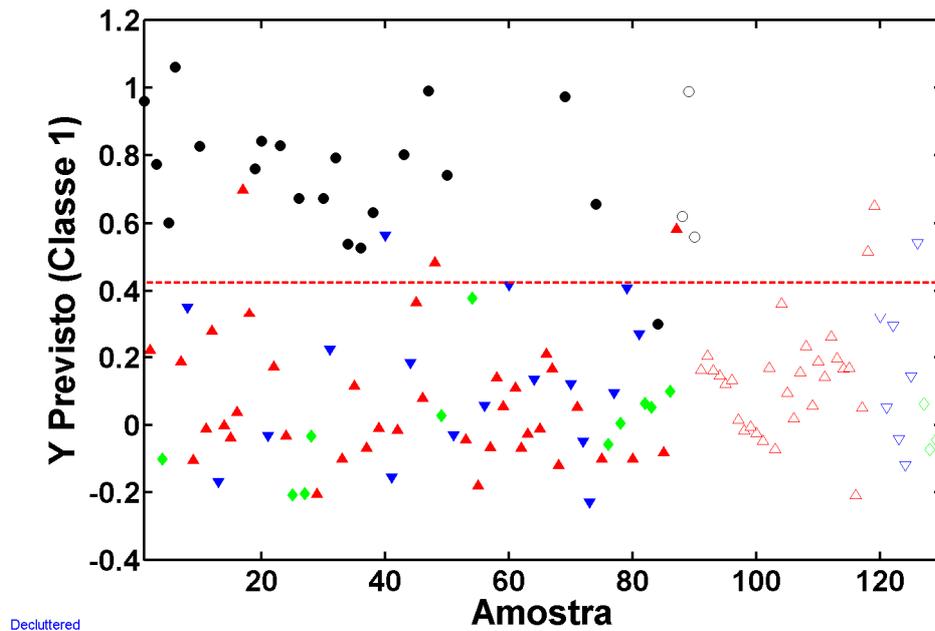
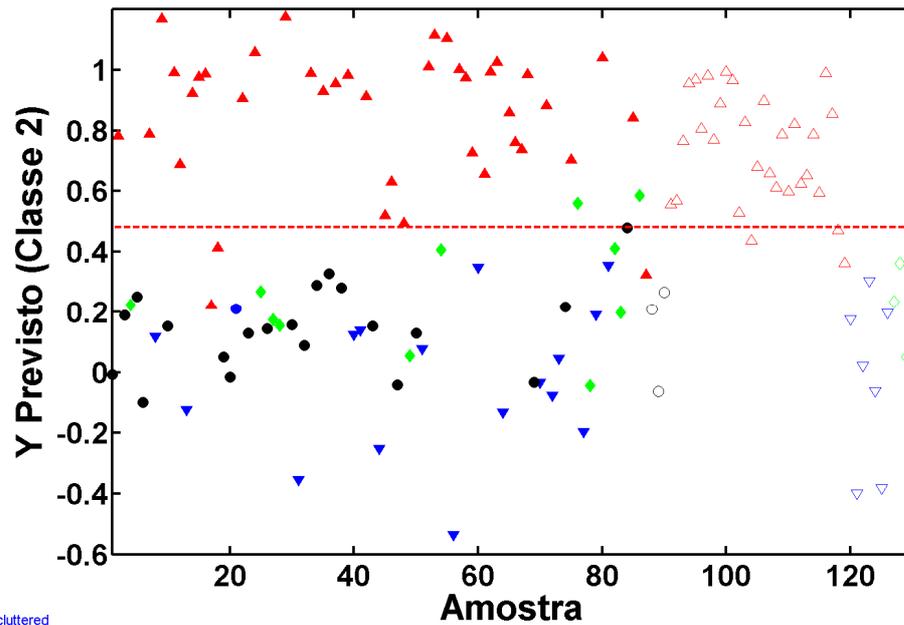


FIGURA 30: Classificação das amostras de leite em pó integral sem adição de soro e/ou amido (● – calibração; ○ – validação); as amostras classificadas como sem adulteração encontram-se acima da linha tracejada.

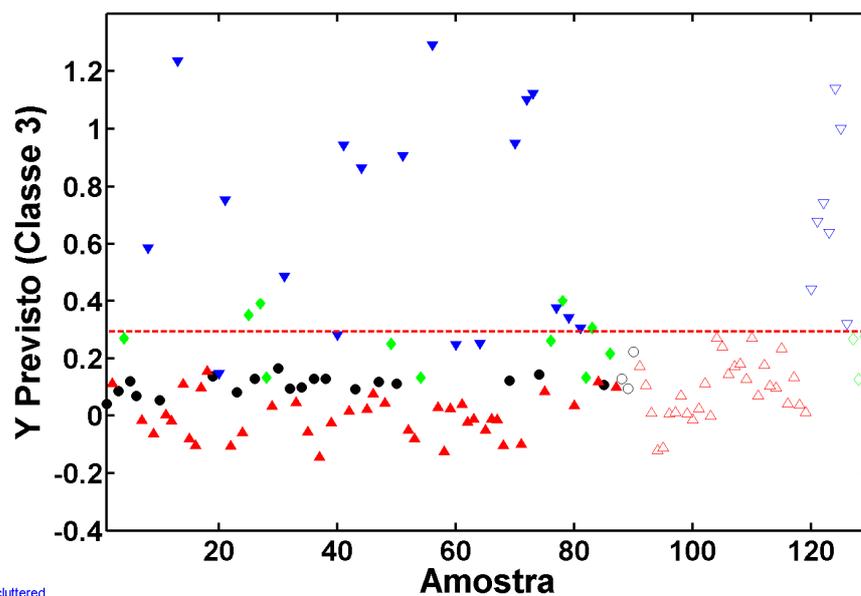
Para as amostras de leite em pó com soro, representadas na Figura 31 pela classe 2, 94,07% das amostras de calibração e 94,83% das amostras de validação foram classificadas corretamente. Mais uma vez, as amostras com baixo teor de soro não foram identificadas adequadamente. Observa-se que no grupo das amostras de calibração, amostras com adição de soro e amido foram classificadas como amostras contendo apenas soro, estas amostras foram identificadas e possuem cerca de 20% m/m de soro e de 5 a 7% m/m de amido.



Decolored

FIGURA 31: Classificação das amostras de leite em pó integral adulteradas com soro ( $\blacktriangle$  – calibração;  $\triangle$  – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada.

Na Figura 32 são mostrados os resultados para as amostras de leite em pó com adição de amido. Na etapa de previsão, todas as amostras com amido foram classificadas corretamente. Para o conjunto de calibração observou-se que as amostras contendo soro e amido foram identificadas como amostras contendo apenas amido.



Decolored

FIGURA 32: Classificação das amostras de leite em pó integral adulteradas com amido ( $\blacktriangledown$  – calibração;  $\triangledown$  – validação); as amostras classificadas como adulteradas com amido encontram-se acima da linha tracejada.

Para as amostras de leite em pó com soro e amido (misturas ternárias), representadas na Figura 33, as amostras com alto teor de soro e baixo teor de amido não foram classificadas corretamente e as amostras contendo apenas amido foram identificadas como contendo soro e amido. As mudanças que ocorrem nos espectros Raman das amostras com a presença de soro e amido são semelhantes às mudanças que ocorrem nos espectros das amostras com apenas um componente, justificando assim os resultados observados para o conjunto de dados em questão.

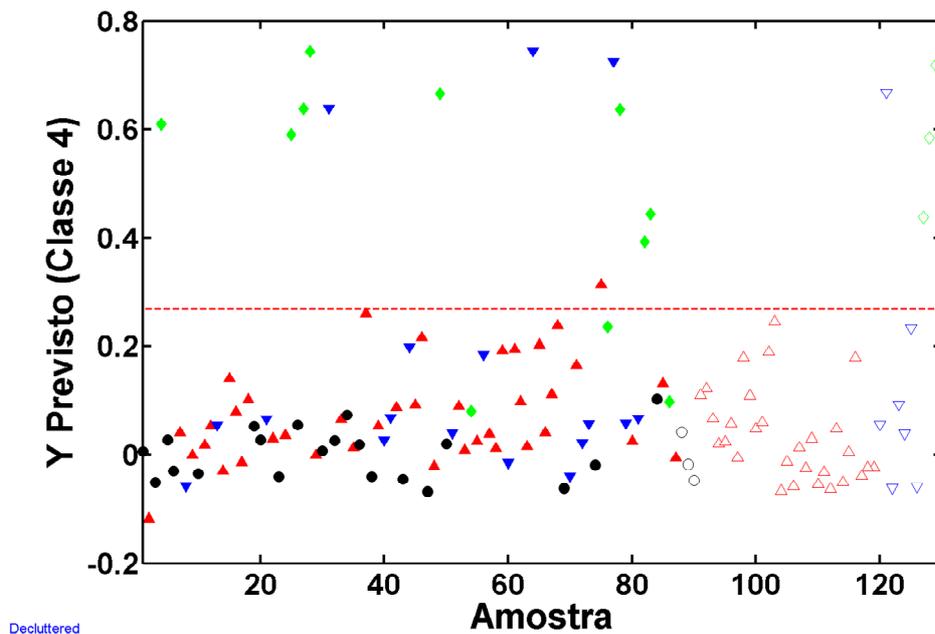
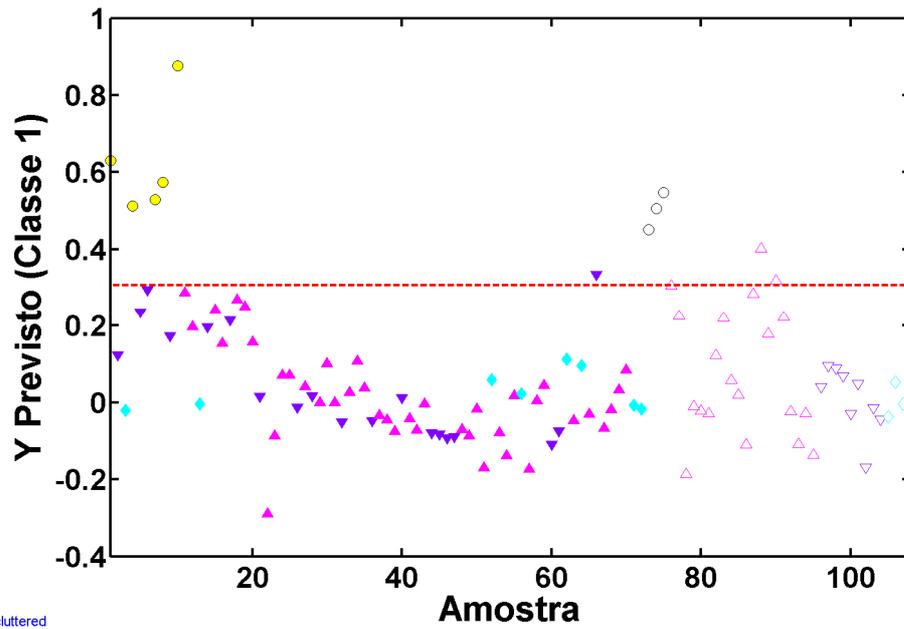


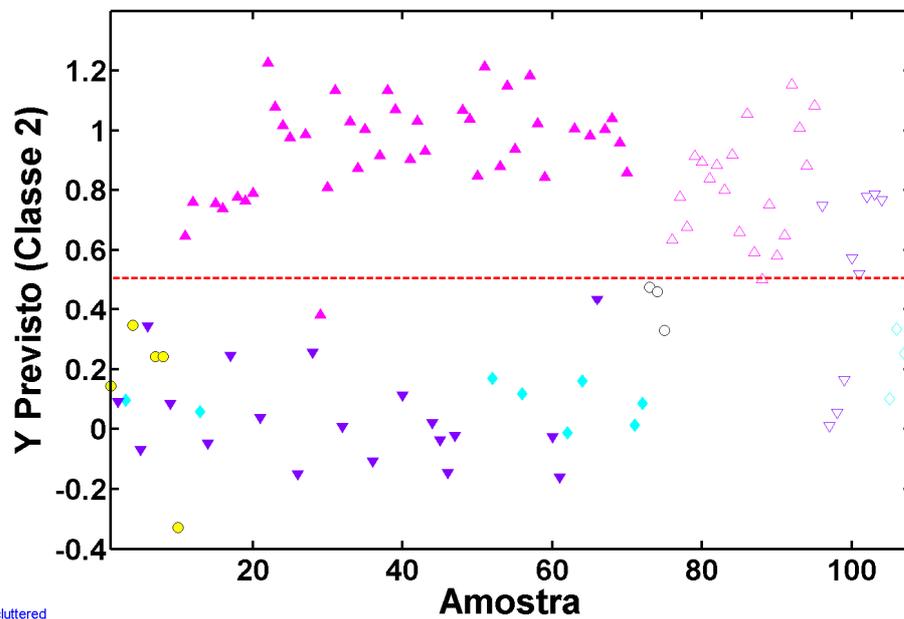
FIGURA 33: Classificação das amostras de leite em pó integral adulteradas com soro e amido (◆ – calibração; ◇ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada.

O PLS-DA também foi empregado para as amostras de leite desnatado com 5 variáveis latentes. A classe 1 do modelo representa as amostras comerciais; a classe 2 descreve as amostras com soro (1-50% m/m); a classe 3 as amostras de leite em pó com amido (1-30% m/m) e as amostras com adição de soro e amido são representadas pela classe 4. Para as amostras de leite desnatado, resultados semelhantes ao do leite integral foram obtidos como pode ser verificado nas Figuras 34, 35, 36 e 37. Mais uma vez, os modelos construídos não conseguiram classificar as amostras contendo de 1 a 3% m/m de adulteração de forma adequada.



Decoloured

FIGURA 34: Classificação das amostras de leite em pó desnatado sem adição de soro e/ou amido (● – calibração; ○ – validação); as amostras classificadas como sem adulteração encontram-se acima da linha tracejada.



Decoloured

FIGURA 35: Classificação das amostras de leite em pó desnatado adulteradas com soro (▲ – calibração; △ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada.

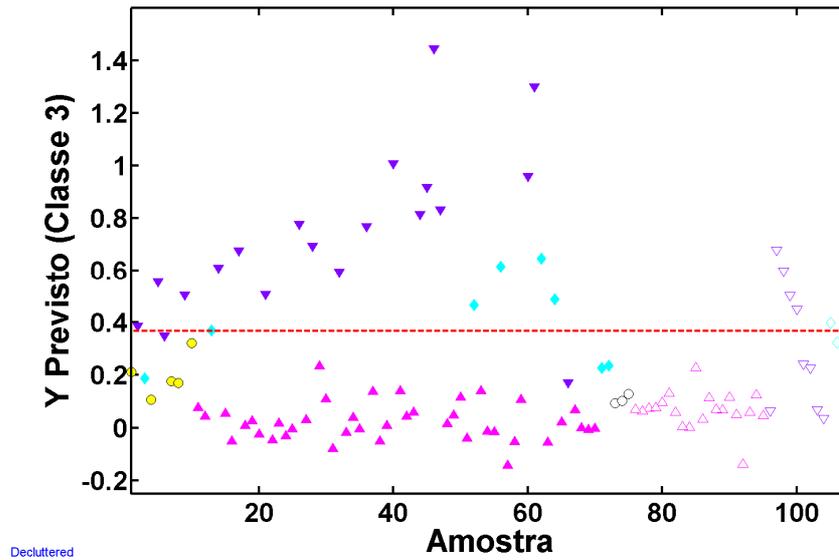


FIGURA 36: Classificação das amostras de leite em pó desnatado adulteradas com amido (▼ – calibração; ▽ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com amido encontram-se acima da linha tracejada.

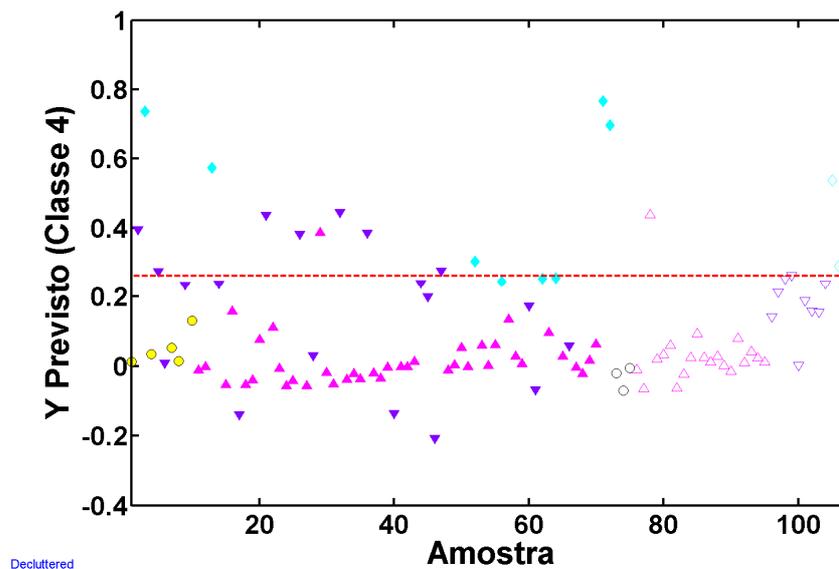


FIGURA 37: Classificação das amostras de leite em pó desnatado adulteradas com soro e amido (◆ – calibração; ◇ – validação); as amostras classificadas como adulteradas com soro encontram-se acima da linha tracejada.

Os modelos construídos empregando PLS-DA apresentaram resultados melhores para a identificação das amostras de leite em pó, como adulteradas ou não, do que a PCA, principalmente para baixas concentrações. As informações fornecidas pelos espectros Raman das amostras de leite juntamente com esta ferramenta podem auxiliar na identificação de leites adulterados com concentrações da ordem de até 3% (m/m) e podem ser empregadas como teste de *screening*, onde permitem a classificação em categorias como negativo, positivo ou suspeito para adição de soro, amido e ambos.

### 6.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE SORO E AMIDO EM AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ

Nesta etapa do trabalho foram construídos modelos de calibração multivariada, empregando a regressão por PLS, para determinação de soro e amido em amostras de leite em pó utilizando os espectros Raman das amostras de leite com e sem adição de adulterante.

Na construção do modelo de regressão, para a determinação do teor de soro nas amostras de leite em pó integral, empregou-se 75 amostras com concentrações de soro variando de 0 a 50% (m/m). A escolha do número de variáveis latentes foi feita com base no menor valor do RMSECV; o número escolhido para o modelo final foi de 5 variáveis latentes com RMSECV de 3,13%. A Figura 38 mostra a correlação entre os valores de referência (quantidades de soro adicionadas no laboratório) com os valores previstos pelo PLS utilizando as informações fornecidas pelos espectros Raman das amostras.

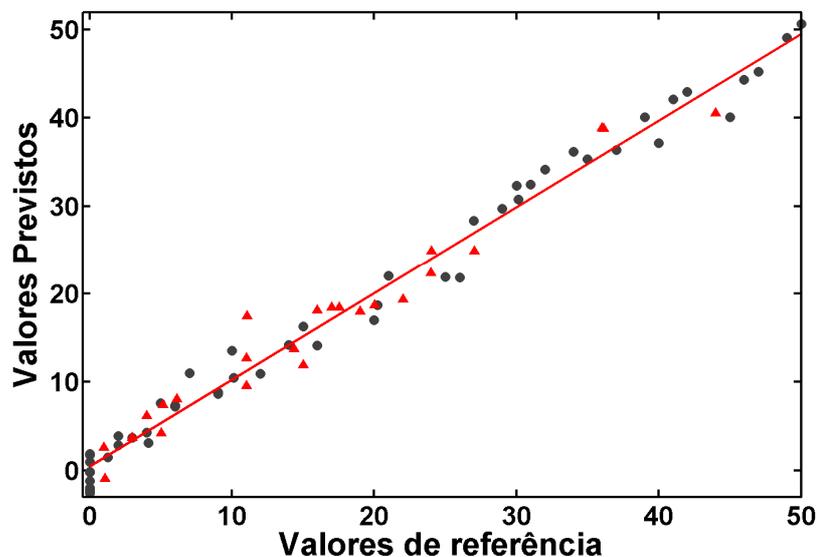


FIGURA 38: Valores previstos pelo PLS versus os valores de referência da % (m/m) de soro adicionado no leite em pó. Amostras de calibração (●) e amostras de validação (▲).

A avaliação da performance do modelo foi realizada através da determinação dos valores previstos pelo modelo, seus respectivos erros relativos e do valor de RMSEP, que expressa o grau de concordância entre o valor estimado pelo modelo e o valor de referência. O RMSEP obtido para a determinação de soro nas amostras de leite em pó foi de 2,32% (m/m), a curva de correlação entre os valores de referência e os previstos pela regressão PLS foi de 0,96. Na avaliação dos erros relativos, observou-se que estes foram maiores para as amostras

com baixos teores de soro. Para algumas amostras com adição de soro abaixo de 5% (m/m) os erros relativos foram de até 50%, para as demais amostras, os erros relativos ficaram abaixo de 15%, a média dos erros relativos para o modelo foi de 30%. Uma amostra de leite em pó com adição de 1% (m/m) de soro foi prevista como amostra sem adição de soro.

A Figura 39 mostra a curva dos valores previstos contra os valores de referências para a determinação de amido nas amostras de leite em pó, o coeficiente de regressão da curva é de 0,98, o que mostra uma boa relação entre os valores de referência e os valores previstos pela regressão PLS. Para construção do modelo foram empregadas 30 amostras (20 amostras para a calibração e 10 para a validação), o número de variáveis latentes escolhido foi igual a 4, esta escolha foi baseada no menor valor de RMSECV de 1,60% (m/m). O RMSEP do modelo final apresentou valor de 1,31% (m/m), e os erros relativos foram menores que 10% para a maioria das amostras de previsão. Cabe ressaltar que duas amostras apresentaram erros relativos de 50 e 21%, referentes a amostras com adição de 1 e 3% (m/m) de amido, respectivamente.

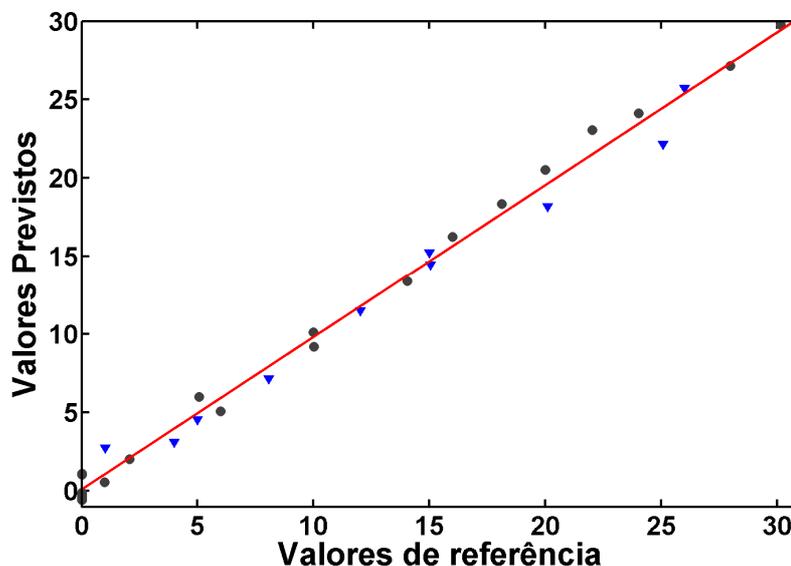


FIGURA 39: Valores previstos pelo PLS versus os valores de referência da % (m/m) de amido adicionado no leite em pó. Amostras de calibração (●) e amostras de validação (▼).

Uma observação importante é que, nos modelos de regressão PLS para o soro e o amido, os valores de previsão para algumas amostras sem adição de adulterante aparecem com valores diferentes de zero, ou valores negativos ou maiores que zero, neste caso, a análise pode indicar um resultado falso positivo de fraude. Esse resultado também foi

observado para os modelos PLS construídos por Borin e colaboradores (2006) para determinação de soro, amido e sacarose em leite em pó utilizando espectroscopia NIR.

Na análise dos pesos da primeira variável latente das amostras de leite com soro, mostrada na Figura 40, observa-se que as regiões do espectro Raman que contribuem para o modelo de regressão são aquelas que sofrem alterações nas suas intensidades; entre elas, as regiões de  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$ , tais regiões possuem modos vibracionais relacionados com a presença de lipídeos, e está relacionado com a diluição desse nutriente nas amostras de leite em pó adulteradas. Outras bandas que também sofrem alterações são observadas em 1080, 860 e  $850\text{ cm}^{-1}$ , todas características do dissacarídeo lactose. Para as amostras com a presença de amido, o gráfico dos pesos na Figura 41 mostra que as regiões que mais colaboram para a regressão estão em  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas com a mudança nas quantidades de lipídeos e a contribuição da banda em  $477\text{ cm}^{-1}$ , indicadora da presença de amido.

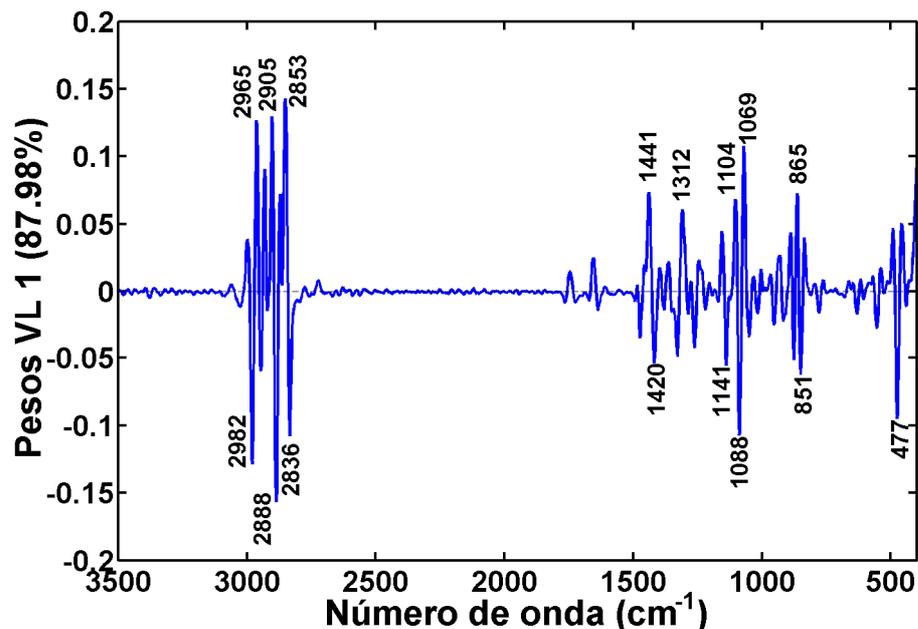


FIGURA 40: Gráfico dos pesos da VL 1 versus os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do soro.

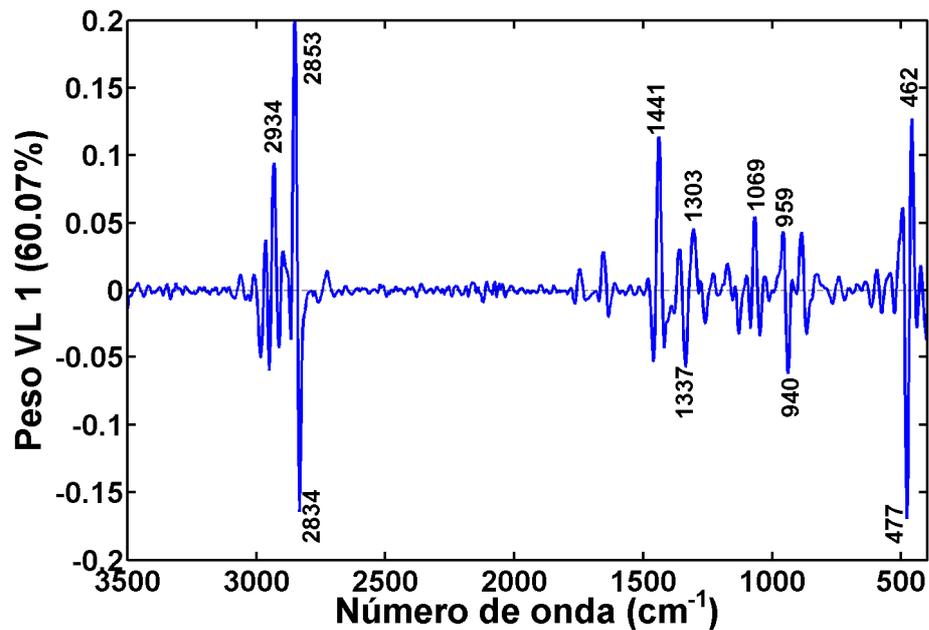


FIGURA 41: Gráfico dos pesos da VL 1 versus os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do amido.

Os modelos construídos para as amostras de leite em pó desnatado apresentaram resultados inferiores ao do leite integral. O valor de RMSEP do modelo de regressão para o soro foi de 4,20% (m/m) e do amido de 2,44% (m/m). A curva de correlação entre os valores previstos pelo PLS e os valores de referência para as amostras com adição de soro foi de 0,95 e para adição de amido de 0,96. Uma explicação para o resultado obtido é o fato das amostras de leite desnatado possuírem alto teor de carboidrato, em torno de 50% (m/m). Desta forma, a adição de pequenas quantidades de soro ou amido não é relevante para o modelo, causando erros altos de previsão.

A medida que as amostras ficam mais complexas, como no caso das misturas ternárias, acontece uma diminuição da capacidade de previsão do modelo, com aumento nos erros de validação cruzada e previsão. Para as misturas ternárias de leite em pó integral, os valores de RMSECV foram de 7,57 % (m/m) para o soro e de 1,94% (m/m) para o amido; os valores de RMSEP obtidos para determinação de soro e amido foram de 3,08 e 1,81% (m/m), respectivamente. A Tabela 11 resume os resultados obtidos para os modelos PLS.

TABELA 12: Valores previstos pelos modelos PLS construídos para as amostras de leite em pó.

Modelo	RMSECV %(m/m)			RMSEP %(m/m)		
	Integral	Desnatado	Misturas ternárias	Integral	Desnatado	Misturas ternárias
<b>Soro</b>	3,13	5,65	7,75	2,32	4,20	3,08
<b>Amido</b>	1,60	3,07	1,94	1,31	2,44	1,81

Os resultados para determinação de amido no leite apresentaram melhores respostas em todos os modelos construídos. Uma justificativa para tal resultado é que o soro apresenta em sua composição constituintes que também estão presentes no leite, o que dificulta a regressão e faz com que os modelos para quantificação de soro no leite apresentem resultados inferiores ao do amido. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Borin e co-autores (2006), onde empregaram espectroscopia NIR e modelos PLS para quantificar amido, soro e sacarose em amostras de leite em pó.

A fim de otimizar os modelos de regressão construídos para soro e amido recorreu-se aos métodos de seleção de variáveis, que envolve a escolha de determinadas regiões do espectro a construção da regressão. Foi empregado o iPLS, que é um algoritmo que divide o conjunto de dados, neste caso os espectros Raman, em um certo número de intervalos equidistantes e calcula-se um modelo PLS para cada intervalo. Sendo escolhido o intervalo ou a faixa espectral que apresente menor erro em relação ao modelo utilizando todo o espectro. O iPLS foi aplicado aos dados deste trabalho, no entanto, forneceu resultados semelhantes ou inferiores aos modelos construídos utilizando toda a faixa espectral. Como o iPLS demanda um tempo maior de processamento que o PLS, optou-se por utilizar apenas o PLS com todo o intervalo espectral.

Os valores obtidos para as amostras adulteradas com soro utilizando o modelo PLS foram correlacionados com o método espectrofotométrico da ninidrina ácida proposto por FUKUDA (1994). Esta técnica é empregada como método oficial para determinação quantitativa de ácido siálico no leite pelo MAPA (BRASIL, 2003). O ácido siálico é um componente específico do soro e deve está ausente no leite. Em 2004, Fukuda e co-autores correlacionaram a técnica da ninidrina ácida com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, obtendo resultados tão satisfatórios que, propuseram a técnica tanto como metodologia de *screening*, quanto como metodologia substituta para detectar a presença de soro em leite. Neste teste as amostras são classificadas como negativas para soro quando a concentração de ácido siálico é menor que 5,14 mg/L; são classificadas na categoria de

suspeitas às amostras que apresentam teor de ácido siálico maior que 5,14 mg/L e menor que 7,89 mg/L e as amostras com concentração de ácido siálico maior que 7,89 mg/L de leite são consideradas positivas para soro (PRATA, 2002).

O teste da ninidrina ácida foi aplicado para as amostras comerciais e amostras modificadas em laboratório com soro. Após a obtenção da curva de calibração para determinação de ácido siálico, mostrada na Figura 42, foram feitas as análises quantitativas para as amostras de leite em pó. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

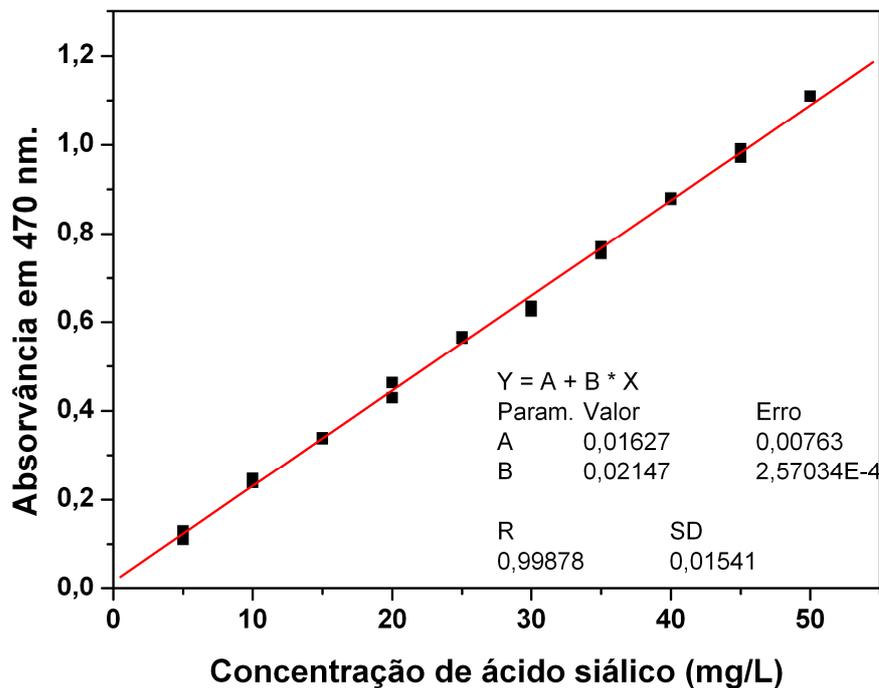


FIGURA 42: Curva de calibração do ácido siálico para o método da ninidrina ácida.

TABELA 13: Medidas de ácido siálico no leite em pó comercial e adulterado com soro pelo método da ninidrina ácida.

Amostra	Soro adicionado % (m/m)	Absorvância em 470 nm	Concentração de ácido siálico (mg/L)
1	0	0,117	4,69
2	0	0,126	5,11
3	1,02	0,140	5,76
4	2,13	0,165	6,93
5	5,03	0,316	13,96
6	10,06	0,376	16,75
7	15,16	0,595	26,95
8	20,11	0,759	34,59

As amostras comerciais apresentaram teor de ácido siálico entre 4,69 mg/L e 5,11 mg/L e foram classificadas como negativas para soro de acordo com PRATA (2002). As amostras de leite em pó com adição de soro entre 1 e 2 % m/m enquadraram-se na categoria suspeitas e as amostras com adição de 5% m/m ou mais apresentaram teor de ácido siálico maior que 7,89 mg/L e foram classificadas como positivas para soro. Diante desses resultados, as porcentagens de adição de soro ao leite em pó foram correlacionadas com os resultados obtidos pelo método da ninidrina ácida, construiu-se uma curva dos valores de absorvância em 470 nm versus a concentração de soro adicionada, como mostrado na Figura 43.

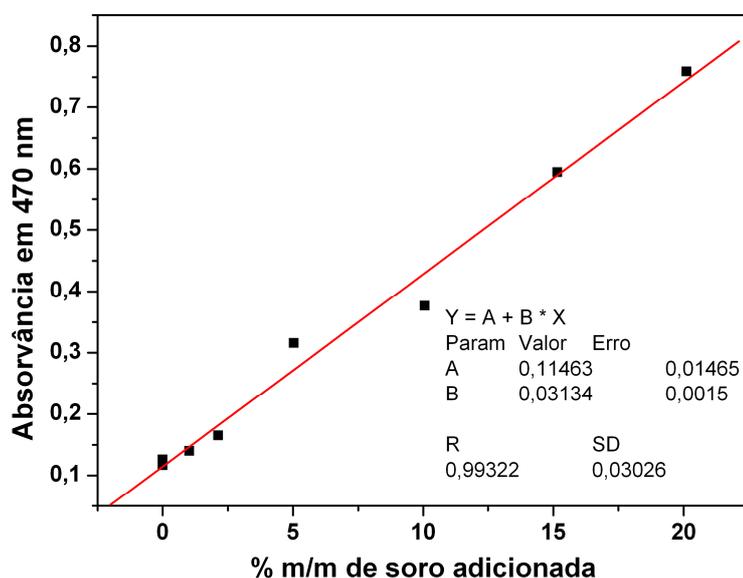


FIGURA 43: Correlação entre a quantidade de soro adicionada e a leitura em 470 nm pelo método da ninidrina.

A regressão mostrou-se linear com coeficiente de correlação igual a 0,993. A partir da equação da reta obtida para o método da ninidrina ácida, novas amostras de leite em pó comerciais e adulteradas em laboratório foram analisadas. Assim como foram previstas pelo modelo PLS através dos seus espectros Raman.

Os valores obtidos no modelo PLS para novas amostras foram comparados com os valores obtidos pela metodologia espectrofotométrica da ninidrina ácida. Na Tabela 13 são apresentados os resultados obtidos para os dois métodos.

TABELA 14: Previsão das amostras de leite em pó comercial e adulterado com soro empregando a regressão por PLS e a metodologia de ninidrina ácida.

Soro adicionado % (m/m)	Valores previstos pelo PLS % (m/m)	Valores previstos pelo método da ninidrina ácida % (m/m)
0	-1,32	0,36
0	2,12	0,23
1,01	1,47	0,78
2,13	2,82	0,65
5,03	7,40	2,82
10,10	10,49	7,19
15,02	11,91	10,67
20,24	18,69	21,45
<b>RMSEP</b>	<b>1,77</b>	<b>2,12</b>

O modelo PLS para determinação de soro nas amostras de leite em pó estudadas foi capaz de quantificar adequadamente amostras a partir de 2% m/m de soro. Porém, a grande dificuldade do modelo PLS é a incapacidade de prever corretamente a ausência de soro nas amostras em estudo.

O teste F foi realizado para comparar os valores obtidos pela metodologia da ninidrina ácida e os valores fornecidos pelo PLS. O valor de F calculado foi de 1,43 e o valor teórico é 4,99 para 7 graus de liberdade. Este resultado mostra que não existe diferença significativa em um intervalo de 95% de confiança entre os valores fornecidos pela regressão PLS e a metodologia da ninidrina ácida.

Como a técnica de espectroscopia Raman não necessita de preparo de amostra, permitindo, dessa forma, uma análise rápida de um grande número de amostras, podemos propor tal técnica como teste de *screening* para determinação de soro em amostras de leite em pó empregando o modelo de regressão por PLS.

#### 6.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ ARMAZENADAS

As modificações nos espectros Raman dos leites armazenados variou de acordo com as condições de estocagem. Para amostras estocadas na temperatura e umidade ambiente ocorreram modificações nos espectros Raman após quatro meses de armazenamento. Para as amostras armazenadas em dessecadores de vidro, as modificações só foram observadas a partir do sexto mês de estocagem para o leite integral, e após oito meses para o leite desnatado. Com base nestes resultados, pode-se inferir que a presença de oxigênio atmosférico e o aumento da umidade no ambiente podem acelerar o processo de perda da qualidade do leite em pó.

Os espectros Raman do leite desnatado após quatro meses armazenado em embalagens plásticas na temperatura e umidade ambiente, e em dessecadores de vidro são mostrados na Figura 44. As principais mudanças ocorrem na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , e principalmente na região entre  $1200$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ ; estas alterações no perfil dos espectros podem ser atribuídas ao início do processo de mudança de fase da lactose amorfa para a lactose cristalina, durante a qual ocorre o aparecimento de novas bandas, devido ao abaixamento de simetria que ocorre na passagem da forma amorfa para a forma cristalina (CELEDON e AGUILERA, 2002).

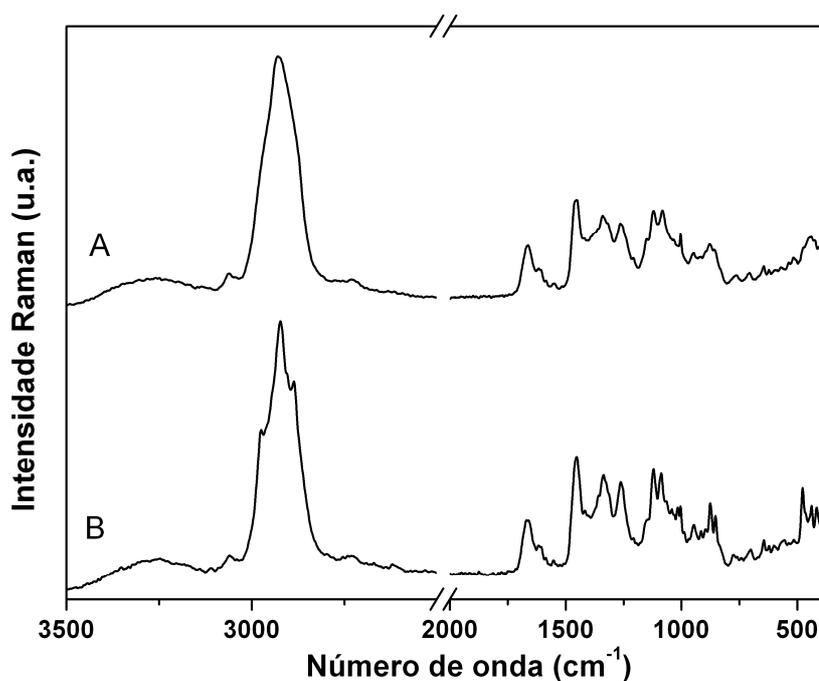


FIGURA 44: Espectro Raman da amostra de leite em pó desnatado armazenado durante quatro meses em dessecador (A) e em embalagem plástica fora do dessecador (B).

Para as amostras de leite integral também foram observadas mudanças nos espectros Raman. Estas modificações podem ser observadas na Figura 45, que mostra o espectro Raman das amostras armazenadas durante quatro meses dentro e fora do dessecador. A presença de lipídeos insaturados no leite integral favorece as reações de oxidação, sendo os produtos desta reação responsáveis pelo sabor e odor de ranço no leite em pó (ROMEU-NADAL, *et al.*, 2007).

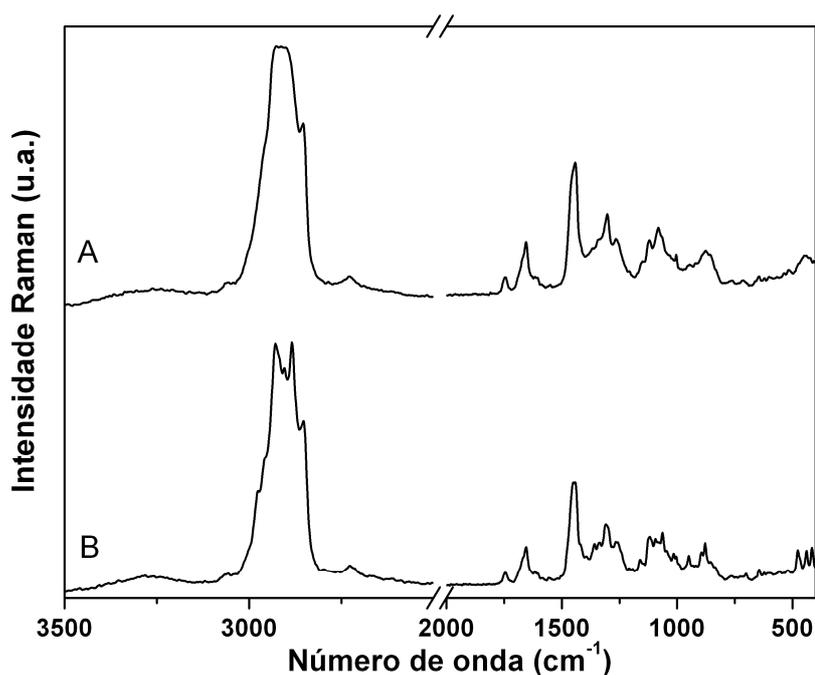


FIGURA 45: Espectro Raman do leite em pó integral armazenado dentro (A) e fora (B) do dessecador em um período de quatro meses.

Uma investigação da oxidação de lipídeo é dificultada através da análise dos espectros Raman das amostras armazenadas, uma vez que as regiões que caracterizariam esse processo, como a região em  $1650\text{ cm}^{-1}$ , que envolve os modos de estiramento  $\text{C}=\text{C}$  dos compostos insaturados, também possui contribuição de modos relacionados a proteínas. As mudanças ocorridas na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  são difíceis de serem associadas à modificação na estrutura de lipídeos, uma vez que envolve modos vibracionais dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Pequenas modificações nas regiões de  $1300\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{CH}_2)$ ],  $1150\text{ cm}^{-1}$  e  $1060\text{ cm}^{-1}$  envolvendo os modos [ $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$ ] ocorreram com o tempo de armazenamento, estas alterações podem estar relacionadas com mudanças na superfície do pó devido a migração dos lipídeos para superfície (KIM, *et al.*, 2009). As outras mudanças observadas estão na região de carboidratos e indicam o início da mudança de fase da lactose amorfa para a lactose cristalina.

A Figura 46 confronta o espectro Raman da lactose cristalina com os espectros Raman de amostras de leite com adição de diferentes quantidades de lactose cristalina. Observa-se que quando o teor de lactose cristalina aumenta na amostra de leite em pó, os modos vibracionais característico desse componente ficam mais evidentes e o formato das bandas são muito similares ao do padrão de lactose. Isso fica bem evidente para o leite desnatado, onde a cristalização da lactose é o principal evento, já para as amostras de leite integral, as mudanças na estrutura dos lipídeos competem com a cristalização da lactose. Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, não é possível afirmar qual evento antecede o outro nas amostras de leite em pó integral.

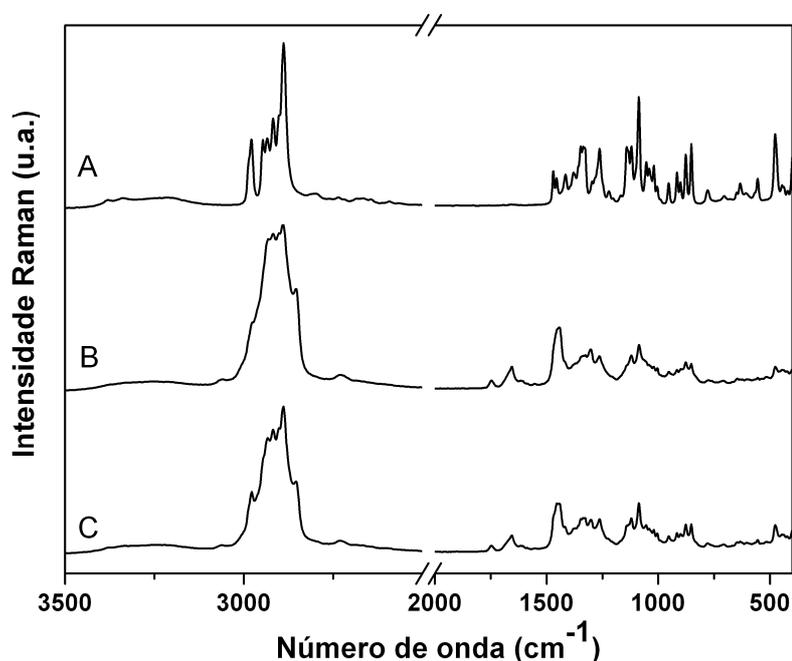


FIGURA 46: Espectro Raman da lactose cristalina (A); do leite em pó com adição de 15% m/m de lactose cristalina (B); e do leite em pó com adição de 20% m/m de lactose cristalina (C).

As modificações que ocorrem nos espectros Raman das amostras armazenadas fora do dessecador podem ser provocadas, principalmente, pelo aumento na quantidade de água. Quando o leite em pó é exposto à umidade relativa alta, o pó absorve água e há um aumento da concentração de água no alimento. Como consequência ocorre uma diminuição da viscosidade e aumento da mobilidade molecular. Esses dois fatores determinam uma série de modificações estruturais dependentes do tempo, tais como: pegajosidade, colapso e cristalização dos componentes amorfos, que diminuem a vida útil do leite em pó.

Para acompanhar a quantidade de umidade nas amostras de leite em pó armazenadas fora do dessecador e possíveis eventos químicos e físicos, foram obtidas as curvas TG/DTA. A Figura 47 mostra as curvas termogravimétricas para o leite desnatado.

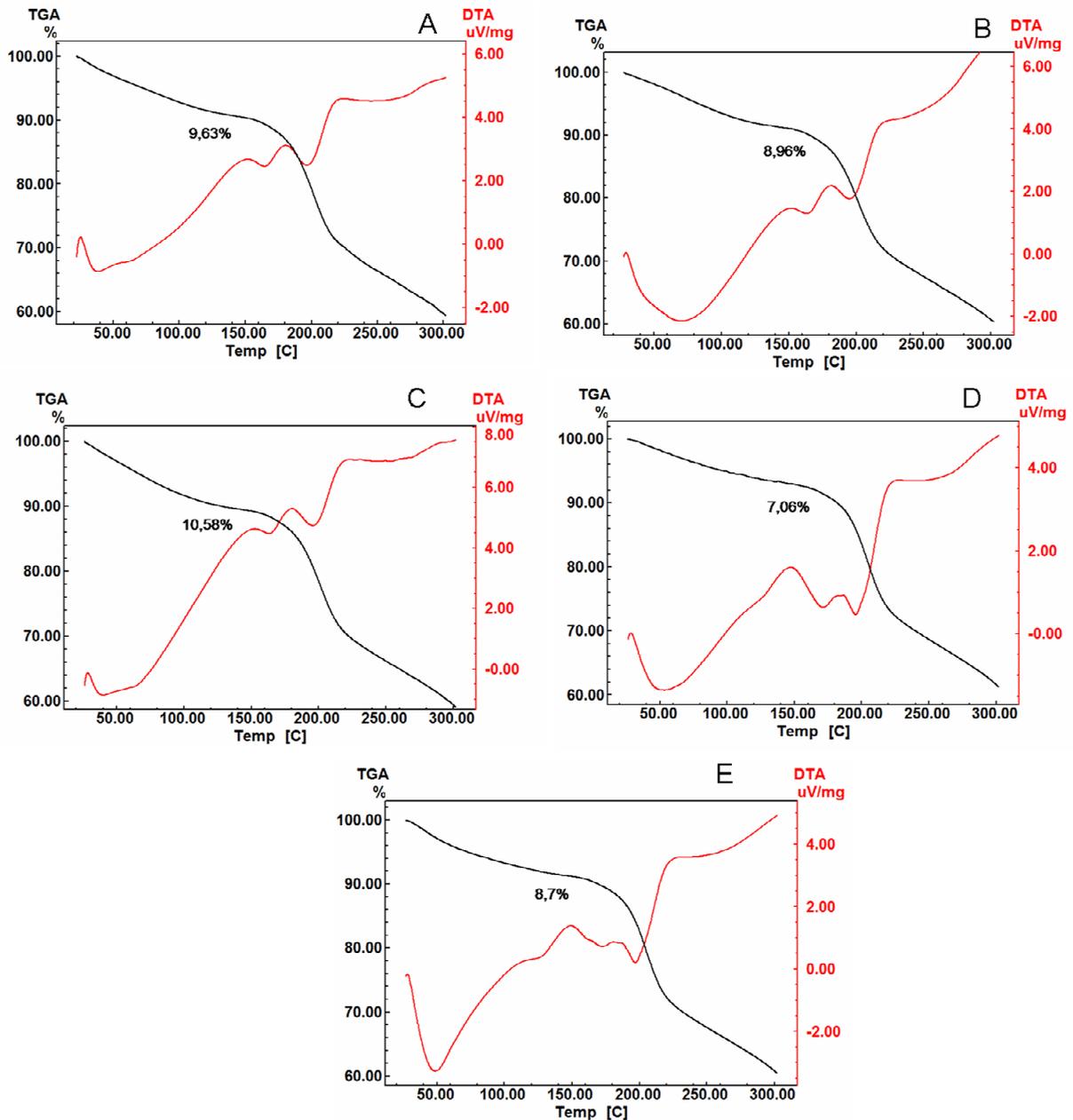


FIGURA 47: Curvas termogravimétricas TG/DTA para o leite desnatado no dia da abertura da embalagem (A); e durante o período de estocagem de: um (B), dois (C), três (D) e quatro (E) meses.

A primeira perda de massa medida pela TGA para as amostras de leite em pó está associada a um evento endotérmico, como mostra a curva DTA. Este evento está associado à saída de moléculas de água. As próximas perdas de massa estão relacionadas a eventos exotérmicos, o primeiro pico exotérmico pode estar relacionado à cristalização da lactose e o

segundo pico pode ser devido à reação de escurecimento não enzimático, reação de Maillard (VUATAZ, *et al.*, 2010). As amostras com mais de três meses de armazenamento começaram a apresentar perfil diferente para as curvas DTA, indicando mudanças na estrutura dos seus componentes, principalmente relacionada à mudança de fase da lactose.

A Figura 48 mostra as curvas termogravimétricas TG/DTA para o leite integral. Após o terceiro mês de estocagem também ocorreram mudanças no perfil da curva DTA do leite integral. Observa-se que a quantidade de água liberada no evento endotérmico é menor que para as amostras de leite desnatado. O leite integral apresenta tendência de absorver menos água que o leite desnatado pelo fato das gorduras serem hidrofóbicas. Isso justifica as modificações relacionadas a cristalização da lactose mais pronunciadas no espectro Raman do leite desnatado do que no integral.

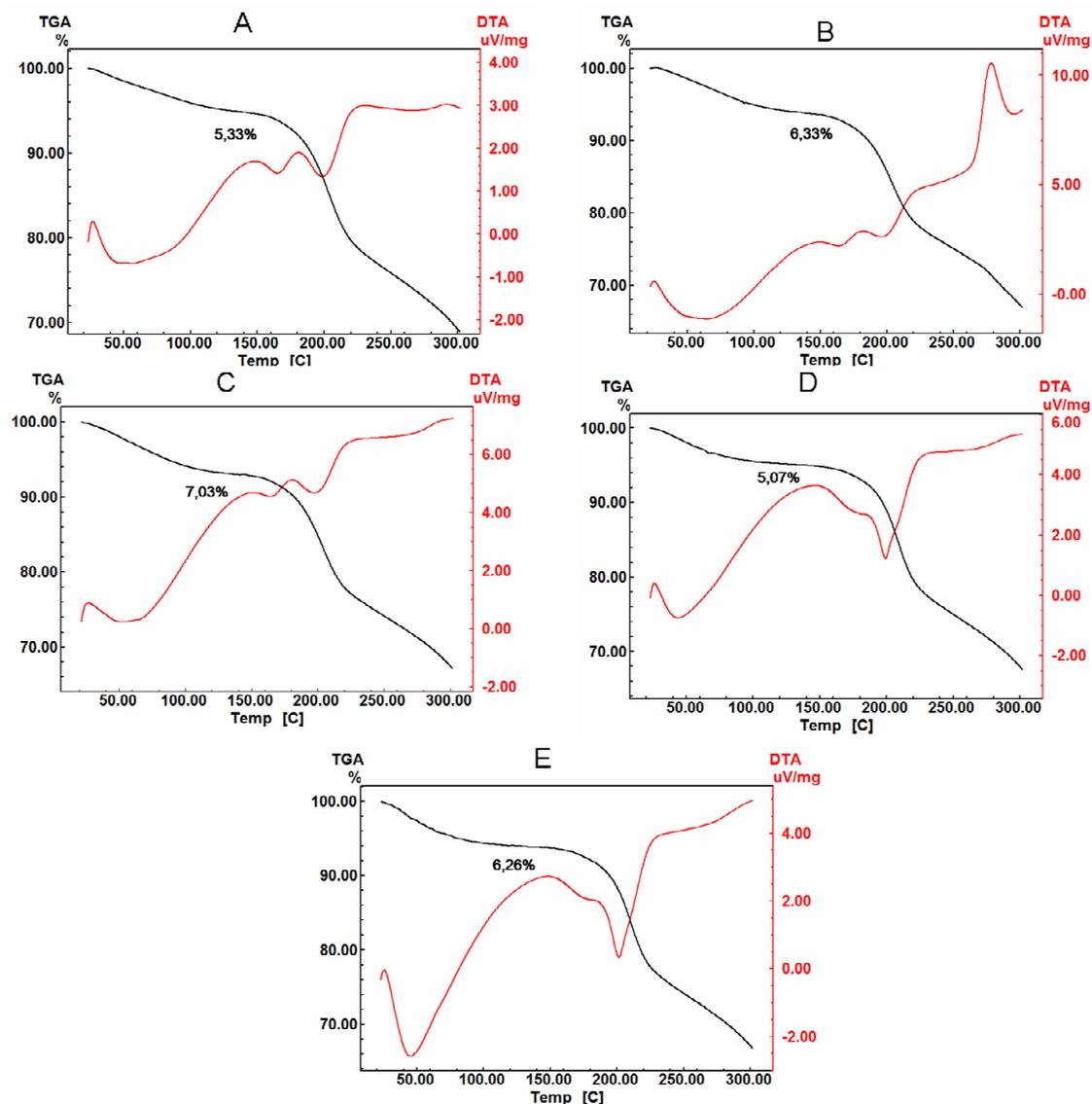


FIGURA 48: Curvas termogravimétricas TG/DTA para o leite integral no dia da abertura da embalagem (A); e durante o período de estocagem de: um (B), dois (C), três (D) e quatro (E) meses.

## 6.5 AVALIAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS DIFERENTES MARCAS DE LEITE CONDENSADO BRASILEIRO

Para esse estudo foram obtidos os espectros Raman de nove marcas de leite condensado de diferentes lotes, totalizando 22 amostras. Após a obtenção dos espectros Raman foi feita uma PCA a fim de identificar padrões para essas amostras. A Figura 49 exibe o gráfico dos escores para as duas primeiras componentes principais que representam 83,06% da variância total. As amostras do lote 1, 2 3 ficaram agrupadas no quadrante direito, com exceção de algumas amostras que ficaram separadas do grupo.

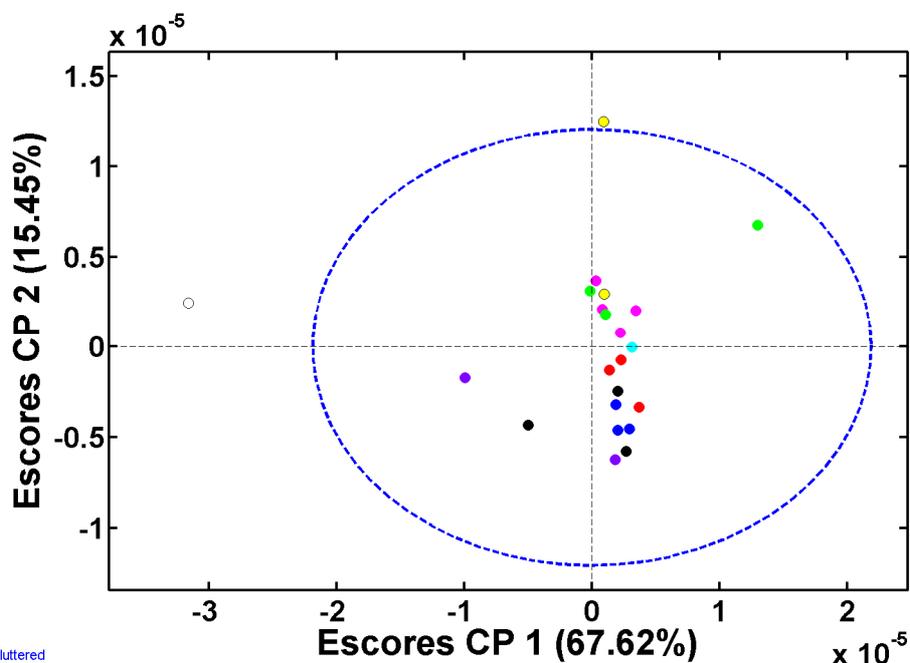


FIGURA 49: Gráfico de escores dos dois CP's para as amostras de leite condensado.

Os espectros Raman destas amostras são mostrados na Figura 50, as principais diferenças entre os espectros das amostras estão na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento da ligação C-H; as outras regiões que apresentam diferenças entre os espectros são em  $1100\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O e a região de  $850\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao modo vibracional da ligação glicosídica dos carboidratos presentes. Tais diferenças estão relacionadas com as diferentes concentrações de sacarose adicionadas na produção do leite condensado.

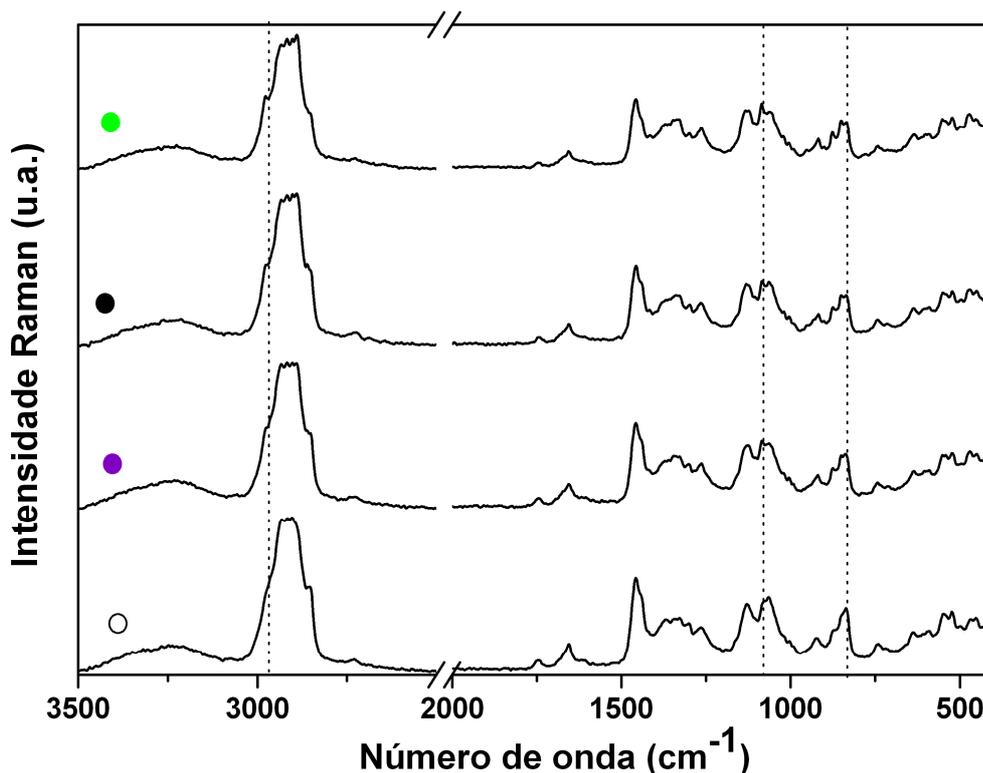


FIGURA 50: Espectro Raman das amostras de leite condensado que ficaram separadas no gráfico de escores.

Os gráficos dos pesos da primeira e da segunda componente principal, ilustrados na Figura 51 e 52, respectivamente, mostram a contribuição de cada banda Raman para a distribuição das amostras no gráfico de escores. A maior contribuição na primeira componente principal está relacionada aos modos vibracionais característicos de carboidratos, esta análise vem contribuir com a análise dos espectros Raman. Para a segunda componente principal, além da contribuição dos modos vibracionais de carboidratos, observam-se regiões características da contribuição de lipídeos, entre elas a região de  $2853\text{ cm}^{-1}$ , conferida ao estiramento simétrico  $\text{CH}_2$ ; em  $1441\text{ cm}^{-1}$  e  $1303\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação da ligação  $\text{CH}_2$  e torção da ligação  $\text{CH}$ , respectivamente. Estes resultados mostram que as amostras de leite condensado também apresentam quantidade variável de lipídeos, que pode estar relacionada à época de fabricação do leite condensado.

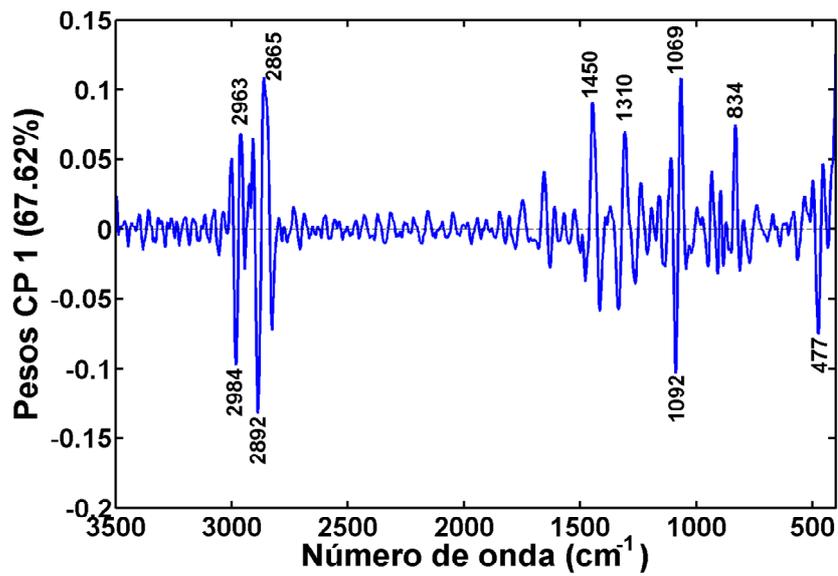


FIGURA 51: Gráfico de pesos da CP 1, mostrando a contribuição de cada banda Raman para o gráfico de escores da PCA.

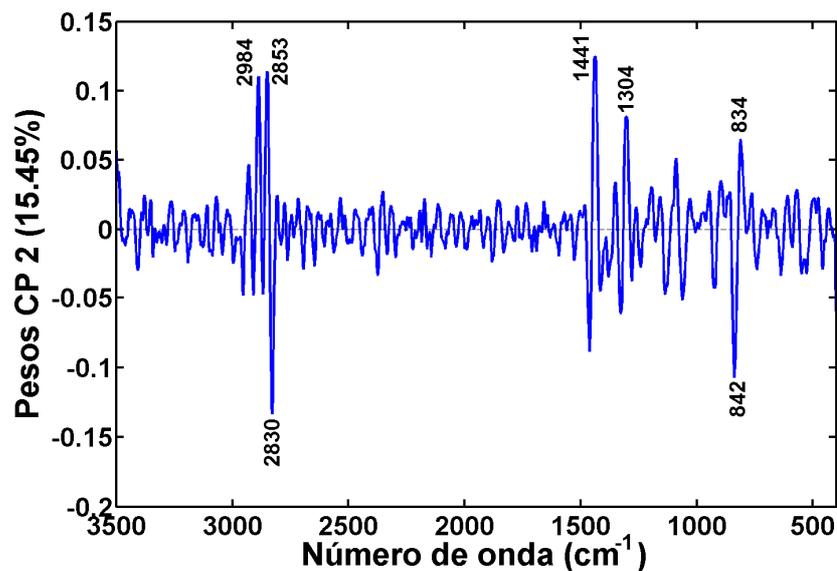


FIGURA 52: Gráfico de pesos da CP 2, mostrando a contribuição de cada banda Raman para o gráfico de escores da PCA.

Os dados obtidos mostram a possibilidade de utilizar a espectroscopia Raman na avaliação da qualidade do leite condensado em relação a seus principais constituinte. Fornecendo informações rápidas e sem a necessidade de métodos tradicionais dispendiosos para a análise de tal produto.

## 7 CONCLUSÕES

A proposta de uma metodologia para identificar e quantificar os principais componentes utilizados como adulterante no leite em pó, soro e amido, foi alcançada neste trabalho e aplicada com sucesso para o conjunto de amostras estudado. Tal metodologia pode ser proposta como *screening analysis* para avaliação de um grande número de amostras, sem a necessidade de utilizar as metodologias tradicionais que são processos onerosos, deixando tais métodos apenas para os casos de amostras duvidosas.

A análise de componentes principais mostrou-se eficiente na separação das amostras comerciais de leite em pó das amostras modificadas em laboratório, pela adição de soro e amido. Esta separação foi melhor para as amostras com quantidades superiores a 5% (m/m) dos adulterantes. Já na classificação do leite em pó, a PCA mostrou eficaz na separação dos diferentes tipos de leite disponíveis no comércio, bem como a separação de amostras com composições diferentes dentro de um mesmo grupo.

O método de classificação aplicado, o PLS-DA, apresentou resultados melhores que a PCA, uma vez que, a partir de um conjunto de treinamento as amostras foram identificadas como adulteradas ou não. A partir desse modelo foram feitas as previsões de novas amostras com obtendo resultados satisfatórios. O modelo PLS-DA oferece ainda a possibilidade do cálculo da probabilidade de uma amostra ser classificada corretamente.

Os modelos de regressão obtidos através do PLS são aceitáveis e mostram-se robustos para a adição de novas amostras. Tais modelos conseguiram quantificar e também identificar amostras com e sem a presença de soro e/ou amido com concentrações de até 2% (m/m).

A avaliação da qualidade de leite em pó em relação ao tempo e condições de armazenamento, empregando a espectroscopia Raman, apresentou bons resultados: foi possível identificar as modificações que ocorrem nas amostras de leite em pó, como a cristalização da lactose. O uso da análise termogravimétrica corroborou com os resultados obtidos via espectroscopia Raman.

Para as amostras de leite condensado, a espectroscopia Raman mostrou-se como técnica alternativa na avaliação dos principais constituintes. Diante da comparação dos espectros de diferentes marcas é possível estabelecer padrões de identidade ao produto, sem a necessidade de utilizar técnicas diferentes para avaliação de cada parâmetro.

Por fim, o uso da espectroscopia Raman e das ferramentas quimiométricas apresentaram um grande potencial na avaliação da qualidade das amostras leite em pó e leite

condensado. Tal abordagem de análise é isenta da necessidade de métodos de separação e de outras etapas de preparo de amostras. Desta forma, a análise pode ser feita de forma rápida e sem geração de resíduos.

## REFERÊNCIAS

- ALESI, M. C.M. **Avaliação da hidrólise alcalina da gordura sobre a biodegradação anaeróbia de soro de queijo**. 2005, 83p. Dissertação (Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.
- ALVAREZ-GUERRA, M. *et al.* Development of models for predicting toxicity from sediment chemistry by partial least squares-discriminant analysis and counter-propagation artificial neural networks. **Environmental Pollution**, v. 158, n.2, p. 607-614, 2010.
- BAECHLER, R. *et al.* Physical changes in heat-treated whole milk powder. **Lait**,. v. 85, n. 4-5, p. 305-314 Jul-Oct 2005.
- BARANSKA, M. *et al.* In situ analysis of polyacetylenes, carotenoids and polysaccharides in carrot roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p.6565 – 6571, 2005.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v.17, p. 166 – 173, 2003.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. 25 anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006
- BARTHUS, R.C. **Aplicação de Métodos Quimiométricos para Análises de Controle de Qualidade de Óleos Vegetais Utilizando Espectroscopia no Infravermelho e Raman**. 1999, Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- BENZERDJEB, A. M.; MOKHTARI, I. N. T.; RAHAL, M. S. Normal coordinates analyses of disaccharides constituted by D-glucose, D-galactose and D-fructose units. **Spectrochimica Acta Part A**, 68, p.284-299, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. RIISPOA - **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Decreto nº 30.691, de 29/03/52. Brasília: Ministério da Agricultura, 1952. p. 109-110.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria n. 124, 23 set. 1991, Aprova métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. **Diário Oficial da União**, 20 nov. 1991, p. 26245-26246.
- BRASIL, decreto nº 2244 de 4 de junho de 1997. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção I, 05 de junho de 1997a, p. 11555.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento; **Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade do leite em pó**, Portaria n° 369. de 04 de setembro de 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária n. 22, 14 abr. 2003. Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 02 mai. 2003, p.3-25.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária n. 69, 13 dez. 2006. Institui critérios de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “Índice CMP”. **Diário Oficial da União**, 15 de dezembro de 2006, seção 1, p.67.

BORIN, A. *et al.* Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, n. 1, p. 25-32, 2006.

BREMER, M.G.E.G. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. **International Dairy Journal**, v.18, p. 294–302, 2008.

BRERETON, R.G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. Ed. Wiley. University of Bristol, UK, 2003.

CELEDON, A.; AGUILERA, J. M. Applications of Microprobe Raman Spectroscopy in food Science. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 2, p. 101 – 108, 2002.

CHENG, Y. *et al.* Screening melamine adulterant in milk powder with laser Raman spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 2, p. 199-202. 2010.

CLARK, R. J. H.; DINES. T. J. Resonance Raman Spectroscopy, and its application to inorganic chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 25, p. 131-158, 1986.

EMBRAPA GADO DE LEITE, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Informações Técnicas, Estatística do leite, disponível em <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0420.php>. acessado em 22/03/10.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. C. G. GONÇALVES, N. S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**, v. 20, n. 3. p. 319-323, 1997.

FERREIRA, M. M. C.; *et al.* Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FILOMENO, J. G. B. **Manual de Direitos do Consumidor**. 1ª Ed. São Paulo: Atlas, 1991, p. 28.

FITZPATRICK, J. J. *et al.* Glass transition and the flowability and caking of powders containing amorphous lactose. **Powder Technology**, v. 178, n. 2, p. 119-128, Sep 15 2007a.

FITZPATRICK, J. J. *et al.* Effect of composition and storage conditions on the flowability of dairy powders. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 383-392, Apr 2007b.

FUKUDA, S. P. **Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite**. 1994. 142p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FUKUDA, S. P., ROIG, S. M., PRATA, L. F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. **Lait**, v.84, p. 501-512, 2004.

GAIANI, C. *et al.* Native phosphocaseinate powder during storage: Lipids released onto the surface. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 2, p. 130-134, 2009.

HAQUE, K.; ROOS, Y. H. Crystallization and X-ray diffraction of spray-dried and freeze-dried amorphous lactose. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 2, p. 293-301, 2005.

HERRERO, A .M. Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meta and fish: A review. **Food Chemistry**, 17, p. 1672 – 1657, 2008.

HOGAN, S.A., O'CALLAGHAN, D.J. Influence of milk proteins on the development of lactose-induced stickiness in dairy powders. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 212–221, 2010.

INMETRO, disponível em [http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comites/codex\\_historico.asp](http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comites/codex_historico.asp)  
Acessado em 18/07/10.

INON, F. A.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, n. 2, p. 401-412, 2004.

ISLAM, M. I. U.; LANGRISH, T. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. **Food Research International**, v. 43, p. 46-56, 2010.

KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 621-640, 2007.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer aided desing of experiments, **Technometrics**, v.11, n.1, p. 137-148, 1969.

KIM, E. H. J.; CHEN, X. D.; PEARCE, D. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 3. Changes in the surface composition during long-term storage. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 2, p. 182-191, 2009

KIRK, J. H., *et al.* Lactose: A definitive guide to polymorph determination. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, n.1-2, p. 103-114, 2007.

LEAL, E. S.; OKADA, F. M.; ZAMORA, P. P.; Caracterização físico-química de queijo prato por Espectroscopia no Infravermelho e Regressão de Mínimos Quadrados. **Química Nova**, n. 7, p. 1621-1625, 2008.

LEMOS. A. M.; PERRONE, I.T.; STEPHANI, R. Introdução à tecnologia de produtos lácteos concentrados e desidratados. In: **XXII Congresso Nacional de Laticíios**. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT. Disponível em [http://www.candidotostes.com.br/Download/Qu%EDmica\\_e\\_doce\\_de\\_leite.pdf](http://www.candidotostes.com.br/Download/Qu%EDmica_e_doce_de_leite.pdf), acessado em 18/06/2010.

LI-CHAN, E. C. Y.; The application of Raman spectroscopy in food science. **Trends in Food Science & Technology**, 7, p. 361 – 370, 1996.

MARTIN-HERNANDEZ, C. *et al.* Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 205-208, 2009.

MCGOVERIN, C. M. *et al.* Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 1, p. 26-32, 2010.

MORGAN, F. *et al.* Lactose crystallization and early Maillard reaction in skim milk powder and whey protein concentrates. **Lait**,. v. 85, n. 4-5, p. 315-323 Jul-Oct 2005.

MOROS, J.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Evaluation of nutritional parameters in infant formulas and powdered milk by Raman spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, n. 1, p. 30-38, 2007

MOSKOVITS, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. **Journal of Raman Spectroscopy**, 36, p. 485-496, 2005.

MURPHY, B. M *et al.* Measurement of lactose crystallinity using Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n.1, p. 186–190, 2005.

NØRGAARD, L. *et al.* Multivariate near-infrared and Raman spectroscopic quantifications of the crystallinity of lactose in whey permeate powder. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1261–1270, 2005.

OLIEMAN, C.; VAN DEN BEDEM, J.W. A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v.37, n. 1 – 2, p.27-36, 1983.

OLIEMAN, C., VAN RIEL, J.A.M. Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 43, n.2, p.171–184, 1989.

OLIVEIRA, L. F. C. **Estudo Espectroscópico de Compostos Policarbonílicos e de suas espécies de Coordenação**, 1991. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

OTTO, M. Chemometrics: **Statistics and Computer application in Analytical Chemistry**, Weinheim: Wiley, 1999.

OZKAN, N.; WALISINGHE, N.; CHEN, X. D. Characterization of stickiness and cake formation in whole and skim milk powders. **Journal of Food Engineering**, v.55, p. 293-303, 2002.

PRATA, L.F. **Distribuição de GMP livre, em leites crus e pasteurizados, na definição da detecção de fraudes por adição de soro**. 2002. 104p. Tese (Livre Docência em Inspeção de Alimentos de Origem Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2002.

RECIO, I.; *et al.* Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic on kappa-casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

RIBEIRO, F. A. L. **Análise de imagens nível de cinza utilizando métodos quimiométricos**. 2007, 173p. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RIBEIRO, J. S.; SALVA, T. J.; FERREIRA, M. M. C. Chemometric studies for quality control of processed Brazilian coffees using DRIFTS. **Journal of Food Quality**, v. 33, p. 212-227, 2010.

ROMEU-NADAL, M. *et al.* Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 756-763, 2007.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no infravermelho**. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E.; Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964.

SENA, M. M.; *et al.* Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 647-556, 2000.

SGARBIERI, V. D. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n.1, p. 43-56, Jan/Mar 2005.

SILALAI, N.; ROOS, Y. H. Roles of Water and Solids Composition in the Control of Glass Transition and Stickiness of Milk Powders. **Journal of Food Science**, v. 75, n.5, p. 285-296, 2010.

SILVA, P. H. F. Leite Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3 – 5, 1997.

SILVA, P. H. F.; *et al.* Determinação e avaliação de viscosidade, teor de sólidos solúveis e atividade de água em leite condensado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, p. 20-23, 2008.

SIMIONATO, J. I. **Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados**. 2008. 181f. Tese (Doutorado em Ciência) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

TAYLOR, L. S., ZOGRAFI, G. The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 755–761, 1998.

THOMAS, M. E. C.; *et al.* Milk Powders Ageing: Effect on Physical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 44, p. 297-322, 2004a.

THOMAS, M. E. C.; SCHER, J. DESOBRY, S. Lactose/ $\beta$ -Lactoglobulin Interaction During Storage of Model Whey Powders. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 5, p. 1158-1166, 2004b.

THOMSEN, M. K.; *et al.* Water activity-temperature state diagram of amorphous lactose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9182-9185, Nov 16 2005.

\_\_\_\_\_. Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7082-7090, Sep 7 2005a.

\_\_\_\_\_. Two types of radicals in whole milk powder. Effect of lactose crystallization, lipid oxidation, and browning reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1805-1811, Mar 9 2005b.

TORRES, E. A. F. S.; *et al.*; Composição Centesimal e Valor Calórico de Alimentos de origem animal, **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, 20, 2, 2000.

VARGAS, R. E. S. **Programa de Controle e Melhoria da Qualidade do Leite e Produtos Lácteos Produzidos no Brasil**, disponível em <http://www.camara.gov.br/internet/comissao/index/perm/capr/Fraudema%C3%A7ao2.pdf>, acessado em 23/06/2009.

VEIJ, M. et al. Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients. **Journal of Raman Spectroscopy**, 40, p.297 – 307, 2009.

VUATAZ, G.; MEUNIER, V.; ANDRIEUX, J.C. TG-DTA approach for designing reference methods for moisture content determination in food powders. **Food Chemistry**, 122, p. 436 – 442, 2010.

WALSTRA, P.; *et al.* **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. 1 ed., Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.

WU, D.; FENG, S.; HE, Y. Infrared spectroscopy technique for the nondestructive measurement of fat content in milk powder. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3613-3619, 2007

\_\_\_\_\_. Short-wave near-infrared spectroscopy of milk powder for brand identification and component analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 939-949, 2008.

WU, D.; HE, Y.; FENG, S. Short-wave near-infrared spectroscopy analysis of major compounds in milk powder and wavelength assignment. **Analytica Chimica Acta**, v. 610, n. 2, p. 232-242, 2008.

WU, D. *et al.* Study on infrared spectroscopy technique for fast measurement of protein content in milk powder based on LS-SVM. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 124-131, 2008.

YANG, L.; ZHANG, L. M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 349- 361, 2009.

ZHOU, Q. *et al.* Sequential changes of main components in different kinds of milk powders using two-dimensional infrared correlation analysis. **Journal of Molecular Structure**, v. 799, n. 1-3, p.77-84, 2006.

## ANEXO

### Súmula Curricular

#### Dados pessoais

---

Mariana Ramos de Almeida

Sexo: Feminino

Data de nascimento: 04/12/1985

E-mail: mariquimica49@yahoo.com.br

Nome em citações bibliográficas: ALMEIDA, M. R.; Almeida, Mariana R..

#### Formação Acadêmica

---

2009-2011 Mestrado em Química  
Área de concentração: Físico-Química.  
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.

2004-2008 Graduação em Química – Bacharel e Licenciatura  
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.

#### Produção científica

---

Resumos de trabalhos científicos apresentados em congressos:

(1) Mariana Ramos Almeida, Kamila de Sá Oliveira, Rodrigo Stephani, Luiz Fernando Cappa de Oliveira. Raman spectroscopy as tool for monitoring the lactose in milk powder crystallization. In: VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, de 02 a 05 de dezembro de 2010, São Carlos, SP. (Pôster premiado).

(2) Leandra Natália de Oliveira, Mariana Ramos Almeida, Luiz Fernando Cappa de Oliveira. Quality control of white chocolate by Raman spectroscopy. In: VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, de 02 a 05 de dezembro de 2010, São Carlos, SP.

(3) Kamila de S. Oliveira, Mariana R. Almeida, Luiz Fernando C. de Oliveira, Rodrigo Stephani. Uma metodologia para *screening analysis* de leite em pó utilizando espectroscopia Raman e análise multivariada. In: XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-MG, de 30/10 a 01/11 de 2010. Viçosa, MG.

(4) Mariana R. Almeida, Rodrigo Stephani, Paulo Henrique F. Silva, Luiz Fernando C. de Oliveira. FT-Raman spectroscopy in quality control of milk powder during shelf life. In: IDF Symposium on Science and Technology of Fermented Milk and Microstructure of Dairy Products, de 07 a 11 de junho de 2010. Tromsø, Noruega.

(5) Mariana R. Almeida, Rafael S. Alves, Rodrigo Stephani, Luiz Fernando C. De Oliveira. Aplicação da espectroscopia Raman na identificação da autenticidade de leite em pó. In: Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman, de 06 a 09 de dezembro de 2009. São Pedro, SP.

(6) Mariana R. Almeida, Rafael S. Alves, Laura B. L. R. Nascimbem, Rodrigo Stephani, Ronei J. Poppi, Luiz Fernando C. De Oliveira. Espectroscopia FT-Raman e análise multivariada: ferramentas para identificação da origem de amidos. In: 23° Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química em Minas Gerais, de 30 de outubro a 02 de novembro de 2009. Juiz de Fora, MG.

(7) Mariana R. Almeida, Rafael S. Alves, Laura B. L. R. Nascimbem, Rodrigo Stephani, Ronei J. Poppi, Luiz Fernando C. de Oliveira. Determinação do teor de amilose em amidos utilizando espectroscopia Raman e calibração multivariada. In: 15° ENQA e 3° CIAQA, 18 a 21 de outubro de 2009, Salvador, BA.

(8) Mariana R. Almeida, Rafael S. Alves, Rodrigo Stephani, Luiz Fernando C. de Oliveira. Avaliação da Qualidade de Leite em Pó por Espectroscopia Raman. In: 26° Congresso Nacional de Laticínios, de 13 a 16 de julho de 2009, Juiz de Fora - MG.

(9) Mariana R. Almeida, Rodrigo Stephani, Helio F. Dos Santos, Luiz Fernando C. de Oliveira. Caracterização Espectroscópica e Cálculos Teóricos do Corante E124 (Ponceau 4R). In: 31° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, de 26 a 29 de maio de 2008, Águas de Lindóia, SP.

(10) Mariana R. Almeida, Rodrigo Stephani, Helio F. Dos Santos, Luiz Fernando C. De Oliveira. Caracterização Vibracional do Corante E124 por Espectroscopia Raman e Cálculos Teóricos. In: XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, de 01 a 04 de novembro de 2007, Uberlândia, MG.

#### Artigos:

(1) Mariana R. Almeida, Rodrigo Stephani, Helio F. Dos Santos, Luiz Fernando C. De Oliveira. *Spectroscopic and Theoretical Study of the Azo-Dye E124 in Condensate Phase: Evidence of a Dominant Hydrazo Form.* **The Journal of Physical Chemistry. A**, v. 114, p. 526-534, 2010.

(2) Mariana R. Almeida, Rafael S. Alves, Laura B. L. R. Nascimbem, Rodrigo Stephani, Ronei J. Poppi, Luiz Fernando C. De Oliveira. *Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis.* **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2693-2701, 2010.

(3) Mariana R. Almeida, Kamila de S. Oliveira, Rodrigo Stephani, Luiz Fernando C. De Oliveira. *Fourier transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening.* **Journal of Raman Spectroscopy**. (aceito).