

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

José Carlos de Almeida Júnior

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA EM CONCENTRADO
PROTEICO DE SORO DE LEITE POR FT-MIR-ATR COMBINADA COM
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

JUIZ DE FORA

2018

JOSÉ CARLOS DE ALMEIDA JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA EM CONCENTRADO
PROTEICO DE SORO DE LEITE POR FT-MIR-ATR COMBINADA COM
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva

JUIZ DE FORA
2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Junior, José Carlos de Almeida.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA EM CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE POR FT-MIR ATR COMBINADA COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA / José Carlos de Almeida Junior. -- 2018.

77 p. : il.

Orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos

Coorientador: . Paulo Henrique Fonseca da Silva

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2018.

1. Whey Protein. 2. Kjeldahl. 3. Espectroscopia . I. Anjos, Virgílio de Carvalho dos , orient. II. Silva, . Paulo Henrique Fonseca da , coorient. III. Título.

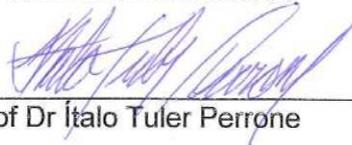
JOSÉ CARLOS DE ALMEIDA JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA EM CONCENTRADO
PROTEICO DE SORO DE LEITE POR FT-MIR-ATR COMBINADA COM
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 08 de junho de 2018

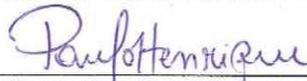
BANCA EXAMINADORA



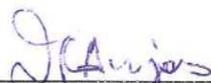
Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone



Prof.ª Dr.ª Sandra Maria Pinto



Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva



Prof.ª Dr. Virgílio Carvalho dos Anjos

DEDICATÓRIA

No final dessa jornada, é possível sentir o cansaço no corpo e na mente, após todas as batalhas enfrentadas. Sinto-me feliz, pois nessas batalhas sempre terminei vitorioso. Sou agradecido, pois meu principal pedido a Deus foi que não diminuísse meus fardos, e mas que me desse sempre força para aguentá-los, e assim fui abençoado.

Dedico essa grande vitória na minha vida a minha irmã Josete e minha tia Mariza, por dar todo apoio e suporte necessário, aos meus pais pois sempre estiveram ao meu lado me apoiando e principalmente pela educação que me foi dada. Em especial para uma pessoa muito companheira e querida, à Carolina Carvalho R. Viana, que esteve em toda as minhas dificuldades e comigo chegou até as vitórias. Em muito mais vitórias nessa vida estaremos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o financiamento deste trabalho à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Professor Virgílio e à Professora Maria José Valenzuela Bell. A ele, a minha enorme gratidão por me dar condições de cursar e concluir o mestrado, pela oportunidade, apoio, confiança e por possibilitar este trabalho.

Aos colegas Jonathan e Cristina, por todo apoio dado, orientações incondicionais, críticas para meu crescimento e desenvolvimento e pela amizade construída. Este trabalho não teria a mesma qualidade sem vocês!

Ao professor Paulo Henrique, por toda atenção e disponibilidade a ajudar, pelas excelentes aulas oferecidas no curso, dando uma nova visão de conhecimento.

A colega Leandra, pelo seu grande apoio e ajuda nesse trabalho. Pessoa e profissional de alta qualidade.

A Carolina Carvalho, minha companheira e amiga de todas as horas, que comigo esteve lado a lado em todos os momentos, me impulsionou e me deu forças para conclusão.

“Não podemos ficar esperando que o mundo se transforme.

Nós somos a própria força transformadora do mundo.”

Marilyn Ferguson

RESUMO

A busca de melhores condições físicas e de um envelhecimento saudável é uma constante atualmente. A dieta pode ser enriquecida com suplementos alimentares, destacando-se os produtos à base de *whey protein*. Este é considerado o suplemento mais conhecido no mundo, o que acarretou o surgimento de diversas marcas e a expansão das vendas, favorecendo um descontrole na sua fiscalização. O controle de qualidade e caracterização de matéria prima e produtos finais vêm aumentando, e para isso, cada vez mais é necessária a aplicação de ferramentas analíticas alternativas para fornecer dados confiáveis equivalentes a métodos de referência. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação da Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR), acoplado a Reflectância Total Atenuada (ATR), juntamente com tratamentos quimiométricos (PCA e PLS) para caracterização de amostras de *Whey Protein Concentrado* (WPC) dopadas com soro de leite em pó (SLP) e a previsão quantitativa simultânea do teor de proteína. Adulterações em WPC entre 0% a 100% de substituição por SLP foram analisadas em triplicata por FT-MIR-ATR e revelou numerosas bandas correspondentes aos componentes do leite. Com aumento de níveis de substituição de SLP, foi observado decréscimo das bandas amida I e amida II apresentando forte correlação com o teor de proteína e indicação de fraude em WPC. A PCA confirmou cargas intensas nas regiões amida I e II, explicando 71% de a variância total. Em 40% de substituição, foi encontrada diferenciação no formato do espectro em torno da banda de carboidrato OH (1080 cm^{-1}), com confirmação por meio da análise da segundo derivada dos espectros. O teor de proteína de cada mistura foi determinado pelo método tradicional de análise (Kjeldahl) e a correlação entre concentrações e espectros foi feito por meio de calibração por modelagem PLS, e resultou em baixos erros de previsão e coeficiente de determinação do ajuste global acima de 0,98. Portanto, a associação da espectroscopia FTIR-ATR com PCA e PLS pode ser usada com precisão para prever simultaneamente a quantidade em gramas de substituições de SLP em WPC e o teor de proteína resultante em cada mistura.

Palavras-chaves: *Whey Protein*, Kjeldahl, Espectroscopia

ABSTRACT

The search for better physical conditions and a healthy aging is a trend nowadays and, in many cases, the diet can be enriched with food supplements, especially with products containing *whey protein*. Whey is the most known supplement in the world, with several brands available in a constant growing market, which favors the lack of control and supervision. The food industry has put effort into the quality control, authentication and characterization of raw materials and final products throughout the years. Thus, it is necessary to develop tools to provide equivalent reliable data reference methods. The objective of this study was to evaluate the Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), attenuated Total Reflectance (ATR) along with (PCA and PLS) for a rapid and non-destructive characterization of *whey Protein Concentrate* (WPC) samples adulterated with (SLP), as well as the simultaneous quantitative protein and the amount in grams of WPC or SLP added to the sample. Substitutions in WPC between 0 to 100% by SLP were analyzed in triplicate by FT-MIR-ATR and revealed numerous bands corresponding to the components of the milk. With increased levels of replacement of SLP, there was a decrease of the Amide I and Amide II bands, revealing a strong correlation with the protein content and indication of fraud in WPC. PCA confirmed intense loads in the amide I and II regions, explaining 71% of the total variance. In 40% of substitution of SLP to the WPC, differentiation was found in the spectrum format around the OH carbohydrate (1080 cm^{-1}), with confirmation by analysis of the second derivative spectra. The protein content of each mixture was determined by Kjeldahl methodology and the correlation between concentrations and spectra was done through calibration by PLS modeling, and resulted in low prediction errors and coefficient of determination of the overall adjustment above 0.98. Therefore, the association of FTIR-ATR spectroscopy with PCA and PLS can be used precisely to predict the amount in grams of SLP substitutions in WPC and the resulting protein content in each mixture.

Keywords: *Whey Protein*, Kjeldahl, Spectroscopy

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Fluxograma simplificado da produção de queijo e separação do soro de leite | 26 |
| Figura 2- Representação comparativa das técnicas de separação por membranas..... | 28 |
| Figura 3- Representação esquemática do processo de Ultrafiltração | 29 |
| Figura 4 - Representação esquemática do processo de Diafiltração..... | 30 |
| Figura 5- Esquema simplificado de “ <i>spray dryer</i> ” | 31 |
| Figura 6 - Processo simples de produção de WPC com 34% a 50% de teor proteico | 31 |
| Figura 7- Processo acoplado a diafiltração para produção de WPC com 50% a 80% de teor proteico..... | 32 |
| Figura 8 - Reação química na etapa de digestão | 37 |
| Figura 9- Reação química na etapa de destilação | 37 |
| Figura 10 - Reação química na etapa de destilação | 37 |
| Figura 11 - Reação química na etapa de titulação | 38 |
| Figura 12 – Divisões da região do Infravermelho | 39 |
| Figura 13 - Diferentes tipos de vibrações de deformação | 40 |
| Figura 14 – Esquema simplificado do interferômetro de Michelson | 41 |
| Figura 15 – Configurações experimentais para FTIR | 43 |
| Figura 16 – Esquema simplificado da reflexão total atenuada (ATR)..... | 44 |
| Figura 17 - Representação esquemática da decomposição por PCA | 46 |
| Figura 18 – Princípios do PCA; decomposição de dados em escores e pesos. | 47 |
| Figura 19 - Pontos utilizados para a calibração e validação da curva na regressão PLS | 59 |
| Figura 20: (A) Porcentagem do teor de proteína em WPC puro (0% de substituição), SLP puro (100% de substituição) e a cada amostra substituída em base seca. (B) Diferença no teor de proteína para cada substituição de 2,5% de WPC por SLP..... | 62 |
| Figura 21: Espectro FTIR-ATR MIR de amostras de WPC, SLP e amostras dopadas..... | 64 |
| Figura 22: Segunda derivada de parte da região de estiramento de OH (1135 cm-1 a 960 cm-1) dos espectros MIR de WPC, SLP e suas misturas em diferentes proporções | 67 |
| Figura 23. Análise de Componentes Principais dos espectros de número de onda selecionados de seis amostras avaliadas (WPC, SLP, 20%, 40%, 60% e 80%). Biplot contendo o posicionamento dos escores (<i>score plot</i>) e o peso dos números de onda (<i>loading plot</i>), representado pelos vetores azuis. | 68 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 24 - Calibração e previsões de validação de (A) teor de proteína, (B) massa de WPC em pó e (C) massa de soro de leite em pó, pelo modelo PLS..... 71

Figura 25. Gráficos residuais para os conjuntos de dados de validação. (A) Conteúdo de proteínas; (B) Massa de WPC em pó; (C) Massa de soro de leite em pó 71

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Quantidade em gramas por litro das principais soroproteínas no leite bovino | 20 |
| Tabela 2- Comparação da composição de aminoácidos entre as soroproteínas do leite e a caseína..... | 24 |
| Tabela 3- Comparação da composição de soro doce e soro ácido | 27 |
| Tabela 4- Composição de alguns derivados de soro de leite | 33 |
| Tabela 5- Divisão e características das regiões de importância do espectro eletromagnético | 39 |
| Tabela 6- Resultados físico-químicos das matérias-primas de referência..... | 60 |
| Tabela 7- Resultados de proteína total nas amostras avaliadas pelo método de Kjeldahl..... | 61 |
| Tabela 8- Área sob a curva de regiões específicas dos espectros das amostras mostradas na Figura 20 | 66 |
| Tabela 9- Modelo PLS relativo à quantificação de proteína total, WPC e SLP adicionados ($m \cdot m^{-1}$) nas amostras..... | 70 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

| | |
|----------------------------------|--|
| % | Percentual |
| α -LA | Alfa-lactoalbumina |
| ABENUTRI | Associação Brasileira de Nutrição |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ATR | Reflectância Total Atenuada |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists |
| ASB | Albumina do soro bovino |
| BCAA | Aminoácidos de cadeia ramificada |
| β -LG | Beta-lactoglobulina |
| cm | Centímetro |
| cm^{-1} | Inverso do centímetro |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |
| CMP | Caseinomacropéptido |
| CPS | Concentrados proteicos de soro do leite |
| DF | Diafiltração |
| EUA | Estados Unidos da America |
| F_c | Fator de correção |
| FIR | do inglês <i>Far Infrared</i> |
| FT | Transformada de Fourier |
| FTIR | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier |
| FT-MIR | Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier |
| FT-MIR-ATR | Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier acoplado à Reflectância Total Atenuada |
| g | Gramas |
| $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Gramas por litro |
| $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ | Gramas por cem gramas |
| GMP | Glicomacropéptidos |
| h | Hora |
| HPLC | do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| Ig | Imunoglobulinas |

| | |
|----------------------------------|--|
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| kDa | Quilodalton |
| m | Massa |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MF | Microfiltração |
| MG | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| $m \cdot m^{-1}$ | Massa por massa |
| $m \cdot v^{-1}$ | Massa por volume |
| μm | Micrômetro |
| MIR | Infravermelho Médio |
| nm | Nanometro |
| NF | Nano filtração |
| NIR | Infravermelho Próximo |
| NT | Nitrogênio total |
| $\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ | Oxigênio por litro |
| OR | Osmose reversa |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| p.a. | Padrão analítico |
| PB | Proteína bruta |
| PCA | do inglês <i>Análise por Componentes Principais</i> |
| PLS | do inglês <i>Regressão de Mínimos Quadrados Parciais</i> |
| PRESS | do inglês <i>Predictive Residual Sum of Squares</i> |
| RE | do inglês <i>Erro Relativo</i> |
| RMSE | do inglês <i>Raiz Quadrada do Erro quadrático Médio</i> |
| RPM | Rotações por minuto |
| SLP | Soro de leite em pó |
| UHT | Temperatura ultra alta |
| UF | Ultrafiltração |
| UFJF | Universidade Federal de Juiz de Fora |

| | |
|------|---------------------------------|
| US\$ | Dólares |
| V | Volume |
| WPC | <i>Whey Protein</i> Concentrado |
| WPI | <i>Whey Protein</i> Isolado |
| WPH | <i>Whey Protein</i> Hidrolisado |

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | O soro do leite e sua composição proteica | 20 |
| 2.1.1 | Beta-lactoglobulina (β -LG) | 20 |
| 2.1.2 | Alfa-lactoalbumina (α -LA) | 21 |
| 2.1.3 | Albumina do soro bovino (ASB) | 22 |
| 2.1.4 | Imunoglobulinas (Ig) | 22 |
| 2.1.5 | Caseinomacropéptido (CMP) | 22 |
| 2.1.6 | Outras proteínas que compõem o soro do leite | 22 |
| 2.2 | Valor nutricional das soroproteínas do leite | 23 |
| 2.3 | Uso de suplementos à base de <i>whey protein</i> | 25 |
| 2.4 | Processo de produção do soro do leite | 26 |
| 2.5 | Separação por membranas na obtenção de <i>whey protein</i> | 28 |
| 2.6 | Classificação dos concentrados proteicos do soro | 32 |
| 2.7 | Fraudes em alimentos | 33 |
| 2.8 | Métodos Oficiais utilizados na análise de alimentos | 35 |
| 2.8.1 | Determinação de umidade por secagem direta em estufa | 35 |
| 2.8.2 | Determinação de gordura pelo método de Gerber | 35 |
| 2.8.3 | Teor de nitrogênio e proteínas totais por método de Kjeldahl | 36 |
| 2.9 | Espectroscopia na região do Infravermelho | 38 |
| 2.9.1 | Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) | 41 |
| 2.9.2 | Reflexão Total Atenuada - (ATR) | 43 |
| 2.10 | Quimiometria e análise de dados | 45 |
| 2.10.1 | Análise de componentes principais | 45 |
| 2.10.2 | Regressão por Mínimos Quadrados Parciais | 47 |
| 3 | OBJETIVOS | 51 |
| 3.1 | Objetivo geral | 51 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2 | Objetivos específicos | 51 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 4.1 | Análises preliminares de WPC e SLP | 52 |
| 4.1.1 | Determinação de umidade | 52 |
| 4.1.2 | Determinação de gordura pelo método de Gerber | 53 |
| 4.1.3 | Determinação de lactose por sistema HPLC | 53 |
| 4.2 | Preparo das amostras dopadas | 54 |
| 4.3 | Teor de proteína bruta | 55 |
| 4.4 | Obtenção dos espectros e tratamentos de dados | 57 |
| 4.4.1 | Espectroscopia FT-MIR-ATR | 57 |
| 4.4.2 | Análise estatística | 58 |
| 4.4.3 | Análise quimiométrica | 58 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 60 |
| 5.1 | Conteúdo de proteína | 60 |
| 5.2 | Estudo de espectros FT-MIR para componentes das amostras ... | 63 |
| 5.3 | Modelo parcial de regressão de mínimos quadrados (PLS) | 70 |
| 6 | CONCLUSÃO | 73 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 74 |

1 INTRODUÇÃO

A busca por melhores condições físicas, promoção da saúde e um envelhecimento saudável vêm crescendo atualmente. Para isso, fazem-se necessárias mudanças que afetem a qualidade de vida, como a busca por atividades físicas regulares e uma alimentação balanceada nutricionalmente (MENDES, 2012). Em muitos casos, a dieta pode ser enriquecida com suplementos alimentares, destacando-se dentre eles os produtos à base de *whey protein*, considerado por muitos a melhor proteína existente, e sendo hoje, o suplemento mais conhecido no mundo (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

Segundo Haraguchi *et al.* (2006), o suplemento alimentar *whey protein* é amplamente usado e conhecido por atletas de alta performance devido a seu alto valor nutricional. É constituído por soroproteínas do leite, que possuem baixo peso molecular, alto valor nutricional e grande capacidade de absorção. Os suplementos *whey protein* são produtos de valor agregado e se movem rapidamente para o status de *commodities*, com uma forte posição no mercado de nutrição esportiva (HA & ZEMEL, 2003).

De acordo com Alves *et al.* (2010), dentre as proteínas totais que constituem o leite, duas frações tem maior importância: as caseínas, que correspondem a aproximadamente 80% do teor total, e as soroproteínas do leite, correspondendo aos outros 20%. Após a coagulação do leite para a fabricação dos queijos, o soro se torna um co-produto desse processamento e por muito tempo foi um problema para a indústria láctea, por se tratar de um produto com alta demanda bioquímica, sendo proibido seu descarte sem algum tratamento prévio. Partindo-se da necessidade de se encontrar um destino correto para esse co-produto e com o desenvolvimento de técnicas de fracionamento, hoje o soro é requisitado para compor a fórmula de alimentos ou para ser usado diretamente como produto prioritário, sendo um exemplo disso, a fabricação de suplementos proteicos a base de soroproteínas (ALVES *et al.*, 2010).

Segundo Haraguchi *et al.* (2006), além dos benefícios que estas proteínas promovem para a recuperação muscular, elas também favorecem a saúde humana, atuando como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento, entre outros. Além disso, possuem propriedades funcionais, justificando sua intensa utilização em

tecnologia de alimentos. Dentre as funcionalidades, incluem-se geleificação, capacidade de retenção de água, formação e estabilização de emulsões e espumas além de alterar características sensoriais, permitindo a sua utilização em inúmeros alimentos como fórmulas infantis, alimentos e bebidas com apelo à saúde e alimentos congelados (LUCENA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2015).

Tantos benefícios justificam a alta demanda do consumo e utilização, e também a grande quantidade de fabricantes de suplementos que oferecem produtos dessa categoria para os consumidores. No mercado pode-se encontrar diversas marcas e variedades contendo a mesma base de ingredientes. Dentre vários tipos e categorias de suplementos usados por praticantes de exercícios físicos, o *whey protein* é sempre o de principal escolha, demonstrando sua crescente popularidade (MENDES, 2012).

Segundo INMETRO (2014), a produção de *whey protein* é bastante complexa, mas a evolução tecnológica das indústrias produtoras na última década permitiu o surgimento de suplementos de nova geração, com isolados de proteínas muito concentrados. Por conta das diferentes técnicas de produção e processamento, os suplementos variam muito de acordo com suas concentrações, misturas, processamento e valor biológico, existindo três classificações para o produto: (i) o concentrado, podendo fornecer 29% a 89% de proteínas; (ii) o isolado, podendo fornecer 90% ou mais de proteínas; e (iii) o hidrolisado, fornecendo alta concentração de proteínas parcialmente ou completamente hidrolisada, resultando em tri- ou di-peptídeos ou ainda em aminoácidos livres (TUNICK, 2008).

Apesar da crescente utilização deste suplemento, observa-se uma precariedade na fiscalização e controle desses produtos, tanto na avaliação da composição quanto na forma de se rotular, podendo conter informações errôneas ou que podem levar a uma má compreensão do consumidor. Os órgãos de fiscalização utilizam métodos de análises oficiais, para quantificar e qualificar as proteínas e outros compostos do suplemento *whey protein*. Tais métodos algumas vezes requerem custo elevado devido a treinamentos de capacitação de analistas, reagentes utilizados e descarte de resíduos, ou muitas vezes são demorados e por vezes, de baixa precisão analítica. Tem-se como exemplo o método de Kjeldahl, que é comumente utilizado para determinar o teor de nitrogênio e proteínas em alimentos. A quantificação do nitrogênio

proteico é realizada por meio da titulação das amostras previamente digeridas e destiladas. Essa técnica é muitas vezes questionada, por se tratar de um método que doseia proteína de forma indireta, utilizando-se de um fator de conversão. O principal fator negativo é a complexidade, a demora e, conseqüentemente, os custos envolvidos ao se determinar o teor proteico da amostra por essa técnica (BRASIL, 2006).

Desse modo, faz-se necessário o estudo de métodos de análises alternativos para dosear a concentração proteica nesse tipo de amostra, tornando mais rápida e precisa a determinação da qualidade dos suplementos à base de *whey protein*.

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma das técnicas que fornece informações sobre os modos de vibração molecular, que por sua vez dependem da estrutura da molécula. (SANTOS *et al.*, 2012). Na região do infravermelho médio (MIR) ocorrem combinações e sobretons (sobreposição) das absorções vibracionais dos grupamentos O-H, N-H, S-H e C-H, o que significa que os espectros possuem grande quantidade de informação a respeito da organização da maioria dos compostos orgânicos. Dentro deste contexto, a espectroscopia no MIR tem sido frequentemente utilizada como um método analítico, fornecendo resultados suficientes para determinação de grupos funcionais orgânicos, principalmente amostras que contém elevados níveis de proteínas (muitas ligações N-H) e sólidos finamente divididos (CAMPESTRINI, 2005).

Pelo exposto, observa-se o aumento atual do consumo de suplementos alimentares à base de *whey protein*, principalmente para a estética e para busca de um estilo de vida saudável. Há um descontrole em fiscalizar a qualidade dos produtos do gênero, principalmente quanto à precisão e agilidade dos métodos avaliadores. Assim, o presente trabalho visa propor a espectroscopia de absorção no infravermelho médio como um método de análise alternativo, de modo a proporcionar resultados rápidos e precisos para a determinação do teor proteico de suplementos à base de *whey protein*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O soro do leite e sua composição proteica

O leite de vaca possui aproximadamente 3,2% de proteínas e entre elas, 80% são caseínas e 20% soroproteínas. Este percentual pode variar em função da raça do gado, ração ou capim composto na alimentação do animal, clima do país de origem e época do ano em que o leite é produzido, ou seja, estes fatores representam a influência da sazonalidade na produção (WALSTRA, WOUTERS, & GEURTS, 2006).

O soro do leite é obtido principalmente como um co-produto a partir da concentração da caseína e gordura, que formam uma massa para a produção de queijo, sendo composto majoritariamente por água, lactose, proteínas e sais solúveis (FOX e McSWEENEY, 1998).

As soroproteínas, conforme ilustrado na Tabela 1, possuem como principais frações a beta-lactoglobulina (β -LG), a alfa-lactoalbumina (α -LA), a albumina do soro bovino (ASB) e as imunoglobulinas (Ig). Possuem estrutura globular e algumas pontes de dissulfeto, que conferem grau de estabilidade estrutural (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

Tabela 1- Quantidade em gramas por litro das principais soroproteínas no leite bovino.

| Soroproteínas | Quantidade no leite bovino ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|---------------------|---|
| Beta-Lactoglobulina | 3,2 |
| Alfa-lactoalbumina | 1,2 |
| Soroalbumina | 0,4 |
| Imunoglobulina | 0,7 |

Fonte: Adaptado de Sgarbieri (2004)

2.1.1 Beta-lactoglobulina (β -LG)

A β -LG corresponde a maior porção proteica do soro (45% a 57%) e representa aproximadamente 10% da proteína total do leite. É constituída por 162 aminoácidos e apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada

(BCAA), próximo a 25,1% e massa molecular média variando entre 18,4 kDa a 36,8 kDa (EDWARDS *et al.*, 2009).

Segundo Yada (2004), por ser a proteína de maior porção, é responsável pela maioria das propriedades características dos concentrados proteicos do soro do leite. Acreditava-se que β -LG era uma proteína exclusiva de leite de ruminantes, mas descobriu-se que está presente no leite de outros mamíferos. Não está presente no leite humano, sendo a α -LA a proteína principal do soro desta espécie (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A β -LG não estando presente como componente do leite materno, é potencialmente considerada como causa de alergia ao leite, porém, devido à incerteza disso e a variabilidade da resposta do sistema imunológico humano, não existe uma estrutura em particular que possa ser diretamente responsabilizada pela alergenicidade, deixando todas as proteínas que o compõem em evidência (GARCÍA *et al.*, 1998).

2.12 Alfa-lactoalbumina (α -LA)

A α -LA corresponde a aproximadamente 15% a 25% das proteínas do soro de leite bovino e é a principal proteína do leite humano (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006). Apresenta massa molecular de aproximadamente 14,2 kDa, considerada pequena e de fácil e rápida digestão. Sua molécula é constituída de 123 aminoácidos, com grande quantidade de lisina, cistina, treonina e leucina (FOX e McSWEENEY, 1998).

Contém maior teor de triptofano entre todas as fontes proteicas alimentares. A α -LA possui como característica ser precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário, além de ser capaz de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente a absorção desta proteína no trato gastrointestinal. A α -LA apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

2.1.3 Albumina do soro bovino (ASB)

A albumina do soro bovino possui massa molecular de 66 kDa sendo considerada de alto peso molecular. Correspondendo a 10% das proteínas do soro, é rica em cisteína, que tem grande importância na síntese de glutathione, um antioxidante que contribui para recuperação muscular (LANDS, GREY, & SMOUNTAS, 1999). Possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídios, o que favorece seu transporte no sangue (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

2.1.4 Imunoglobulinas (Ig)

As imunoglobulinas são constituídas por quatro tipos diferentes existentes no soro bovino (IgG, IgA, IgE, IgM), sendo proteínas de alta massa molecular, com variação entre 150 kDa a 1000 kDa. Entre as variações, a IgM é a mais abundante no leite bovino, com 80% do total, diferente do leite humano que prevalece a IgA, correspondendo a 90% (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

2.1.5 Caseinomacropéptido (CMP)

Os CMP possuem baixa massa molecular, com aproximadamente 6,7 kDa. Alguns autores não o consideram como um peptídeo do soro, por se tratar de um derivado da hidrólise da kappa-caseína, por ação enzimática da quimosina na fabricação de queijos. Está presente no chamado “*rennet whey*” ou soro proveniente de coalho. É um peptídeo tão rico em aminoácidos essenciais quanto a β -LG, com aproximadamente 47% destes presentes em sua estrutura (HARAGUCHI *et al.*, 2006).

2.1.6 Outras proteínas que compõem o soro do leite

O soro possui também peptídeos secundários, sendo assim denominados devido a se apresentarem em pequenas quantidades no leite. Suas subfrações são: lactoferrina, beta-microglobulinas, gama-globulinas, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteases-peptonas e aminoácidos livres (HARAGUCHI *et al.*, 2006). Apesar de

sua importância na composição do leite, não serão evidenciados no presente trabalho.

2.2 Valor nutricional das soroproteínas do leite

As soroproteínas possuem grande valor biológico, que podem ser representados em uma escala de acordo com sua absorção, utilizando como referência a proteína do ovo. Existem proteínas que podem superar os 100% do valor biológico comparados ao padrão-ovo e neste cenário, o valor biológico das soroproteínas (constituintes do suplemento *whey protein*) está entre 106% a 159% desse padrão, demonstrando, assim, sua qualidade em relação a outras proteínas (INMETRO, 2014).

Segundo Antunes (2003) os aminoácidos podem ser divididos em indispensáveis e dispensáveis. Os aminoácidos essenciais devem ser obtidos a partir de uma dieta que possa oferecê-los ao organismo, devido à incapacidade de sintetizá-los. São eles: histidina, leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina, metionina, treonina, valina e triptofano. Já os não-essenciais são sintetizados no organismo a partir de micronutrientes fornecidos principalmente pela absorção de compostos dos alimentos digeridos. A qualidade das proteínas alimentares depende da quantidade de aminoácidos essenciais, da sua digestibilidade e absorção no organismo, refletindo na eficácia com que o organismo pode utilizá-las. Assim, o valor biológico das proteínas do soro está relacionado ao excelente perfil de aminoácidos apresentados, e entre todos que a compõem, grande quantidade são de aminoácidos essenciais.

Segundo Yada (2004) é visto que as soroproteínas apresentam elevada qualidade proteica, comparado com a caseína e a outras proteínas, devido a sua grande oferta desses aminoácidos, conforme Tabela 2. Elas também possuem alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada como leucina, isoleucina, valina e aminoácidos contendo enxofre como cisteína e metionina (WALZEM *et al.*, 2002; MARSHALL, 2004).

Tabela 2- Comparação da composição de aminoácidos entre as soroproteínas do leite e a caseína

| Aminoácido | Soroproteínas (g·100g⁻¹ de proteína) | Caseína (g·100g⁻¹ de proteína) |
|---|--|--|
| Alanina | 5,0 | 3,0 |
| Arginina | 2,5 | 3,5 |
| Acido aspártico | 11,5 | 6,5 |
| Cisteína | 3,5 | 0,5 |
| Acido glutâmico | 16,0 | 20,5 |
| Glicina | 2,0 | 1,5 |
| Histidina | 2,0 | 2,5 |
| Isoleucina | 6,0 | 5,5 |
| Leucina | 12,5 | 8,5 |
| Lisina | 10,5 | 7,0 |
| Metionina | 2,0 | 2,5 |
| Fenilalanina | 3,5 | 4,5 |
| Prolina | 3,5 | 10,5 |
| Serina | 3,5 | 6,5 |
| Treonina | 4,5 | 4,0 |
| Triptofano | 2,5 | 1,0 |
| Tirosina | 4,0 | 5,5 |
| Valina | 5,0 | 6,5 |
| Total aminoácidos essenciais | 46,5 | 39,5 |

Fonte: Adaptado de Yada (2004); Pennings *et al.*(2011).

Segundo Sgarbieri (2004) praticamente, todos os aminoácidos presentes no soro excedem as recomendações nutricionais, sendo que a fenilalanina e tirosina não chegam a ultrapassar, mas atendem a quantidade recomendada.

Assim, considerando a elevada quantidade de aminoácidos essenciais e a qualidade proteica, as soroproteínas podem aumentar o valor nutricional dos alimentos usados na dieta humana, podendo ser usada diretamente na preparação de concentrados proteicos e na fabricação de suplementos com essa base.

2.3 Uso de suplementos à base de *whey protein*

O crescimento significativo da procura e do uso de suplementos nutricionais ocorreu durante a década de 1990, devido ao aumento da expectativa de vida e a conscientização da população sobre o estilo de vida saudável. Atualmente o crescimento é mais intenso devido à preocupação com a estética, saúde e envelhecimento. Para isso, se faz necessário uma alimentação balanceada nutricionalmente, mas nos dias atuais, a falta de tempo para se dedicar a uma boa nutrição proveniente somente pela alimentação, contribui para que seja adotada a suplementação alimentar (ABENUTRI, 2015).

Segundo dados da Associação Brasileira de Nutrição (ABENUTRI, 2015), o mercado mundial de suplementos nutricionais tem um crescimento anual, em média, de 20% a 25%. De acordo com pesquisas, o mercado mundial em 2007 fechou em US\$ 59,8 bilhões, aumentando para US\$ 78,5 bilhões em 2008, e US\$ 150 bilhões em 2011. Atualmente, é possível que esses valores sejam muito maiores, haja visto o crescimento do mercado de suplementos nos dias atuais.

O mercado de suplementação no Brasil está em expansão. Em 2008, houve um crescimento de 11% no segmento de nutrição esportiva, considerando que na época, apenas 5% da população consumia este tipo de produto. O setor de suplementação alimentar atualmente movimenta em torno de US\$ 1 bilhão por ano no mercado brasileiro, sendo este um faturamento nacional muito alto, mas em comparação ao mercado dos EUA, que movimenta US\$ 10 bilhões por ano, o mercado brasileiro ainda precisa desenvolver-se muito (ABENUTRI, 2015).

No passado, as empresas especializadas existiam principalmente para atender aos atletas de alta performance, mas atualmente foram levadas a incrementar seu portfólio por conta das mudanças nos hábitos de consumo da população em geral. Entre 2009 e 2012, o número de abertura de novas empresas do ramo de nutrição, sendo lojas de suplementos e de produtos naturais, passou de 323 unidades para 1413 novos empreendimentos, atingindo uma média acima de 1100 novas lojas ao ano (MIURA, 2014).

Nas academias, além do foco na musculação, o uso de suplementos alimentares vem se tornando cada vez mais popular entre os praticantes, destacando-se a preferência para o consumo de *whey protein*. Segundo MIURA (2014), considerando o volume de vendas dos produtos do segmento nutricional, 60% são à base de *whey protein*, puro ou adicionado de outros ingredientes, confirmando sua prevalência. No entanto, apesar da popularização e preferência entre os consumidores, o custo do produto é alto, possuindo grande valor agregado.

2.4 Processo de produção do soro do leite

O soro é obtido principalmente durante a fabricação de queijos, considerada como a transformação dos componentes do leite em um produto de fácil conservação, menor volume, alto valor nutricional, sabor agradável e boa digestibilidade. Porém, nesse processo não há 100% do rendimento do leite em queijo, mas sim uma variação de 8,5% a 20%, produzindo além de queijo, o soro (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001), conforme ilustrado na Figura 1.

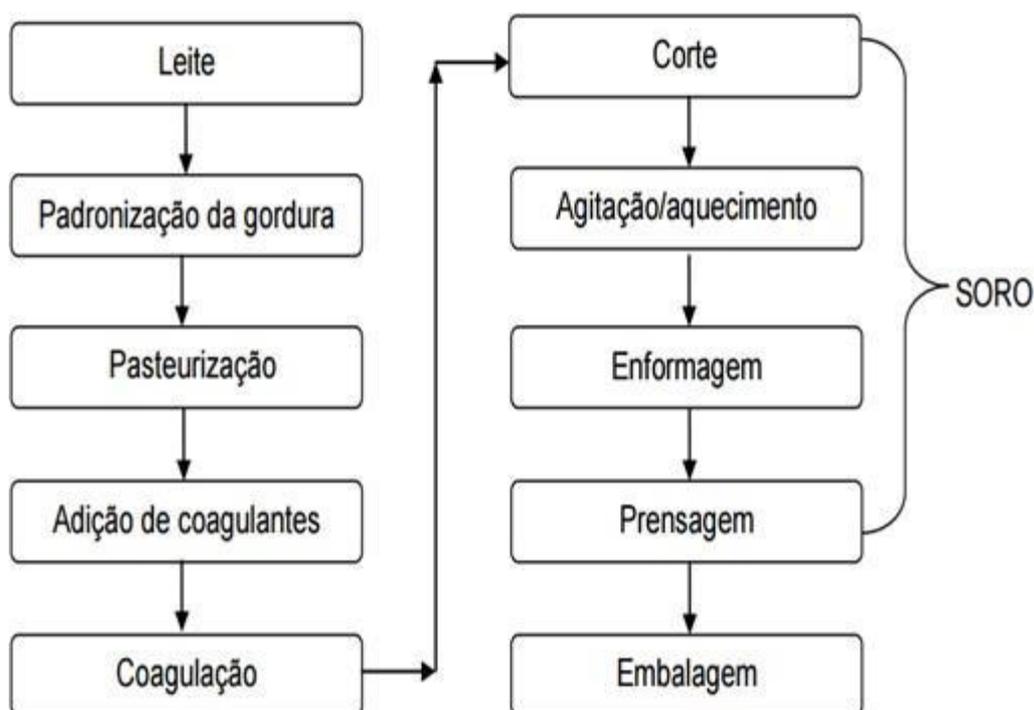


Figura 1- Fluxograma simplificado da produção de queijo e separação do soro de leite

Fonte: Leindecker (2011)

Dois tipos de soro fluido podem ser obtidos na fabricação de queijo: o soro doce e o soro ácido, que são obtidos de acordo com o tipo de queijo produzido. As diferentes composições estão ilustradas na Tabela 3. Dos tipos de queijos produzidos, o predomínio é dos que derivam o soro doce, provenientes da manufatura de queijos duros, semi-duros ou macios (Cheddar, Suíço, Provolone, Muçarela, etc.). São denominados doce, pois a desestabilização das micelas de caseína é realizada por via enzimática, obtendo assim soro com pH ligeiramente menor do que o do leite fresco, variando entre 5,9 a 6,6. O soro ácido é obtido por diminuição do pH do leite, com consequente desestabilização das micelas de caseína (ZADOW, 1992).

Tabela 3- Comparação da composição de soro doce e soro ácido

| Componente (%) | Soro doce | Soro ácido |
|-----------------------|------------------|-------------------|
| Proteína | 0,80 | 0,70 |
| Lactose | 4,90 | 4,40 |
| Minerais | 0,50 | 0,80 |
| Gordura | 0,20 | 0,04 |
| Água | 93,00 | 93,50 |

Fonte: Leindecker (2011)

No soro doce, a ação das enzimas não provoca a significativa redução do pH, logo os íons cálcio são retidos no queijo, associados às caseínas. A composição proteica de ambos os soros é semelhante no que se refere à maioria das proteínas (RODRIGUES, 2001). A maior parte dos produtos à base de soro é derivada de soro doce (BALDASSO, 2008).

Por muitos anos, o soro era considerado um problema, sendo que seu principal inconveniente é o alto poder poluente, representado pela lactose e proteínas. Possui uma demanda bioquímica de oxigênio que varia entre 30 g e 60 g de $O_2 \cdot L^{-1}$, dependendo do processo utilizado na produção do queijo. Em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto, equivale à poluição diária de 470 pessoas (ANDRADE; MARTINS, 2002). Contudo, o contínuo desenvolvimento de tecnologias e a crescente responsabilidade ambiental por parte da indústria, mudaram a imagem

do soro de efluente para uma valiosa fonte nutricional, tecnológica e, conseqüentemente, de rendimentos (BALDASSO, 2008).

2.5 Separação por membranas na obtenção de *whey protein*

Dentre as operações unitárias utilizadas para obtenção de soro em pó, concentrados e isolados proteicos de soro, a tecnologia de separação por membrana, a evaporação a vácuo e a secagem em *spray dryer* merecem destaque (ALVES *et al.*, 2014).

A microfiltração (MF) e a ultrafiltração (UF) são processos semelhantes que se baseiam na separação por meio da diferença de tamanho entre as partículas e o gradiente de pressão da força motriz. Segundo Mulder (1996), a principal diferença entre os processos está na resistência hidrodinâmica. A UF possui uma camada superior mais densa, resultado da utilização de membrana com menor número de poros e poros de menor diâmetro em sua superfície, gerando uma resistência hidrodinâmica muito maior. Assim, o processo de UF pode ser considerado como intermediário à MF e a nanofiltração (NF), com diâmetro de poro da membrana variando entre 0,05 μm e 0,001 μm , conforme ilustrado na Figura 2.

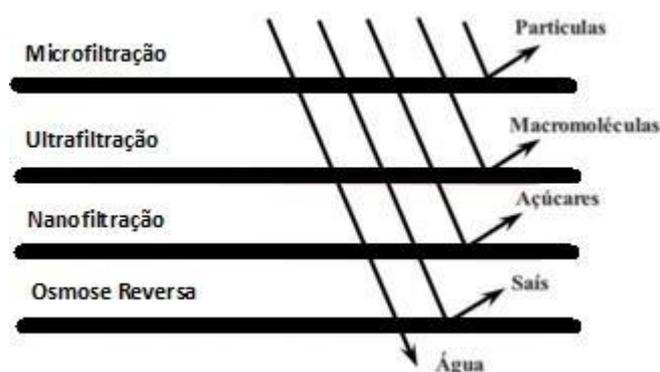


Figura 2- Representação comparativa das técnicas de separação por membranas.

Fonte: Adaptado de Pearson (2015)

Segundo Fellows (2006) a UF é usada para concentrar ou fracionar macromoléculas, onde estas são retidas total ou parcialmente pela membrana, enquanto as pequenas moléculas atravessam-na livremente. O processo de UF utiliza como força motriz a diferença de pressão, e sua membrana em comparação com as membranas de osmose reversa (OR) e nanofiltração (NF) apresentam uma porosidade maior e retêm somente macromoléculas como proteínas ou coloides, que têm pressão osmótica mais baixa.

Os componentes de baixa massa molar como lactose, sais e água permeiam por meio da UF. Os processos de NF e OR são utilizados para a separação de açúcares e de sais, respectivamente (FELLOWS, 2006). Segundo Alves *et al.* (2014) a tecnologia de separação por membranas, em especial a ultrafiltração, é a mais utilizada para recuperar as soroproteínas, devido a adequação da massa molecular à escala ótima de retenção deste processo.

Na UF, o soro pode ser separado em duas frações, conforme ilustrado na Figura 3: (i) o retentado – para produção de WPC em concentrações diferentes, porém com teores de proteína acima de 25%, ou mesmo o WPI com conteúdo de proteína superior a 90% em base sólida – e (ii) o permeado. O permeado pode ser evaporado posteriormente para produzir lactose em graus diferentes, e também durante o processo, é possível retirar sais, como o fosfato de cálcio (BALDASSO, 2008).

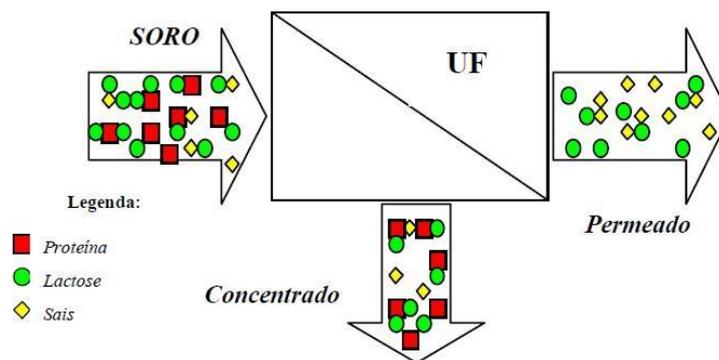


Figura 3- Representação esquemática do processo de Ultrafiltração

Fonte: Baldasso (2008)

Para otimizar o processo de ultrafiltração, pode-se utilizar a diafiltração (DF). A DF consiste na adição de água ou solução tampão em alguma fase

durante o processo de concentração com objetivo de lavar o retentado e permitir que os componentes de baixa massa molar melhor se permeiem, e conseqüentemente aumentar a purificação do retido (Figura 4) (GRADISON & LEWIS, 1996).

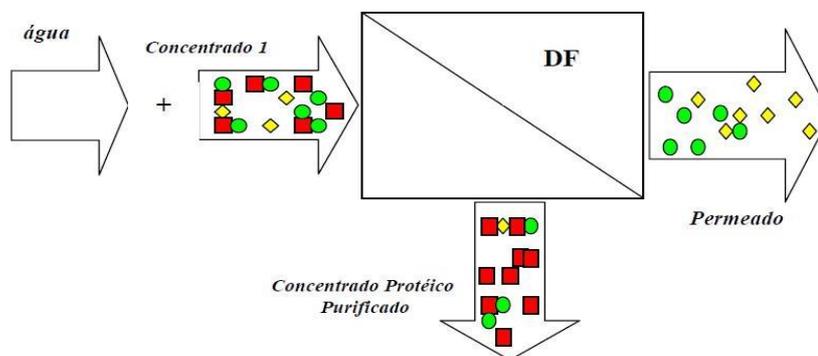


Figura 4 - Representação esquemática do processo de Diafiltração

Fonte: Baldasso, 2008

As indústrias que utilizam essa operação são as de alimentos, bebidas, biotecnológicas e farmacêuticas com a finalidade de purificar produtos. Em especial nas indústrias lácteas, a diafiltração é empregada após a pré-concentração do soro, permitindo maior separação de lactose e sais minerais, elevando a proporção e conseqüentemente a pureza de proteínas do retido. Após a etapa de concentração, o retentado é alimentado em secadores obtendo-se o WPC em pó (YEE *et al.*, 2007). O retentado na sua forma líquida é seco em *spray dryer* (Figura 5) obtendo WPC ou WPI, de acordo com o teor proteico após a secagem (BALDASSO, 2008). As figuras 6 e 7 ilustram o processo completo de obtenção de WPC com variadas concentrações, mostrando o processo simples e o acoplado a DF.

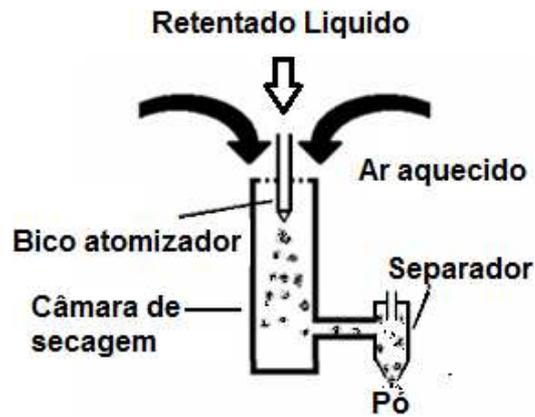


Figura 5- Esquema simplificado de “*spray dryer*”

Fonte: Adaptado de LABMAQ (2003)

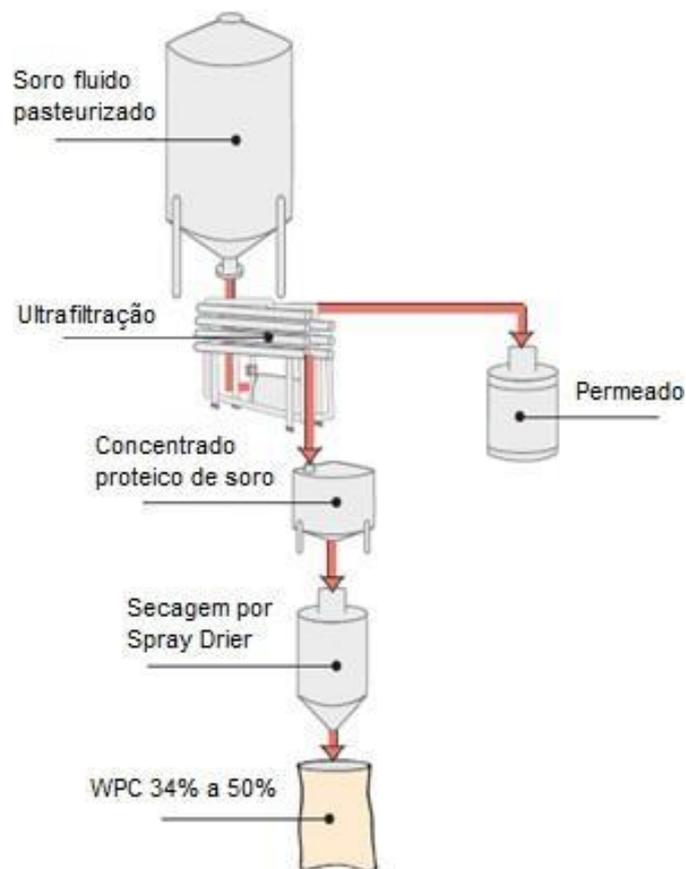


Figura 6 - Processo simples de produção de WPC com 34% a 50% de teor proteico

Fonte: Adaptado de Smith (2008)

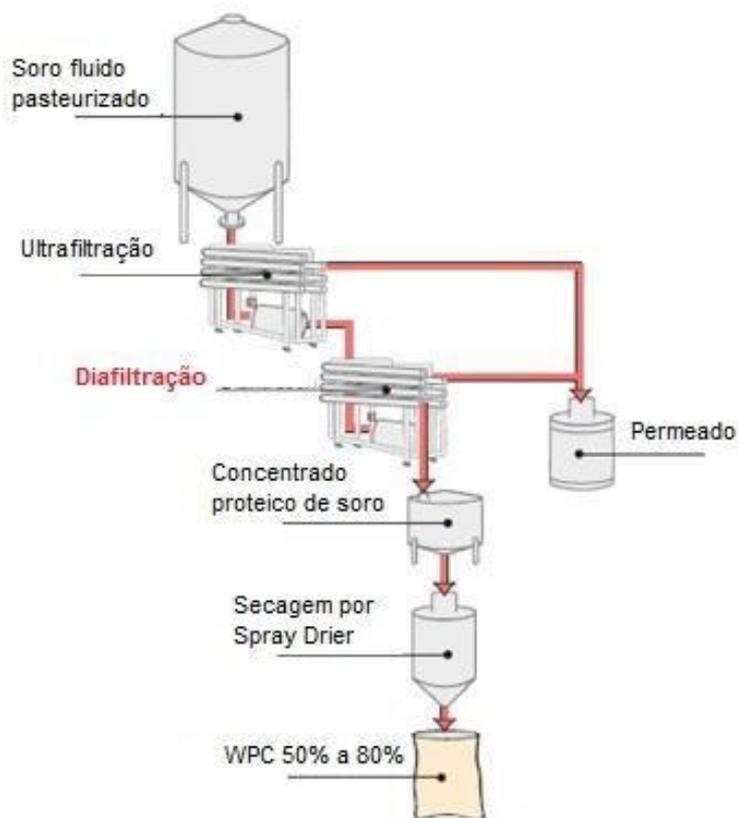


Figura 7- Processo acoplado a diafiltração para produção de WPC com 50% a 80% de teor proteico

Fonte: Adaptado de Smith (2008)

2.6 Classificação dos concentrados proteicos do soro

Após o processamento, o soro pode se apresentar de três formas: soro concentrado, soro seco e soro modificado. O soro concentrado é a substância obtida pela remoção parcial da água, deixando todos os outros constituintes na mesma proporção relativa ao soro original, enquanto que o soro seco ou em pó difere pela remoção quase total da água. Já o soro modificado constitui uma classe de produtos obtidos por vários processos e procedimentos, onde se inclui os concentrados proteicos (BOSCHI, 2006).

Os WPC e WPI são classificados de acordo com sua concentração de proteínas. Segundo Antunes (2003) os concentrados proteicos do soro do leite são obtidos pela remoção dos constituintes não proteicos de tal modo que o produto final seco contenha, pelo menos, 25% de proteína. Em geral, o teor

proteico dos concentrados varia entre 29% a 89%, sendo os WPC comumente apresentados com concentração de 65% a 80% de proteínas e os WPI com valor superior a 90% (em base seca) (TUNICK, 2008). Alguns produtos derivados do soro de leite são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4- Composição de alguns derivados de soro de leite

| Produto | Proteína (%) | Lactose (%) | Gordura (%) | Sais (%) | Umidade (%) |
|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| Soro em pó | 10 a 15 | 63 a 75 | 1,0 a 1,5 | 8,2 a 8,8 | 1,0 a 2,0 |
| WPC 35 | 34 a 36 | 46 a 52 | 3,0 a 4,5 | 6,5 a 8,0 | 3,0 a 4,5 |
| WPC 50 | 50 a 52 | 33 a 37 | 5,0 a 6,0 | 7,5 a 8,5 | 3,0 a 4,5 |
| WPC 65 | 63 a 65 | 20 a 23 | 5,0 a 6,5 | 3,0 a 7,0 | 3,0 a 4,5 |
| WPC 80 | 80 a 82 | 4 a 8 | 4,0 a 8,0 | 3,0 a 4,0 | 3,0 a 4,5 |
| WPI | >90 | 0,5 a 1,0 | 0,5 a 1,0 | 2,0 a 3,0 | 3,0 a 4,5 |
| Lactose | - | >99 | - | 0,3 | 1 |

Fonte: Adaptado de Baldasso (2008).

Outro produto do seguimento é o concentrado proteico hidrolisado, que é obtido quando, durante o processamento, as moléculas de proteína são hidrolisadas, gerando peptídeos menores. É produzido normalmente a partir de concentrados de soro com teor de lactose reduzido e elevada concentração de proteína (ANTUNES, 2003).

Sendo suplementos alimentares derivados do soro bastante visados economicamente, produtores mal intencionados podem vir a utilizar meios ilícitos para aumento de volume de comercialização e, conseqüentemente, maiores lucros.

2.7 Fraudes em alimentos

Todos os alimentos possuem características específicas no que diz respeito à composição química, estrutura física, características nutricionais e sensoriais, entre outras. Muitos possuem regulamentos técnicos que definem sua identidade e qualidade, assegurando alimentos genuínos, inócuos e principalmente seguros aos consumidores. Essas características são

monitoradas por órgãos fiscalizadores que utilizam métodos analíticos de referência para avaliação qualitativa e quantitativa dos seus componentes e entre as avaliações a detecção de fraudes (REISSIG, 2009).

A fraude em alimentos é um pratica antiga e atualmente é considerada problema de saúde pública uma vez que leva riscos ao consumidor. Essa prática tem como objetivo adulterar e/ou falsificar o alimento com a finalidade de obtenção de maiores lucros por meio do aumento de volume e do prolongamento da vida útil do produto empregando artifícios que infringem a legislação (NASCIMENTO, BELL, ANJOS & FURTADO, 2010).

Dentre os alimentos que com grande frequência sofrem com as fraudes, o leite e seus derivados são exemplos, com destaque atualmente para os suplementos alimentares a base de *whey protein* (SCARLATO *et al.*, 2016). Recentemente, órgãos fiscalizadores indicaram irregularidades significativas na composição de vários suplementos proteicos disponíveis no mercado, tornando o assunto destaque nacional. Foram evidenciados problemas referentes à qualidade do produto, a dificuldade de fiscalização e o monitoramento de sua composição por meio de análises tradicionais (INMETRO, 2014).

Os órgãos de fiscalização utilizam métodos de análises oficiais, para quantificar e qualificar os constituintes presentes nos suplementos a base de *whey protein*. Como exemplos de métodos utilizados se destacam a avaliação do percentual de umidade por secagem direta, o teor gordura por método de Gerber e teor de proteína por método de Kjeldahl. Tais métodos requerem equipamentos simples e específicos, de baixo custo, mas exigem longos tempos de análise, descarte químico específico e pessoal altamente treinado, encarecendo o processo. Além disso, tais análises geram resultados com subjetividade na leitura. Atualmente uma alternativa que auxilie a avaliação analítica é a aplicação de metodologias utilizando análises físicas espectroscópicas (BRASIL, 2006).

Este campo de estudo vem contribuindo muito para o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, de baixo custo, fornecendo informações importantes e até mesmo inovadoras. Como exemplos de aplicação pode-se citar Vieira *et al.* (2015) que aplicaram a espectroscopia no infravermelho médio para detecção de fraudes com soro de leite adicionado a leite cru, e concluíram que é um método eficaz e possui vantagens ao se comparar com métodos

tradicionais. Ven *et al.* (2002) também utilizou a espectroscopia na região do infravermelho médio para qualificar propriedades funcionais em amostras de whey e caseína hidrolisada, concluindo que o método foi eficiente para o objetivo proposto e que as informações fornecidas pela espectroscopia foram além do que os métodos tradicionais podiam oferecer.

2.8 Métodos Oficiais utilizados na análise de alimentos

2.8.1 Determinação de umidade por secagem direta em estufa

Os alimentos possuem umidade em sua composição estrutural em alta ou baixa proporção, de acordo com o método de industrialização a que se tenham sido submetidos. Normalmente essa umidade é representada pela água contida e pode ser classificada em: água livre, presente nos espaços intergranulares e entre os poros do alimento, mantendo as propriedades físicas e servindo como agente dispersante para substâncias coloidais, e como solvente para compostos cristalinos. A água livre é facilmente evaporada e retirada da estrutura. Água absorvida está fracamente ligada à superfície de macromoléculas (amido, pectina, celulose e proteínas) por forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio, e por isso é retirada com um pouco de dificuldade. Água de hidratação ou água ligada está quimicamente vinculada com outras substâncias do alimento e não é eliminada na maioria dos métodos de determinação de umidade (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2004).

A análise de umidade corresponde à perda de massa sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Esse método se baseia no aquecimento direto da amostra em estufa a 105°C onde o resíduo obtido é chamado de resíduo seco ou sólido total (BRASIL 2006).

2.8.2 Determinação de gordura pelo método de Gerber

Esse método é o mais empregado para determinação de gordura em leite e derivados, onde a leitura é realizada diretamente em escala presente na

coluna do dispositivo chamado de Lactobutirômetro de Gerber. (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2004)

Baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido reage com a matéria orgânica, digerindo as proteínas que se encontram ligadas à gordura e rompendo glóbulos. Com isso, diminui-se a viscosidade do meio, aumenta-se a densidade da fase aquosa e funde-se a gordura liberada. A liberação de calor proveniente da reação favorece a separação da gordura pelo meio extrator (álcool amílico) e a leitura é feita direta na escala do butirômetro após centrifugação e imersão em banho-maria (BRASIL 2006).

2.8.3 Teor de nitrogênio e proteínas totais por método de Kjeldahl

A análise de proteínas em amostras foi proposta por Kjeldahl no século XIX pela determinação do nitrogênio total e correlação indireta. Atualmente com poucas modificações, ainda é muito usado para essa finalidade, sendo considerado o método oficial por muitos órgãos fiscalizadores em diversos países, inclusive no Brasil (GALVANI & GAERTNER, 2006).

O método se baseia em 3 etapas. Na primeira, ocorre a decomposição da matéria orgânica por digestão a 400°C em presença de ácido sulfúrico concentrado e de catalisador sulfato de cobre. Nessa etapa a matéria orgânica presente na amostra é transformada em amônia (NH_3), que reage com o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o sulfato de cobre, formando o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), conforme Figura 8.

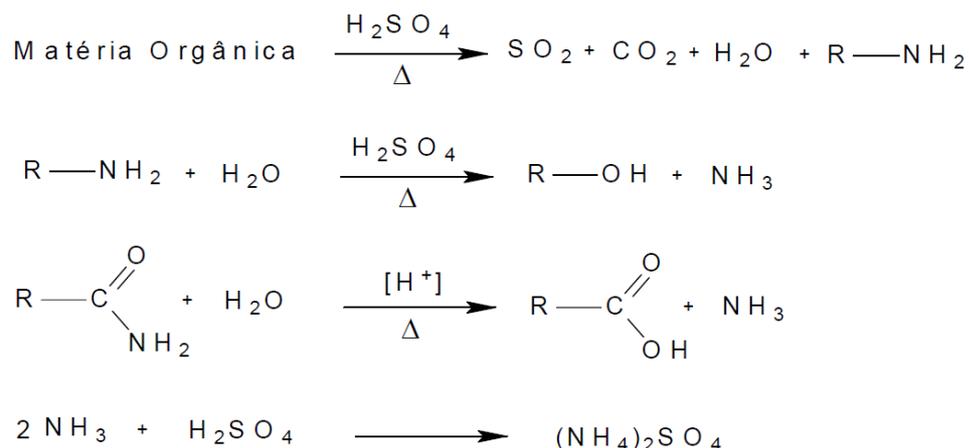


Figura 8 - Reação química na etapa de digestão

Fonte: Galvani e Gaertner (2006)

Na segunda etapa, é realizada a destilação do nitrogênio por arraste a vapor em equipamento apropriado. Nessa etapa, o sulfato de amônio é tratado inicialmente com hidróxido de sódio (NaOH) em excesso, ocorrendo a liberação de amônia (NH₃), conforme Figura 9.

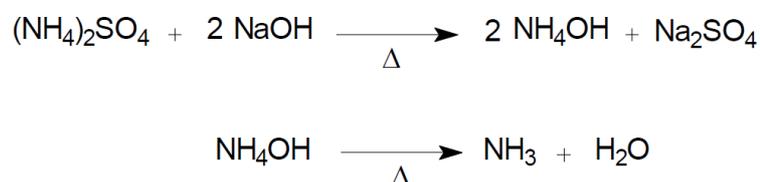


Figura 9- Reação química na etapa de destilação

Fonte: Galvani e Gaertner (2006)

A amônia que desprende na reação é coletada em um frasco contendo ácido bórico (H₃BO₃) com indicador. À medida que ocorre a destilação, há a formação do borato de amônio (NH₄H₂BO₃), conforme Figura 10.



Figura 10 - Reação química na etapa de destilação

Fonte: Galvani e Gaertner (2006)

Na terceira e última etapa do processo, o borato de amônio é titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl) de título conhecido, conforme Figura 11. O processo deve ser realizado até a alteração da cor do indicador (viragem) e volume gasto de titulante será usado no cálculo do teor de nitrogênio.



Figura 11 - Reação química na etapa de titulação

Fonte: Galvani e Gaertner (2006)

Ao final dessas etapas obtém-se o teor de nitrogênio total por meio de cálculos matemáticos. Na determinação da proteína bruta, multiplica-se o valor do nitrogênio total encontrado por um fator que converte o nitrogênio em proteína. O fator de conversão representa a quantidade de nitrogênio presente na amostra analisada, onde se pode variar em determinados tipos de amostras (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2004).

2.9 Espectroscopia na região do Infravermelho

A Espectroscopia é definida como o estudo da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Trata-se de um método não invasivo e não destrutivo de amostras, e entre as espectroscopias mais comuns pode-se destacar as rotacionais, vibracionais e eletrônicas. A radiação vai de radiofrequências aos raios gama, e entre elas estão as regiões ultravioleta, visível, infravermelho e micro-ondas, sendo que a matéria se organiza numa grande variedade de formas (Tabela 5). Normalmente, as transições eletrônicas são situadas na região do ultravioleta e visível, as vibrações moleculares na região do infravermelho e as rotações moleculares na região de micro-ondas (ANJOS, 2016; BUENO, 1989).

Tabela 5- Divisão e características das regiões de importância do espectro eletromagnético

| $>12800\text{ cm}^{-1}$ | $12800-4000\text{ cm}^{-1}$ | $4000-200\text{ cm}^{-1}$ | $200-100\text{ cm}^{-1}$ | $< 100\text{ cm}^{-1}$ |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| Visível e Ultravioleta | Infravermelho Próximo | Infravermelho Médio | Infravermelho Longínquo | Micro-ondas |
| Transições Eletrônicas | Vibrações Moleculares | Vibrações Moleculares | Vibrações Moleculares | Rotações Moleculares |

Fonte: Adaptado de Bueno (1989) e Hooler *et al.* (2009)

A região do infravermelho está situada entre as regiões do visível e as micro-ondas e se dividem em infravermelho próximo (NIR, “*near infrared*”), infravermelho médio (MIR, “*middle infrared*”) e infravermelho longínquo ou distante (FIR, “*far infrared*”), conforme ilustrado na Figura 12 (HOLLER *et al* 2009).

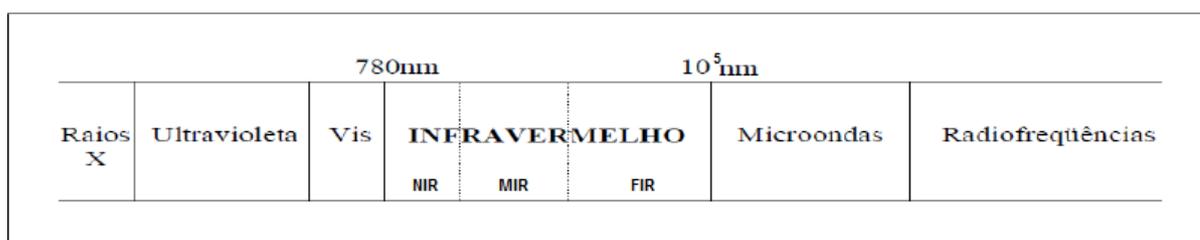


Figura 12 – Divisões da região do Infravermelho

Fonte: Adaptado de Sotelo (2006)

As energias vibracionais e rotacionais são atribuídas pelo fenômeno de deslocamento dos núcleos atômicos, onde os átomos que constituem a molécula não possuem uma estrutura rígida havendo movimentação constante (Figura 13).

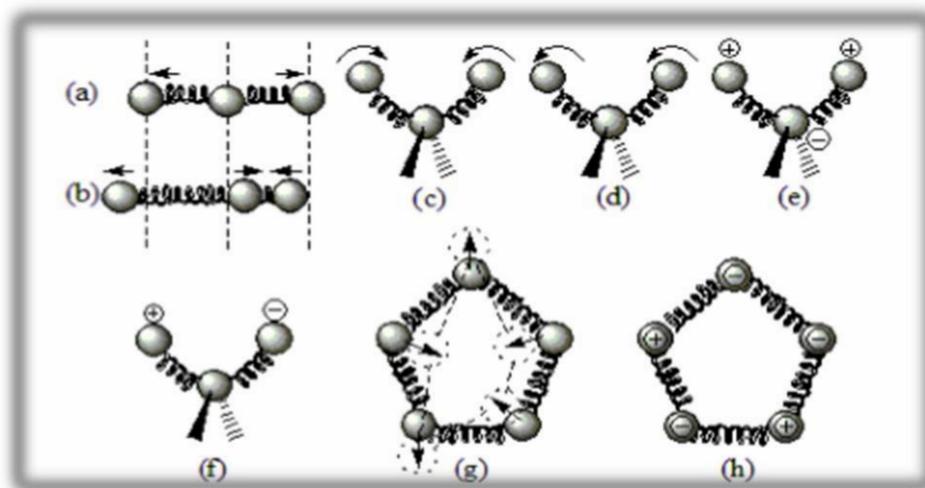


Figura 13 - Diferentes tipos de vibrações de deformação

Fonte: Bueno (1989)

Os diferentes tipos de vibrações são definidos como: (a) vibração de estiramento simétrico, (b) vibração de estiramento assimétrico, (c) vibração de deformação tipo tesoura (*scissoring*), (d) vibração de deformação tipo oscilação, rotação, (e) vibração de deformação tipo balanço (*wagging*), (f) vibração de deformação tipo torção (*twisting*), (g) vibração de deformação no plano e (h) fora do plano (BUENO, 1989).

Os espectros de infravermelho são obtidos por meio da energia absorvida pela amostra a cada comprimento (ou número) de onda quando aplicado feixe luminoso intenso, monocromático e coerente (laser). Os espectros tem caráter de transmissão ou absorção e identificam ligações químicas presentes na amostra (ANJOS, 2016). A energia absorvida é convertida em energia vibracional por não possuir potência energética suficiente para causar transições eletrônicas (MEDEIROS, 2009).

Quanto mais ligações químicas possuir a amostra analisada, mais complexa será a interpretação dos espectros obtidos, em virtude da grande quantidade de informações fornecidas pelo método. Tal característica indica capacidade em fornecer informações relevantes ao se analisar matrizes orgânicas como amostras de alimentos (ANJOS, 2016).

29.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Albert Abraham Michelson no final do século XIX construiu um modelo de interferômetro e em 1892 Lord Rayleigh correlacionou esse modelo com espectros utilizando a operação matemática denominada transformada de Fourier. Sendo assim, hoje a base de qualquer espectrômetro FTIR é o interferômetro de Michelson (RODRIGUES, 2012).

A inserção do interferômetro de Michelson na espectrofotometria permitiu maiores resolução e qualidade espectral com maior velocidade de varredura e aquisição de espectros, possibilitando confiabilidade e robustez de análises (LIMA, 2015). Atualmente essa técnica revolucionou a espectroscopia e os equipamentos utilizados em grande maioria são baseados nos princípios interferométricos e não mais em elementos dispersivos como utilizados na década de 1970 (MEDEIROS, 2009).

O princípio do interferômetro de Michelson é representado na Figura 14.

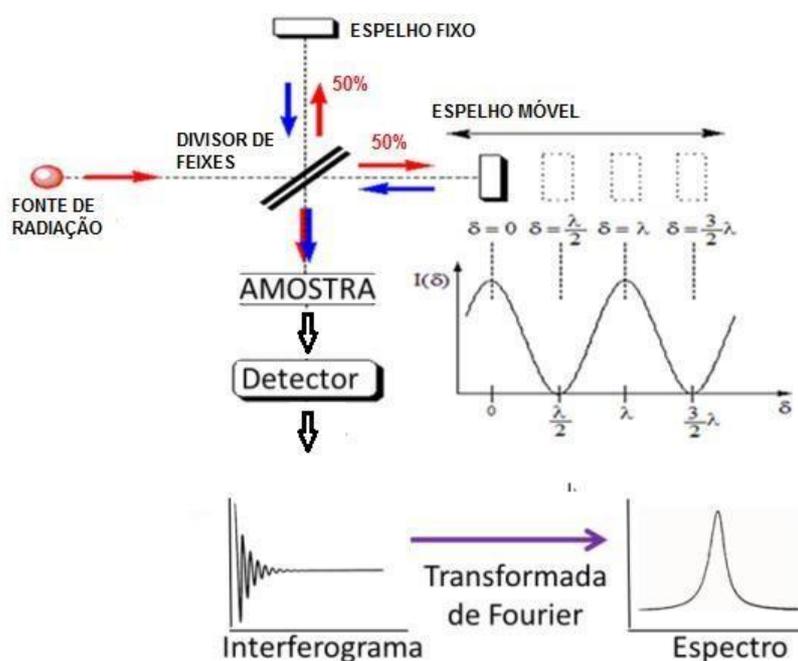


Figura 14 – Esquema simplificado do interferômetro de Michelson

Fonte: Adaptado de RODRIGUES (2012)

Nesse sistema, a radiação emitida é dividida em dois feixes, cada um correspondendo a 50% do original no divisor de feixes. Seguindo a representação esquemática na Figura 14, tem-se que um dos feixes segue em direção ao espelho de posição fixa (seta vermelha) no qual reflete de volta para o divisor (seta azul vertical). A outra metade da radiação original segue para o espelho móvel (seta vermelha horizontal), reflete e retorna ao divisor de feixes (seta azul horizontal). Ao se encontrarem no divisor de feixes, há uma defasagem entre os feixes luminosos e, conseqüentemente, interferência luminosa. Este novo feixe de luz atravessa a amostra e atinge o detector. A diferença no caminho percorrido é chamada de atraso e o gráfico da intensidade de radiação em função desse atraso é chamado de interferograma (RODRIGUES, 2012).

O interferograma contém todas as informações fornecidas pelo espectrômetro, mas a forma com que elas se apresentam não são muito úteis para a espectroscopia e a química analítica. Essas informações são convertidas em espectros, relacionando as intensidades com as respectivas frequências, por meio da transformada de Fourier. O interferograma é, portanto, formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam ao interferômetro e possui todas as informações espectrais da amostra (CONSTANTINO, 2008).

As configurações experimentais para aquisição de espectros FTIR podem ser feitas de diferentes maneiras, sendo as mais utilizadas à transmissão, transflexão e reflexão total atenuada (ATR) (Figura 15) (LIMA, 2015).

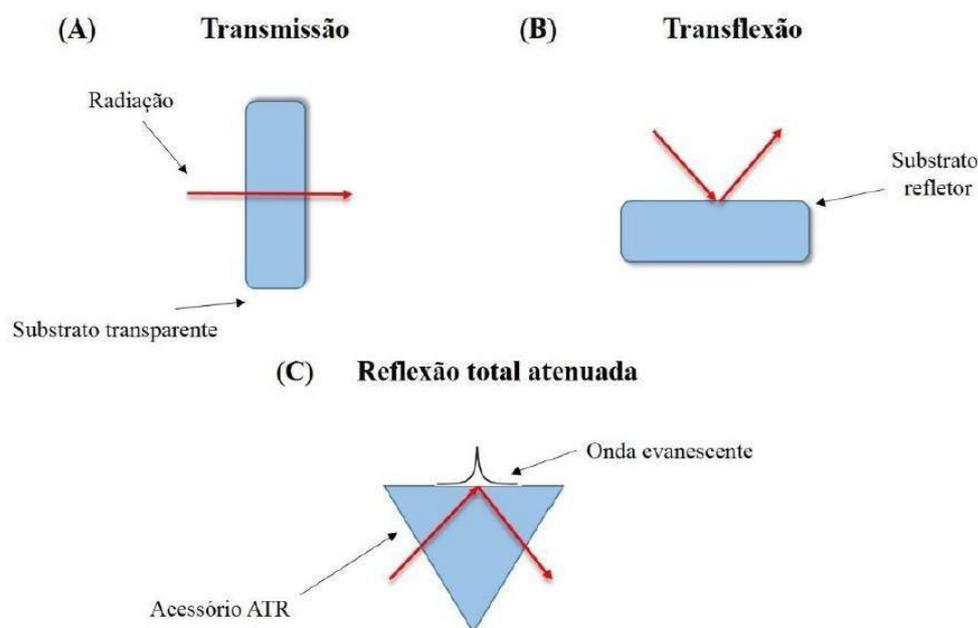


Figura 15 – Configurações experimentais para FTIR

Fonte: Lima (2015)

Pode-se destacar a reflexão total atenuada (ATR) como configuração experimental ideal para análises em alimentos por não necessitar de substratos especiais, além de pouco ou nenhum preparo das amostras (pós, sólidas, pastosas ou líquidas). As amostras são colocadas em contato direto com o elemento de reflexão interna (diamante, por exemplo), possibilitando análises rápidas e não destrutivas (LIMA, 2015).

292 Reflexão Total Atenuada - (ATR)

A ATR geralmente está relacionada com análises de amostras de difícil manuseio, utilizada normalmente para se obter espectros no infravermelho de materiais em pasta, adesivas e em pó que possui dificuldade de ser analisadas nos métodos de espectroscopia tradicionais. Seu uso vem crescendo, pois é uma técnica rápida, com aplicação em diversos tipos de amostras e com o mínimo de tratamento e preparação. Devido a essas características, sua aplicação é indicada em análises de alimentos (BARTH, 2007).

O seu princípio está baseado na passagem de um feixe de radiação pelo cristal de ATR (que é um meio mais denso que a amostra), atingindo a amostra, onde ocorre a reflexão. Podem ser usados os cristais de seleneto de zinco (ZnSe), germânio (Ge), iodeto de tálio (KRS-5) e diamante. A fração do feixe de luz incidente que é refletida aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência, e quando excede um determinado ângulo crítico a reflexão é completa. A reflexão interna total ocorre na interface da amostra com o cristal e a radiação refletida (onda evanescente), penetra a amostra até uma curta distância (0,5 μm a 5,0 μm), sofrendo absorção. A Figura 16 demonstra de forma resumida os princípios da reflexão total atenuada (MEDEIROS, 2009).

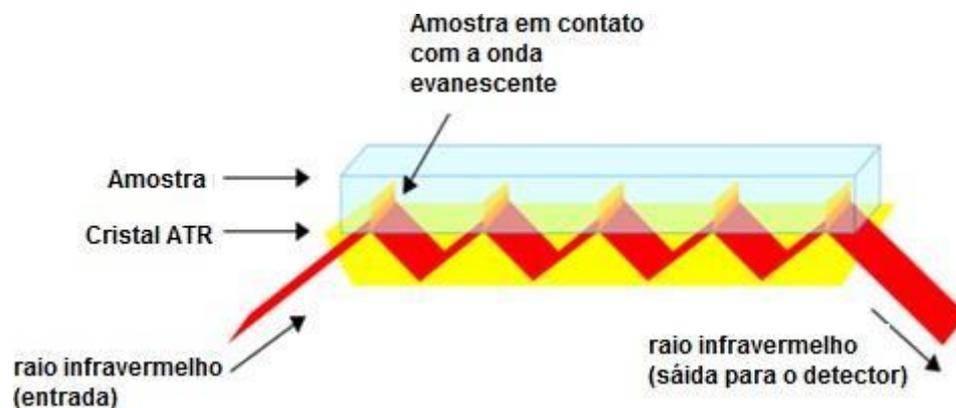


Figura 16 – Esquema simplificado da reflexão total atenuada (ATR)

Fonte: Adaptado de Perkinelmer (2005)

A intensidade da radiação é atenuada devido às múltiplas reflexões ao longo do comprimento da amostra, sendo essa radiação absorvida em comprimentos de ondas correspondentes as bandas de absorção no infravermelho e assim obtém-se espectros (BARTH, 2007).

2.10 Quimiometria e análise de dados

2.10.1 Análise de componentes principais

A análise estatística multivariada vem se tornando uma importante ferramenta para interpretação de dados analíticos, principalmente análise exploratórias, reconhecimento de padrões e análises discriminantes (STEPHANI, 2010). Há diversos métodos para se realizar a análise estatística multivariada dentre os quais está a análise por componentes principais (*PCA* – do inglês *Principal Component Analysis*), que foi descrita inicialmente por Pearson em 1901 e posteriormente desenvolvida por Hotelling em 1933, usando com propósito de analisar as estruturas de correlação (HONGYU, SANDANIELO, & JUNIOR, 2015).

Essa técnica estatística consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. A combinação linear de todas as variáveis originais são independentes entre si e estimadas com o propósito de reter o máximo de informação em termos da variação total contida nos dados, visando extrair e transformar as informações de uma tabela convertendo-a em gráficos informatizados (VARELLA, 2008).

A análise de componentes principais tem objetivo de reduzir a quantidade de dados com a menor perda possível da informação e explicar a estrutura da variância e covariância de um vetor aleatório. Procura-se redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados. A análise multivariada foi desenvolvida para resolver problemas específicos em diversas áreas do conhecimento, como por exemplo, tratar dados obtidos por meio da espectroscopia no infravermelho (VARELLA, 2008).

Segundo Stephani (2010), a PCA faz uma aproximação 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, visto na Figura 17.

$$X = T_1 P_1^T + T_2 P_2^T + \dots + T_a P_a^T$$

Figura 17 - Representação esquemática da decomposição por PCA

Fonte: Stephani (2010)

A matriz é o produto de dois vetores, *score* (*score*) “*t*” e peso (*load* ou *loading*) “*p*” para “*a*” componentes principais, conforme Equação 1, a qual pode ser simplificada pela Equação 2 (STEPHANI, 2010).

$$X = t_1 p_1 + t_2 p_2 + \dots + t_a p_a \quad \text{(Equação 1)}$$

$$X = TP^T \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: “*X*” é o conjunto original dos dados com “*n*” linhas (amostras) e “*m*” colunas (variáveis); “*T*” é a matriz dos *scores* com “*n*” linhas e “*d*” colunas (número de componentes principais, novas coordenadas no novo sistema de eixos); “*P*” é a matriz dos *loadings* (informação do peso de cada variável original na formação dos novos eixos) com “*d*” linhas e “*m*” colunas.

A Figura 18 demonstra a decomposição dos dados de variáveis espectrais em escores e pesos, formando o eixo de componentes principais que explica os dados originais.

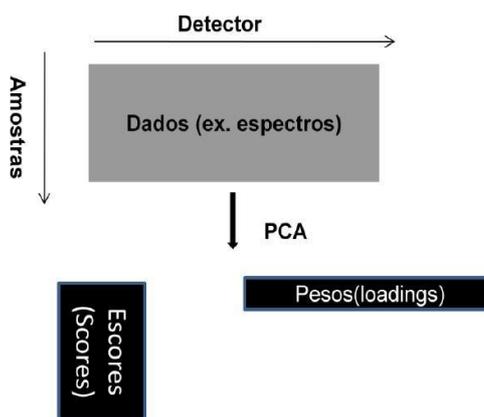


Figura 18 – Princípios do PCA; decomposição de dados em escores e pesos.

Fonte: Medeiros (2009)

A grande fração da variância é descrita nos primeiros componentes principais, sendo possível visualizar os dados pelo gráfico dos *scores* de um componente contra o outro. O gráfico de *scores* mostra similaridade e as diferenças entre as amostras e o gráfico dos *loadings* mostra a contribuição de cada variável para o modelo das componentes principais (STEPHANI, 2010).

2.102 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

O modelo Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*PLS* - do inglês *Partial Least Squares*) é uma técnica quimiométrica de regressão muito utilizada internacionalmente para associação de espectros de difícil designação de bandas. Em espectroscopia, esperam-se comportamentos lineares sendo que ruídos e interferentes podem reduzir as informações quando se utiliza calibrações mais simples, fator que em calibração *PLS* a influencia é mínima. É considerada uma ferramenta extremamente útil porque os fatores que causam sobreposição em dados experimentais não influenciam de forma contundente os modelos de calibração. Em calibrações que relacionam concentrações e espectros, o modelo *PLS* leva em consideração a estimativa de erros, assumindo que esses estão igualmente distribuídos, enquanto que em outros

modelos assumem que a concentração estimada está livre desses erros, forçando definir quais variáveis possuem erros associados (MEDEIROS, 2009).

A técnica consiste em uma modelagem que estima simultaneamente os fatores de sobreposição de matrizes. As informações espectrais (matriz X) são correlacionados com as medidas de referência ou concentrações (matriz Y) para se obter uma relação linear. A construção do modelo retira informações do conjunto de dados da matriz espectral correlacionando com as informações retiradas do conjunto de dados de referência, obtendo o número de variáveis latentes (ou fatores) necessárias para essa correlação. As variáveis latentes descrevem a máxima variância entre as matrizes, o que na realidade são combinações lineares das componentes principais, calculada pelo método PCA (TAVARES, 2012).

O PLS é muito similar ao PCA, exceto que os fatores são escolhidos para descrever as variáveis na matriz Y (concentração) e na matriz X (espectros). Isso é realizado utilizando as colunas da matriz Y para estimar fatores para X. Ao mesmo tempo as colunas da matriz X (neste caso, os números de onda) são usadas para estimar fatores para Y. Para a construção do modelo de calibração, é utilizado um número de variáveis latentes que proporcione o menor erro possível de previsão (TAVARES, 2012).

O modelo de regressão é definida pelas Equações 4 e 5:

$$X = TP + E \quad \text{(Equação 3)}$$

$$Y = UQ + F \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde, X é a matriz dos espectros; Y a matriz dos valores de referência; T e U são matrizes de projeções de X e Y (também chamados de escores), respectivamente); P e Q são matrizes ortogonais de pesos (chamados loadings); E e F são erros associados com a modelagem de acordo com o PLS. As decomposições de X e Y são feitas de modo a maximizar a covariância entre T e U.

A eficiência dos modelos de calibração multivariada pode ser avaliada pelo cálculo dos valores de erro quadrático médio (RMSE – do inglês, *root mean square error*) e do erro relativo (RE). O RMSE representa o desvio padrão dos

erros de previsão, ou seja, quanto menor, melhor será o erro do modelo. O RE explica o erro geral do método e quando multiplicado por 100, representa o erro médio percentual (BASSBASI, *et al.* 2014; MORGANO, *et al.* 2007). O RMSE e o RE são definidos pelas Equações 6 e 7 :

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{prev} - y_{referência})^2}{N}} \quad \text{(Equação 5)}$$

$$RE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i_{prev} - y_i_{referência})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i_{referência})^2}} \times 100 \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde “n” representa o número de amostras do conjunto de calibração, “ y_{prev} ” é o valor estimado pelo modelo e “ $y_{referência}$ ” é o valor de referência.

Para avaliação dos modelos de calibração e análise da validação efetuada é necessário calcular o valor de R^2 . Esse coeficiente informa a correlação entre os valores reais e os preditos pelo modelo, tanto para a calibração, quanto para a validação (MEDEIROS, 2009). Quanto mais próximas forem as curvas de ajuste do modelo (reta de tendência), melhor o método. Pode ser medido por meio da Equação 8:

$$R^2 = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_{prev} - y_{referência})^2}{\sum (y_{referência} - y_m)^2}} \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde “ y_m ” é o valor médio encontrado para o “ $y_{referência}$ ”.

Para o modelo proposto é necessária sua validação comparando os valores obtidos por experimentos aos previstos. Para isso, um teste muito usado para indicar a qualidade do modelo é a validação por conjunto de testes ou também denominada validação externa. Para a constituição do modelo, dois conjuntos de dados independentes são separados, um para calibração do modelo, e outro para validação. As propriedades previstas no conjunto de validação são então comparadas com as propriedades obtidas experimentalmente e o erro de previsão é calculado (MEDEIROS, 2009).

A espectroscopia no infravermelho é amplamente utilizada para análises de amostras orgânicas, principalmente de alimentos. Essa técnica em associação ao método PLS é bem indicada para avaliações quantitativas em amostras, sendo uma ferramenta bem adequada e viável para se utilizar em análises rotineiras onde se necessita de rapidez de resultados, mínimo de tratamento das amostras e em alguns casos necessidade de técnica não destrutiva (TAVARES, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi usar a Espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR), acoplado à Reflectância Total Atenuada (ATR), para uma caracterização rápida e não destrutiva de amostras de *WPC* em diferentes concentrações proteicas a partir da substituição do *WPC* por *SLP*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as composições físico-químicas (umidade, gordura, lactose e proteína) das amostras de *WPC* e *SLP* (amostras matriz) e avaliar sua qualidade para uso como base de referência;
- Preparar amostras de *WPC* dopadas com *SLP*, simulando diferentes concentrações proteicas;
- Quantificar os teores de proteínas pelo método de Kjeldahl;
- Utilizar a PCA para caracterizar as dopagens a partir das semelhanças entre seus espectros FTIR;
- Utilizar o método de mínimos quadrados parciais para a previsão quantitativa simultânea do teor de proteína e a quantidade em gramas de *WPC* ou *SLP* adicionados à amostra (de um total de 10g).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O WPC e SLP utilizados foram produzidos e disponibilizados pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Análises preliminares para caracterização dos produtos desidratados WPC e SLP foram realizadas utilizando métodos oficiais de análise, tomando como referência a Instrução Normativa nº 68, de 12 de Dezembro de 2006, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Análises de umidade, gordura e proteína total foram a base de avaliação da qualidade das matérias-primas (amostras matriz). Os ensaios analíticos foram feitos nos laboratórios: Lab Caseus Consultoria LTDA, situado em Leopoldina, Minas Gerais, Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora, Centralbio – Faculdade de Farmácia/UFJF e Laboratório de Pesquisa do Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG.

4.1 Análises preliminares de WPC e SLP

4.1.1 Determinação de umidade

Inicialmente foi pesado em cápsula de porcelana, 10g de areia purificada e adicionado à mesma um pequeno bastão de vidro. Os conjuntos cápsula de porcelana, areia e bastão usados nas análises, em duplicata, foram colocados em estufa a $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1h e esfriados em dessecador. Logo após, foram cuidadosamente pesados utilizando uma balança eletrônica analítica, na qual pesou-se aproximadamente 5g de cada matéria-prima (denominação para massa inicial na Equação 8). Esse procedimento foi realizado separadamente a cada amostra.

Em seguida, os conjuntos foram direcionados a estufa previamente regulada e deixados por 2h em aquecimento constante. A primeira leitura de massa foi feita após esse tempo e o procedimento foi constituído de retirada das cápsulas e transferência para dessecador para esfriamento, seguido de pesagem.

O conjunto foi colocado novamente na estufa mantendo a regulagem de temperatura, porém as próximas pesagens foram feitas em intervalo de 30 minutos até que o valor medido na balança se mantivesse constante entre pesagens sucessivas. O cálculo do teor de umidade foi realizado, portanto, utilizando a Equação 8.

Equação 8 – Cálculo do teor de umidade da amostra

$$\square \% = \frac{\square\square\square\square \square\square \square\square\square\square\square\square\square\square (\square) - (\square\square\square\square \square\square\square\square\square\square)(\square)}{\square\square\square\square \square\square\square\square\square\square \square\square \square\square\square\square\square\square (\square)} \times 100$$

4.12 Determinação de gordura pelo método de Gerber

Foi adicionado cuidadosamente 10 mL de solução de ácido sulfúrico (de densidade 1,820 g·mL⁻¹ a 1,825 g·mL⁻¹ a 20°C) em butirômetro apropriado para leite em pó (Teichert) da marca Gerber. Em sequência, adicionou-se 10 mL de água, aproximadamente 2,5 g da amostra matriz e, por fim, 1 mL de álcool isoamilico. Em seguida limpou-se o gargalo e vedou-se o butirômetro.

Esse conjunto foi envolvido com toalha, agitado vigorosamente e levado para centrifugação por 5 minutos, a 1300 rpm, em centrífuga de Gerber. Logo após, foram colocados em banho-maria a 65°C por 3 minutos para leitura direta do teor de gordura na escala da própria vidraria.

4.13 Determinação de lactose por sistema HPLC

A lactose foi determinada utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) modelo Empower3™ (Waters®; Milford, MA, USA) equipado com detector de índice de refração 2414 (Waters®) para sistemas modulares, um sistema de bomba binária 1525 e coluna Waters® XBridge Amide (3,5 mm x 4.6 mm x 150 mm). Os experimentos foram realizados de acordo com Neves *et al.* (2017) usando fase móvel composta por acetonitrila e água (75:25) e 0,2% de trietilamina sob fluxo isocrático de 1,0 mL·min⁻¹. Todos

os ensaios foram realizados em duplicatas com um volume de injeção na coluna cromatográfica de 20 μL . Os dados obtidos foram processados utilizando o software Waters® Empower3™.

Foi necessário preparar as amostras para que os possíveis interferentes fossem removidos, mantendo o analito intacto. O método de preparação utilizado foi caracterizado por uma precipitação controlada usando uma solução a 24% de ácido tricloroacético (TCA) (NEVES *et al.*, 2017). Uma massa conhecida de cada amostra de pó foi pesada e diluída com água deionizada. Uma alíquota (10 mL) foi transferida para um balão volumétrico (volume final de 50 mL), e adicionou-se 10 mL de solução de TCA a 24% sob agitação constante e o volume foi completado com água deionizada. A amostra foi filtrada em um filtro qualitativo de papel. Antes da injeção, a amostra foi novamente filtrada usando uma membrana filtrante de nylon com tamanho do poro 0,45 μm . Todas as amostras apresentaram um fator 5 de diluição, que foi considerado no final cálculo do teor de lactose.

4.2 Preparo das amostras dopadas

O universo amostral foi constituído de 2 amostras das matérias-primas puras sendo elas WPC e SLP e 36 amostras de pós de WPC com percentagem diferente de substituição por SLP. Os níveis de reposição foram de 0% a 100%, com substituição progressiva de aproximadamente 2,5% ($\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$) de WPC por SLP.

Para cada amostra, os pós foram pesados em balança analítica e misturados com um peso total de 10 g, sendo a mistura homogeneizada vigorosamente (por vortex) durante cinco vezes durante dois minutos. Alíquotas de 250 mg de cada uma das 38 amostras foram retiradas, pré-homogeneizadas com gral e pistilo e posteriormente submetidas à prensa para a formação de pastilhas para análise. Foi utilizada uma prensa hidráulica automática, (Atlas™ Power Hydraulic Press T25, SPECAC INC, Fort Washington, PA, EUA) configurada para pressão equivalente a 3 toneladas por 3 segundos de prensagem, para criar uma pastilha com aproximadamente 1 cm de diâmetro e

espessura de 1 mm. As pastilhas foram analisadas posteriormente utilizando espectroscopia FT-MIR-ATR em triplicata.

4.3 Teor de proteína bruta

Foi utilizando o método de Kjeldahl como referência para medir o teor de proteínas nas amostras. O método foi estabelecido como método oficial de análise pela *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC) e adotada pela Instrução Normativa nº 68, de 12 de Dezembro de 2006 – MAPA (BRASIL, 2006). A metodologia utilizada foi realizada baseada em Instituto Adolf Lutz (2004).

Para determinar o teor de nitrogênio total e proteínas, utilizou-se sistema composto por bloco digestor Novatecnica modelo NT 420, destilador Novatecnica modelo NT 420 e bureta digital eletrônica Kasvi modelo K3-0050.

As 38 amostras constituíram-se de pós sólidos finamente divididos. Para uma melhor abertura das amostras no sistema Kjeldahl foram diluídas em soluções a 5% ($m \cdot v^{-1}$). Em balança analítica (marca Shimadzu, modelo ATX 224), foi pesado aproximadamente 1g das amostras, que foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL e diluídas com água purificada até completar o menisco. Posteriormente, foram homogeneizadas vigorosamente com vórtex durante 2 minutos até total dissolução.

Alíquotas das soluções com volume aproximado de 2 mL foram transferidas para microtubos de Kjeldahl, juntamente com 1,5 g de sulfato de potássio p.a. e 0,1 g de sulfato de cobre p.a., pérolas de vidro e 3 mL de ácido sulfúrico p.a.. Todas as soluções de amostras foram preparadas nos tubos em duplicata totalizando 76 tubos de amostras com reagentes e 2 tubos contendo somente os reagentes e água destilada, representando o branco amostral.

Em bloco digestor com capacidade para 40 microtubos, a matéria orgânica das amostras foi decomposta e digerida em duas etapas, devido à capacidade do equipamento. Em capela de exaustão, a temperatura de digestão foi alterada gradativamente até aquecimento a 400° C, e assim se manteve até total digestão, onde o nitrogênio presente nas amostras foi transformado em sal

amoniacoal, percebida por mudança de coloração do conteúdo do tubo de preto (inicial) para um tom leve de azul translúcido.

Após digestão, os 78 tubos contendo material digerido foram destilados em coluna de destilação de nitrogênio, onde a amônia é liberada do sal amoniacoal pela reação com hidróxido de sódio e capturada em frasco erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico 4% (m·v⁻¹) adicionado de indicador misto de cor roxa (vermelho de metila e azul de metileno). O equipamento possuía capacidade para um tubo por vez. Nessa etapa utilizou-se 15 mL de solução de hidróxido de sódio a 35% (m·v⁻¹) para cada processo de destilação.

O destilado de borato de amônio captado foi titulado com solução volumétrica de ácido clorídrico 0,05 M até ponto final, indicada por mudança de cor verde para roxa.

Possíveis interferências e erros de análise foram retirados realizando juntamente às amostras, duas provas em branco, utilizando-se água destilada.

Os volumes gastos na titulação foram anotados e por meio de cálculo matemático a partir da Equação 9 pode-se obter o teor de nitrogênio total (%NT) contido nas amostras. Para a conversão de %NT em percentual de proteínas foi aplicada a Equação 10, utilizando o fator de conversão 6,38 que é indicado para fontes proteicas de origem láctea (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2004).

Equação 9 – Cálculo do teor de nitrogênio total

$$\% \text{NT} = \frac{V_a - V_b \cdot C_{\text{HCl}} \cdot 1,4}{C_{\text{HCl}}}$$

Onde:

% NT – teor de nitrogênio total na amostra, em percentagem;

V_a – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, em mililitros;

V_b – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco, em mililitros;

M – Concentração do HCl (mol·L⁻¹);

F_c – fator de correção para o ácido clorídrico 0,05 mol·L⁻¹;

m – massa da amostra (em gramas).

Equação 10 – Cálculo do teor de proteína bruta

$$\%PB = \%NT \times \text{Fator}_{\text{proteína}}$$

Onde: %PB – teor de proteína verdadeira; %NT- teor de nitrogênio total

4.4 Obtenção dos espectros e tratamentos de dados

O processo completo de obtenção de espectros e tratamento dos dados foi realizado da seguinte forma: (1) aquisição de dados espectrais das amostras no FTIR-ATR MIR; (2) pré-processamento de dados (mudança de linha de base) para eliminar ruídos de fundo do ambiente; e (3) análise estatística por meio da PCA e criação de modelos de calibração PLS usando um conjunto de amostras com concentrações conhecidas obtidas por métodos adequados de referência; e (4) validação dos modelos usando outro conjunto de amostras não utilizadas no conjunto de calibração.

4.4.1 Espectroscopia FT-MIR-ATR

Os espectros MIR foram registrados em um espectrofotômetro FT-MIR (Bruker, modelo Vertex 70), com acessório ATR e software OPUS 6.5, do Laboratório de Espectroscopia de Materiais, no Departamento de Física da UFJF. Os espectros foram coletados a partir de 64 varreduras no modo de absorvância no intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas à temperatura ambiente (20°C), e o *background* (para subtração da linha de base) foi coletado antes de cada amostra ser medida. Todas as medidas foram feitas em triplicatas e os dados foram analisados usando OriginPro 8.0, Minitab 16.1.1 e MS-Excel.

Devido a ser uma grande quantidade de amostras e estarem preparadas no formato de pastilha, foi adotado um procedimento padrão de análise a fim de evitar erros analíticos e melhorar a resolução de leitura. Após a análise do *background*, as pastilhas foram organizadas de acordo com o teor de dopagem e cada pastilha foi posicionada sobre o cristal de diamante certificando sua cobertura total. Uma leve pressão foi feita em cada pastilha para que se obtivesse o máximo de contato com a superfície do diamante. Essa pressão foi feita utilizando uma estrutura apropriada (anvil) que faz parte do equipamento, e a força aplicada foi padronizada para cada amostra, seguindo as instruções de uso do equipamento. Após esses procedimentos, as leituras foram feitas seguindo as etapas e procedimentos de uso do software Opus e de armazenamento dos dados. Após a certificação do armazenamento, a pressão do anvil sobre a amostra foi aliviada e cuidadosamente a pastilha lida foi retirada. O mesmo procedimento foi feito para todas as amostras e entre leituras o cristal foi devidamente limpo utilizando tecido apropriado e álcool isopropílico.

4.4.2 Análise estatística

As diferenças nos valores médios dos grupos foram obtidas por meio da análise de Variância (ANOVA). O teste TukeyHSD foi realizado quando foram obtidas diferenças significativas entre os grupos. Todos os testes estatísticos foram realizados com 95% de significância. A análise estatística foi realizada usando o software Rstudio v1.0.153.

4.4.3 Análise quimiométrica

Análise dos componentes principais (PCA) foi aplicada usando software Minitab 16.1.1 para caracterizar seis amostras diferentes e seus comportamentos em relação ao aumento das substituições de WPC por SLP.

Para prever o teor de proteína e a quantidade em gramas de WPC e SLP em substituição, foi aplicada regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) usando OriginPro 2015. De acordo com Geladi e Kowalski (1986), a técnica de

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conteúdo de proteína

Os resultados analíticos preliminares, das matérias-primas de WPC e SLP estão descritas na Tabela 6 e foram utilizadas como base de referência para os cálculos de substituição das amostras.

Tabela 6- Resultados físico-químicos das matérias-primas de referência

| Amostras de referência | Teor de proteína total (g·100⁻¹) | Teor de lactose (g·100⁻¹) | Teor de gordura (g·100⁻¹) | Teor de umidade (g·100⁻¹) |
|-------------------------------|--|---|---|---|
| SLP puro | 11,0 ± 0,3 | 62,3 ± 3,3 | 1,5 ± 0,4 | 4,6 ± 0,5 |
| WPC puro | 82,4 ± 4,1 | 2,7 ± 0,49 | 5,5 ± 0,2 | 5,9 ± 0,7 |

Os resultados físico-químicos do teor de proteína total na amostra pura de WPC (0% de substituição), e SLP (100% de substituição) e nas diferentes amostras com substituição (2,5% a 97,5%) são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados de proteína total nas amostras avaliadas pelo método de Kjeldahl

| Substituição de SLP em WPC (%) | Teor de proteínas total (g·100⁻¹) Erro ±0,06 Replicata 1 | Teor de proteínas total (g·100⁻¹) Erro ±0,06 Replicata 2 | Média da duplicata (g·100⁻¹) Erro ±0,06 | Teor médio de proteína total em base seca (g·100⁻¹) Erro ±0,06 |
|---------------------------------------|--|--|---|--|
| 0,0 | 80,46 | 74,63 | 77,55 | 82,41 |
| 2,5 | 70,82 | 71,83 | 71,33 | 75,63 |
| 5,0 | 68,07 | 67,67 | 67,87 | 72,07 |
| 7,5 | 67,06 | 67,79 | 67,43 | 71,53 |
| 10,0 | 65,82 | 65,82 | 65,82 | 69,83 |
| 12,5 | 65,14 | 65,71 | 65,43 | 69,33 |
| 15,0 | 60,10 | 59,87 | 59,99 | 63,80 |
| 17,5 | 57,70 | 59,93 | 58,82 | 62,53 |
| 20,0 | 58,19 | 58,75 | 58,47 | 62,08 |
| 22,5 | 57,35 | 57,12 | 57,24 | 60,75 |
| 25,0 | 56,67 | 56,62 | 56,65 | 60,06 |
| 27,5 | 55,44 | 55,38 | 55,41 | 58,73 |
| 30,0 | 53,53 | 53,65 | 53,59 | 56,81 |
| 32,5 | 51,96 | 52,31 | 52,14 | 55,26 |
| 35,0 | 50,95 | 51,34 | 51,15 | 54,17 |
| 37,5 | 48,26 | 48,78 | 48,52 | 51,45 |
| 40,0 | 48,53 | 48,76 | 48,65 | 51,47 |
| 42,5 | 47,14 | 47,30 | 47,22 | 49,95 |
| 45,0 | 45,06 | 44,61 | 44,84 | 47,47 |
| 47,5 | 43,21 | 43,15 | 43,18 | 45,71 |
| 50,0 | 41,41 | 41,36 | 41,39 | 43,82 |
| 52,5 | 41,13 | 40,68 | 40,91 | 43,24 |
| 55,0 | 39,00 | 38,60 | 38,80 | 41,04 |
| 57,5 | 37,48 | 37,82 | 37,65 | 39,79 |
| 60,0 | 34,29 | 34,73 | 34,51 | 36,55 |
| 62,5 | 34,45 | 34,45 | 34,45 | 36,39 |
| 65,0 | 32,71 | 32,55 | 32,63 | 34,48 |
| 67,5 | 30,58 | 30,81 | 30,70 | 32,44 |
| 70,0 | 28,56 | 29,12 | 28,84 | 30,49 |
| 72,5 | 27,44 | 28,17 | 27,81 | 29,36 |
| 75,0 | 27,89 | 27,50 | 27,70 | 29,15 |
| 77,5 | 25,76 | 26,20 | 25,98 | 27,33 |
| 80,0 | 22,73 | 22,67 | 22,70 | 23,96 |
| 82,5 | 21,55 | 21,55 | 21,55 | 22,71 |
| 85,0 | 19,13 | 19,64 | 19,39 | 20,44 |
| 87,5 | 18,46 | 18,52 | 18,49 | 19,45 |
| 90,0 | 16,95 | 16,83 | 16,89 | 17,75 |
| 92,5 | 15,48 | 15,54 | 15,51 | 16,27 |
| 95,0 | 14,42 | 14,36 | 14,39 | 15,06 |
| 97,5 | 12,96 | 13,69 | 13,33 | 13,89 |

| | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 100,0 | 10,77 | 10,38 | 10,58 | 11,05 |
|-------|-------|-------|-------|-------|

O teor de proteína em base seca das amostras avaliadas é mostrado na Figura 20A, juntamente ao desvio padrão e um ajuste linear com $R^2 = 0,9953$. A Figura 20B demonstra a diminuição no teor de proteína para cada substituição de 2,5% de WPC por SLP.

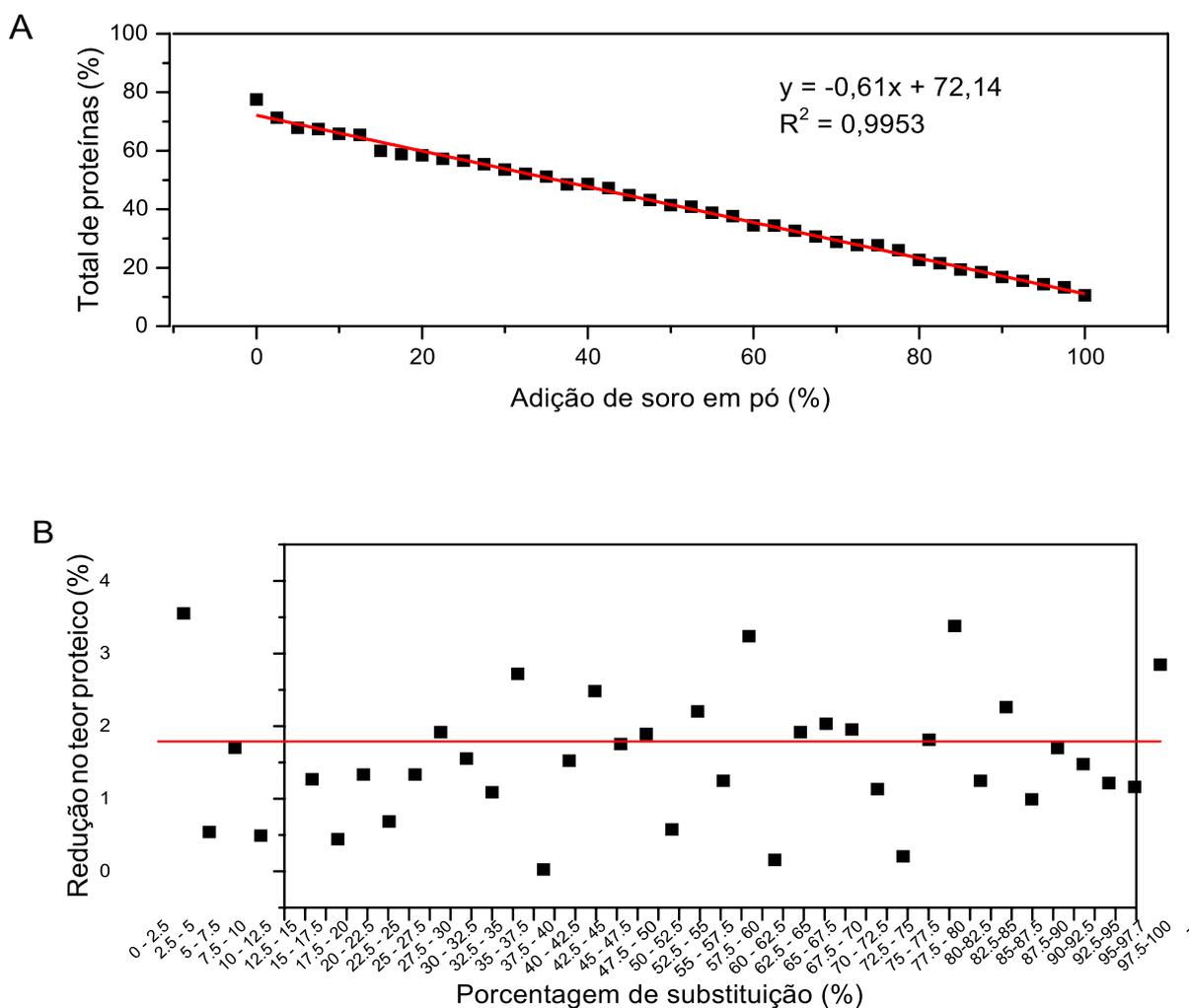


Figura 20: (A) Porcentagem do teor de proteína em WPC puro (0% de substituição), SLP puro (100% de substituição) e a cada amostra substituída em base seca. (B) Diferença no teor de proteína para cada substituição de 2,5% de WPC por SLP.

Na Figura 20B, pode-se observar que a cada substituição de aproximadamente 2,5% do WPC houve uma diminuição média no teor de proteína da mistura de 1,79% (linha horizontal vermelha).

De acordo com Tunick (2008), uma composição típica do WPC é de 65% a 80% de teor de proteínas e até 21% de lactose em base seca. Com base nos dados obtidos da caracterização das matérias-primas (SLP e WPC), conforme Tabela 6, por meio de cálculos matemáticos, quando se considera apenas o conteúdo de lactose, a adição de até 30,7% de SLP em WPC ainda estaria dentro do limite de 21% estabelecido para tais produtos. No que diz respeito ao teor de proteína, acima de 24,4% do SLP adicionado ao WPC diluiria o teor de proteína, extrapolando o limite de 65%.

De acordo com a Tabela 7 e Figura 20A, os valores reais obtidos analiticamente pelo método de Kjeldahl revelaram teores proteicos abaixo de 65% a partir de 15% de substituição. Tal diferença em relação ao valor teórico calculado (24,4% de substituição) é devido a erros intrínsecos do modelo usado.

Se for considerada uma substituição de até 12,5% de SLP em WPC, conforme mostrado na tabela 7, seria respeitado o limite mínimo aceitável de 65% de teor proteico em base seca, que caracteriza o produto como concentrado proteico. Já quando se segue o limite teórico de 24,4% ao fazer substituição, extrapola-se o teor proteico de 65%.

5.2 Estudo dos espectros FT-MIR para os componentes das amostras

Na faixa espectral estudada 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} existem numerosos picos que correspondem às diferentes ligações moleculares dos componentes do leite que interagem com a radiação Infravermelha. Os picos mais relevantes foram encontrados entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} , e entre 1800 cm^{-1} a 900 cm^{-1} e são apresentados na Figura 21, que mostra os espectros MIR de algumas misturas analisadas de WPC e SLP.

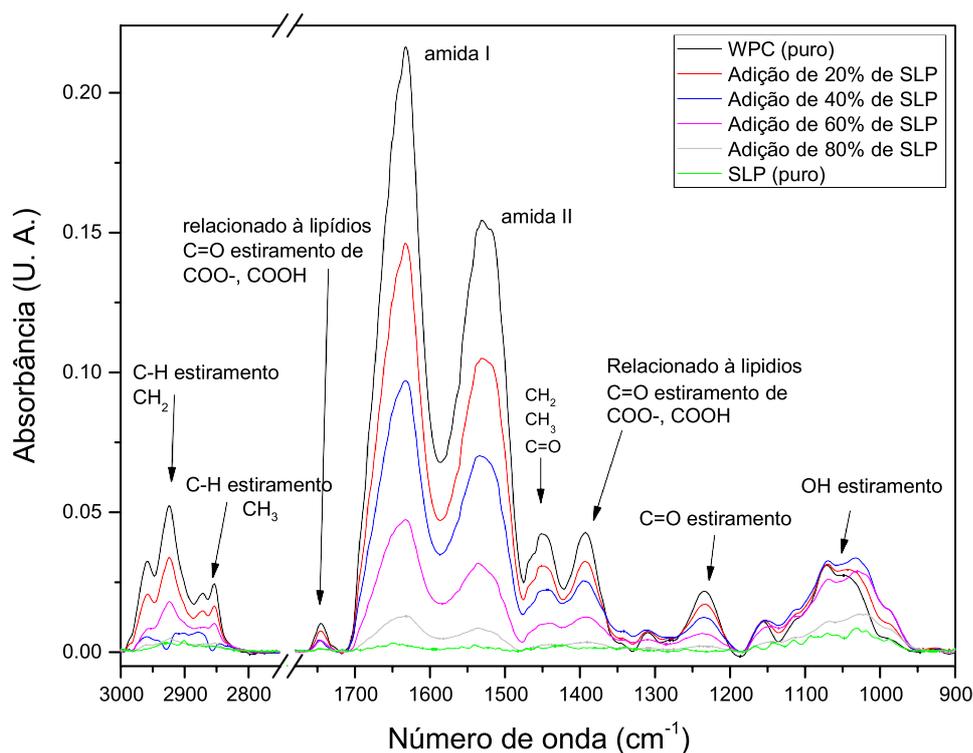


Figura 21: Espectro FTIR-ATR MIR de amostras de WPC, SLP e amostras dopadas

As setas identificam os principais picos e o intervalo selecionado de número de onda. O WPC e SLP diferem em suas densidades e níveis de pureza, portanto, as pastilhas obtidas podem ter características diferentes. Analisando os espectros dos comprimidos feitos de WPC (alta pureza), foram obtidas bandas bem definidas com altos níveis de absorvância e com ruído de medição mínimo (Figura 21). Já as amostras de SLP mostraram níveis mais baixos de absorvância e em alguns pontos, muitos ruídos. Esse comportamento pode ser associado a alta pureza do WPC (acima de 65%).

Na produção do WPC, ocorre inicialmente a concentração dos níveis proteicos do soro e remoção de lactose pelos processos de ultrafiltração e diafiltração, e só então, após atingidos altos níveis de proteína e de redução efetiva no teor de carboidratos, ocorre a secagem por pulverização. Dessa maneira, a lactose, minerais e outros componentes e impurezas de baixo peso molecular são removidos efetivamente, tornando o produto proteico puro (JELEN, 2011). O SLP por outro lado contém altos níveis de carboidratos e

impurezas, o que leva a baixa intensidade e alto nível de ruído na leitura das pastilhas.

A Figura 21 mostra que as intensidades de absorção dos picos foram maiores no WPC de alta pureza que nas amostras de SLP misturadas e puras. A ampla faixa entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} foi atribuída como região de ácidos graxos (MOROS *et al.*, 2006). Os picos a 2926 cm^{-1} e 2856 cm^{-1} marcam as vibrações de estiramento de grupos CH e carbonila de triglicerídeos (RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2006) e as vibrações de CH_2 e CH_3 dos grupos de ácidos graxos presentes em produtos lácteos (BOTELHO *et al.*, 2015; MOROS *et al.*, 2006). Ao trabalhar com queijo, Dufour *et al.* (2000) relacionaram esses números de onda à presença de gordura na amostra. Os autores também atribuíram como gordura um pico em aproximadamente 1750 cm^{-1} , que pode estar associado a estiramentos C=O de grupamentos ésteres ou ácidos carboxílicos, encontrados nos resultados deste trabalho localizados em 1746 cm^{-1} .

A região entre 1700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} é uma região mista com vibração de bandas de ácidos graxos, proteínas e polissacarídeos. A região entre 1700 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} foi a que apresentou os picos mais altos e áreas integradas com significantes distinções entre as diferentes amostras (Figura 21 e Tabela 8). Dois picos principais foram observados: Amida I (C = O, C-N) em 1640 cm^{-1} e Amida II em 1550 cm^{-1} (NH, CN), relacionado a ligações peptídicas (CO-NH) (Martín-del-Campo, Picque, Cosio-Ramírez, & Corrieu, 2007; Sun, Subramanian, & Rodriguez-Saona, 2009). Esses picos estão relacionados à concentração de proteína dentro das amostras. Com níveis crescentes de SLP nos comprimidos, foi observado de forma bem definida uma tendência decrescente das bandas relacionadas às proteínas, caracterizando a dopagem no pó de WPC.

Wang *et al.*, (2015) atribuíram os principais picos centrados em 1640 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} como os responsáveis por diferentes tipos de proteína de soro (WPC, WPI e hidrolisados (WPH). Na Figura 21 a diminuição da intensidade dos picos de amida I e II foi observada a medida que o WPC era substituído por SLP. Como esses picos são atribuídos as vibrações de grupos peptídicos em proteínas, existe uma correlação direta dos dados obtidos com o teor de proteína (Figura 20A).

Tabela 8: Área sob a curva de regiões específicas dos espectros das amostras mostradas na Figura 20

| Amostra | Área (U. A.) | | |
|---------|------------------------------------|--|---|
| | OH (1135-960 cm ⁻¹) | Amida I (1712-1585 cm ⁻¹) | Amida II (1585-1475 cm ⁻¹) |
| WPC | 2.7 ± 0.0 ^a | 14.7 ± 0.3 ^a | 11.7 ± 0.2 ^a |
| 20% | 3.3 ± 0.3 ^{ab} | 9.9 ± 0.3 ^b | 8.0 ± 0.3 ^b |
| 40% | 3.8 ± 0.2 ^{ab} | 6.9 ± 0.2 ^c | 5.4 ± 0.1 ^c |
| 60% | 3.4 ± 0.1 ^{ab} | 3.3 ± 0.1 ^d | 2.3 ± 0.1 ^d |
| 80% | 1.6 ± 0.4 ^b | 0.9 ± 0.1 ^d | 0.6 ± 0.2 ^d |
| SLP | 0.8 ± 0.1 ^b | 0.2 ± 0.0 ^d | 0.0 ± 0.2 ^d |

Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas dentro das amostras na mesma faixa de números de onda.

Finalmente, a região dominada por picos de polissacarídeos está localizada em 1200 cm⁻¹ e 900 cm⁻¹ (EL DARRA *et al.*, 2017; MOROS *et al.*, 2006), onde o pico em aproximadamente 1080 cm⁻¹ é comumente associado ao estiramento OH de carboidratos como a lactose (EL DARRA *et al.*, 2017; MARTÍN-DEL-CAMPO *et al.*, 2007). Em amostras com predominância de SLP (60% e 80% de substituição e SLP puro), os valores de intensidade de absorvância da banda OH são quase iguais ou superiores às suas bandas amidas, devido ao alto nível de lactose presente em SLP. O indicativo de dopagem no produto, também pode ser visto por meio da Figura 21 em torno de 1048 cm⁻¹, onde há uma diferenciação no formato do espectro acima de 20% de SLP adicionado. Nota-se um pico em substituições acima deste nível. Os espectros das segundas derivadas desta região confirmam este fato (**Figura 22**). Assim como neste trabalho, Rein (2012) mostrou espectros semelhantes entre quatro diferentes proteínas do leite (α -lactalbumina, WPC 80%, WPI e β lactoglobulina), onde a diferenciação ocorreu apenas na amostra WPC, devido à presença de lactose.

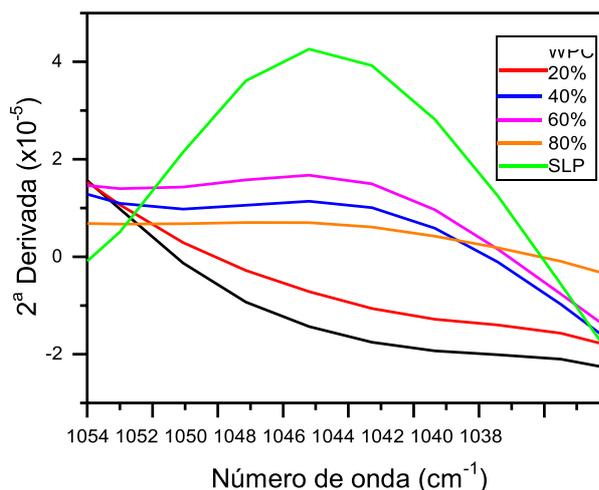


Figura 22: Segunda derivada de parte da região de estiramento de OH (1135 cm⁻¹ a 960 cm⁻¹) dos espectros MIR de WPC, SLP e suas misturas em diferentes proporções

Os tratamentos empregados neste trabalho focaram, em especial, nos níveis proteicos e picos relacionados à proteína. Apesar da região característica de carboidratos estar inclusa na análise, não foi encontrada uma correlação direta com o provável aumento de carboidratos na amostra, uma vez que não foi quantificado. A banda característica do estiramento de OH em 1080 cm⁻¹ (lactose), não apresentou o comportamento de aumento da intensidade do pico que à medida que as substituições continuaram. A região espectral empregada neste trabalho não considerou os números de onda abaixo de 900 cm⁻¹, que poderiam ser importantes na caracterização dos carboidratos (Wiercigroch *et al.*, 2017).

Tal comportamento impreciso da região em torno de 1080 cm⁻¹ já foi declarado na literatura, com dados inconsistentes. No caso do estudo do leite humano, Fusch *et al.* (2015) descobriram que a espectroscopia MIR e NIR resultou em dados que não se correlacionaram com a quantificação de lactose, com valores de R² atingindo 0,006 e 0,002 para NIR e MIR, respectivamente. Solis-Oba *et al.* (2011), por outro lado, conseguiu alcançar a quantificação de proteínas e lactose usando a associação de FTIR e quimiometria em soro de leite processado com ultra e nano filtrações. Em relação aos pós de proteína de soro de leite, Wang *et al.* (2015) revelou que as principais diferenças entre os espectros de WPI, WPC e WPH dependem das

regiões de banda de proteína, onde foi possível separá-los em grupos por meio de quimiometria.

A análise PCA foi realizada em seis amostras diferentes para caracterizar os espectros normalizados de uma variedade de amostras compreendendo diferentes níveis de substituições (Figura 23). Os vetores dos números de onda indicam os pesos (*loadings*) de cada um deles sobre os novos eixos das componentes principais. Dessa forma, de acordo com cada espectro das amostras, os vetores influenciam no posicionamento das amostras no *score plot* da PCA de acordo com seus espectros, evidenciando as similaridades e diferenças entre elas.

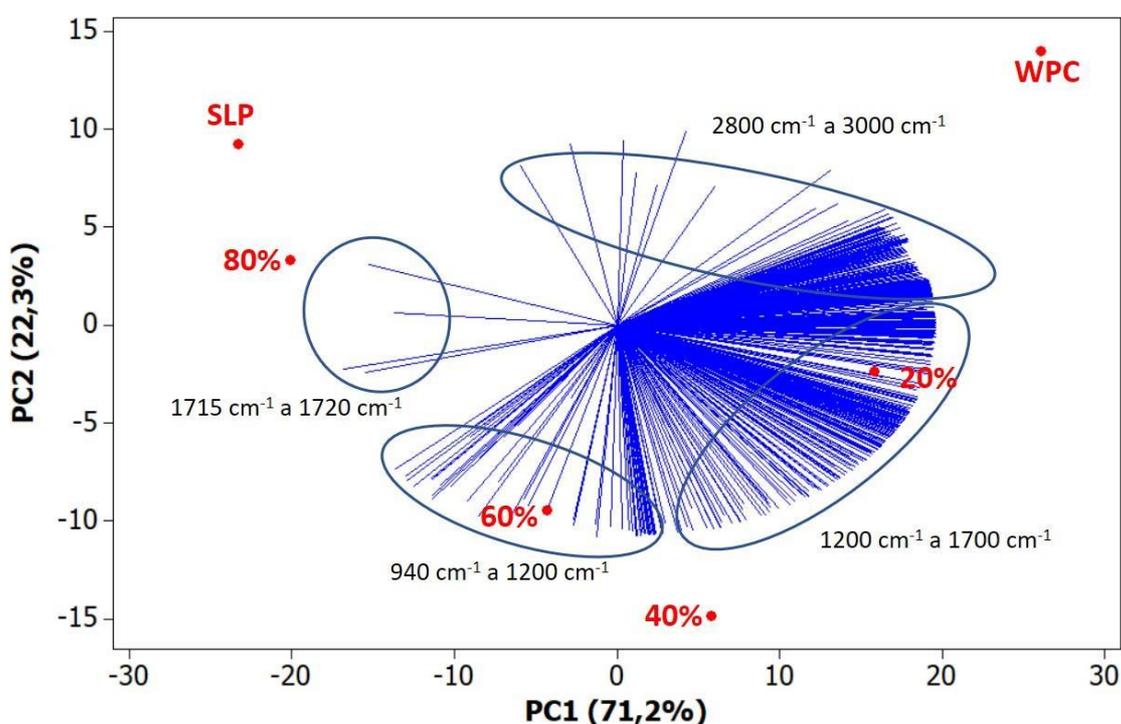


Figura 23. Análise de Componentes Principais dos espectros de número de onda selecionados de seis amostras avaliadas (WPC, SLP, 20%, 40%, 60% e 80%). Biplot contendo o posicionamento dos escores (*score plot*) e o peso dos números de onda (*loading plot*), representado pelos vetores azuis.

PC1 e PC2 descrevem acima de 90% da variância total dos espectros, sendo 71,2% explicado pelo PC1 e 22,3% pelo PC2. Uma clara separação foi obtida com diferenças significativas entre as amostras WPC e SLP. A partir da Figura 23, pode-se observar uma diferenciação entre as amostras de WPC puro e SLP puro, que estão localizados em extremidades opostas em relação

ao PC1. As amostras adicionadas com SLP ficaram distribuídas quase uniformemente no gráfico dos escores entre as amostras puras. As amostras com os níveis mais altos de WPC (WPC puro, 20% e 40% de substituição) foram posicionadas no lado positivo do PC1, enquanto que as amostras com o menor conteúdo de WPC (SLP puro, 80% e 60% de substituição) foram posicionadas no lado negativo.

Por meio da Figura 23, pode-se estabelecer correlações entre os comprimentos de onda e o peso (influência) em relação aos componentes principais. Os principais picos de absorbância que contribuem para a discriminação entre as amostras são aqueles relacionados ao teor de proteína, como os de Amida I, Amida II, e também a banda relacionada com carboidratos em torno de 1230 cm^{-1} .

Embora PC2 explique 22,3% da variância total, ele não mostra uma clara correlação entre algum componente presente nas amostras com suas distribuições no gráfico dos escores. Ao relacionar a Figura 23 com a Figura 21 pode-se observar que PC2 é positivo em números de onda com valores de absorbância baixos (próximos a zero). A amostra de WPC puro é a única que teve influência positiva na maior parte do espectro em números de onda onde ambos PC1 e PC2 obtiveram pesos favoráveis.

As amostras de WPC, SLP e a mistura em 80% foram influenciadas positivamente em relação ao PC2 pelos números de onda em torno de 2800 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} . Essa região apresentou picos bem definidos para lipídios nos espectros isolados de cada amostra. A região entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , que são relacionados principalmente a proteínas, influenciou positivamente, em relação ao PC1, o posicionamento das amostras WPC, 20% e 40%. Esse comportamento é coerente, pois tais amostras são as mais concentradas em proteínas submetidas a esta análise e esse intervalo de absorção apresentou picos intensos e bem definidos indicando mudanças de concentração proteica a medida que as substituições aumentavam. A região com predominância de carboidratos, que está entre 1200 cm^{-1} e 900 cm^{-1} tiveram influencia negativa em relação tanto ao PC1 e quanto ao PC2, nas amostras de 40% e 60% de adulteração. Esta região também é responsável pelo posicionamento negativo em relação ao PC1 das amostras que contém maiores níveis de carboidratos, mesmo com espectros ruidosos.

Uma vez diferenciados e encontradas correlações entre os diferentes espectros e as substituições realizadas, pode-se criar um modelo matemático para prever resultados quantitativos.

5.3 Modelo parcial de regressão de mínimos quadrados (PLS)

Os valores médios da proteína total obtidos pelo método Kjeldahl (em base seca (Tabela 7)) e os valores lidos na pesagem de WPC e SLP misturados às amostras foram utilizados para estimar o modelo de regressão com base nos intervalos espectrais de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} a 900 cm^{-1} . Durante a calibração do método, utilizando a validação cruzada, o modelo com 15 fatores, ou variáveis latentes, foi o que apresentou os melhores resultados de previsão.

Os resultados do modelo PLS são mostrados na Tabela 9, com valores de coeficiente de determinação (R^2), o RMSE e o erro relativo (RE) de ambos os conjuntos de dados de calibração e validação. As regressões de calibração e validação podem ser visualizadas na Figura 24 com o valor experimental *versus* os valores previstos do modelo PLS.

Tabela 9: Modelo PLS relativo à quantificação de proteína total, WPC e SLP adicionados ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$) nas amostras.

| Medidas | Calibração $n = 27$ | | | Validação $n = 11$ | | |
|----------------------|---------------------|-------|------|--------------------|-------|------|
| | R^2 | RMSE | RE | R^2 | RMSE | RE |
| Conteúdo de proteína | 0,9995 | 0,417 | 0,90 | 0,9820 | 2,469 | 4,80 |
| WPC ponderado | 0,9999 | 0,032 | 0,50 | 0,9805 | 0,384 | 6,00 |
| SLP ponderado | 0,9999 | 0,032 | 0,60 | 0,9805 | 0,384 | 7,70 |

Em todos os casos, o coeficiente de determinação estava acima 0,98 para ambos os conjuntos de calibração e validação. O RMSE de conjuntos de dados de calibração e validação foram maiores na predição do conteúdo proteico em comparação com os outros, revelando que a maior dispersão dos dados foi obtida nesse caso.

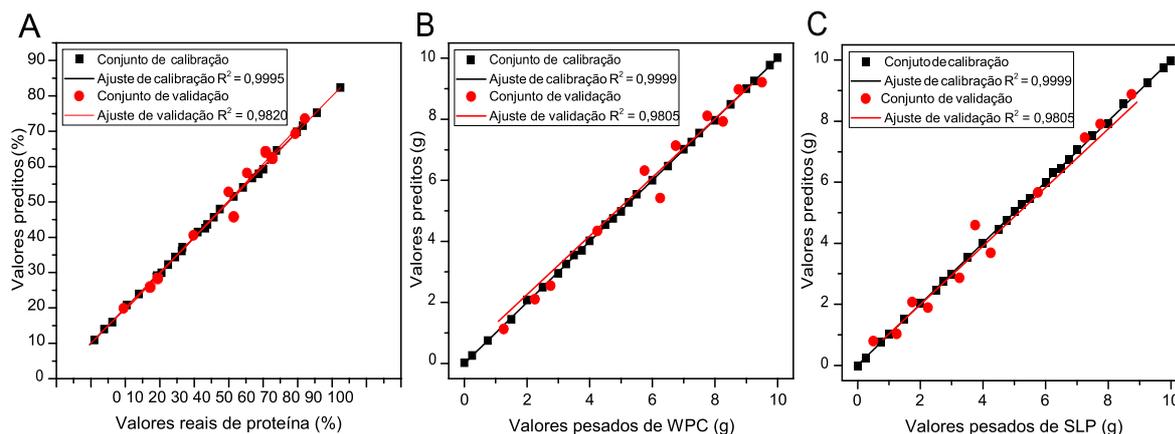


Figura 24 - Calibração e previsões de validação de (A) teor de proteína, (B) massa de WPC em pó e (C) massa de soro de leite em pó, pelo modelo PLS

As diferenças entre a medida real e os valores previstos estão representadas nos gráficos dos resíduos (Figura 25). Em todos os casos, foi obtida uma distribuição aleatória de dados. Portanto, a distribuição dos dados é homocedástica, sem qualquer tendência quanto ao aumento ou diminuição dos valores previstos.

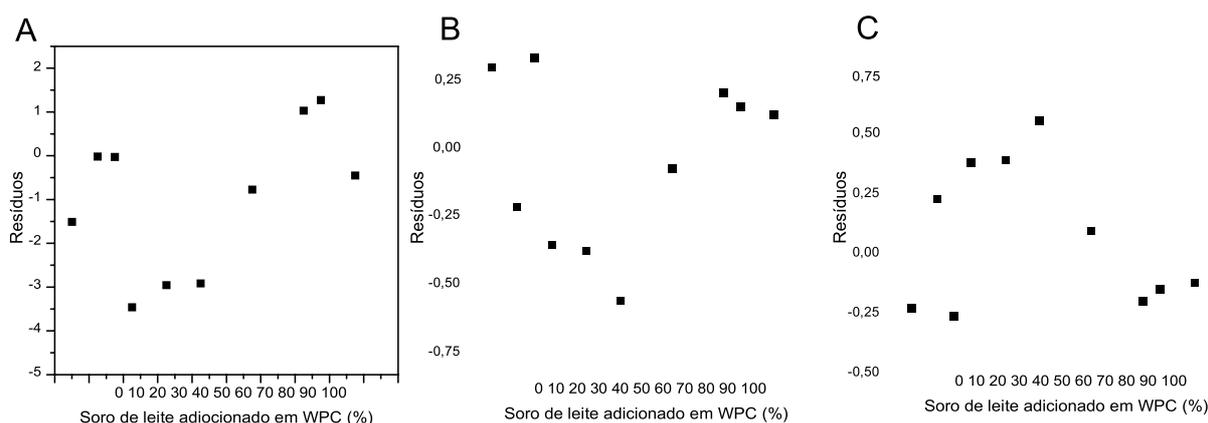


Figura 25. Gráficos residuais para os conjuntos de dados de validação. (A) Conteúdo de proteínas; (B) Massa de WPC em pó; (C) Massa de soro de leite em pó

Finalmente, os baixos valores obtidos para RMSE e RE para os conjuntos de dados de calibração e validação, revelaram que o modelo ajustou bem as medidas experimentais e fez boas previsões. Além disso, foram obtidas fortes correlações entre os valores previstos e os reais. As curvas de calibração e validação foram superpostas, com coeficiente de correlação com valor próximo a 1 nos três casos.

Morgano *et al.* (2007) ao aplicar espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) juntamente com regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) em análises de determinação de açúcar total em café, obteve resultados satisfatórios, concluindo que os modelos de regressão construídos apresentaram bons desempenhos na quantificação e que as principais vantagens do método proposto quando comparado com o método tradicional gravimétrico são redução do tempo de análise, pouca manipulação das amostras, diminuição de resíduos químicos e redução do custo.

Oliveira (2010) fez uso da espectroscopia NIR para determinação de CMP em leites UHT fraudados com soro de leite bovino e concluiu que é possível aplicar esse método de forma alternativa para esse fim, sendo necessário um bom modelo de calibração. Além disso, sugere que a regressão PLS é uma ferramenta quimiométrica eficiente desde que haja um conjunto de calibração com amostras representativas da população a ser predita.

Vieira *et al.* (2015) aplicou espectroscopia no infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-MIR), juntamente com a técnica quimiométrica do mínimo parcial quadrados (PLS) para determinar a adulteração por adição de soro de queijo em leite cru e concluiu que o método foi validado e que os resultados foram satisfatórios para todas as estimativas, com ausência de erros sistemáticos. Demonstrou ter grande potencial como alternativa para a quantificação de soro em fraudes no leite, podendo ser adotada como um método eficiente para o controle de qualidade.

Os trabalhos citados mostraram coerência com resultados deste trabalho ao se aplicar espectroscopia na região do infravermelho médio juntamente com modelo de calibração por regressão por mínimos quadrados parciais. Para todos, os resultados foram satisfatórios para análises qualitativas e quantitativas de amostras complexas como alimentos e que possui grande potencial como alternativa aos métodos tradicionais.

6 CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, foi possível investigar a aplicação da espectroscopia no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR), acoplado a Reflectância Total Atenuada (ATR) em análises de amostras de WPC em diferentes concentrações proteicas a partir da substituição por SLP.

As análises preliminares das amostras matriz possibilitou sua avaliação físico-química, servindo como base de referência para os cálculos de substituição de WPC por SLP.

A partir da análise de teor de proteínas pelo método de Kjeldahl foi possível determinar a diversidade de concentrações proteicas nas amostras substituídas.

A investigação espectral possibilitou a identificação das principais estruturas moleculares das amostras e as faixas de absorção que foram afetadas pelas adulterações, diferenciando-as por meio da análise PCA.

Em relação às previsões, o coeficiente de determinação do ajuste global para a regressão PLS obteve número elevado, que é considerado ótimo, além de erros de previsão relativos baixos.

Dessa forma, pode-se concluir que a análise espectroscópica utilizando o FTIR-ATR tem potencial para caracterização rápida e não destrutiva das amostras. Associados a análises multivariadas, os resultados puderam ser usados na determinação de proteína das amostras e na previsão quantitativa em gramas de WPC ou SLP adicionadas.

7 REFERÊNCIAS

- ALVES, M. P. *et al.* Soro de Leite e sua Processibilidade. p.251–278. 2010
- ALVES, M. P. *et al.* Soro De Leite: Tecnologias Para O Processamento De Coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** v. 69, n. 3, p. 212–226 , 2014.
- ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P.. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 22, n. 3, p. 249–253 , 2002.
- ANJOS, O. **Desenvolvimento de metodologias de análise rápidas em alimentos por espectroscopia de infravermelho**. III Ciclo de Conferências: Conselho Técnico-Científico. , 2016
- BALDASSO, c. **Concentração , Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 179 p.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1767, p. 1073–1101 , 2007.
- BASSBASI, M *et al.* FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. **Food Chemistry** v. 146, p. 250–254 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.044>>.
- BOSCHI, J. R. **Concentração e Purificação das Proteínas do Soro de Queijo por Ultrafiltração**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- BUENO, W. A. **Manual de espectroscopia vibracional**. McGrawHill, 1989
- CARLOS, M. R. E. **Avaliação das Propriedades Funcionais de Hidrolisados de Proteínas do Soro de Leite**. Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- CONSTANTINO, M. G. Espectroscopia no Infravermelho. **Química Orgânica, volume 3: Curso básico universitário** p. 95–137 , 2008.978-85-216-1593-4.
- GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta**. Corumbá: [s.n.], 2006.
- GIROTO, J.M.;; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos** n. 1, p. 43–46 , 2001.
- HA, E., & ZEMEL, M. B. . Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, 14(5), 251–258. 2003
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para

a saúde humana. **Revista de Nutricao** v. 19, n. 4, p. 479–488 , 2006.1415-5273.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. O. Análise de Componentes Principais: resumo teórico , aplicação e interpretação. **Engineering and Science** v. 1, p. 83–90 , 2015.

INMETRO. **Relatório Final Sobre a Análise em Suplementos Proteicos Para Atletas – WHEY PROTEIN**. [S.l: s.n.], 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4a. Edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2004. 1032p.

LANDS, L C; GREY, V L; SMOUNTAS, A a. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. **Journal of Applied Physiology** v. 87, n. 4, p. 1381–1385 , 1999.8750-7587.

LEINDECKER, G. C. **Separação Das Proteínas Do Soro Do Leite in Natura Por Ultrafiltração**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

LIMA, C. A. **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LESÕES NEOPLÁSICAS VIA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER**. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2015.

LUCENA, M. E., ALVAREZ, S., MENÉNDEZ, C., RIERA, F. A., & ALVAREZ, R.. Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates. Production of milk derivatives as a base for infant formulas. **Separation and Purification Technology**, 52(2), 310–316. 2006

MEDEIROS, A. R. B. **Uso de ATR / FTIR e FTNIR associado a técnicas quimiométricas para quantificação de aditivos em gasolina automotiva**. Universidade de Brasília, 2009. 86 p.

MENDES. L. B. **Tipos de Suplementos mais utilizados por praticantes de Musculação, de uma academia da cidade de Criciúma - SC. Trabalho de Conclusão de Curso (Educação Física)** [S.l: s.n.], 2012.

MIURA. J. F. N. **WHEY PROTEIN: Nacional ou Importado? Uma Análise do Comportamento do Consumidor**. , Dissertação (MBA em Marketing). Brasília, DF: [s.n.], 2014.

MORGANO *et al.* Determinação de açúcar total em café cru por Espectroscopia no Infravermelho Próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova** v. 30, n. 2, p. 346–350 , 2007.

NASCIMENTO, W. W. G *et al.* USO DE MEDIDAS DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA PARA A DETECÇÃO DE ADIÇÃO DE ÁGUA , CLORETO DE SÓDIO E SODA CÁUSTICA NO LEITE. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”** p. 11–17 , 2010.

NEVES, L. N. O.; CARVALHO, R. G.; AGUIAR, J. A. K.; SILVA, P. H. F. Alternative method for lactulose quantification in the presence of lactose in milk

using HILIC with refractive index detection. **Analytical Methods**, v. 9, p. 4657-4662, 2017.

OLIVEIRA, R. R. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo para a determinação do caseinomacropéptido em leite UAT**. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária. Dissertação (Mestrado). 2010.

PERKINELMER. *FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)*. [S.l.]: Nota Técnica. EUA. , 2005

REISSIG, G. N. **Fraudes em Alimentos: Tipos e Detecção**. Trabalho acadêmico – Bacharelado em Química de Alimentos. Disciplina de Seminários em Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2009. 38f.

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

SCARLATO RC, MIRANDA NGM, COSTA RS, SIMÕES KMA, VIDAL IKS, REGO ECP. Determinação do teor de proteínas e carboidratos totais em suplementos tipo *Whey Protein*. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2016;75:1701.

SMITH, K. **Dried Dairy Ingredient Handbook**. Wisconsin Center for Dairy Research. 2008. Disponível em: http://future.aae.wisc.edu/publications/dried_dairy_ingdients.pdf Acessado em: 20 jan 2018

SOTELO, F.F. **Aplicação da espectroscopia de Infravermelho Próximo na caracterização de petróleo. Simulação de uma unidade de destilação atmosférica**. 2006. 77 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade de São Paulo, São Paulo.

STEPHANI, R. **COMPORTAMENTO DE PRODUTOS LÁCTEOS PROTÉICOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES SIMULADAS DE PROCESSAMENTO TÉRMICO**. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010. 149 p.

TAVARES, K. M. **Detecção de adulteração em café riado torrado e moído por espectroscopia no infravermelho e análise sensorial**. Dissertação (mestrado) UFLA, 2012. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/483/1/DISSERTACAO_Detec%C3%A7%C3%A3o%20de%20adultera%C3%A7%C3%A3o%20em%20caf%C3%A9%20riado%20torrado%20e%20mo%C3%ADdo%20por%20espectroscopia%20no%20infravermelho%20e%20an%C3%A1lise%20sensorial.pdf Acessado em: 05 fev 2018

TUNICK, M. H.. *Whey protein production and utilization: a brief history*. In C. I. Onwulata & P. J. Huth (Eds.), **Whey processing, functionality and health**

benefits (1st ed.). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. 2008

VARELLA, C. A. A. **Análise de Componentes Principais**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008. 12 p.

VEN, C. V. D *et al.* FTIR Spectra of Whey and Casein Hydrolysates in Relation to Their Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 50, p. 6943–6950 , 2002.

VIEIRA, S. M. *et al.* FTMIR-PLS as a promising method for rapid detection of adulteration by waste whey in raw milk. **Dairy Science & Technology** , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13594-015-0247-0>>.

WANG, T., TAN, S. Y., MUTILANGI, W., AYKAS, D. P., & RODRIGUEZ-SAONA, L. E.. Authentication of Whey Protein Powders by Portable Mid-Infrared Spectrometers Combined with Pattern Recognition Analysis. **Journal of Food Science**, 80(10), C2111–C2116. 2015

WALSTRA, Pieter; WOUTERS, Jan T. M.; GEURTS, Tom J. **Dairy Science and Technology**. 2nd. ed. [S.l: s.n.], 2006. .0-8247-0187-9.

WIERCIGROCH, E. *et al.*, Raman and Infrared Spectroscopy of Carbohydrates: a review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Vol. 185, Pp. 317–335, 2017.