

**Universidade Federal de Juiz de Fora**  
**Pós-Graduação em Química**

**Rodrigo Stephani**

**UMA CONTRIBUIÇÃO À PESQUISA DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS  
CONCENTRADOS PROTEICOS DE SORO DO LEITE**

**Juiz de Fora**  
**2015**

**Rodrigo Stephani**

**UMA CONTRIBUIÇÃO À PESQUISA DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS  
CONCENTRADOS PROTEICOS DE SORO DO LEITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Química.  
Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira.

**Juiz de Fora**

**2015**

**Rodrigo Stephani**

**UMA CONTRIBUIÇÃO À PESQUISA DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS DOS  
CONCENTRADOS PROTEICOS DE SORO DO LEITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Química.  
Área de concentração: Físico-Química

Aprovada em 17 de março de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr. Ítalo Tuler Perrone  
Universidade Federal de Viçosa

---

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu  
Universidade Federal de Lavras

---

Dra. Ariene Gimenes Fernandes Van Dender  
Instituto de Tecnologia de Alimentos

---

Dr. Antônio Carlos Sant'Ana  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira, por ser um eterno orientador, amigo e parceiro científico, mostrando caminhos tão diferentes na minha formação. A nossa caminhada não termina aqui, ela apenas está iniciando.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Gemacom Tech S/A, pela oportunidade única de viver este ideal.

À Universidade Federal de Viçosa, por compartilhar os seus laboratórios para as atividades experimentais do trabalho.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes, por ser meu berço discente e docente.

Ao amigo Me. Henrique de Castro Neves, por ter investido em mim a sua confiança.

Ao Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone, pela incomparável generosidade, única dos grandes homens da ciência.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho, pelo apoio a este estudante que sempre o teve como referência profissional e ética nas atividades acadêmicas e industriais.

Ao Prof. Braz dos Santos Neves por ser o mentor que me guiou nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu pela acolhida calorosa na Universidade Federal de Lavras.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva, pelos ensinamentos técnicos e científicos.

Ao amigo Me. Alisson Borges de Souza pela contribuição única nos experimentos e pelos momentos de discussão.

Ao Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira pela grande contribuição para a realização do trabalho.

A todos os colegas do Departamento Técnico da Gemacom Tech que, de alguma forma, fizeram parte destes anos de trabalho e amizade nas muitas horas de convívio. Em especial, à Débora, Emílio, Gabriel, João Paulo, Thomaz, Rafael, Leonardo, Eduardo e Matheus.

À Profa. Ma. Regina Célia Mancini por sempre apoiar os meus projetos, ser a minha orientadora docente e compartilhar meus ideais “ILCTianos”.

Às amigas, Eloá Corrêa de Souza e Raquel Pigozzo Almeida, pelos anos de carinho e amizade. A distância só nos aproxima.

À Kamila de Sá Oliveira, Carlos Eduardo Rocha de Almeida e Thiago Dadalti B. Barroso, pela paciência e colaboração neste trabalho.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Maria Eduarda e Matheus pela inocência pura e verdadeira. Vocês nunca deixarão o meu coração.

À Keli, por sempre estar presente nos momentos difíceis e felizes.

Ao Geraldo Magela e a Seila por estenderem as mãos para a minha família sempre quando foi necessário. Meus agradecimentos serão eternos e a responsabilidade em divulgá-los me acompanharão sempre.

Aos meus pais, por toda a luta, garra e sabedoria ao longo dos anos. Vocês me deixam a maior herança que um filho pode receber: respeito, dignidade e honestidade. Que Deus os proteja e faça da trajetória de suas vidas ensinamentos para as próximas gerações.

À Renata, minha esposa, por todo o carinho, respeito e paciência ao longo destes anos. Você me deu o maior projeto da minha vida. Sem você nada teria sido possível!

Ao meu filho Nicolás, que me ensina todos os dias o significado da palavra amor. Que este documento seja um estímulo na busca pelos seus sonhos.

Muito obrigado!

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi utilizar a espectroscopia Raman e o analisador rápido de viscosidade (RVA) no estudo das propriedades químicas dos concentrados proteicos de soro do leite (WPC), visando identificar atributos intrínsecos aos produtos durante processamento de obtenção ou utilização industrial. Com o uso da espectroscopia Raman foi possível identificar o estado físico da lactose presente em amostras de WPC, obtidas em planta piloto sob diferentes parâmetros tecnológicos, devido a caracterização do estado físico deste carboidrato nas partículas dos pós. O processo de cristalização da lactose foi identificado em diferentes repetições dos tratamentos aplicados, devido às mudanças espectrais que ocorrem na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  e, principalmente, na região entre  $1200$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ . Estas alterações no perfil dos espectros foram atribuídas ao processo de mudança de fase da lactose amorfa para a lactose cristalina, durante a qual ocorre o aparecimento de novas bandas, devido ao abaixamento de simetria que ocorre na transição de fases. O RVA foi utilizado para avaliar o comportamento sinérgico de sistemas proteicos reidratados contendo WPC, visando elucidar a influência das diferentes estruturas proteicas destes sistemas em diferentes processamentos térmicos sob a influência do pH do meio, permitindo alcançar melhor otimização da definição dos produtos e processos. A interpretação das reações e das interações que ocorrem de forma simultânea entre os constituintes proteicos destes sistemas em dispersão durante o processamento térmico ainda é um grande desafio e, neste trabalho, foi feita através da observação das mudanças reológicas da viscosidade durante a rampa de aquecimento, utilizando-se 10 parâmetros analíticos específicos obtidos nos perfis viscográficos. O estudo demonstrou a clara influência do pH 5,5 na elevação de no mínimo  $5^{\circ}\text{C}$  na temperatura de início da viscosidade de arranque dos sistemas proteicos e o impacto das diferentes proporções proteicas em pH 7,0 no perfil das curvas viscográficas, tendo como principal agente o efeito sinérgico proveniente entre as reações e interações das caseínas com as proteínas do soro durante o processamento. Assim, este trabalho reforça a importância da espectroscopia Raman como ferramenta analítica na caracterização do estado físico da lactose, do RVA como um instrumento analítico utilizado na simulação de processos industriais envolvendo os sistemas proteicos e o uso da rampa de viscosidade de arranque como forma de interpretação das interações dos seus componentes em relação às modificações relacionadas à temperatura de tratamento.

Palavras-chave: WPC. Raman. Transição vítrea. RVA.

## ABSTRACT

The objective of this study was to use Raman spectroscopy and Rapid Viscosity Analyzer (RVA) in the study of chemical properties of Whey Protein Concentrates (WPC), aiming to identify intrinsic attributes of the products during processing or during industrial use. By means of Raman spectroscopy, it was possible to identify the structure of the lactose present in the WPC samples, obtained in a pilot plant under different technological parameters, due to the characteristics of the physical state of this sugar in the powder particles. The crystallization process of the lactose has been identified in different repetitions of treatments because of the spectral changes occurring in the region of  $2900\text{ cm}^{-1}$  and especially in the region between  $1200$  and  $800\text{ cm}^{-1}$ . These changes in the profile of the spectra were attributed to phase change process of amorphous lactose to crystalline lactose, which occurs during the appearance of new bands due to the lowering of symmetry in the phase transition. The RVA was used to evaluate the synergistic behavior of WPC containing rehydrated protein systems, to elucidate the effect of different protein structures of these systems in various thermal processing under the influence of pH, allowing to a better optimization of definition of products and processes. The interpretation of reactions and interactions that occur simultaneously among the protein constituents of these systems in dispersion during thermal processing is still a major challenge, and this work was carried out by observing the rheological changes in viscosity during the heating ramp, using 10 specific analytical parameters obtained from the viscographic profiles. The study showed a clear influence of pH 5.5 in the elevation of at least  $5^{\circ}\text{C}$  in the initial temperature of the start-up viscosity of the protein systems and the impact of different protein ratios at pH 7.0 in the profile of viscographic curves, the main agent being the synergistic effect between the reactions and interactions of caseins with whey proteins during processing. This study reinforces the importance of Raman spectroscopy as an analytical tool in characterizing the physical state of lactose and the RVA as an analytical tool used in the simulation of industrial processes involving protein systems and also the use of start-up viscosity ramp as a means of interpretation of the interactions of its components in relation to thermal treatment related changes.

Keywords: WPC, Raman, Glass transition, RVA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estrutura química da lactose.....	22
FIGURA 2 - Gerações dos produtos lácteos em pó.....	28
FIGURA 3 - Representação esquemática da decomposição por PCA.....	33
FIGURA 4 - Modelo de Inovação Fechada.....	37
FIGURA 5 - Modelo de Inovação Aberta.....	38
FIGURA 6 - Visão geral dos experimentos e amostras de referência.....	54
FIGURA 7 - Fluxograma de produção das amostras de WPC do segundo bloco.....	56
FIGURA 8 - Fluxograma de produção das amostras de WPC do terceiro bloco.....	59
FIGURA 9 - Espectro Raman do WPC produzido em condições ideais (A), WPC produzido em condições ideais e armazenado durante 6 semanas em condição ambiente (B); $\alpha$ -lactose monohidratada (C).....	66
FIGURA 10 - Espectros Raman dos WPC produzidos no segundo bloco experimental....	69
FIGURA 11 - Espectros Raman dos WPC produzidos no terceiro bloco experimental.....	72
FIGURA 12 A e B - Gráfico de escores CP1 <i>versus</i> CP2 (A) e gráfico de amostras <i>versus</i> escores PC1 (B) da região espectral 1200-800 $\text{cm}^{-1}$ das amostras de WPC do primeiro bloco experimental ( $\blacktriangledown$ ), WPC35 adquiridos no mercado (*), WPC do segundo bloco experimental ( $\square$ ), WPC do terceiro bloco experimental ( $\blacktriangle$ ); $\alpha$ -lactose monohidratada (+) e soro em pó ( $\blacklozenge$ ).....	77



FIGURA 13 - Gráfico dos pesos na CP 1 versus números de onda da região espectral 3500-400cm <sup>-1</sup> .....	79
FIGURA 14 - Composição típica das proteínas do leite.....	88
FIGURA 15 - Composição típica das frações proteicas do leite.....	89
FIGURA 16 - Composição típica das frações de soro proteínas do leite.....	89
FIGURA 17 - Composição calculada das proteínas de um sistema proteico com 30% de MPC e 70% de WPC.....	91
FIGURA 18 - Composição calculada das frações proteicas de um sistema proteico com 30% de MPC e 70% de WPC.....	91
FIGURA 19 - Parâmetros configurados no RVA.....	94
FIGURA 20 - Parâmetros analíticos coletados: viscosidade inicial (Vi), viscosidade de pico (Vp), temperatura inicial de pico (Ti), temperatura final de pico (Tp), tempo inicial do pico (ti) e tempo final de pico (tf); parâmetros analíticos calculados: viscosidade de arranque ( $\Delta V$ ), diferença de temperatura ( $\Delta T$ ), intervalo de tempo do pico ( $\Delta t$ ) e relação viscosidade de arranque por intervalo de tempo do pico ( $\Delta V/\Delta t$ ).....	95
FIGURA 21 - Gráfico dos 35 experimentos <i>versus</i> viscosidade de arranque - $\Delta V$ ( $\approx$ ) de acordo com a temperatura (°C) do tratamento térmico ( $\blacksquare$ ), concentração de WPC (%) nas amostras ( $\blacksquare$ ) e pH ( $\blacksquare$ ) .....	100
FIGURA 22 - Gráfico dos 35 experimentos <i>versus</i> temperatura inicial do pico (°C) - Ti ( $\approx$ ) de acordo com a temperatura (°C) do tratamento térmico ( $\blacksquare$ ), concentração de WPC (%) nas amostras ( $\blacksquare$ ) e pH ( $\blacksquare$ ).....	101

FIGURA 23 - Perfis viscográficos dos experimentos das amostras A até E (variável  $X_3$ ) nos tratamentos térmicos (variável  $X_1$ ) 85°C/15minutos (A85 – E85) e 95°C/5minutos (A95 – E95) nos diferentes pH (variável  $X_2$ ): 5,5 ( — ), 6,5 ( — ) e 7,0 ( — )......104

FIGURA 24 - Gráficos de escores CP1 *versus* CP2 e gráfico de amostras *versus* escores CP1 utilizando os 10 parâmetros analíticos coletados da rampa de aquecimento dos perfis viscográficos das amostras de WPC: grupo  $\alpha$  amostras C, D e E em pH 7,0 e tratamento térmico de 85°C/15min e 95°C/5min (■); grupo  $\beta$  amostras A, B, C, D e E em pH 5,5 e tratamento térmico 85°C/15min e 95°C/5min (▼); grupo  $\kappa$  demais amostras (•)..... 106

FIGURA 25 - Gráfico dos pesos na PC 1 *versus* os 10 parâmetros analíticos coletados da rampa de aquecimento dos perfis viscográficos das amostras de WPC (variáveis) ..... 107

FIGURA 26 - Visualização gráfica do planejamento misto 2x3x5.....108

FIGURA 27 - Visualização gráfica do planejamento misto 2x3x5 com os agrupamentos obtidos na análise exploratória.....108

FIGURAS 28 A e B - Interpretação do perfil viscográfico dos experimentos em  $\alpha$  com ponto de ruptura na rampa de aquecimento (A) e  $\beta$  com ponto de ruptura na rampa de resfriamento (B).....109

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Condições empregadas durante a produção dos WPC (n=3).....	55
TABELA 2 – Condições de temperatura empregadas durante a produção dos WPC.....	58
TABELA 3 – Valores médios dos resultados das análises de composição centesimal e físico-químicas realizadas nas amostras de WPC do segundo bloco (n=3).....	62
TABELA 4 – Valores médios dos resultados das análises de composição centesimal e físico-químicas realizadas nas amostras de WPC do terceiro bloco (n=4).....	64
TABELA 5 – Tentativa de atribuição do espectro Raman do WPC.....	68
TABELA 6 – Análise comparativa dos espectros Raman e atribuição em relação à estrutura da lactose presente nas amostras de WPC.....	75
TABELA 7 – Análises físico-químicas dos concentrados proteicos.....	90
TABELA 8 – Proporções de MPC e WPC nas amostras de sistemas proteicos em pó preparados por mistura a seco.....	92
TABELA 9 – Configurações do processamento térmico nível médio (85°C por 15 minutos).....	93
TABELA 10 – Configurações do processamento térmico ponto central (90°C por 10 minutos).....	93
TABELA 11 – Configurações do processamento térmico nível alto (95°C por 5 minutos).....	94

TABELA 12 – Descrição dos dados coletados e calculados no perfil viscográfico.....	95
TABELA 13 – Fatores e níveis utilizados no planejamento misto 2x3x5.....	96
TABELA 14 – Matriz do planejamento misto 2x3x5.....	96/97
TABELA 15 – Resultados das análises físico-químicas dos concentrados proteicos.....	98
TABELA 16 – Teor de proteína nas soluções utilizadas para os ensaios no RVA.....	99
TABELA 17 – Matriz do planejamento misto 2X3X5 com os parâmetros analíticos coletados no RVA.....	102/103
TABELA 18 – Resumo dos agrupamentos da análise exploratória.....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of official analytical chemists</i>
BSA	Albumina do soro bovino
CCD	Detectores multicanal
CIP	<i>Cleaning in place</i>
CP	Componente principal
CPs	Componentes principais
CP1	Primeiro componente principal
CP2	Segundo componente principal
DF	Diafiltração
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DWP	Soro em pó desmineralizado
ESI-MS	Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray
ESCA	Espectroscopia Eletrônica para Análise Química (igual à XPS)
FAO	Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FIL	<i>Fédération Internationale de Laiterie</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Filtração em gel
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IgA	Imunoglobulina A
IgG <sub>1</sub>	Imunoglobulina G <sub>1</sub>
IgG <sub>2</sub>	Imunoglobulina G <sub>2</sub>
IgM	Imunoglobulina M
Igs	Imunoglobulinas
IN	Instrução normativa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Microfiltração
min	Minuto
MIR	Espectroscopia no Infravermelho Médio
MP	Proteínas lácteas

mPa.s	Milipascal segundo
MPC	Concentrado proteico de leite
MPI	Isolado proteico de leite
MPP	Produto lácteo proteico
MPPs	Produtos lácteos proteicos
NF	Nanofiltração
NIR	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
NMP	Número mais provável
N-caseínico	Nitrogênio caseínico
N-não-caseínico	Nitrogênio não caseínico
N-soroproteínas	Nitrogênio das soroproteínas
N-total	Nitrogênio total
N-β-lactoglobulina	Nitrogênio da β-lactoglobulina
P	Nível de significância
PCA	Análise dos Componentes Principais
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Ponto de ruptura
PS	Proteínas do soro
rad.s <sup>-1</sup>	Radianos por segundo
RMF	Resíduo mineral fixo
RVA	Analisador Rápido de Viscosidade
s	Segundo
SA	Soralbumina
SC	Componente secretor
SMP	Leite em pó desnatado
SP	Sistemas proteicos
TCW	<i>Thermocline for Windows<sup>TM</sup></i>
tf	Tempo final do pico
Tg	Temperatura de Transição Vítreá
ti	Temperatura inicial do pico
TMP	Proteína total do leite
Tp	Temperatura final do pico
UF	Ultrafiltração
UFC	Unidade formadora de colônia

UHT	Ultra Alta Temperatura
$V_i$	Viscosidade inicial
$V_F$	Viscosidade final
$V_P$	Viscosidade de pico
$V_R$	Viscosidade de retenção
WP	Soro em pó
WPC	Concentrado proteico de soro
WPI	Isolado proteico de soro
WPNI	Índice de desnaturação proteica
XPS	Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X
XRD	Difração de Raios X
$\alpha$ -LA	$\alpha$ -lactoalbumina
$\alpha$ S1-CN	$\alpha$ S1 – caseína
$\alpha$ S2-CN	$\alpha$ S2 – caseína
$\beta$ -CN	$\beta$ – caseína
$\beta$ -LG	$\beta$ -lactoglobulina
$\gamma$ -CN	$\gamma$ – caseína
$\kappa$ -CN	$\kappa$ – caseína
$\Delta V$	Viscosidade de arranque
$\Delta T$	Diferença de temperatura
$\Delta t$	Intervalo de tempo do pico
$\Delta V/ \Delta t$	Relação viscosidade de arranque x Intervalo de tempo do pico
$v$	Estiramento
$\delta$	Deformação
$\tau$	Torção

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 QUÍMICA E TECNOLOGIA DE PROTEÍNAS LÁCTEAS.....	21
2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS.....	30
2.3 ANALISADOR RÁPIDO DE VISCOSIDADE (RVA).....	34
2.4 INOVAÇÃO ABERTA E INTERAÇÕES INTERINSTITUCIONAIS.....	36
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
<b>3 - OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
<b>4 – ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO FERRAMENTA NA CARACTERIZAÇÃO DA LACTOSE EM CONCENTRADOS PROTEICOS DE SORO.....</b>	<b>49</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>49</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
<b>4.2.1 Amostras de WPC.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.2 Amostras de WPC do primeiro bloco experimental (controle) .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.3 Amostras de WPC do segundo bloco experimental (variáveis: evaporação e secagem).....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.4 Amostras de WPC do terceiro bloco experimental (variáveis: tratamento térmico e microfiltração).....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.5 Análises de composição centesimal e físico-químicas.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.6 Espectroscopia Raman.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.7 Análises Quimiométricas.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.8 Análises estatísticas.....</b>	<b>61</b>



4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
4.3.1	Análises de composição.....	62
4.3.2	Análises espectroscópicas durante estocagem do WPC: controle do primeiro bloco experimental.....	65
4.3.3	Análises espectroscópicas dos WPC do segundo bloco de amostras .....	68
4.3.4	Análises espectroscópicas dos WPC do terceiro bloco de amostras .....	71
4.3.5	Análise exploratória das amostras de WPC.....	75
4.4	CONCLUSÃO.....	80
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## **5 – AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EM ANALISADOR RÁPIDO DE VISCOSIDADE.....**

	RESUMO.....	84
5.1	INTRODUÇÃO.....	85
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	88
5.2.1	Amostras e preparo dos experimentos.....	88
5.2.2	Parâmetros do <i>Rapid Visco<sup>TM</sup> Analyser (RVA)</i> .....	92
5.2.3	Planejamento misto 2x3x5.....	96
5.2.4	Análises dos resultados de RVA.....	97
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
5.3.1	Caracterização físico-química das amostras utilizadas no experimento .....	98
5.3.2	Caracterização analítica das rampas de viscosidade de arranque .....	99
5.3.3	Análise exploratória nas condições simuladas no RVA.....	105
5.3.4	Interpretação e discussão dos comportamentos observados .....	109
5.4	CONCLUSÃO.....	112
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

## **6 - CONCLUSÕES GERAIS.....**

## **7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....**

<b>ANEXOS.....</b>	<b>118</b>
<b>PUBLICAÇÕES RELACIONADAS.....</b>	<b>134</b>
<b>SÚMULA CURRICULAR.....</b>	<b>136</b>

## 1 – INTRODUÇÃO GERAL

O concentrado proteico de soro (*whey protein concentrate* - WPC) em pó é um produto com elevado valor de mercado, sendo empregado como ingrediente nobre nas indústrias de aditivos e ingredientes, nas indústrias de alimentos e na elaboração de dietas nutricionalmente elaboradas para pessoas com necessidades especiais em nutrientes.

A produção de WPC por meio da aplicação das técnicas de membranas, evaporação a vácuo e secagem por spray é uma alternativa tecnológica viável ao aproveitamento do soro oriundo das fábricas de queijos, possibilitando a obtenção de produtos com alto valor mercadológico agregado (CARVALHO e MAUBOIS, 2010), grande aplicabilidade industrial e também propriedades funcionais diferenciadas aos produtos obtidos a partir de soro.

Entretanto, historicamente, o Brasil caracteriza-se como grande importador de WPC, existindo uma grande carência por informações técnicas, principalmente com embasamento científico, por parte das indústrias de laticínios no tocante às tecnologias para transformação do soro em WPC. No Estado de Minas Gerais os Laticínios Barbosa e Marques (Governador Valadares), Laticínios Porto Alegre (Ponte Nova e Mutum) e Kerry do Brasil (Três Corações) destacam-se pelos investimentos nos últimos anos na instalação de sistemas de membranas, evaporação a vácuo e secagem por spray, com vistas ao aproveitamento do soro e à produção industrial de derivados desidratados em pó deste co-produto da produção de queijos. O estado de Minas Gerais possui aproximadamente 35% das indústrias de laticínios do Brasil sendo, portanto, Estado potencial para o aproveitamento de parte do seu soro como WPC.

Atualmente, as relações interinstitucionais constituem o cerne da vida acadêmica e refletem os avanços experimentados pela consolidação da ciência no mundo. A importância estratégica das relações interinstitucionais consiste em fortalecer o conhecimento científico, construindo, nos seus espaços de articulação e de diálogo, a viabilidade necessária para a realização de projetos de desenvolvimento nacional. As relações interinstitucionais permitem às Instituições Científicas e Tecnológicas (ICTs) dialogar entre si e demais instituições do segundo e terceiro setor e, assim, promover a articulação necessária para realizar inovação e criar condições para o crescimento tecnológico e econômico, objetivando distribuição de renda e inclusão social, geração de empregos e oportunidades de trabalho para todos. Nesse sentido, o diferencial estratégico das relações interinstitucionais é promover relações baseadas no diálogo, na cooperação e principalmente na transparência. As relações interinstitucionais,

visando à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo, são incentivadas pela Lei nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004, conhecida como “Lei da Inovação”, que reflete a necessidade do país contar com dispositivos legais eficientes que contribuam para o delineamento de um cenário favorável ao desenvolvimento científico, tecnológico e ao incentivo à inovação (BRASIL, 2004.). Desta forma, o marco legal em vigor representa um amplo conjunto de medidas cujo objetivo maior é ampliar e agilizar a transferência do conhecimento gerado no ambiente acadêmico para a sua apropriação pelo setor produtivo, estimulando a cultura de inovação e contribuindo para o desenvolvimento industrial do país.

É neste cenário que inserimos este trabalho, cujo tema **“Uma contribuição à pesquisa das propriedades químicas dos concentrados proteicos de soro do leite”** visa utilizar a **“Espectroscopia Raman como ferramenta de caracterização da estrutura da lactose em concentrados proteicos de soro e o analisador rápido de viscosidade no estudo das propriedades viscosgráficas de proteínas lácteas”** já que, nos últimos anos, foi possível construir relações interinstitucionais sólidas visando a pesquisa na área de concentrados e desidratados do leite e derivados, com ênfase na pesquisa de produtos e processos de preparação de concentrados proteicos de soro do leite entre a Universidade Federal de Juiz de Fora, Universidade Federal de Viçosa e a Gemacom Tech S/A. O desenvolvimento do trabalho está dividido em duas etapas principais:

- **4 – Espectroscopia Raman como ferramenta na caracterização da lactose em concentrados proteicos de soro;**
- **5 – Avaliação do efeito sinérgico de proteínas lácteas em analisador rápido de viscosidade.**

A espectroscopia Raman tem sido empregada no estudo de diversos produtos lácteos, apresentando importantes contribuições no entendimento das tecnologias e nas propriedades químicas destes produtos (ALMEIDA *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2010).

O Instituto Americano de Produtos Lácteos (ADPI, 2002), que estabelece padrões elaborados como um guia para a seleção de produtos lácteos a serem utilizados como ingredientes na indústria alimentícia, mostra que a lactose é o componente majoritário do WPC35 (~350,0 g.kg<sup>-1</sup> de proteína na base seca). A caracterização da estrutura da lactose presente neste produto, utilizando a espectroscopia Raman, é extremamente útil para o estudo da influência do processamento e das condições e tempo de armazenamento na lactose

presente no mesmo, devido ao fato de não ser previamente cristalizada durante a produção. A espectroscopia Raman consiste então, em uma potencial ferramenta emergente e relevante para o uso no controle de qualidade da produção industrial e para o entendimento e aperfeiçoamento dos métodos produtivos, impactando diretamente e decisivamente no crescimento e na competitividade das indústrias de alimentos do Estado de Minas Gerais.

Em uma ótica complementar, as proteínas presentes nos WPC também possuem grande importância sob a perspectiva tecnológica, já que desempenham funções reológicas em diferentes aplicações. Este trabalho insere-se na perspectiva do uso de condições simuladas de processamento, empregando o equipamento Analisador Rápido de Viscosidade (RVA), o qual proporciona ampla versatilidade ao permitir a aplicação de diferentes tratamentos térmicos com simultânea determinação contínua da viscosidade. Na literatura científica internacional este instrumento é citado como simulador de processo (BENNET *et al.*, 2007).

Espera-se que, ao final do trabalho, obtenha-se uma matriz de correlação da influência das interações proteicas e da identificação das propriedades das proteínas frente às variações de tratamentos térmicos e pH de diferentes sistemas proteicos, considerando que a desnaturação térmica das soro-proteínas é determinante para a funcionalidade dos ingredientes lácteos e pode ser descrita e avaliada, em diferentes tratamentos, com auxílio do RVA.

Este projeto foi construído com o objetivo de se obter a transferência direta das tecnologias obtidas para as indústrias, por meio da difusão pública das conclusões obtidas no trabalho, assim como pela formação de mão de obra especializada constituída pelos pesquisadores e colaboradores envolvidos no projeto, com capacidade multiplicadora de conhecimento técnico científico. Este mesmo projeto está configurando como uma pesquisa realizada por meio de relações interinstitucionais (UFJF : UFV : Gemacom Tech), na qual o avanço do conhecimento científico possui imediato e direto retorno para a sociedade.

O modelo de interação utilizado foi o da **Inovação Aberta**, permitindo o compartilhamento dos laboratórios destas instituições, gerando um ambiente multicolaborativo único e essencial para a execução das atividades envolvidas neste trabalho, devido ao nível de complexidade e especificidades envolvidas tanto nos procedimentos de produção em escala piloto dos produtos, quanto nos procedimentos analíticos. Assim, este projeto teve como fundamentação apresentar a viabilidade da relação pública: privada no âmbito da **Inovação Aberta**, como mecanismo de aceleração do desenvolvimento científico e industrial na área de alimentos no Brasil.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

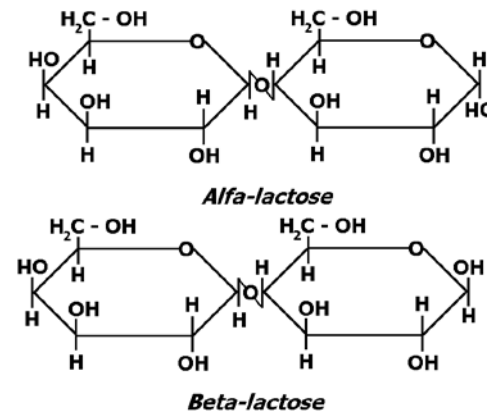
### 2.1 QUÍMICA E TECNOLOGIA DE PROTEÍNAS LÁCTEAS

A obtenção dos concentrados proteicos pode ser realizada empregando a associação de processos de filtração por membranas, evaporação a vácuo e secagem em *Spray Dryer*. A secagem por atomização é a técnica mais conveniente para a produção de concentrados proteicos em pó. Entretanto, o seu emprego para secagem de produtos oriundos do soro de leite (por exemplo, o concentrado proteico de soro – WPC) e novos produtos, frequentemente ocorre de forma empírica, ocasionando a agregação de partículas coloidais e adesão dos pós nos equipamentos. A origem destes problemas está associada às propriedades físico químicas dos produtos e atributos de processamento. As variáveis de controle mais relevantes são a atividade de água, a transição vítrea e a cristalização da lactose (SCHUCK *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de atributos operacionais e tecnológicos para o processamento do WPC é necessário para um eficiente projeto de equipamentos na indústria de Concentrados e Desidratados nacional. Equipamentos e linhas de processo bem projetados contribuirão para uma maior competitividade destas indústrias nos mercados nacional e internacional, bem como o melhor aproveitamento do soro.

O dissacarídeo lactose é o predominante e mais importante carboidrato do leite, existindo concentrações muito baixas de outros monossacarídeos, incluindo glicose e galactose, oligossacarídeos neutros e ácidos e carboidratos ligados a peptídeos e proteínas (ROBINSON, 1981). Na Figura 1 é apresentada a estrutura química de lactose.

FIGURA 1- Estrutura química da lactose



Fonte: PERRONE *et al.*, 2011

De acordo com Damodaran *et al.* (2010), a concentração de lactose no leite varia conforme a origem entre 2,0 % a 8,5 %. O leite de vaca contém, corriqueiramente, maior quantidade de lactose do que qualquer outro componente sólido, apresentando uma concentração quase constante entre 45 g.L<sup>-1</sup> a 50 g.L<sup>-1</sup> (WALSTRA e JENNESS, 1984).

Os açúcares que possuem átomos de carbono assimétricos são opticamente ativos e suas soluções desviam o plano de vibração da luz polarizada que os atravessa. A  $\alpha$ -lactose e a  $\beta$ -lactose diferem em sua rotação específica. Uma solução recém preparada de qualquer uma delas mudará sua rotação com o passar do tempo à medida que tem lugar o equilíbrio com a outra forma. Segundo Holsinger (1997), a lactose pode ocorrer em duas formas cristalinas nos produtos lácteos,  $\alpha$ -hidratada e  $\beta$ -anidra, ou como uma mistura vítrea amorfa de  $\alpha$  e  $\beta$  lactose. A forma estrutural da  $\alpha$ -lactose pode ser convertida na forma estrutural beta por meio da mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor. Esta mudança na rotação na conformação espacial é denominada mutarrotação. De acordo com Whittier (1944), a mutarrotação é um fenômeno característico de todo açúcar redutor em solução aquosa e, em algumas instâncias, é atribuída às mudanças nas concentrações das formas  $\alpha$  e  $\beta$ .

De acordo com Knipschildt e Andersen (1994), o método de secagem é o mais importante método de conservação de lácteos, pois a utilização desta técnica possibilita a conversão do leite ou soro em leite ou soro em pó com perdas nutricionais mínimas. Há três tipos principais de sistemas de secagem em utilização pelas indústrias: Na secagem em único estágio, emprega-se apenas a câmara de secagem para transformar o leite ou soro concentrados em pó, o que produz um pó particulado caracterizado pela baixa solubilidade em

água; Na secagem em dois estágios, além da câmara de secagem, emprega-se o fluidizador, acarretando na obtenção de um pó aglomerado, com características superiores de solubilidade; E a associação de dois fluidizadores com capacidade de evaporação junto à câmara de secagem caracteriza o processo de secagem em três estágios e em intensa aglomeração do pó (WESTERGAARD, 2001).

O processo de secagem de lácteos implica na formação de lactose no estado amorfo que é altamente higroscópica. Segundo Hynd (1980), os produtos de soro em pó possuem a tendência de absorver água do ar ambiente, acarretando agregação de partículas coloidais do produto durante o armazenamento e a substituição de parte da lactose amorfa por lactose cristalina, como resultado da cristalização do soro concentrado, transforma o soro em um produto não higroscópico. De acordo com Fox e McSweeney (2003), no intuito de aumentar o prazo de conservação do soro em pó, por exemplo, deve-se realizar controle da acidez do soro, da cristalização da lactose e da temperatura do ar de saída da câmara de secagem. Segundo Masters (2002), o soro em pó, quando obtido sem prévia cristalização, é um pó muito fino, higroscópico e com grande tendência à agregação de partículas coloidais, o que se deve à presença de lactose em um estado vítreo ou amorfo.

De acordo com Knipschildt e Andersen (1994), a cristalização do soro concentrado pode ser realizada pela adição de núcleos de cristalização, lactose microcristalina ou soro em pó, seguida de agitação e controle da temperatura.

Segundo Schuck (2001), as propriedades dos produtos lácteos desidratados são influenciadas por fatores que envolvem as condições de operação dos equipamentos, as características da matéria prima e as condições de estocagem. O aprimoramento da qualidade de produtos lácteos desidratados, o qual é governado pelo histórico de tempo e temperatura, envolve um grande entendimento do processo por meio de abordagens físico químicas, termodinâmicas e cinéticas (JEANTET *et al.*, 2008).

De acordo com Schuck *et al.* (2008), a quantidade máxima de umidade em um produto lácteo desidratado deve ser definida pelo valor da atividade de água, sendo desejado um valor próximo a 0,200.

Conforme Roos (2001), elevadas temperaturas empregadas durante a secagem, em associação com a presença de água residual nos estágios finais da secagem produzem a “pegajosidade” (aderência), a agregação de partículas coloidais e a adesão do soro em pó ao equipamento. Segundo Hardy (2001), no caso de produtos lácteos desidratados, as suas



propriedades (fluidez, estabilidade ao armazenamento e solubilização) são intrinsecamente dependentes do modo e da intensidade das interações químicas da água com os outros constituintes.

De acordo com Schuck *et al.* (2004), ao se produzir produtos em pó de soro deve-se controlar a temperatura do ar de saída da câmara de secagem para que seja sempre inferior a 100°C, no intuito de evitar a transformação de lactose amorfa em lactose cristalina, o que acarreta em aglomeração e adesão do produto no equipamento. Segundo Vuataz (2002), o processo de secagem do leite e de seus derivados foi desenvolvido empregando uma base mais empírica e tecnológica do que em conceitos da ciência dos materiais alimentícios, o que pode ser desenvolvido por meio de diagramas de fases, curvas de sorção e análise da composição físico-química.

O principal componente quantitativo do leite é a água, seguida pela lactose, gordura e proteína (caseína e soro-proteína). O leite também contém pequena quantidade de minerais, específicas proteínas do sangue, enzimas e pequenos intermediários da síntese mamária. A composição do leite varia de acordo com a raça e a sanidade do animal, estágio de lactação e o tipo e a quantidade de alimentação, dentre outros (WALSTRA e JENNESS, 1984).

O leite bovino normal contém aproximadamente 35 g.L<sup>-1</sup> de proteína, a qual pode ser fracionada em caseínas e soro-proteínas. Segundo Walstra e Jenness (1984), as caseínas são um grupo de fosfoproteínas específicas do leite as quais se precipitam com acidificação a pH 4,6, presente na forma de micelas. Nesta categoria são inclusos quatro tipos de cadeias polipeptídicas designadas  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas, junto com alguns derivados formados pela proteólise destas. Micelas de caseína são partículas coloidais com 80 nm a 300 nm de diâmetro (média aproximada de 150 nm), consistindo uma base seca de aproximadamente 94% de proteína e 6% aproximadamente de matéria inorgânica como cálcio, fosfato, magnésio e citrato, sendo um importante composto inorgânico presente o fosfato de cálcio coloidal.

As principais frações das proteínas do soro são  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), albumina do soro bovino (BSA),  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA) e imunoglobulinas (Igs). Diversas revisões abrangendo as estruturas e propriedades das proteínas do soro têm sido publicadas (EDWARDS *et al.*, 2009; HAMBLING *et al.*, 1992; KINSELLA e WHITEHEAD, 1989).  $\beta$ -LG é a mais abundante soro-proteína, representando aproximadamente 50% do total das soro-

proteínas do leite bovino, tem uma massa molecular de 18.000 unidades de massa atômica, possui duas ligações dissulfeto internas e um grupo tiol livre.

O processo de conversão do leite ou do soro líquido em pó altera a natureza e o comportamento dos componentes do leite. Fatores que afetam a capacidade de absorção de água das proteínas lácteas incluem: composição; estrutura proteica e conformação; carga superficial e polaridade; presença de carboidratos, lipídios e sais; pH; força iônica; temperatura; grau de desnaturação e agregação; e formação de ligações dissulfídicas (DAMODARAN, 1996; GARCIA *et al.*, 1997).

A modificação na estrutura das proteínas e, conseqüentemente, as interações entre as mesmas e também com outros compostos não proteicos, é extremamente determinante para o comportamento funcional dos produtos desidratados.

Segundo Araújo (1995), a desnaturação altera várias propriedades importantes das proteínas, do ponto de vista da tecnologia de alimentos. A proteína desnaturada é, geralmente, menos solúvel ou até mesmo insolúvel, promove aumento na viscosidade do alimento e tem a reatividade de seus grupos laterais intensificada. O autor prossegue afirmando que a proteína desnaturada é mais sensível à hidrólise por enzimas proteolíticas.

A desnaturação das soro-proteínas afeta a conformação tridimensional e as características funcionais das mesmas. O grau de desnaturação térmica das soro-proteínas varia em função da intensidade do tratamento térmico aplicado ao leite no processamento de diferentes derivados. Dessa forma, a desnaturação deve ser conduzida de forma a beneficiar as propriedades importantes para cada derivado lácteo.

Alterações na conformação proteica podem afetar a termodinâmica de ligação com a água por alterar a disponibilidade de sítios polares ou sítios de hidratação. A transição da conformação globular compacta da molécula de proteína, para a conformação aleatória, resulta no aumento da área superficial disponível e exposição de peptídeos e cadeias laterais de aminoácidos (antes protegidos), desta forma, podem interagir com a água (KINSELLA, 1982).

O comportamento térmico das proteínas do soro é governado, principalmente, pelas propriedades da  $\beta$ -lactoglobulina que, por sua vez, são afetadas pelo pH do meio, lactose, cloreto de sódio, íons cálcio e outros. Particularmente, a  $\beta$ -lactoglobulina e a BSA comandam a agregação de proteínas por meio da troca tiol-dissulfeto e reações de oxidação-redução durante o tratamento térmico.

A desnaturação das proteínas do soro afeta a conformação tridimensional e propriedades funcionais das mesmas. Assim, é de esperar-se um comportamento ligeiramente diferente da soro-proteína do leite fervido, se comparado com o pasteurizado, por exemplo, relativo à capacidade de absorver água, de gelificar, emulsificar, na viscosidade e outros.

O grau de desnaturação térmica das soro-proteínas varia em função da intensidade do tratamento térmico aplicado ao leite no processamento de diferentes derivados. Dessa forma, a desnaturação deve ser conduzida de forma a beneficiar as propriedades importantes para cada derivado.

A cinética da desnaturação térmica das soro-proteínas é complexa, com efeito significativo nas mudanças entre 80-100°C. A reação de desnaturação mostra uma relação não linear de Arrhenius; existe uma notável mudança dependente da temperatura próximo de 80-90°C para ambas  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG. A energia de ativação aparente está na faixa de 260 kJ.mol<sup>-1</sup> a 280 kJ.mol<sup>-1</sup> para a  $\beta$ -LG e 270 kJ.mol<sup>-1</sup> a 280 kJ.mol<sup>-1</sup> para a  $\alpha$ -LA em temperaturas abaixo de 90°C (DANNENBERG e KESSLER, 1998; OLDFIELD *et al.*, 1998a). Em temperaturas mais altas, a energia de ativação é menor, variando de 54 kJ.mol<sup>-1</sup> a 60 kJ.mol<sup>-1</sup> para a  $\beta$ -LG e de 55 kJ.mol<sup>-1</sup> a 70 kJ.mol<sup>-1</sup> para a  $\alpha$ -LA, indicando interação química (agregação).

Oldfield *et al.* (1998b) sugerem que existem pelo menos três possíveis espécies de desnaturação da  $\beta$ -LG que podem associar com as micelas: (i) monômero de  $\beta$ -LG desdobrado, (ii) auto-agregação de  $\beta$ -LG e (iii) agregados de  $\beta$ -LG/ $\alpha$ -LA. A taxa relativa de associação destas espécies com as micelas de caseína depende da temperatura e do gradiente de aquecimento que, por sua vez, afetam as taxas relativas de desdobramento e formação das diferentes espécies agregadas. Em temperaturas elevadas e taxas de aquecimento rápido, todas as soro-proteínas do leite começam a se desdobrar em um curto período de tempo, apresentando assim mais oportunidade para os monômeros de  $\beta$ -LG desdobrados se auto-agregarem que, conseqüentemente, fará a associação com as micelas de caseína menos eficiente. Estes agregados de  $\beta$ -LG poderiam sobressair da superfície da micela de caseína promovendo um efeito estérico para novas associações de  $\beta$ -LG. Além disso, estes agregados podem ter seus grupos reativos sulfidrílicos enterrados no interior do agregado e, portanto, indisponível para as reações de transferência sulfidril-dissulfeto com a  $\kappa$ -caseína micelar. A formação de  $\beta$ -LG desdobrada pode ser promovida por longos períodos de aquecimento a temperaturas baixas, ou por aquecimento em uma taxa lenta até a temperatura desejada. Estas

moléculas monoméricas de  $\beta$ -LG desdobradas penetram na camada capilar da  $\kappa$ -caseína com maior facilidade e tem o grupo sulfidrílico mais facilmente acessível.

Além do tempo e da temperatura de aquecimento, vários outros fatores influenciam a extensão da associação das soro-proteínas desnaturadas com as micelas de caseína, que incluem o pH do leite antes do aquecimento, as concentrações de cálcio e fosfato solúveis e a concentração de sólidos do leite (SINGH, 2009). Aquecimento em valor de pH inferior a 6,7 resulta em uma maior quantidade de soro-proteína desnaturada associada com as micelas de caseína, enquanto em pH mais alto, os complexos de soro-proteína e  $\kappa$ -caseína dissociam-se das superfícies das micelas, aparentemente por causa de dissociação da  $\kappa$ -caseína (SINGH e FOX, 1995).

Associações das soro-proteínas modificam as superfícies das micelas de caseína e podem ser capazes de influenciar a funcionalidade de alguns ingredientes lácteos reconstituídos.

As proteínas de origem animal e vegetal estão sendo cada vez mais utilizadas como ingredientes em um grande número de alimentos formulados. Os benefícios das proteínas do leite como ingredientes em outros alimentos originam-se de suas excelentes propriedades nutricionais e sua capacidade de contribuir para propriedades tecno-funcionais, sensoriais e reológicas nos produtos finais.

O mercado de produtos com alto teor de proteína já é uma realidade no Brasil e no mundo onde, a cada ano, cresce a oferta de novos produtos. O iogurte grego já não é mais uma novidade e atualmente tem surgido produtos como *snacks* com alto teor de proteína, iogurte liofilizado, bebidas para praticantes de atividade física, bebidas com alto teor de proteína láctea combinada a proteínas de fontes vegetais, entre outros.

Uma empresa que vem se destacando neste segmento é a Gemacom Tech S/A, pois tem investido fortemente em pesquisas para apresentar ao mercado sistemas proteicos (SP) que proporcionem melhor tecno-funcionalidade dentro de cada perfil de produto. Atualmente, oferece ao mercado uma completa linha de proteínas lácteas isoladas e combinadas à diferentes estabilizantes e espessantes atendendo à crescente demanda de produtos com maior teor proteico.

No seu Centro de Inovação Tecnológica (CIT) é uma realidade a apresentação de inovação em produtos com alto teor de proteína. Este CIT se configura como um dos mais

modernos do Brasil no segmento de alimentos, contendo: planta piloto UHT, liofilizadores, sistema de homogeneização de alta pressão, setor de padaria e confeitaria. Dentro desta configuração já é grande o número de pesquisas realizadas que tem gerado sucesso na apresentação de produtos inovadores ao mercado de alimentos, onde os produtos com alto teor de proteína são o principal sucesso nos últimos anos.

O aprimoramento da cadeia de produtos lácteos em pó já é mundialmente estabelecido e se enquadra atualmente como um dos mercados que mais crescem devido à necessidade constante dos consumidores em relação a produtos com maior valor nutricional.

FIGURA 2 - Gerações dos produtos lácteos em pó



Fonte: SCHUCK, 2010

De acordo com a Figura 2, a cada avanço em tecnologia e conceitos ligados a melhoria da especificidade nutricional e tecno-funcional temos um enquadramento dos produtos em uma nova geração. Diante da realidade do mercado nacional, somos significativos produtores de leite em pó integral e desnatado além de soro em pó, ou seja, pensando na capacidade produtiva das indústrias lácteas estamos enquadrados na 1ª Geração de produtos lácteos desidratados.

Analisando o mercado dos produtos enquadrados na 2ª Geração, verificamos que o Brasil é hoje um grande importador destes itens, mas já se visualizam os primeiros passos das indústrias nacionais no intuito de atender este mercado, principalmente pensando em concentrado proteico de soro (WPC).

Contudo, quando pensamos em relação à 3ª Geração que, traduzindo, seria denominada de ingredientes tecno-funcionais, já encontramos algumas indústrias nacionais trabalhando de maneira intensa para atendimento à necessidade do mercado consumidor. Estes ingredientes são desenvolvidos avaliando exigências sensoriais e tecnológicas dos produtos, bem como, as realidades de cada processo industrial, considerando suas diferenciações e especificidades quanto ao tipo de tratamento térmico e necessidades reológicas dentro dos processos, por exemplo.

O uso de diferentes tratamentos térmicos nas indústrias de alimentos é um dos principais fatores de influência sobre as propriedades tecno-funcionais dos SP, dentre as quais a desnaturação térmica das soro-proteínas é determinante para a obtenção das características desejáveis no produto processado. A compreensão do comportamento da desnaturação térmica destas proteínas na matriz a ser aplicada é de fundamental importância para o controle tecnológico do processamento.

Os tradicionais produtos lácteos proteicos, leite em pó desnatado (SMP) e o soro em pó (WP), têm uma longa história de uso como ingredientes nos produtos alimentícios, por exemplo, nas bebidas, sorvetes, pães e bolos entre outros. O SMP pode ser classificado quanto ao índice de desnaturação proteica (WPNI) como baixo, médio e alto tratamento térmico. Leite em pó com alta concentração de proteína variando entre 500 g.kg<sup>-1</sup> a 850 g.kg<sup>-1</sup> são normalmente classificados como concentrados proteicos de leite (MPC), sendo os principais o MPC56, MPC70 e MPC85, onde o número é referente à concentração aproximada de proteína na base seca.

O processo de fabricação do SMP consiste em diferentes etapas como: (i) desnate e pasteurização do leite cru, (ii) pré-aquecimento do leite com possíveis combinações entre tempo/temperatura, (iii) concentração do leite em evaporadores de múltiplos efeitos, (iv) tratamento térmico do concentrado para reduzir a viscosidade inicial na entrada da câmara de secagem, e (v) secagem do concentrado.

Na fabricação do MPC, o leite desnatado é concentrado por ultrafiltração (UF) para aumentar o conteúdo de proteína e remover parte da lactose e os sais. Para os produtos com concentração mais alta de proteína, (normalmente acima de 700 g.kg<sup>-1</sup> de proteína na base seca) diafiltração (DF) é normalmente aplicada. Geralmente, nenhuma etapa de pré-aquecimento é necessária. Depois da UF e DF do SMP, o retentado é evaporado para aumentar a concentração de sólidos e depois desidratado em câmara de secagem.

Os MPCs são comumente adicionados ao leite ou queijos formulados para aumentar a concentração de proteínas e/ou rendimento do produto final. O MPC pode ser utilizado para melhorar as características de textura do iogurte, requeijões e queijos processados. O uso do MPC em bebidas nutricionais vem crescendo nos últimos anos no Brasil. Nestas aplicações o MPC contribui com ambas as proteínas do leite (caseína e soro-proteínas), na mesma proporção que o leite, porém com concentração de lactose muito menor.

A produção dos derivados de soro em pó envolve a combinação de diferentes processos como UF, NF, DF, osmose reversa, troca iônica, evaporação e secagem. Os produtos comerciais incluem os concentrados proteicos de soro (WPC), isolados proteicos de soro (WPI) e proteínas fracionadas como a  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG. Os mais importantes sob o ponto de vista comercial são o WPC (aproximadamente 850 g.kg<sup>-1</sup> de proteína) e o WPI (aproximadamente 950 g.kg<sup>-1</sup> de proteína).

O WPC tem aplicação em produtos cárneos, bebidas, panificação e produtos infantis. As principais características de funcionalidade dos derivados de soro incluem a forte interação com água, emulsificação, aeração e geleificação. As funcionalidades destes produtos não dependem somente da composição, mas também dos vários processos a que são submetidos durante as etapas de fabricação.

## 2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

O efeito Raman pode ser entendido a partir da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Quando a radiação atinge um composto químico e essa radiação não é absorvida, ela pode passar direto pela matéria ou então ser espalhada.

A radiação eletromagnética pode ser descrita por dois componentes: os campos elétrico e magnético, perpendiculares entre si. Isso quer dizer que uma onda eletromagnética é formada por dois vetores perpendiculares, que se somam para dar origem a essa onda. Quando a radiação eletromagnética interage com a matéria, do ponto de vista de transição entre estados moleculares, apenas a parte elétrica da radiação é importante, e desconsidera-se o efeito provocado pela componente magnética. Na verdade, será esse campo elétrico da

radiação que irá interagir com a molécula, para dar origem ao efeito do espalhamento (OLIVEIRA, 2001).

Toda molécula tem um momento de dipolo intrínseco ou efetivo. Entretanto, quando o campo elétrico da radiação incidente interage sobre a molécula, teremos o aparecimento de um novo momento de dipolo, que agora será induzido pela radiação. Esse momento de dipolo induzido  $\mathbf{P}$  apresenta uma relação linear com o campo elétrico da radiação incidente, de acordo com a Equação 1:

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde o negrito significa que essas grandezas são vetores.

O termo  $\alpha$  que aparece na equação é uma constante, conhecida como polarizabilidade, e tem uma semelhança muito grande com o momento de dipolo efetivo da molécula. A polarizabilidade é uma propriedade intrínseca de cada sistema químico, mas que somente se manifesta quando há interação da radiação eletromagnética com o composto em questão.

Tendo a molécula uma geometria de equilíbrio, descrita pelo estado eletrônico fundamental, na qual ela tem seus  $3N-6$  graus de liberdade vibracionais, alguns deles serão ativos na técnica de espectroscopia no infravermelho, mas outros não. Esses modos é que nos interessam quando falamos em espectroscopia Raman, pois, como os efeitos físicos envolvidos são distintos nas duas técnicas, os modos vibracionais também serão distintos.

Para uma determinada molécula, alguns modos vibracionais aparecem no infravermelho e outros no Raman. Isto implica em que as duas técnicas são complementares entre si, e para uma análise completa da estrutura vibracional de um sistema químico, torna-se necessário obter-se ambos os espectros. Quando a radiação eletromagnética monocromática (fóton) interage com uma molécula, temos uma nova identidade, que podemos identificar como ‘molécula + radiação’. Dessa forma, ela sofre uma transição, pois o sistema ‘molécula + radiação’ está acrescido da energia que a radiação eletromagnética (fóton) carrega. Quando esse sistema volta ao estado fundamental, temos o espalhamento de um fóton, que pode apresentar-se de duas formas: primeiro esse fóton espalhado tem a mesma energia do fóton incidente, e então teremos o princípio da conservação de energia estabelecido. Nesse caso, temos o espalhamento conhecido como Rayleigh (tem esse nome em homenagem a *Sir J.*



Rayleigh, reconhecido físico que estudou o fenômeno de fluorescência de compostos). A segunda forma consiste do espalhamento Raman descrito anteriormente (OLIVEIRA, 2001).

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

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

Os avanços na instrumentação facilitaram a tarefa de obter um espectro Raman, como exemplo, as novas fontes de radiação monocromática, no início eram utilizadas lâmpadas de mercúrio e hoje são empregados lasers como radiação incidente. Os lasers apresentam atributos que os tornam uma excelente fonte de excitação, entre os quais podemos destacar monocromaticidade, direcionalidade e coerência. Novos tipos de detectores, como os detectores multicanal (CCD), uso de microscópio óptico acoplado ao espectrômetro, utilização de fibra óptica para medidas remotas, desenvolvimento da espectroscopia FT-Raman, técnicas de imagem e a minituarização da instrumentação tem tornado a espectroscopia Raman uma técnica cada vez mais popular para a caracterização rápida e fácil de sólidos, líquidos e no controle de qualidade, ganhando assim novos campos de pesquisa e espaço no setor industrial (ALMEIDA *et al.*, 2011).

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

A quimiometria utiliza métodos matemáticos e estatísticos para a análise de dados multivariados com o objetivo de extrair informação, melhorar e otimizar medidas de processos químicos. Nos dados multivariados, diversas variáveis são analisadas simultaneamente. O uso das ferramentas quimiométricas tornou possível o processamento e

interpretação de dados que antes seriam impossíveis de serem analisados. Isso se deve ao aumento da capacidade de processamento dos computadores, da instrumentação analítica e da habilidade de adquirir dados rapidamente. Dentre as ferramentas quimiométricas mais utilizadas estão: calibração multivariada, reconhecimento de padrões e planejamento e otimização de experimentos (BARROS NETO *et al.*, 2006).

O uso de análises estatísticas multivariadas para a interpretação de dados analíticos vem se tornando uma importante ferramenta para a interpretação de dados analíticos nos últimos anos, principalmente aquelas com base na análise exploratória de dados, reconhecimento de padrões e análise discriminante.

Os métodos de reconhecimento de padrões permitem identificar similaridades e diferenças nas propriedades das amostras e/ou variáveis. Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser supervisionados e não supervisionados. Os métodos não supervisionados, denominados também de métodos de análise exploratória, são aqueles usados apenas para examinar similaridades ou diferenças entre amostras. Exemplo: a Análise por Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*). O PCA é, dentre os métodos multivariados, o mais simples e pode ser usado para explicar a estrutura de covariância-variância de um conjunto de dados usando uma combinação linear das variáveis originais para formar componentes principais (PCs) (BRERETON, 2003). As combinações das dimensões originais descrevem a maior variação entre os conjuntos de dados, e a maioria das informações do conjunto de dados original pode ser explicada por um pequeno número de variáveis.

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, como mostra a Figura 3.

FIGURA 3 - Representação esquemática da decomposição por PCA

$$\boxed{X} = \boxed{T_1} \boxed{P^T_1} + \boxed{T_2} \boxed{P^T_2} + \dots + \boxed{T_a} \boxed{P^T_a}$$

Fonte: ALMEIDA, 2011

Esta matriz pode ser escrita como produto de dois vetores, escore **t** e peso **p**, conforme a apresentado na Equação 2.

$$X = t_1p_1 + t_2p_2 + \dots + t_ap_a \quad (\text{Equação 2})$$

Para “**a**” componentes principais. Outra maneira de escrever a Equação 1 é por meio da Equação 3:

$$X = TP^T \quad (\text{Equação 3})$$

Onde *X* é o conjunto original dos dados com **n** linhas (amostras) e **m** colunas (variáveis); *T* é a matriz dos escores 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.

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

### 2.3 ANALISADOR RÁPIDO DE VISCOSIDADE (RVA)

O *Rapid Visco<sup>TM</sup> Analyser* (RVA<sup>TM</sup>), ou Analisador Rápido de Viscosidade é um viscosímetro rotacional capaz de mensurar continuamente a viscosidade de uma amostra sob condições controladas de temperatura (BOOTH e BASON, 2007). É um instrumento com interface computacional, desenvolvido pela *Newport Scientific* (Warriewood, Austrália), para avaliar as propriedades intrínsecas à viscosidade dos amidos, cereais, massas e outros

alimentos. A capacidade do RVA em suspender uma amostra no solvente, mantê-la em suspensão durante todo o teste e aplicar apropriada agitação que pode ser configurada conforme processo industrial fazem com que o mesmo tenha grande valor em inúmeros processos de pesquisas. Ele é especialmente usual para testes de matérias que exigem relativos testes complexos, usando variações de temperatura e agitação, permitindo que o material demonstre as suas propriedades em relação à viscosidade. O instrumento combinado com o software *Thermocline for Windows<sup>TM</sup>* (TCW) é capaz de aquecer e resfriar a amostra em mais de 100 diferentes gradientes de temperatura, em períodos variando de segundos ou até mais de 100 horas.

O material a ser avaliado é disposto em um porta-amostra de alumínio, juntamente com o solvente. Para hidrocolóides, como o amido, normalmente são necessários 2 g a 4 g de amostra, tendo a massa final (amostra juntamente com o solvente) aproximadamente 25 g a 30 g. O solvente mais comum é a água, mas outros solventes como tampões de pH, etanol e etileno glicol podem ser utilizados. O agitador plástico é acoplado ao sensor de torque que está diretamente ligado ao motor elétrico montado no cabeçote do RVA. Configurando o motor para altas rotações, muitas amostras em pó podem ser efetivamente e convenientemente suspensas no solvente. O equipamento permite configurações de  $0 \text{ rad.s}^{-1}$  a  $125,7 \text{ rad.s}^{-1}$ . Em relação à temperatura, diferentes perfis podem ser programados, com diferentes gradientes de aquecimento e resfriamento, sendo a temperatura máxima de  $100^{\circ}\text{C}$ .

As diferentes combinações de agitação, aquecimento e resfriamento ao longo do tempo, permitem criar curvas de viscosidade do material que mostram características como número de inflexões, picos e vales. As coletas de dados podem ser feitas a cada 0,5, 1, 2, 4 e 8 segundos entre as leituras. Estas informações podem ser utilizadas para caracterizar o material em diferentes testes (BOOTH e BASON, 2007).

Podemos definir viscosidade como sendo a resistência de um fluido ao escoamento (STEFFE, 1996). No RVA, a resistência ao escoamento da amostra que está sendo testada é mensurada pela rotação do agitador na mesma em uma velocidade conhecida. Esta resistência da amostra ao escoamento promove um torque em direção oposta à rotação. Para manter a velocidade constante, o motor diretamente ligado ao agitado, precisa fornecer um torque igual e oposto, sendo este mensurado e convertido para leitura de viscosidade.

Devido às suas características, Bennet *et al.* (2007) sugerem o uso do RVA na caracterização das propriedades dos ingredientes e alimentos ricos em proteínas. Amostras de

leite em pó desnatado e concentrado proteico de soro processados com diferentes tratamentos térmicos tiveram suas propriedades de viscosidade avaliadas pelo RVA e correlacionadas com a proporção de soro-proteínas solúvel. Proteínas de soja, glúten, gelatina, proteínas de ovo, leite condensado açucarado e queijos também foram submetidos a diferentes perfis de avaliação no RVA e cada grupo de produtos apresentou respostas viscográficas específicas quanto ao tipo de processamento, pH, concentração e forma de hidratação, mostrando a sensibilidade do equipamento a diversas influências nas proteínas destes produtos. Simulações do processamento de iogurte também foram realizadas no RVA, desde o preparo da base, o tratamento térmico, fermentação, quebra do gel e resfriamento. Assim, obtendo-se um perfil viscográfico de todas as etapas da fabricação.

## 2.4 INOVAÇÃO ABERTA E INTERAÇÕES INTERINSTITUCIONAIS

Atualmente a informação está mais disponível do que nunca. Se para as crianças de hoje não é comum pensar em realizar uma busca em uma enciclopédia, há pouco mais de 15 anos isso era praticamente a única fonte de referência para qualquer pesquisa formal que se fazia. O desafio de encontrar informação confiável é ainda maior no mundo de hoje, onde tudo está ao alcance de um clique, já que tudo é “encontrável” pela internet.

O ser humano do século XXI chegou ao extremo de ter uma expressão em inglês para traduzir a frase: “vamos procurar isso no Google”. Não sei se você leitor já ouviu ou conhece, mas os americanos quando querem indicar algo a ser buscado na ferramenta eletrônica usam a expressão “*let’s Google it*”, ou seja, “Google isso” ou “vamos googlar isso”.

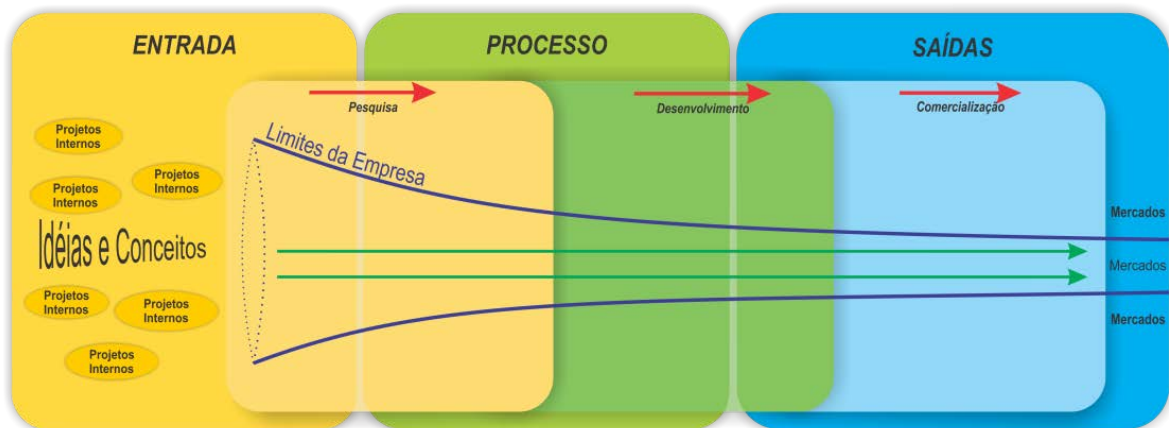
Para grande parte dos itens que se busquem na internet é possível encontrar milhares ou milhões de resultados. Com um universo deste tamanho é possível encontrar coisas boas e ruins, materiais com bom conteúdo e materiais dispersos e que trazem as palavras de forma isolada. Por isso, é preciso ter cuidado com o que encontramos na internet ou que não conhecemos a fonte.

Neste contexto de facilidade de interação e acesso a informações, diversos ambientes colaborativos ganham espaço, surgindo com uma enorme abrangência.

O conceito de Inovação Aberta é relativamente novo, tornou-se público em 2003, apresentado pelo professor da Universidade norte-americana de Harvard, Henry Chesbroug, através da publicação do seu livro “*Open Innovation: The New Imperative for Creating and Profiting from Technology*”.

Para chegarmos ao conceito de Inovação Aberta, precisaremos abordar primeiro a Inovação Fechada (Figura 4), que é o modelo mais comum de ser encontrado nas empresas em todo o mundo e que, resumidamente, consiste na empresa realizar suas atividades de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de forma não colaborativa, ou seja, somente com sua própria equipe.

FIGURA 4 - Modelo de Inovação Fechada



Fonte: GEMACOM TECH, 2014

Usando a ilustração base proposta pelo Prof. Chesbroug e adaptada pela Gemacom Tech (2014), vamos considerar que a empresa é um grande funil, linha azul identificada como os “limites da empresa”, ou seja, o que está dentro do funil são questões e ações internas da empresa e o que está fora é o mundo ao redor da empresa.

Esta empresa de nosso exemplo encontra-se colocada sobre um processo qualquer, por isso, apresenta “Entrada”, em amarelo escuro, o “Processo” propriamente dito, em verde escuro, e as “Saídas” desta atividade, em azul escuro. Como estamos tratando de processos de Pesquisa e Desenvolvimento, colocamos a empresa também sobre o processo de P&D, composto por: “Pesquisa”, em amarelo claro; “Desenvolvimento”, em verde claro e a “Comercialização”, em azul claro. A montagem da ilustração de forma sobreposta é

intencional e busca facilitar a visualização de em qual etapa de um processo está a etapa ou atividade do processo de P&D dentro da empresa.

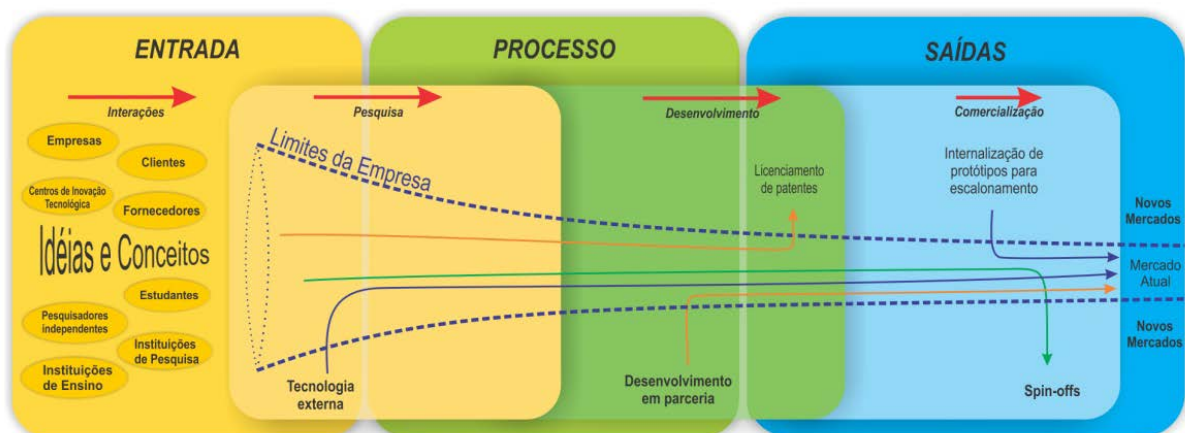
O fluxo dos processos segue o sentido das setas vermelhas da figura, ocorrendo da esquerda para a direita.

Como esta empresa trabalha sem nenhum relacionamento com o mundo exterior a ela, ou seja, trabalha fechada, as únicas entradas que existem para seus respectivos projetos são suas próprias ideias e conceitos. Assim, como ingresso neste processo nós só teremos projetos internos da companhia. No processo fechado não se produz nada público e também não se utiliza nada de domínio público durante o processo. Neste modelo as saídas também são controladas pela empresa, apresentando ao mercado somente aquilo que é considerado interessante.

Este modelo é amplamente utilizado por empresas que acreditam que podem obter vantagem competitiva através de um novo produto, ou seja, maximizar seu lucro obtido com um novo produto, tornando a ação da concorrência mais demorada, havendo demanda por uma grande equipe de P&D, altamente qualificada, além de altos investimentos nestes projetos para que atinjam seus objetivos. Nesse contexto – para melhorar o retorno, reduzir os custos dos projetos de P&D e aproximar todos os agentes que podem contribuir –, é que surgiu o conceito de Inovação Aberta.

Para apresentarmos o modelo de inovação aberta vamos usar a mesma figura, mas com alguns elementos modificados, que são exatamente as diferenças e os agregados da inovação aberta.

FIGURA 5 - Modelo de Inovação Aberta



Fonte: GEMACOM TECH, 2014

É possível reparar que os limites da empresa estão pontilhados, ou seja, a empresa não fica mais isolada do mundo. Essa é a ideia que a linha pontilhada deve transmitir: o funil está todo aberto.

Como a empresa não está mais trabalhando sozinha, nas entradas acrescentamos uma etapa que chamamos de “interações”, que são exatamente as trocas de ideias e conceitos que poderão servir de entrada no processo de P&D. Ou seja, outras empresas, clientes, fornecedores, centros de inovação tecnológica, pesquisadores, estudantes, entre várias outras possibilidades, todos podem contribuir ou ser geradores de ideias e conceitos.

Outra mudança significativa nesta ilustração é que ao longo do processo de P&D novos elementos podem ser agregados ao projeto, assim como pode haver saídas antes da conclusão do projeto, pelas mais diversas razões, já que o projeto pode parar em um determinado momento por falta de viabilidade e ficar na “geladeira”, até seu possível aproveitamento em outro projeto, não necessariamente na mesma empresa. Enfim, são inúmeras as possibilidades, não sendo exequível demonstrar todas as possibilidades na ilustração. Por isso, a ideia principal é que haja a compreensão de que todas as possibilidades devem ser avaliadas.

Há uma tendência natural de que o proponente da ideia não veja nenhum ponto negativo na sua criação ou que queira usar a ideia como meio único e absoluto para algum determinado fim. Mas, trabalhar em equipe é extremamente produtivo, exatamente para juntar pontos de vista distintos. Além disso, não podemos esquecer que se trata de um modelo cujo objetivo final é alcançar o mercado, ou seja, se a ideia for fantástica e maravilhosa na opinião de todo o grupo de trabalho, mas o apelo não seduzir o consumidor, o sucesso não ocorrerá! Sem ter quem compre, o novo bem ou serviço já deixou de ser uma inovação. Até por isso existem saídas antes de chegar ao mercado criando até mesmo novos negócios, pois o proponente pode acreditar que consegue criar a demanda e pode resolver por criar uma *startup* ou uma *spin-off*.

Quando as saídas são produtos ou serviços da empresa, neste modelo de Inovação Aberta, as novidades podem ser para o mercado atual ou para um novo mercado.

Na prática, cada empresa possui uma interpretação e usa a teoria dentro de sua realidade. A Gemacom Tech, por exemplo, possui uma Plataforma de Inovação Aberta *online*, que pode ser acessada pelo link [www.inovacaoabertagemacomtech.com.br](http://www.inovacaoabertagemacomtech.com.br). Esta Plataforma é a primeira do Brasil focada na indústria de alimentos.



Na Plataforma há um espaço para submissão de projetos e todas as possibilidades de interação são apresentadas no *site*, à disposição de qualquer usuário da rede mundial de computadores, gerando a capilaridade necessária para a captação de diferentes propostas.

Trabalhar com inovação não é uma tarefa fácil, pois não basta incluir no nome de um departamento ou de um setor uma “palavra mágica”. Colocar o conceito de inovação em prática é um desafio que começa na alta direção da empresa e vai até o “*blue-collar worker*” (o chão de fábrica), pois envolve o comprometimento de orçamento e a dedicação da equipe. Se integrar ações dentro da empresa já é difícil, imaginemos acrescentar elementos externos, cujo controle direto é inexistente. O desafio é ainda maior.

É possível que haja um enorme esforço das instituições públicas e privadas de ensino e pesquisa em todo o mundo, não sendo adequadamente aproveitado, tanto do ponto de vista de conhecimento quanto o de potenciais produtos e serviços. Por isso, a ideia de trabalhar num ambiente colaborativo, onde o mais simples dos projetos pode trazer um retorno a quem participa e a quem o produto final do projeto se destina é algo de um enorme potencial. Explorar este conceito é a proposta do modelo de inovação Aberta que, como o próprio nome sugere, está aberta a todos.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADPI. American Dairy Products Institute. *Ingredient Description Brochure*. Elmhurst, IL: ADPI, 2002.

ALMEIDA, M.R. **Avaliação da qualidade e variedade de leite em pó e leite condensado por espectroscopia Raman e análise multivariada**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010.

ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, K.S; STEPHANI, R; OLIVEIRA, L.F.C. Application of FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Analysis for Determination Adulteration in Milk Powder. In: *Analytical Letters*. 2012. V. 45. p. 1–14.

ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, K.S; STEPHANI, R; OLIVEIRA, L.F.C. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. In: *J. Raman Spectrosc.* 2011, V. 42, p. 1548–1552.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C; RIELLY, C.D; STAPLEY, A.G. F. Effects of Process Variables on the Denaturation of Whey Proteins during Spray Drying. In: *Drying Technology*, v.25, p.799–807, 2007.

ANEMA, S.G. The whey proteins in milk: thermal denaturation, physical interactions and effects on the functional properties of milk. In: THOMPSON, A; BOLAND, M; SINGH, H. *Milk protein: from expression to food*. New York: Academic/Press, 2009, p.239-273.

ANEMA, S.G. On heating milk  $\kappa$ -casein from the casein micelles can precede interactions with the denatured whey proteins. In: *Journal of Dairy Research*, 75, p. 415–421, 2008.

ANEMA, S.G. Role of  $\kappa$ -casein in the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, p. 3635–3642, 2007.

ANEMA, S.G; Li, Y. Effect of pH on the association of denatured whey proteins with the casein micelles in heated reconstituted skim milk. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1640–1646, 2003.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1995, 335 p.

BAECHLER, R. *et al.* Physical changes in heat-treated whole milk powder. In: *Lait*, v. 85, n. 4-5, p. 305-314 Jul-Oct 2005.

BARROS NETO, B; Scarminio, I. S; BRUNS, R. 25 anos de Quimiometria no Brasil. In: *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

BENNETT, L; POLLARD, A; ROSS, A.S. Characterizing the properties of protein-rich ingredients and foods. In: CROSBIE, G. B; ROSS, A. S. eds. *The RVA Handbook*. United States of America: AACC International, 2007. cap. 8, p.95-112.

BENZERDJEB, A. M; MOKHTARI, I.N.T; RAHAL, M.S. Normal coordinates analyses of disaccharides constituted by D-glucose, D-galactose and D-fructose units. In: *Spectrochimica Acta Part A*, 68, p.284-299, 2007.

BOOTH, R; BASON, M. Principles of operation and experimental techniques. In: CROSBIE, G. B; ROSS, A. S., eds. *The RVA Handbook*. United States of America: AACC International, 2007. cap. 1, p.1-17.

BRASIL. **Lei de Inovação Tecnológica (Lei n.º 10.973/2004)**. Brasília, DF: Congresso Nacional. Atos do Poder Legislativo, DOU, n.º 232 de 03.12.2004.

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

CARVALHO, A. F; MAUBOIS, J.-L. Applications of membrane technologies in the dairy industry. In: COIMBRA, J. S. R; TEIXEIRA, J. A. (Eds.) *Engineering aspects of milk and dairy products*. Boca Raton: CRC Press, 2010, 256p.

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

CHESBROUGH, H.W. *Open Business Models*: How to Thrive in the New Innovation Landscape. Boston, MA: Harvard Business School Press, 2006.

CHESBROUGH, H.W. *Open Innovation*: The New Imperative for Creating and Profiting from Technology. Boston, MA: Harvard Business School Press, 2003; – Materiais internos da Gemacom Tech, 2014.

DAMODARAN, S; PARKIN, K.L; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

- DAMODARAN, S. Functional properties. In: NAKAI, S.; MODLER, H. W. *Food proteins: properties and characterization*. New York: VCH, 1996. p.167-234.
- DANNENBERG, F; KESSLER, H.G. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. In: *J Food Sci*, v.53, p.258-263. 1998.
- DE WIT, J.N; KLARENBECK, G; ADAMSE, M. Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and compositions. In: *Neth Milk Dairy J*, v.40, p.41-56, 1996.
- EDWARDS, P.B; CREAMER, L.K; JAMESON, G.B. Structure and stability of whey protein. In: THOMPSON, A; BOLAND, M; SINGH, H. *Milk protein: from expression to food*. New York: Academic/Press, 2009. p.163-190.
- FOX, P.F; MCSWEENEY, P.L.H. *Advanced Dairy Chemistry*. 3.ed. v.1. New York, Kluwer: Academic/Plenum Publisher, 2003.
- GAIANI, C. *et al.* Native phosphocaseinate powder during storage: Lipids released onto the surface. In: *Journal of Food Engineering*, v. 94, n. 2, p. 130-134, 2009.
- GARCIA, M. C. *et al.* Composition and characterization of soybean and related products. In: **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 4, p. 361-391, jun. 1997.
- GEMACOM TECH. **Plataforma de Inovação Aberta**. 2014. Disponível em: <[www.inovacaoabertagemacomtech.com.br](http://www.inovacaoabertagemacomtech.com.br)>. Acesso em: 28 fev. 2014.
- HAMBLING, S.G.; MCALPINE, A. S.; SAWYER, L.  $\beta$ -Lactoglobulin. In: FOX, P.F. **Advanced Dairy chemistry**. 2.ed. Barking, Essex: Elsevier Applied Science, 1992. v.1, p.141-190.
- HARDY, J. *Water activity and hydration of milk powders*. First international symposium on spray drying of milk products. Rennes, France, 2001.
- HOLSINGER, V.H. Physicol and chemical properties of lactose. In: FOX, P.F. *Advanced dairy chemistry*. 2.ed. London: Chapman & Hall, v. 3, p. 1-38, 1997.
- HYND. J. Drying of whey. In: *Journal of The Society of Dairy Technology*. Wembley, v.33, n.2, p.52-55, apr.1980.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Milk*: determination of nitrogen content. Brussels: 1993. 12 p. (FIL 20B: 1993)

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Milk*: determination of total solids content. Brussels: 1987. 2 p. (FIL 21B: 1987).

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

JEANTET, R; DUCEPT, F; DOLIVET, A; MÉJEAN, S; SCHUCK, P. Residence time distribution: a tool to improve spray-drying control. In: *Dairy Science and Technology*. Rennes, v.88, p. 31-43, 2008.

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

KINSELLA, J. E. Relationships between structure and functional properties of food proteins. In: FOX, P. F.; CONDON, J. J. *Food proteins*. New York: Applied Science, 1982. p. 51-103.

KINSELLA, J.E; WHITEHEAD, D.M. Protein in whey: Chemical, physical, and functional properties. In: *Adv Food Nutr Res*, v.33, 343-438, 1989.

KNIPSCHILDT, M.E; ANDERSEN, G.G. In: ROBINSON, R.K. *Advances in Milk Processing*. London: Chapman & Hall, 1994.v.1.p159-254.

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

LAW, A.J.R; LEAVER, J. Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk. In: *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 48, 672-679. 2000.

LEI, Y; ZHOU, Q; ZHANG, Y; CHEN, J; SUN, S; NODA, I. Analysis of crystallized lactose in milk powder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. In: *Journal of Molecular Structure*. 974, 88-93p, 2010.

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

MARCHIORI, P.Z. **A ciência e a gestão da informação**: compatibilidade no espaço profissional. *Ci. Inf.*, Brasília, v. 31, n. 2, p. 72-79, maio/ago. 2002. Disponível em: <[www.scielo.br/pdf/ci/v31n2/12910.pdf](http://www.scielo.br/pdf/ci/v31n2/12910.pdf)>. Acesso em: 24 out. 2014.

MASTERS, K. *Spray Drying in Practices*. Denmark: SprayDryConsult International ApS, 2002. 464 p.

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

NGARIZE, S; ADAMS, A; HOWELL, N. K. Studies on egg albumen and whey protein interactions by FT-Raman spectroscopy and rheology. In: *Food Hydrocolloids*. 2004, v. 18, p. 49–59.

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

OLDFIELD, D.J; SINGH, H; TAYLOR, M.W; PEARCE, K.N. Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot plant, Int. In: *Dairy J*, v.8, p.311-318, 1998a.

OLDFIELD, D.J; SINGH, H; TAYLOR, M.W. Association of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin with the casein micelles in skim milk heated in an ultra-high temperature plant, In: *Int. Dairy J*, v.8, p.765-770, 1998b.

OLIVEIRA, L.F.C. Espectroscopia Molecular. **Química Nova na Escola**, Sao Paulo, v. 4, p. 24-30, 2001.

ORDÓÑEZ, J.A.P; CAMBERO, M.I.R; FERNÁNDEZ, L.A. *et al.* **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005. 294p.

PERRONE, I. T; STEPHANI, R; NEVES, B.S. **Doce de Leite: aspectos tecnológicos**. Juiz de Fora: Do autor, 186p., 2011.

PERRONE, I. T; SIMEÃO, M; RODRIGUES JÚNIOR, P. H; STEPHANI, R; CARVALHO, A.F.D. Influence of pilot spray dryer settings on moisture and water activity of whole milk powder. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 68, 5-9. Juiz de Fora, 2013.

ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology: the microbiology of milk*. London and New Jersey: Applied Science Publishers, 258p, 1981.

ROOS, Y.H. *Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders*. First international symposium on spray drying of milk products, Rennes, France, 2001.

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

SHUCK, P. Spray drying of milk products: state of art. **First international symposium on spray drying of milk products**, Rennes, France, 2001.

SCHUCK, P. **Cristalização da lactose e secagem de soro**. Curso ministrado na Disciplina TAL 795 Ciência e tecnologia de leite e derivados Universidade Federal de Viçosa, 2010.

SCHUCK, P; BOUHALLAB, S; DURUPT, D; VAREILLE, P; HUMBERT, J.P; MARIN, M. *Séchage des lactosérums et derives*: role du lactose et de la dynamique de l'eau. *Le Lait*, Rennes, v.84, 243-268, 2004.

SCHUCK, P; DOLIVET, A; JEANTET, R. *Analytical methods for dairy food and dairy powders*. Chichester: John Wiley & Sons. P.16-17, 2012.

SHUCK, P; DOLIVET, A; MÉJEAN, S; JEANTET, R. Relative humidity of outlet air: the key parameter to optimize moisture content and water activity of dairy powders. In: *Dairy Science and Technology*, Rennes, v.88, p. 45-52, 2008.

SINGH, H. Protein interactions and functionality of milk protein products. In: CORREDIG, M. ed. *Dairy-derived ingredients: food and nutraceutical uses*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, 2009. cap. 25, p.644-674. 2009.

SINGH, H; FOX, P.F. Heat stability of milk: pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein on heating milk at ultrahigh temperatures. In: *Int. Dairy Res*, v.52, p.529-538, 1995.

STEFFE, J.F. **Rheological methods in food process engineering**. 2.ed. East Lansing: Freeman Press, 1996.

STEPHANI, R. **Comportamento de produtos lácteos proteicos em diferentes condições simuladas de processamento térmico**. 2010. Juiz de Fora. 147 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Juiz de Fora.

SOUZA, A.B. **Avaliação da influência tecnológica da relação soroproteínas/caseínas durante condições simuladas de processamento térmico**. 2013. Juiz de Fora. 80 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Juiz de Fora.

TAMINE, A.Y. *Dairy Powders and Concentrated Products*. 1.ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2009.

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

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

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

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

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

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

VUATAZ, G. *The phase diagram of milk*: a new tool for optimizing the drying process. *Le Lait*, Rennes, v.82, p.485–500, 2002.

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

WALSTRA, P; WOUTERS, J.T.M; GEURTS, T.J. *Dairy science and technology*. New York: CRC, 2006. p.229-232.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Química y física lactológica*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1984.

WEHR, H. M; FRANK, J. F. Standard methods for the examination of dairy products. In: *American Public Health Association*. 17th ed. Washington: DC, 2004.

WESTERGAARD, V. *Tecnología de La Leche en Polvo – Evaporación y Secado por Atomización*. Copenhague: Niro A/S, 2001.

WHITTIER, E.O. Lactose and its utilization: a review. In: *Journal of dairy science*. Ohio, v. 27, n. 7, p. 505-529, Julho. 1944.

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



### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Devido ao fato de ser iminente o avanço na implantação da tecnologia de produção dos concentrados proteicos no Brasil, este trabalho objetiva avaliar o comportamento químico de proteínas lácteas em sistemas complexos por meio da espectroscopia Raman e da determinação da viscosidade pelo RVA, visando identificar as características das mesmas em relação aos parâmetros tecnológicos utilizados no processo produtivo e também na simulação como ingrediente alimentício.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Este projeto apresenta como proposta acadêmica o uso da espectroscopia Raman como ferramenta para a caracterização da estrutura da lactose no estado amorfo, em transição vítrea e cristalino dos concentrados proteicos de soro em pó produzidos sob diferentes condições tecnológicas de processamento e armazenamento.

Este trabalho insere-se ainda na perspectiva do uso das propriedades viscográficas em RVA de sistemas proteicos (neste estudo a combinação de concentrado proteico de leite e concentrado proteico de soro), na identificação dos atributos tecnológicos proteicos intrínsecos através do uso das condições simuladas de processamento, caracterizadas pela evolução da viscosidade, sob influência de pH e temperatura.

## **4 – ESPECTROSCOPIA RAMAN COMO FERRAMENTA NA CARACTERIZAÇÃO DA LACTOSE EM CONCENTRADOS PROTEICOS DE SORO**

### **RESUMO**

Neste trabalho, a espectroscopia Raman é explorada como uma técnica rápida para a avaliação da qualidade do WPC. Com base em informações fornecidas por espectros Raman das amostras produzidas em planta piloto sob diferentes parâmetros tecnológicos, foi possível classificar os WPCs em relação à estrutura da lactose presente nos produtos. O processo de cristalização da lactose foi identificado em diferentes repetições dos tratamentos aplicados, devido às mudanças espectrais que ocorrem na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  e, principalmente, na região entre  $1200$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ . Estas alterações no perfil dos espectros foram atribuídas ao processo de mudança de fase da lactose amorfa para a lactose cristalina, durante a qual ocorre o aparecimento de novas bandas, devido ao abaixamento de simetria que ocorre na transição de fases. O presente trabalho mostra o uso da espectroscopia Raman como uma ferramenta analítica aplicada ao controle de qualidade do WPC durante o processo produtivo ou durante a vida de prateleira do produto, através da identificação da caracterização da lactose antes, durante e após a transição vítrea. Além disso, a associação entre a espectroscopia Raman e a quimiometria pode ser considerada um método de rastreio para análise de rotina ou controle em linha de produção.

Palavras-chave: WPC. Amorfo. Cristalino. Transição vítrea. Análise de componentes principais (PCA).

## 4.1 INTRODUÇÃO

O concentrado proteico de soro (WPC) tem aplicação em diferentes segmentos alimentícios como em produtos cárneos, bebidas, panificação, lácteos e produtos para dietas específicas como infantis e atletas de alto desempenho. As principais características de funcionalidade dos derivados de soro incluem a forte interação com água, emulsificação, aeração e gelificação. Tais funcionalidades não dependem somente da composição, mas também dos vários parâmetros de processos a que são submetidos durante a fabricação (DE WIT *et al.*, 1996). Muitos produtos à base de soro são produzidos pela técnica de secagem em *spray dryer* utilizando atomizador de bico. Usando tipicamente temperaturas de 160-180°C e 80-90°C para as temperaturas do ar de entrada e saída, respectivamente, sempre com um correto processo de evaporação prévio, esta técnica é bem estabelecida e não resulta em excessivos danos aos componentes do soro.

Produtos à base de soro requerem específicas técnicas de embalagem, especialmente em casos onde a cristalização da lactose não tenha sido incluída no processo. A secagem em *spray* de um produto sem pré-cristalização resulta em um pó de alta higroscopicidade, o que causa empedramento se não protegido da umidade. Os WPCs e WPIs oferecidos no mercado, tais como os produtos para praticantes de atividade física, são frequentemente comercializados em embalagens com barreira de umidade e luz, alguns usando gases inertes para obtenção de atmosfera modificada (TAMINE, 2009).

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

A literatura descreve a mudança da estrutura da lactose como a principal modificação física dos lácteos desidratados e precursora de outras mudanças durante o período de armazenamento do produto. A lactose é o componente mais abundante do soro. Após a remoção da água, a lactose encontra-se no estado amorfo, o qual é altamente higroscópico,

absorvendo facilmente a água do ambiente. O aumento da umidade relativa, da temperatura e escalas de tempo relevantes são os fatores predominantes envolvidos na cristalização da lactose, afetando diretamente as propriedades funcionais dos produtos secos que contêm esse dissacarídeo. A cristalização ocorre acima da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), definida como a temperatura em que ocorre a transição de um estado sólido vítreo para um estado semi-líquido (gomoso) (THOMSEN *et al.*, 2005c). Abaixo da  $T_g$ , um material amorfo apresenta alta viscosidade e limitada mobilidade molecular; na temperatura de transição vítrea e acima dela, a viscosidade diminui drasticamente e o resultado é um aumento significativo na mobilidade molecular dos componentes do sistema, levando a uma série de transformações estruturais como aderência, colapso e cristalização durante o período de processamento e armazenamento do material.

Existem vários trabalhos descritos na literatura sobre o estudo das mudanças físico-químicas no armazenamento dos lácteos em pó. Diferentes técnicas são aplicadas, desde teste de sorção, calorimetria diferencial por varredura (DSC), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS ou ESCA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e até espectroscopia vibracional (NIR) a fim de compreender as mudanças ocorridas em função de fatores como temperatura, umidade relativa e composição (THOMAS *et al.*, 2004b; THOMSEN *et al.*, 2004; BAECHLER *et al.*, 2005; NORGAARD *et al.*, 2005; THOMSEN *et al.*, 2005a, 2005b; GAIANI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, os métodos espectroscópicos, juntamente com as ferramentas quimiométricas, têm sido aplicados para avaliar a qualidade de produtos lácteos como uma alternativa para os procedimentos tradicionais. A espectroscopia Raman oferece algumas vantagens para a caracterização de produtos lácteos em relação às outras técnicas espectroscópicas: a água não é um interferente, é uma técnica versátil, rápida, determina mais de um componente ao mesmo tempo, as amostras não precisam passar por um pré-tratamento, não usa reagentes e não gera subprodutos tóxicos. Além disso, é uma técnica não destrutiva, adequada para processos *on-line*. Desta forma, a espectroscopia Raman oferece oportunidades analíticas para muitas áreas de produção e controle de qualidade, principalmente as que envolvem matrizes lácteas.

Nørgaard *et al.* (2005) utilizaram a espectroscopia Raman e NIR juntamente com ferramentas quimiométricas para quantificar o teor de lactose em soro em pó. Outros trabalhos relatam o uso da espectroscopia Raman no estudo da cristalização da lactose,

principalmente no uso desse componente em fármacos, sem ênfase na matriz WPC (ISLAN e LANGRISH, 2010; MURPHY *et al.*, 2005; KIRK *et al.*, 2007, TAYLOR e ZOGRAFI, 1998). Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que relatassem o emprego da espectroscopia Raman no monitoramento e compreensão das alterações físico-químicas que ocorrem na produção e armazenamento do WPC, o que justifica a necessidade de maiores estudos na área.

Uma vez que a estabilidade é uma característica desejável dos alimentos, as modificações físicas da lactose que ocorrem no WPC, durante a secagem e com o tempo de armazenamento, foram acompanhadas neste trabalho por espectroscopia Raman. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada aos dados espectroscópicos visando caracterizar e identificar a estrutura da lactose presente em diferentes amostras previamente produzidas em escala piloto, com todos os parâmetros tecnológicos monitorados.

Três blocos experimentais de produção de WPC foram preparados visando obter produtos com características diferenciadas em relação à estrutura da lactose presente no pó: amorfa, em transição vítrea e cristalina.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

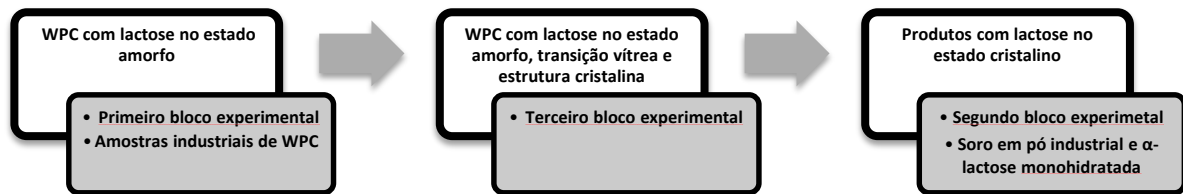
### 4.2.1 Amostras de WPC

Apesar da tecnologia industrial de produção do WPC compreender três operações unitárias principais (filtração, concentração e secagem), diferentes parâmetros tecnológicos são utilizados por cada indústria, visando obter melhor produtividade e produtos com características diferenciadas. Desta forma, visando o maior controle das informações das amostras a serem utilizadas neste experimento, optou-se por produzir em planta piloto diferentes lotes de WPC, considerando parâmetros tecnológicos distintos que simulassem as condições industriais e que pudessem influenciar a característica física da lactose durante a secagem ou armazenamento.

Assim, foram preparados três blocos experimentais de produção piloto de WPC, considerando os produtos do primeiro bloco como os produtos controle (cujos parâmetros operacionais permitissem obter WPC com lactose em estado amorfo); os produtos do segundo bloco, com variáveis tecnológicas visando WPC com lactose no estado cristalino e os produtos do terceiro bloco, com variáveis tecnológicas visando diferentes estados da lactose.

Além das amostras produzidas em planta piloto, também foram avaliadas as características espectroscópicas de diferentes WPC de mercado, sendo selecionados produtos de média concentração proteica WPC35 ( $\sim 350 \text{ g.kg}^{-1}$ ), soro de leite em pó e  $\alpha$ -lactose monohidratada como referenciais comparativos. Estas matrizes foram selecionadas devido ao fato de serem as mais similares em relação às amostras de WPC produzidas para os experimentos deste trabalho. A figura 6 apresenta os blocos experimentais e as amostras utilizadas no estudo correspondentes a cada estado da lactose presente no produto.

FIGURA 6 - Visão geral dos experimentos e amostras de referência.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.2.2 Amostras de WPC do primeiro bloco experimental (controle)

Em laboratório foi preparado em duplicata amostras de WPC utilizando soro de leite obtido através da fabricação de queijo Minas Frescal, realização da ultrafiltração (UF), concentração em evaporador a vácuo e secagem em *spray dryer*. As variáveis “temperatura do ar de entrada” e “fluxo de produto” foram mantidas constantes em  $170 \pm 2$  °C e  $1$  L.h<sup>-1</sup> respectivamente. Estes parâmetros foram definidos por Perrone *et al.* (2013).

#### 4.2.3 Amostras de WPC do segundo bloco experimental (variáveis: evaporação e secagem)

O experimento consistiu na centrifugação do soro de leite obtido através da fabricação de queijo Minas Frescal. Realizou-se então a UF empregando uma planta piloto de ultrafiltração (UF) da marca “WGM Sistemas” com uma membrana espiral de polissulfona/poliamida, porosidade 10 kDa, área filtrante de  $3,0$  m<sup>2</sup> e diferença de pressão de  $2,2$  kgf.cm<sup>-2</sup>.

Ao longo do processo, a temperatura foi mantida acima de  $45$  °C para diminuir a viscosidade do soro e, desta forma, reduzir também o tempo de processamento. Contudo, a temperatura foi controlada de forma a não ultrapassar  $50$ °C, reduzindo assim a precipitação dos sais de cálcio e a desnaturação das proteínas do soro (especialmente a  $\beta$ -lactoglobulina), o que causaria queda no fluxo de permeado e também o favorecimento do desenvolvimento de microrganismos termodúricos. Pode-se também optar pelo processamento a frio, utilizando temperaturas entre  $10$  e  $15$  °C, onde os problemas de precipitação de sais de cálcio, desnaturação de proteínas e multiplicação de termodúricos são totalmente eliminados; porém,

a viscosidade do soro aumenta, provocando também o prolongamento do processamento. O processo de evaporação à vácuo ocorreu à temperatura de  $60 \pm 2$  °C em evaporador rotativo microprocessado de bancada da marca Quimis, modelo Q344M. A evaporação foi conduzida objetivando encontrar um fator de concentração igual a 3. O evaporado produzido foi conduzido a um condensador de contato indireto no qual a temperatura da água de resfriamento foi controlada em  $15 \pm 2$  °C. Após o cálculo da quantidade de água que deveria ser evaporada em cada repetição, visando alcançar o fator de concentração desejado, realizou-se a evaporação até o volume exato calculado de evaporado, que foi medido em proveta. O processo de secagem ocorreu em *spray dryer* de único estágio, com atomizador de bico da marca “Labmaq Brasil”, modelo MSDi 1.0. As condições padronizadas durante o experimento foram vazão de  $1 \text{ L.h}^{-1}$  de produto,  $35 \text{ L.min}^{-1}$  de ar no sistema de aquecimento e  $2,66 \text{ m}^3\cdot\text{min}^{-1}$  de velocidade no soprador principal. Os tratamentos empregados durante a secagem são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Condições empregadas durante a produção do WPC (n=3)

Amostras	Temperatura do ar de entrada (°C)	Teor de sólidos solúveis do retentado da ultrafiltração na entrada do spray dryer (°Brix)
WPC <sub>1</sub>	130±5	15,7±1,9
WPC <sub>2</sub>	145±5	15,7±1,9
WPC <sub>3</sub>	130±5	47,1±1,9
WPC <sub>4</sub>	145±5	47,1±1,9

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

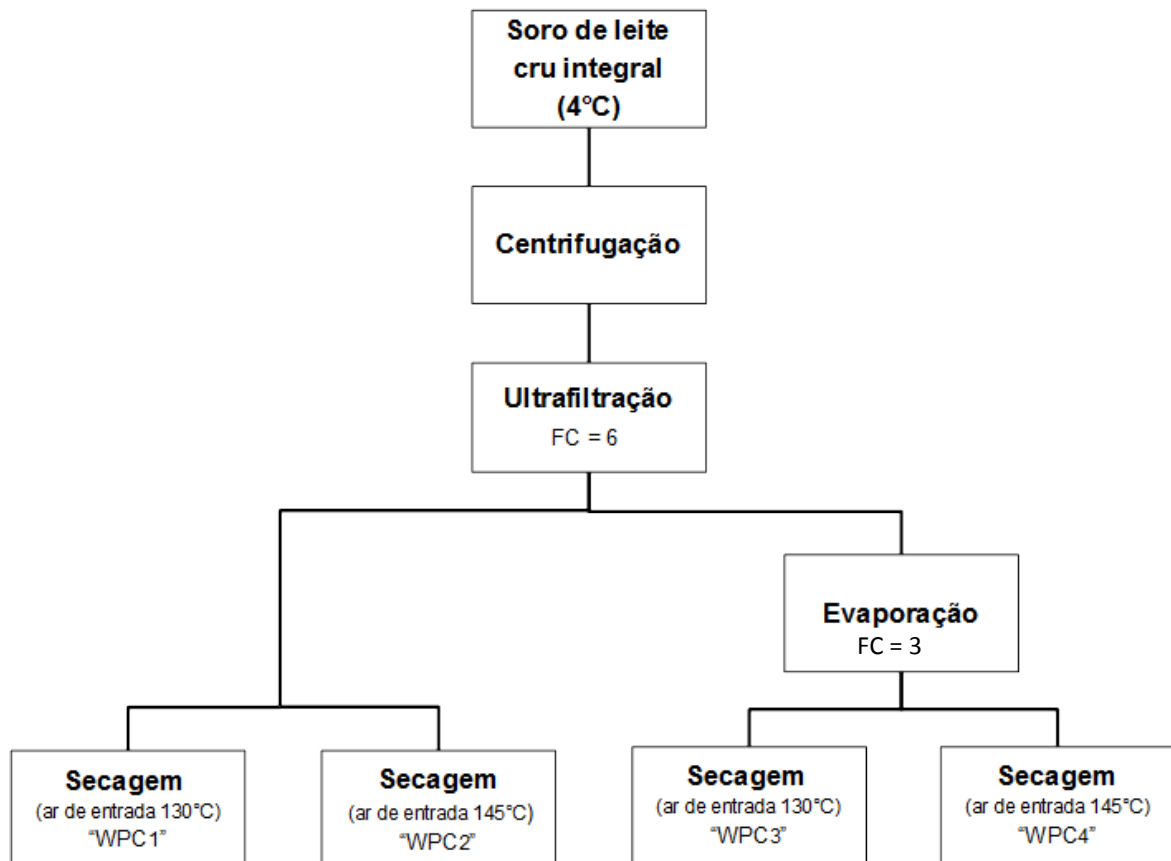
*WPC<sub>X</sub>* = concentrado proteico de soro obtido pelo tratamento X; 1 = temperatura do ar de secagem em 130°C e retentado não concentrado por evaporação a vácuo; 2 = temperatura do ar de secagem em 145°C e retentado não concentrado por evaporação a vácuo; 3 = temperatura do ar de secagem em 130°C e retentado concentrado por evaporação a vácuo; 4 = temperatura do ar de secagem em 145°C e retentado concentrado por evaporação a vácuo.

Foram realizadas três repetições de cada tratamento do delineamento experimental executado. Todas as etapas do trabalho foram realizadas no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O evaporador rotativo microprocessado e o *spray dryer* de único estágio pertencem à Gemacom Tech S/A e estão instalados no



Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV por meio de uma parceria de pesquisa público-privada. A Figura 7, na página seguinte, apresenta o fluxograma básico de produção das amostras deste bloco experimental.

FIGURA 7 - Fluxograma de produção das amostras de WPC do segundo bloco.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.2.4 Amostras de WPC do terceiro bloco experimental (variáveis: tratamento térmico e microfiltração)

O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos aplicados ao soro de leite e quatro repetições. Os quatro tratamentos foram: soro microfiltrado utilizando

membrana de 0,8 µm de diâmetro do poro, seguido de ultrafiltração, evaporação e secagem, obtendo-se o produto **MF0,8UF**; soro microfiltrado utilizando membrana de 1,4 µm de diâmetro do poro, seguido de ultrafiltração, evaporação e secagem, obtendo-se o produto **MF1,4UF**; soro termizado a 65°C por 15 segundos, seguido de ultrafiltração, evaporação e secagem, obtendo-se o produto **TM65UF**; e soro pasteurizado a 72°C por 15 segundos, seguido de ultrafiltração, evaporação e secagem, obtendo-se o produto **PT72UF** (Figura 8). Os atributos avaliados foram: gordura, extrato seco total, umidade, cinzas, proteína total e  $A_w$ . Todos estes resultados de análises de composição centesimal e físico-químicas foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e pela comparação de médias pelo teste de Tukey.

O soro de leite utilizado neste trabalho foi fornecido por uma indústria localizada na Zona da Mata do estado de Minas Gerais/Brasil, sendo obtido a partir da fabricação de queijo Minas Frescal (queijo de origem brasileira de grande comercialização), sem adição de cultura lática. O soro foi armazenado sob refrigeração a 4 °C até o momento do seu uso, onde foi centrifugado antes do início de cada tratamento.

A microfiltração do soro foi realizada em equipamento construído pela empresa “Tetra Pak© Processing”, da França. Primeiramente, foi feita a higienização do equipamento com dois ciclos de limpeza em sistema fechado (*cleaning in place* – CIP), alcalino (80°C) e ácido (50°C), respectivamente. O soro foi aquecido a 50°C e filtrado tangencialmente através de uma membrana cerâmica tubular “Membralox®” com poros de tamanho 0,8 e 1,4 µm, velocidade de permeação 7,2 m.s<sup>-1</sup>, sistema com área total de membrana 0,24 m<sup>2</sup> e com pressão transmembrana de 0,5 bar.

Os tratamentos de termização (65 °C por 15 segundos) e pasteurização (72 °C por 15 segundos) foram realizados em trocador de calor a placas.

A ultrafiltração do soro foi realizada em uma planta piloto da marca “WGM sistema”, sendo o equipamento utilizado um sistema aberto. O soro foi filtrado através de uma membrana de polissulfona do tipo espiral “Koch Membranes” com massa molar de corte de 10 kDa, área filtrante 3,0 m<sup>2</sup>, temperatura de operação de 35 °C e pressão operacional entre 2,1 e 8,3 bar.

A operação de evaporação à vácuo ocorreu à temperatura de 60 ± 2 °C em evaporador rotativo microprocessado de bancada, marca Quimis modelo Q344M<sup>2</sup>. A evaporação foi conduzida objetivando concentrar o soro até um teor de sólidos totais de 250 g.kg<sup>-1</sup> antes da

etapa de secagem. O evaporado produzido foi conduzido a um condensador de contato direto, no qual a temperatura da água de resfriamento foi controlada em  $10 \pm 2$  °C. Após o cálculo da quantidade de água que deveria ser evaporada para as amostras em cada repetição visando alcançar o teor de sólidos desejado, realizou-se a evaporação até o volume exato calculado de evaporado.

A operação de secagem ocorreu em *spray dryer* semi-industrial de único estágio, com atomizador de bico de pressão da marca “Labmaq Brasil”, modelo MSD1.0. As condições padronizadas durante o experimento foram: vazão de 1,10 L.h<sup>-1</sup> de produto, 35 L.min<sup>-1</sup> de ar no sistema de aquecimento e 3,10 m<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> de velocidade no soprador principal. Estas condições foram padronizadas para se obter os WPCs com as características desejadas. Alguns parâmetros de temperatura empregados durante a secagem de cada amostra estão apresentados na Tabela 2:

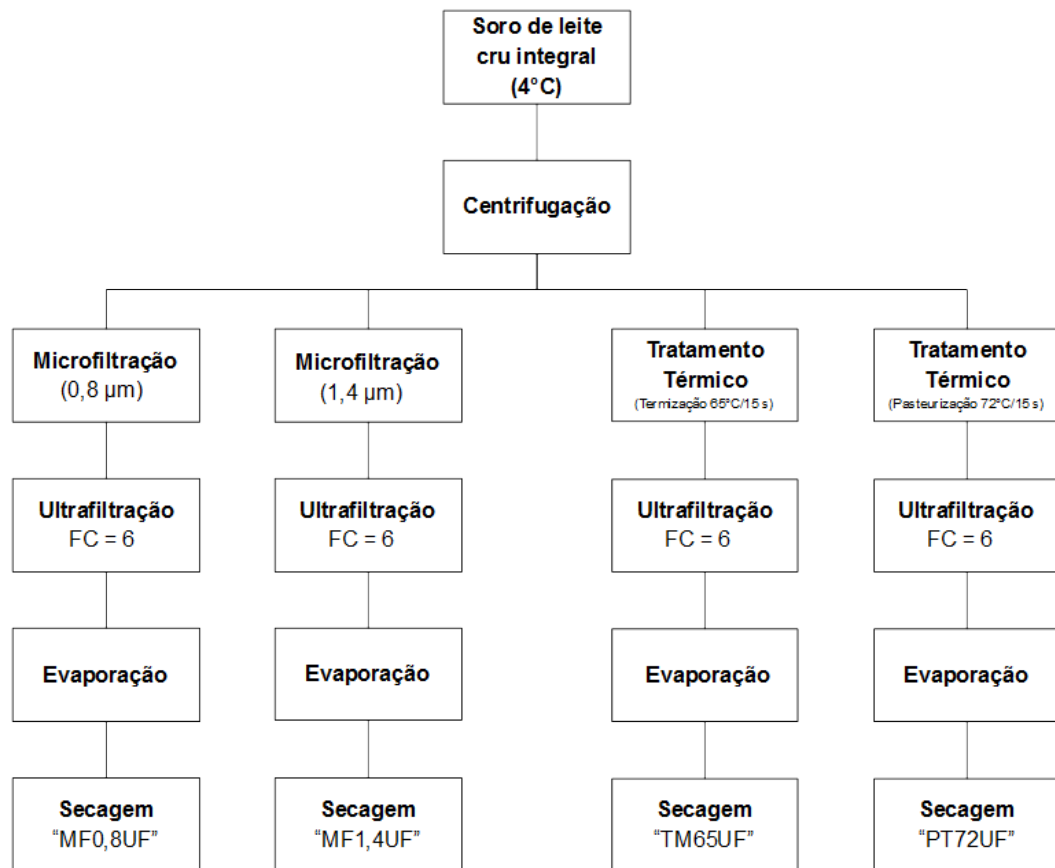
TABELA 2 – Condições de temperatura empregadas durante a produção dos concentrados proteicos de soro

Amostras	Temperatura do ar de entrada (°C)		Temperatura do ar de saída (°C)	
	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo
PT72UF	163	156	97	55
TM65UF	162	157	93	54
MF0,8UF	164	150	99	61
MF1,4UF	162	155	87	61

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

*PT72UF: WPC produzido a partir do soro pasteurizado a 72 °C por 15 segundos; TM65UF: WPC produzido a partir do soro termizado a 65 °C por 15 segundos; MF0,8UF: WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 0,8 µm de diâmetro dos poros; MF1,4UF: WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 1,4 µm de diâmetro dos poros.*

FIGURA 8 - Fluxograma de produção das amostras de WPC do terceiro bloco.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.2.5 Análises de composição centesimal e físico-química

A atividade de água a 25 °C foi determinada utilizando-se medidor digital “Aqualab” (Decagon 3TE, Decagon Devices Inc., USA). O teor de gordura foi determinado utilizando o método Gerber, descrito por Wehr e Frank (2004). Para determinação do resíduo mineral fixo, as amostras foram submetidas à incineração (550 °C) para promover a volatilização da fração orgânica e permanência das cinzas no cadinho, as quais permitiram estimar o teor de minerais da amostra (WEHR e FRANK, 2004). A determinação do extrato seco foi realizada pelo método gravimétrico, que consiste na perda da umidade por dessecação a 102 ± 2 °C e pesagem do extrato seco total de uma quantidade determinada de amostra (FIL 21B:1987). O

teor de nitrogênio total (NT) foi obtido a partir da análise do nitrogênio pelo método de Kjeldahl. A concentração de proteína foi calculada pela multiplicação do teor de NT pelo fator de conversão 6,38 (FIL 20B: 1993).

#### **4.2.6 Espectroscopia Raman**

Os espectros Raman de todas as amostras de WPC representados no presente trabalho foram obtidos utilizando espectrômetro Bruker FT-Raman RFS 100 equipado com detector de Ge refrigerado com nitrogênio líquido, empregando um laser Nd:YAG com linha de excitação em 1064 nm, na região do infravermelho próximo. Poucos miligramas de amostra foram inseridos em porta amostra de alumínio; um feixe luminoso do laser com potência de aproximadamente 10 mW foi incidido e focado na amostra, tendo sido a radiação espalhada coletada a 180°. Para todos os espectros, uma boa relação sinal/ruído foi obtida realizando-se uma média de 512 *scans*, sendo estes coletados com resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup> em uma região compreendida entre 3500 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>. A plataforma OPUS 6.0 foi utilizada para a aquisição dos espectros Raman. Todos os espectros foram obtidos em duplicata a fim de garantir que as intensidades e regiões espectrais dos respectivos modos vibracionais fossem reprodutíveis.

#### **4.2.7 Análises Quimiométricas**

Para a realização da análise exploratória, os espectros Raman foram manipulados utilizando o software Matlab versão 7.10 (R2010a). Um problema no espectro Raman é a presença de contribuições e efeitos devido a vários eventos como efeitos de tamanho de partículas e diferenças morfológicas, dependentes da condição experimental, que devem ser eliminadas antes da utilização da ferramenta quimiométrica. Para isto, os espectros Raman foram pré-processados utilizando a correção da linha de base para minimizar o efeito das variações na mesma e normalizados.

A segunda derivada feita pelo algoritmo Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem e janela com 15 pontos foi aplicada para a correção da linha de base, seguida de correção do espalhamento de luz (MSC) e centralização dos dados centrados na média, para dimensionar os espectros no intervalo semelhante e permitir uma comparação entre as amostras heterogêneas. Na sequência, a PCA foi utilizada e a escolha do número de componentes principais (PCs) foi feita através do gráfico de autovalores (importância de cada componente principal). A análise de pesos permitiu avaliar a contribuição das bandas dos espectros Raman para a distribuição das amostras no gráfico de escores.

#### **4.2.8 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos aplicados ao soro de leite nas etapas dois e três. Foram realizadas três repetições na etapa dois e quatro repetições na etapa três. Os dados obtidos nos dias dos processamentos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey para comparação das médias, e também por análise estatística descritiva. Todos os dados foram analisados por meio do programa estatístico *Statistical Analysis (SAS Institute Inc, 2006)* versão 9.2.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.3.1 Análises de composição

As amostras do WPC controle do primeiro bloco experimental foram caracterizadas em relação ao conteúdo de proteína, cinzas, extrato seco total, umidade e  $A_w$ . Os valores médios encontrados foram, respectivamente, 302,1 g.kg<sup>-1</sup>, 53,1 g.kg<sup>-1</sup>, 958,2 g.kg<sup>-1</sup>, 41,8 g.kg<sup>-1</sup> e 0,201, condizentes com os valores esperados.

As composições dos produtos obtidos durante o segundo bloco do experimento são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 – Valores médios dos resultados das análises de composição centesimal e físico-químicas realizadas nas amostras de WPC do segundo bloco (n=3).

Análises	WPC <sub>1</sub>	WPC <sub>2</sub>	WPC <sub>1+2</sub>	WPC <sub>3</sub>	WPC <sub>4</sub>	WPC <sub>3+4</sub>
<b>Proteína total (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	294,3 <sup>a</sup>	299,2 <sup>a</sup>	296,9 <sup>a</sup>	295,4 <sup>a</sup>	299,4 <sup>a</sup>	308,2 <sup>a</sup>
<b>Cinzas (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	53,6 <sup>a</sup>	53,6 <sup>a</sup>	54,1 <sup>a</sup>	52,8 <sup>a</sup>	53,6 <sup>a</sup>	57,7 <sup>a</sup>
<b>EST (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	953,0 <sup>a</sup>	946,8 <sup>a</sup>	948,9 <sup>a</sup>	949,0 <sup>a</sup>	956,8 <sup>a</sup>	954,8 <sup>a</sup>
<b>Umidade (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	47,0 <sup>a</sup>	53,2 <sup>a</sup>	51,1 <sup>a</sup>	51,0 <sup>a</sup>	43,2 <sup>a</sup>	45,2 <sup>a</sup>
<b>A<sub>w</sub></b>	0,234 <sup>a</sup>	0,284 <sup>a</sup>	0,247 <sup>a</sup>	0,259 <sup>a</sup>	0,174 <sup>a</sup>	0,206 <sup>a</sup>

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

*Dados de três repetições, análises realizadas em duplicata.*

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.*

*WPCX = concentrado proteico de soro obtido pelo tratamento X; 1 = temperatura do ar de secagem em 130 °C e retentado não concentrado por evaporação a vácuo; 2 = temperatura do ar de secagem em 145 °C e retentado não concentrado por evaporação a vácuo; 1+2 = pó retido na câmara de secagem durante os tratamentos 1 e 2; 3 = temperatura do ar de secagem em 130 °C e retentado concentrado por evaporação a vácuo; 4 = temperatura do ar de secagem em 145 °C e retentado concentrado por evaporação a vácuo; 3+4 = pó retido na câmara de secagem durante os tratamentos 3 e 4.*

Não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) quanto aos parâmetros avaliados entre os WPCs, indicando controle adequado durante as etapas de processamento entre os tratamentos.

As amostras WPC<sub>1+2</sub> e WPC<sub>1+3</sub> foram obtidas através da coleta manual do pó retido dentro da câmara de secagem após os tratamentos 1-2 e 3-4. O acúmulo de pó nas paredes internas da câmara de secagem é comum também nas plantas industriais, porém elas possuem sistemas específicos de vibração para a retirada do mesmo. O objetivo de coletar estas amostras de acúmulo foi verificar se as suas características diferiam das amostras dos tratamentos específicos. Conforme apresentado anteriormente, as mesmas não apresentaram diferença significativa para nenhum dos parâmetros avaliados.

O teor médio de proteína dos pós ficou próximo de 300,0 g.kg<sup>-1</sup>, indicando que os fatores de concentração empregados durante a ultrafiltração podem ser elevados visando a obtenção de WPC com, no mínimo, 350,0 g.kg<sup>-1</sup> de proteína. O teor de 350,0 g.kg<sup>-1</sup> de proteínas é um valor de referência dentro dos produtos produzidos pelas indústrias, possuindo grande espectro de aplicação. O teor de umidade dos produtos lácteos desidratados é um importante atributo a ser controlado pelas indústrias, devido a exigências de legislação, rendimento industrial e conservação do produto final. Contudo, a atividade de água é uma ferramenta mais poderosa na predição do comportamento dos lácteos desidratados durante o prazo de validade. Segundo Schuck *et al.* (2008), os lácteos desidratados devem apresentar atividade de água de 0,200, visando a minimização das reações químicas e bioquímicas, assim como o desenvolvimento microbiano. Este valor é recomendado quando a conservação do produto ocorre em temperaturas inferiores a 50 °C. Os produtos desidratados obtidos no experimento apresentaram valor de atividade de água superior a 0,200, indicando que modificações nas suas características podem ocorrer em uma velocidade elevada durante o armazenamento. Desta forma, há necessidade de mudança nos atributos tecnológicos empregados durante a secagem, objetivando manter a  $A_w$  próxima a 0,200. Os parâmetros tecnológicos recomendados para esta adequação são a diminuição da taxa de bombeamento do produto, o aumento da temperatura do ar de secagem e a diminuição da vazão do ar de entrada.

Os resultados referentes às análises de gordura, proteína total, cinzas, lactose, extrato seco total, umidade e atividade de água, realizadas nas amostras de WPC do terceiro bloco são apresentadas na Tabela 4.



TABELA 4 – Valores médios dos resultados das análises de composição centesimal e físico-químicas realizadas nas amostras de WPC do terceiro bloco (n=4).

Análises	PT72UF	TM65UF	MF0,8UF	MF1,4UF
<b>Gordura (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	23,0 <sup>a</sup>	23,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>
<b>Proteína total (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	323,0 <sup>a</sup>	349,0 <sup>a</sup>	336,0 <sup>a</sup>	348,0 <sup>a</sup>
<b>Cinzas (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	63,0 <sup>a</sup>	64,0 <sup>a</sup>	68,0 <sup>a</sup>	67,0 <sup>a</sup>
<b>Lactose* (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	547,0 <sup>a</sup>	521,0 <sup>a</sup>	556,0 <sup>a</sup>	544,0 <sup>a</sup>
<b>EST (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	956,0 <sup>a</sup>	957,0 <sup>a</sup>	960,0 <sup>a</sup>	959,0 <sup>a</sup>
<b>Umidade (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	44,0 <sup>a</sup>	43,0 <sup>a</sup>	40,0 <sup>a</sup>	41,0 <sup>a</sup>
<b>A<sub>w</sub></b>	0,232 <sup>a</sup>	0,277 <sup>a</sup>	0,251 <sup>a</sup>	0,248 <sup>a</sup>

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

*Dados de quatro repetições, análises realizadas em duplicata.*

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na linha, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.*

*\* Cálculo por diferença.*

*T72UF: WPC produzido a partir do soro pasteurizado a 72 °C por 15 segundos;*

*TM65UF: WPC produzido a partir do soro termizado a 65 °C por 15 segundos;*

*MF0,8UF: WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 0,8 µm de diâmetro dos poros; MF1,4UF: WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 1,4 µm de diâmetro dos poros.*

Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao teor de gordura entre as amostras que foram inicialmente tratadas pelo calor e as microfiltradas, resultado da retenção deste componente pela técnica de microfiltração. Quanto aos outros parâmetros avaliados, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os WPCs indicando controle adequado durante as etapas de processamento.

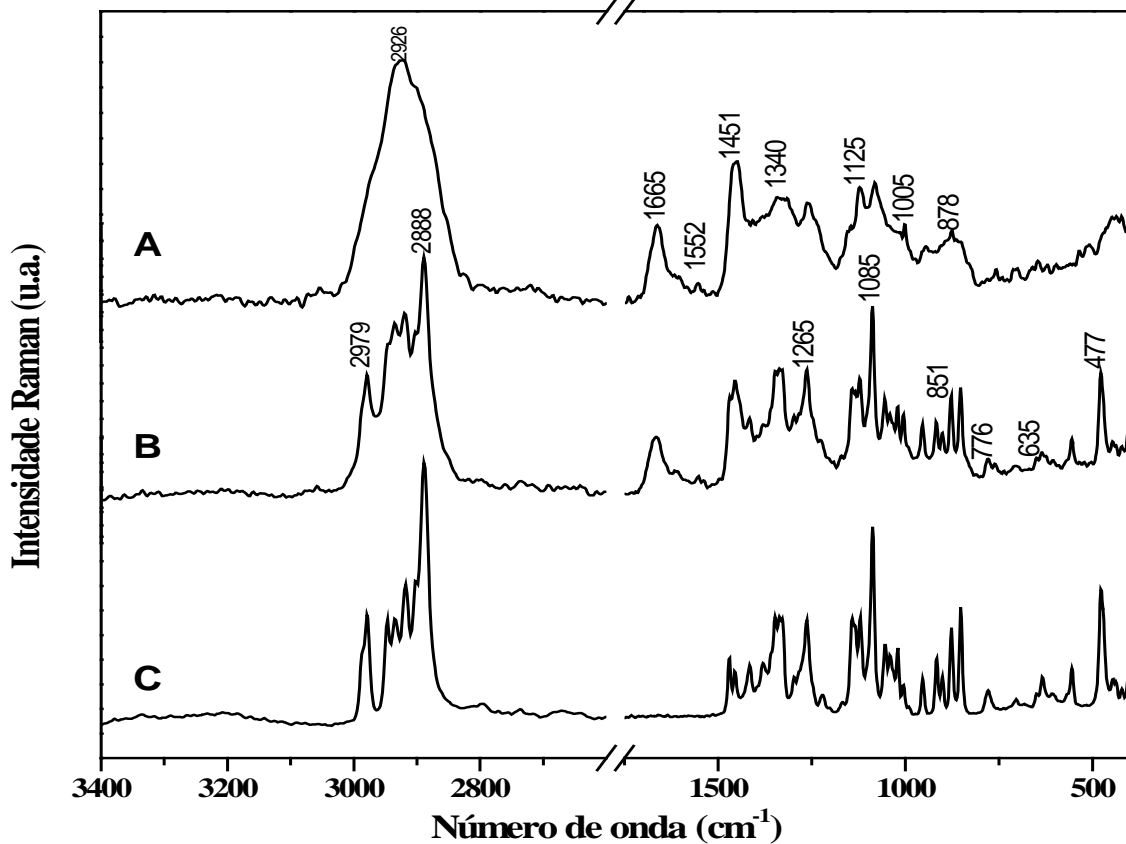
Os WPCs obtidos pela secagem no *spray dryer* apresentaram valores de atividade de água variando acima de 0,200, valor indicado por Schuck *et al.* (2008) como ideal para os lácteos desidratados, pois minimiza as reações químicas e bioquímicas, permitindo uma melhor conservação do produto. Para minimizar a ocorrência de modificações nas características dos produtos obtidos, algumas mudanças poderiam ser feitas durante a etapa de secagem visando reduzir a atividade de água da amostra TM65UF, por exemplo, que apresentou valor um pouco mais elevado, de 0,277. O ideal seria controlar a umidade do ar de secagem, mas como não foi possível controlar este parâmetro no equipamento *spray dryer* utilizado, as possíveis soluções seriam a diminuição da taxa de bombeamento de produto, o aumento da temperatura do ar de secagem e a diminuição da vazão do ar de entrada.

O Instituto Americano de Produtos Lácteos (ADPI, 2002) estabelece padrões elaborados como um guia, para seleção de produtos lácteos a serem utilizados como ingredientes funcionais e nutritivos em indústrias alimentícias. Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com esses padrões, percebeu-se que o teor de proteína está abaixo do teor mínimo de  $350,0 \text{ g.kg}^{-1}$  necessário para WPC e o teor de umidade é bem próximo ao valor máximo estabelecido de  $40,0 \text{ g.kg}^{-1}$ , sendo este parâmetro de grande importância na conservação do produto e determinante no rendimento industrial. Quanto aos demais parâmetros, todos se encontram dentro da faixa de valores estabelecidos pelo Instituto Americano de Produtos Lácteos.

#### **4.3.2 Análises espectroscópicas durante estocagem do WPC: controle do primeiro bloco experimental**

Os espectros Raman das amostras de WPC oriundas do primeiro bloco estão representados na Figura 9, juntamente com o espectro da lactose. As principais bandas observadas e suas respectivas atribuições baseadas em trabalhos já publicados estão listadas na Tabela 5 (LI-CHAN, 1996; BENZERDJEB *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2006).

FIGURA 9 - Espectro Raman do WPC produzido em condições ideais (A), WPC produzido em condições ideais e armazenado durante 6 semanas em condição ambiente (B);  $\alpha$ -lactose monohidratada (C).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O espectro **A** foi obtido logo após a produção do WPC e o espectro **B** foi realizado na mesma amostra, porém armazenada por seis semanas em condições ambientais. As modificações nos espectros Raman dos WPC armazenados variaram de acordo com as condições de estocagem. Para amostras estocadas na temperatura e umidade ambiente ocorreram modificações nos espectros Raman após três semanas de armazenamento. Para as amostras armazenadas em dessecadores, as modificações não foram observadas até um ano de estocagem. Com base nestes resultados, pode-se inferir que a presença de oxigênio atmosférico e da umidade no ambiente podem acelerar o processo de modificação das características dos WPC.

É possível identificar no espectro Raman do WPC após seis semanas armazenado em embalagens plásticas na temperatura e umidade ambiente (**B**), mostrado na Figura 9, que as principais mudanças ocorrem na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  e, principalmente, na região entre  $1200$  e

800  $\text{cm}^{-1}$ . Estas alterações no perfil dos espectros podem ser atribuídas ao início do processo de mudança de fase da lactose amorfa para a lactose cristalina, durante a qual ocorre o aparecimento de novas bandas. A cristalização implica na formação de uma rede tridimensional ordenada de moléculas, diminuindo assim a distribuição das frequências de cada ligação que também reduz a largura dos picos do espectro de Raman de vibração, devido ao abaixamento de simetria que ocorre na passagem da forma amorfa para a forma cristalina (CELEDON e AGUILERA, 2002).

As principais diferenças entre os espectros das amostras estão na região de 2900  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento da ligação C-H. Modificações nas regiões de 1125  $\text{cm}^{-1}$  e 1054  $\text{cm}^{-1}$  envolvendo os modos [ $\nu$  (C-O) +  $\nu$ (C-C) +  $\delta$  (C-O-H)] que ocorreram com o tempo de armazenamento podem estar relacionadas às mudanças observadas nas características do pó, principalmente por estarem na região de carboidratos e indicarem o início da mudança de fase da lactose amorfa para a lactose cristalina. E a região de 850  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao modo vibracional da ligação glicosídica do carboidrato presente.

A Figura 9 confronta ainda o espectro Raman da  $\alpha$ -lactose monohidratada cristalina (C) com os espectros Raman de amostras dos WPC. Observa-se que, quando o teor de lactose cristalina aumenta na amostra de WPC durante o armazenamento, os modos vibracionais característicos desse componente ficam mais evidentes e o formato das bandas são muito similares ao do padrão de lactose. Isso fica bem evidente para o WPC armazenado em condições ambientes normais, onde a cristalização da lactose é o principal evento.

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

Isso indica que a espectroscopia Raman pode ser uma ferramenta emergente para o monitoramento da qualidade de WPC durante o período de armazenamento, considerando a sua sensibilidade para identificar mudanças na estrutura da lactose devido à transição vítrea,

que pode ter como fator de promoção embalagens danificadas, avançada data de fabricação ou exposição excessiva a altas temperaturas durante logística.

TABELA 5 – Tentativa de atribuição do espectro Raman do WPC

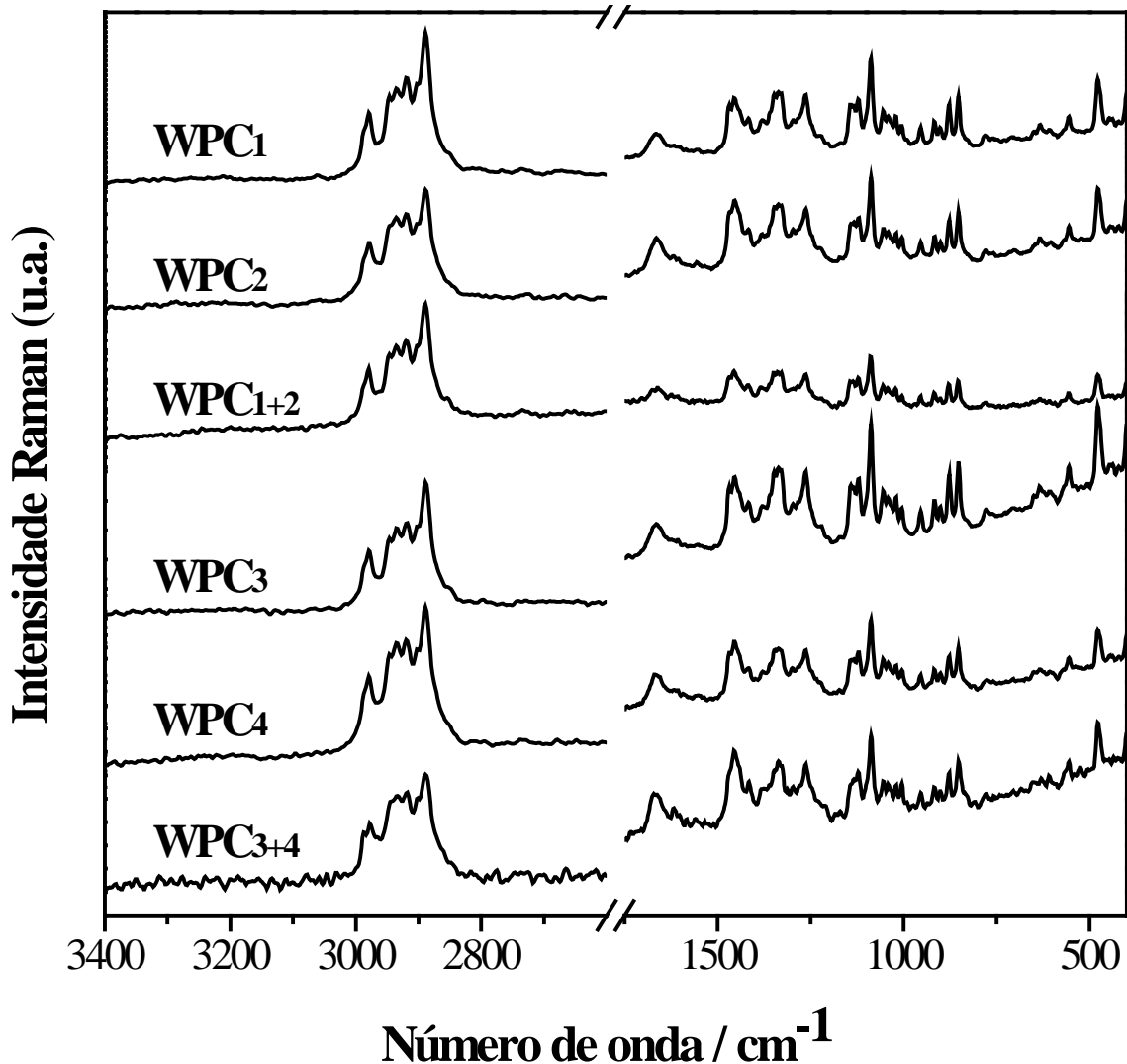
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tentativa de atribuição
2980 - 2850	$\nu_{\text{ass}}(\text{CH}_2) + \nu_{\text{s}}(\text{CH}_3) + \nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
1665	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amida I; $\nu(\text{C}=\text{C})$
1552	$\delta(\text{N-H})$ ; $\nu(\text{C-N})$ Amida II
1451	$\delta(\text{CH}_2)$
1340	$\nu(\text{C-O})$ ; $\delta(\text{C-H})$
1265	$\gamma(\text{CH}_2)$
1125	$\nu(\text{C-O})$ ; $\nu(\text{C-C})$ ; $\delta(\text{C-O-H})$
1085	$\nu(\text{C-O})$ ; $\nu(\text{C-C})$ ; $\delta(\text{C-O-H})$
1054	$\nu(\text{C-O})$ ; $\nu(\text{C-C})$ ; $\delta(\text{C-O-H})$
1005	Ring-breathing (phenylalanine)
955	$\delta(\text{C-O-C}) + \delta(\text{C-O-H}) + \nu(\text{C-O})$
878	$\delta(\text{C-C-H}) + \delta(\text{C-O-C})$
851	$\nu(\text{C-O-C}) + \delta(\text{C-O-H}) + \nu(\text{C-O})$
776	$\delta(\text{C-C-O})$
635	$\delta(\text{C-C-O})$
477	$\delta(\text{C-C-C}) + \tau(\text{C-O})$

Fonte: LI-CHAN, 1996; BENZERDJEB *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2006

#### 4.3.3 Análises espectroscópicas dos WPC do segundo bloco de amostras

Os espectros Raman das amostras de WPC oriundas do segundo bloco experimental estão representados na Figura 10, na página seguinte.

FIGURA 10 - Espectros Raman dos WPC produzidos no segundo bloco experimental



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

*WPC<sub>1</sub>* = temperatura do ar de secagem em 130°C e retentado não concentrado por evaporação a vácuo; *WPC<sub>2</sub>* = temperatura do ar de secagem em 145°C e retentado não concentrado por evaporação a vácuo; *WPC<sub>1+2</sub>* = pó retido na câmara de secagem durante os tratamentos 1 e 2; *WPC<sub>3</sub>* = temperatura do ar de secagem em 130°C e retentado concentrado por evaporação a vácuo; *WPC<sub>4</sub>* = temperatura do ar de secagem em 145°C e retentado concentrado por evaporação a vácuo; *WPC<sub>3+4</sub>* = pó retido na câmara de secagem durante os tratamentos 3 e 4.

Os espectros Raman foram obtidos em duplicata das doze amostras provenientes dos quatro diferentes tratamentos realizados em triplicada e mais as seis amostras de *WPC<sub>1+2</sub>* e *WPC<sub>3+4</sub>*. Os perfis espectroscópicos destas amostras, oriundas de diferentes temperaturas de secagem e de soro de leite fluido e pré-concentrado, mostram-se extremamente similares entre

si, os quais possuem as principais bandas, correspondentes à caracterização de WPC em pó com presença de lactose cristalina, divididas em duas regiões. A primeira região, compreendida entre 2980 a 2888  $\text{cm}^{-1}$ , é atribuída a modos associados ao grupo CH em estruturas aromáticas e alifáticas; uma segunda região, localizada entre 1120 e 849  $\text{cm}^{-1}$ , que possui diversos modos associados, dentre os quais podem ser destacados os modos  $\nu(\text{C-O})$ ,  $\nu(\text{C-C})$  e  $\delta(\text{C-O-C})$  (ALMEIDA *et al.*, 2011). Uma diferença esperada entre os perfis espectroscópicos das amostras corresponderia à ligeira redução na intensidade das bandas características de grupos associados às proteínas, sugerindo assim o início de um processo de desnaturação proteica à medida que se eleva a temperatura a qual o soro é submetido durante o processo de secagem no *spray dryer*. Porém, como a maior parte da energia na forma de calor a qual as gotículas de soro em descendência na câmara de secagem são submetidas estão envolvidas no processo de evaporação da água, o calor residual não é suficiente para gerar alterações efetivas nas estruturas das soro-proteínas, uma vez que o processo de desnaturação térmica necessita envolver um nível mais elevado de energia. A literatura indica que são necessárias condições tanto de elevada temperatura quanto de elevada umidade para que ocorra a desnaturação proteica durante o processo de secagem por atomização (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2007). Neste trabalho, a temperatura de entrada do ar é menor (130 a 145°C) em comparação às definições industriais (180 a 200 °C) (SCHUCK *et al.*, 2012).

Considerando a exposição anterior, é possível afirmar que, apesar da utilização de diferentes temperaturas de secagem no processo de obtenção dos produtos, bem como a utilização de dois tipos de soro (pré-concentrado e fluido), não se evidenciam diferenças significativas nos perfis espectroscópicos em questão, sendo assim possível inferir que as estruturas das partículas e de suas interações são mantidas mesmo após a elevação da temperatura no processo de secagem, de forma a tornar possível a obtenção de um produto padronizado estruturalmente, mesmo quando utilizados diferentes parâmetros de processo.

O fato de os espectros indicarem a forte presença de lactose cristalina nas amostras sugere que as amostras produzidas tiveram a transição vítrea da lactose facilitada, pois a mesma ocorreu durante o processo de secagem ou no tempo compreendido entre a secagem e a realização da análise espectroscópica. Esta característica pode ser explicada pela maior quantidade de água presente nos WPCs produzidos – dado confirmado pelas atividades de

água dos mesmos –, que mostram que os produtos não foram desidratados o suficiente para garantir que transição vítrea da lactose não ocorresse durante a produção ou armazenamento.

Esta caracterização através da espectroscopia Raman mostra que os parâmetros tecnológicos de secagem utilizados neste bloco experimental não são ideais para a obtenção de WPC com validade estendida quanto à manutenção da estrutura amorfa da lactose presente. Além disso, esta técnica acessa uma característica da estrutura dos pós de WPC que as técnicas convencionais não conseguem identificar: a identificação da presença de lactose cristalina sem a necessidade de submeter a amostra a um preparo prévio ou condição analítica que possa interferir na conformação espacial das moléculas presentes nesta matriz complexa.

#### 4.3.4 Análises espectroscópicas dos WPC do terceiro bloco de amostras

No terceiro bloco experimental foram produzidas dezesseis amostras de WPC, sendo quatro repetições de cada um dos quatro tratamentos. Os espectros de cada repetição dentro do mesmo tratamento estão representados na Figura 11: **PT72UF** produzido a partir do soro pasteurizado a 72 °C por 15 segundos; **TM65UF** produzido a partir do soro termizado a 65 °C por 15 segundos; **MF0,8UF** produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 0,8 µm de diâmetro dos poros e **MF1,4UF** produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 1,4 µm de diâmetro dos poros.

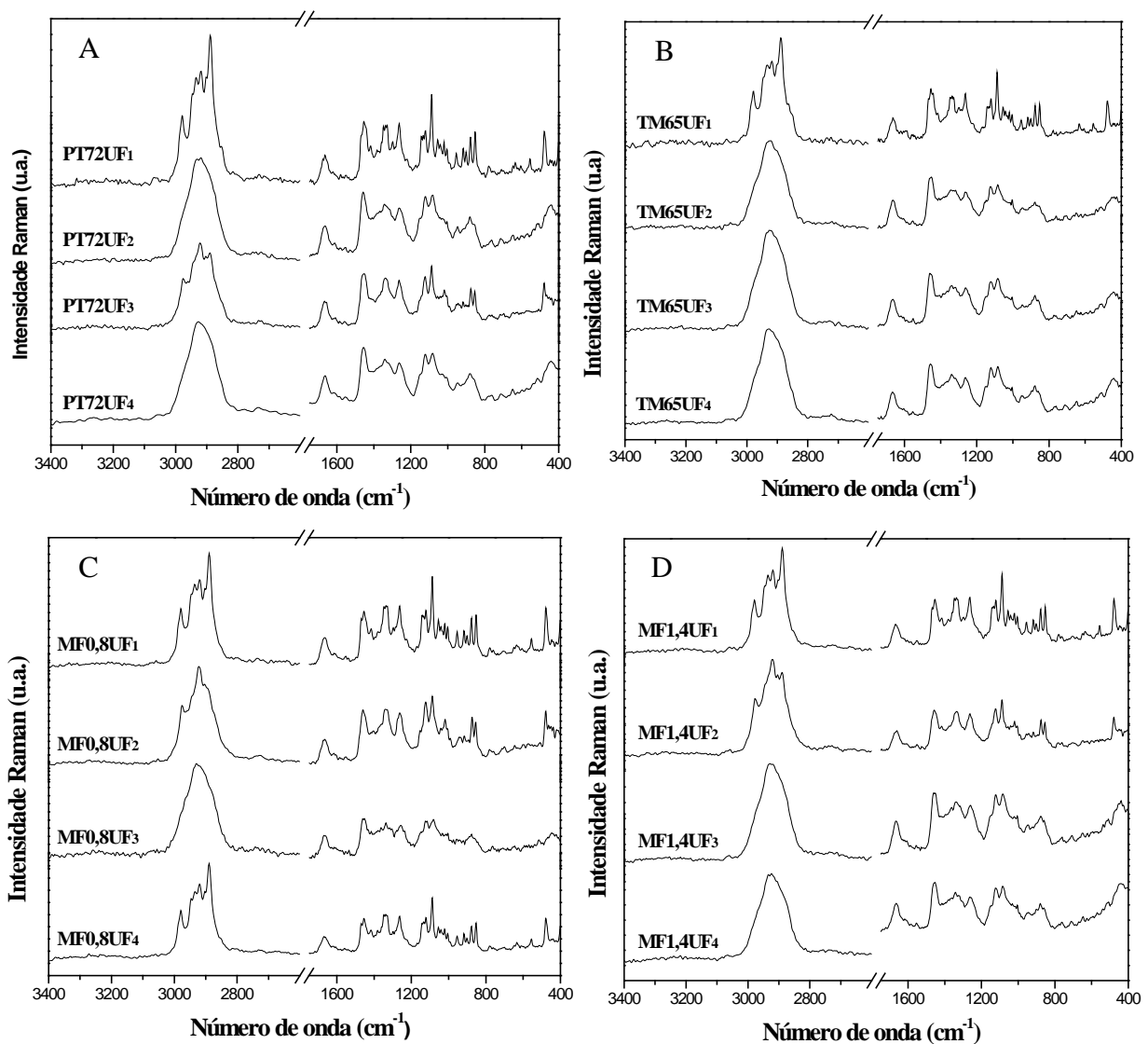
A partir dos espectros Raman obtidos para as amostras dos produtos oriundos do terceiro bloco experimental é possível evidenciar diferenças no que diz respeito aos seus perfis dentro das repetições dos mesmos tratamentos, sugerindo que houveram alterações efetivas na estrutura da lactose quando a matéria-prima é submetida a diferentes parâmetros tecnológicos.

As mudanças mais significativas estão na região de 2900  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento da ligação C-H, nas regiões de 1125 e 1054  $\text{cm}^{-1}$ , envolvendo os modos [ $\nu$  (C-O) +  $\nu$ (C-C) +  $\delta$  (C-O-H)] e na região de 850  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao modo vibracional da ligação glicosídica do carboidrato presente. O mesmo comportamento foi verificado nas avaliações dos dois blocos experimentais anteriores, porém, neste terceiro bloco, a maior contribuição da espectroscopia Raman foi identificar que os mesmos WPC obtidos dentro de um tratamento apresentaram características distintas em relação à estrutura da lactose, levando-se em



consideração que os parâmetros tecnológicos foram mantidos idênticos e que os resultados das análises de composição mostram que não há diferença significativa entre as amostras, reforçando o potencial da espectroscopia Raman como ferramenta de controle de qualidade de um parâmetro, até então não monitorado, utilizando os procedimentos analíticos convencionais.

FIGURA 11 - Espectros Raman dos WPC produzidos no terceiro bloco experimental



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

*PT72UF* – produzido a partir do soro pasteurizado a 72 °C por 15 segundos (A); *TM65UF* – produzido a partir do soro termizado a 65 °C por 15 segundos (B); *MF0,8UF* – WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 0,8 µm de diâmetro dos poros (C); *MF1,4UF*: WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 1,4 µm de diâmetro dos poros (D). Os números de 1 a 4 identificam o número da repetição.

Com isso, pode-se inferir que as principais modificações estão relacionadas às mudanças observadas nas características do pó, principalmente por estarem na região de carboidratos e indicarem o início da mudança de fase da lactose amorfa para a lactose cristalina. O que distingue os espectros são as bandas características da lactose que aparecem de forma mais evidente em alguns espectros. Essas alterações nos espectros Raman podem indicar um processo de cristalização da lactose (NØRGAARD *et al.*, 2005).

Mesmo realizando tratamento térmico inicial na matéria-prima, é possível sugerir que estas temperaturas não são suficientes para que haja alterações significativas à estrutura das proteínas sensível para identificação nos espectros Raman, uma vez que não se evidenciam diferenças espectroscópicas específicas entre os tratamentos com aquecimento (PT72U e TM65UF) e sem aquecimento (MF0,8UF e MF1,4UF) nas bandas relacionadas às estruturas proteicas. Vale ressaltar que as temperaturas às quais estes tratamentos foram submetidos são as temperaturas de pasteurização e termização, respectivamente. Sugere-se que seja necessário um tratamento a uma temperatura consideravelmente maior para que alterações comecem a surgir na estrutura das proteínas e em suas interações. De acordo com Ngarize *et al.* (2004), quando as proteínas do soro de leite são submetidas a temperaturas ligeiramente elevadas (90°C) durante períodos relativamente mais longos (30 minutos), algumas alterações tornam-se notáveis no perfil espectroscópico devido às distintas contribuições em sua estrutura. Segundo estes autores, ao submeter-se as proteínas do soro de leite a estas condições, a conformação destas passa a possuir uma contribuição mais efetiva do aminoácido triptofano, sugerida pela presença de uma banda mais intensa na região próxima a 540  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, ainda conforme estes autores, essas diferentes condições geram alterações na região de interações dissulfeto. Estas alterações anteriormente citadas correspondem à presença de bandas de pequena intensidade na região localizada entre 535 e 516  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às conformações *gauche-gauche-trans* e *trans-gauche-trans*, respectivamente, sendo estas relacionadas às interações dissulfeto da  $\beta$ -lactoglobulina.

Os tratamentos denominados MF0,8UF e MF1,4UF são aqueles os quais a matéria-prima foi processada sem que houvesse um tratamento térmico prévio, porém, sendo estas submetidas aos processos de microfiltração em membrana com poros de 0,8  $\mu\text{m}$  e 1,4  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Uma vez submetido a este processo de microfiltração, o soro de leite passa a se abster da presença de gordura. Não foi possível identificar, analisando os espectros Raman






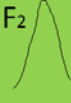










das amostras, a presença ou ausência do conteúdo de gordura. Neste caso, as regiões que possuem contribuição dos modos vibracionais dos lipídeos são 2850, 1440 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ .

A presença de uma banda, mesmo que em baixa intensidade, localizada na região em torno de 2850  $\text{cm}^{-1}$  sugere fortemente um WPC com teor de gordura efetivamente mais baixo, uma vez que esta banda nos espectros pode ser atribuída, segundo trabalho relacionado (ALMEIDA *et al.*, 2011), ao modo estiramento simétrico  $\text{CH}_2$  de lipídios.

Considerando o conjunto de informações supracitadas, é possível sugerir fortemente que há diferenças satisfatórias no que diz respeito às tecnologias empregadas para a obtenção do WPC que foi submetido à secagem em *spray dryer*. Estas diferenças estão intimamente ligadas, principalmente às condições de operação durante a secagem, vide que foi possível verificar diferenças na estrutura da lactose dentro dos tratamentos e entre os tratamentos. Sendo assim, é possível inferir que a utilização da espectroscopia Raman mostra-se muito eficiente quando utilizada como técnica de controle de qualidade destes produtos, uma vez que é possível depreender as principais características estruturais da lactose, bem como notar pequenas oscilações possíveis de ocorrer durante o processo de obtenção dos mesmos devido às mudanças de parâmetros tecnológicos utilizados. Sendo assim, é possível utilizar tal técnica como um indicativo de padronização, não somente no processo de fabricação do WPC, de forma indireta a partir das principais bandas características de carboidratos, principalmente a lactose, mas também de outros lácteos em pó, uma vez que a lactose, juntamente com outros constituintes, possui características estruturais únicas, que podem ser claramente observadas a partir de seu perfil espectroscópico.

Através da análise visual simples dos espectros obtidos neste bloco experimental, podemos indicar três perfis espectroscópicos similares entre os quatro tratamentos e suas repetições. A Tabela 6 apresenta esta compilação da avaliação dos dezesseis espectros.

TABELA 6 – Análise comparativa dos espectros Raman e atribuição em relação à estrutura da lactose presente nas amostras de WPC.

Sequencia da produção piloto	WPCs do terceiro bloco de amostras			
	PT72UF	TM65UF	MF0,8UF	MF1,4UF
Repetição 1	PT72UF <sub>1</sub> 	TM65UF <sub>1</sub> 	MF0,8UF <sub>1</sub> 	MF1,4UF <sub>1</sub> 
Repetição 2	PT72UF <sub>2</sub> 	TM65UF <sub>2</sub> 	MF0,8UF <sub>2</sub> 	MF1,4UF <sub>2</sub> 
Repetição 3	PT72UF <sub>3</sub> 	TM65UF <sub>3</sub> 	MF0,8UF <sub>3</sub> 	MF1,4UF <sub>3</sub> 
Repetição 4	PT72UF <sub>4</sub> 	TM65UF <sub>4</sub> 	MF0,8UF <sub>4</sub> 	MF1,4UF <sub>4</sub> 

	Amorfo
	Transição
	Cristalina

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Onde: PT72UF: WPC produzido a partir do soro pasteurizado a 72°C por 15 segundos;  
 TM65UF: WPC produzido a partir do soro termizado a 65°C por 15 segundos;  
 MF0,8UF: WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 0,8 µm de diâmetro dos poros; MF1,4UF: WPC produzido a partir do soro microfiltrado utilizando membrana de 1,4 µm de diâmetro dos poros.

#### 4.3.5 Análise exploratória das amostras de WPC

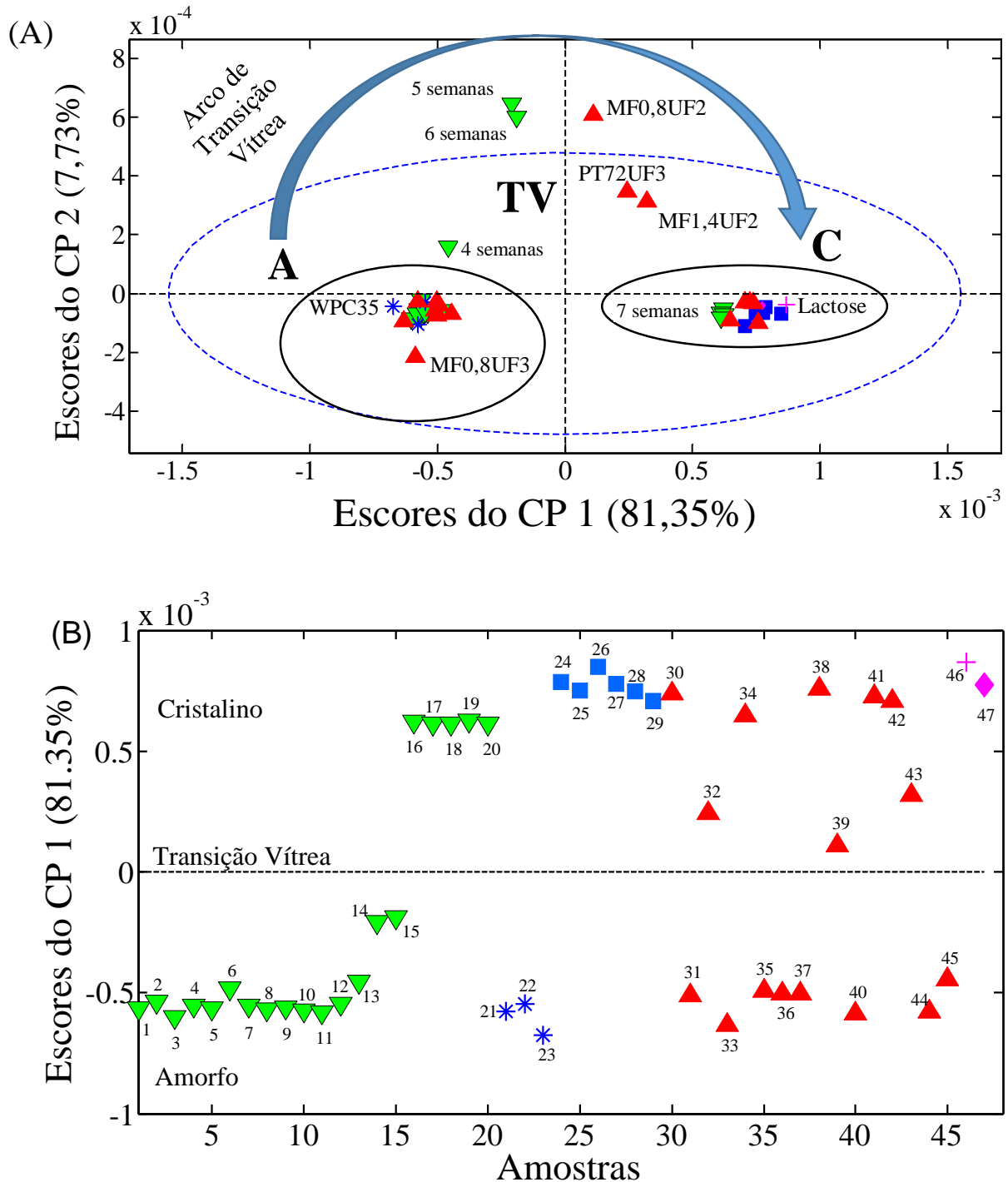
Para melhor avaliar as amostras de WPC empregadas no presente estudo, realizou-se uma análise exploratória empregando a PCA. No modelo construído, foram escolhidos 4 componentes principais, com 94,42% da variância total explicada. A escolha das CPs foi baseada no gráfico de autovalores *versus* o número de componentes principais. A região do espectro que melhor identificou as diferentes características das estruturas dos WPCs foi entre 1200 e 800 cm<sup>-1</sup>. A Figura 12 A e B mostra o gráfico de escores das duas primeiras componentes principais, onde é possível notar a formação de dois agrupamentos, identificados como A e C. As amostras de WPC ficaram agrupadas principalmente pelas características da lactose presente nos pós.

Foram utilizados nesta análise exploratória quarenta e dois espectros Raman na região espectral 1200-800 cm<sup>-1</sup> das amostras dos três blocos experimentais (amostras 1-20 e 24-45),

três espectros (amostras 21, 22 e 23) de amostras industriais de WPC35 ( $\sim 350 \text{ g.kg}^{-1}$  de proteína na base seca), um de  $\alpha$ -lactose monohidratada (amostra 46) e um de soro em pó previamente cristalizado (amostra 47). As amostras dos produtos obtidos no mercado industrial foram introduzidas como referência, vide que o WPC35 industrial não apresenta lactose com estrutura cristalina e a  $\alpha$ -lactose monohidratada e o soro em pó são as referências opostas, já que para o seu processo, a cristalização é uma etapa obrigatória. Optou-se por estas matrizes como referência, pois são as mais próximas dos WPCs produzidos nos blocos experimentais deste trabalho.

O que distingue os espectros das amostras agrupadas em A e C são as bandas características da lactose, as quais aparecem de forma mais evidente nos espectros C. Essas alterações nos espectros Raman indicam um processo de cristalização da lactose (NØRGAARD *et al.*, 2005) que pode ocorrer durante o processamento na câmara de secagem, devido aos parâmetros tecnológicos inadequados ou também a uma falha no armazenamento do WPC, diminuindo o seu tempo de vida de prateleira. É importante observar que a amostra de  $\alpha$ -lactose monohidratada e também o soro em pó (cristalino) foram classificados juntamente com as amostras C. Todas as amostras do segundo bloco experimental também foram agrupadas em C, confirmando a análise espectroscópica da Figura 12, que mostra o perfil cristalino de todos os WPCs produzidos. Além disso, cinco WPCs do terceiro bloco experimental também foram agrupados em C, PT72UF<sub>1</sub>, TM65UF<sub>1</sub>, MF0,8UF<sub>1</sub>, MF1,4UF<sub>1</sub>, e MF0,8UF<sub>4</sub>, os mesmos apontados como cristalinos na Tabela 6. Também foram agrupados no grupo C todas as amostras do primeiro bloco experimental que ficaram acondicionadas em condição ambiente por mais de 7 semanas (amostras 16, 17, 18, 19 e 20), identificando que após este tempo a estrutura da lactose nos WPCs apresentava-se cristalina e não mais amorfa.

FIGURA 12 A e B - Gráfico de escores CP1 *versus* CP2 (A) e gráfico de amostras versus escores PC1 (B) da região espectral 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  das amostras de WPC do primeiro bloco experimental ( $\nabla$ ), WPC35 adquiridos no mercado (\*), WPC do segundo bloco experimental ( $\blacksquare$ ), WPC do terceiro bloco experimental ( $\blacktriangle$ );  $\alpha$ -lactose monohidratada (+) e soro em pó ( $\blacklozenge$ ).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

No agrupamento A, pode-se verificar a presença das amostras de WPC adquiridas no mercado industrial (WPC35), confirmando a expectativa de que as mesmas não apresentam lactose com estrutura cristalina avançada. Também estão agrupadas em A as amostras do primeiro bloco experimental que permaneceram em condição de umidade relativa do ar controlada para não haver absorção de umidade (amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Estas amostras foram monitoradas por doze meses e não houve mudança significativa nos espectros. Para as mesmas amostras mantidas em condição ambiente, o limite de agrupamento em A foi de 3 semanas (10, 11 e 12). Oito amostras do terceiro bloco experimental também foram agrupadas em A. As mesmas identificadas como amorfas na tabela 6.

Apesar de as amostras localizadas na região identificada como TV estarem dispersas no gráfico, é possível perceber que elas possuem uma característica em comum nos seus espectros: a transição entre o estado amorfo e o cristalino. Tal dispersão é totalmente compreensível, pois entre o estado amorfo e o cristalino existem diferentes níveis de transição da estrutura das moléculas de lactose e, por isso, cada amostra de WPC poderá ser alocada em posições diferenciadas em relação à CP1 e à CP2. Observa-se ainda que a transição vítrea é identificada pelas duas componentes principais, mostrando um caminho da transição entre o grupo A e C, indicado pela seta na Figura 12A.

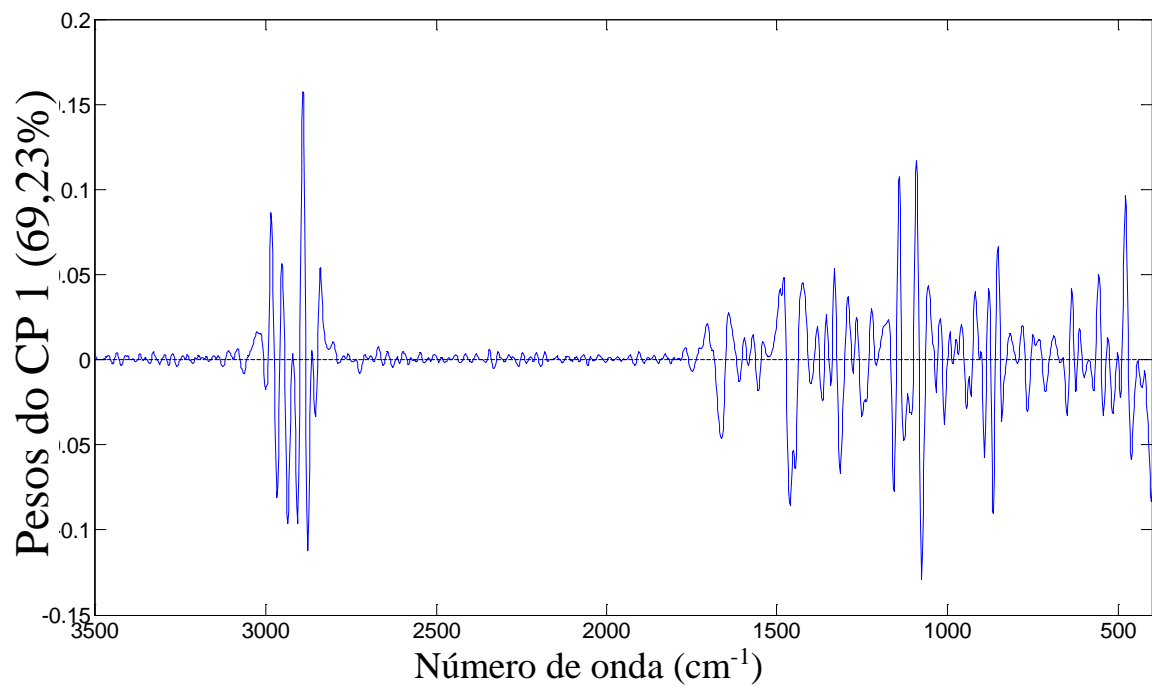
O gráfico de amostras *versus* escores da CP1, apresentado na Figura 12B, mostra as quarenta e sete amostras usadas na construção do modelo, com as indicações das origens destas em relação aos blocos experimentais. Nesse gráfico, é possível observar melhor a divisão das amostras promovida pela primeira componente principal, em relação ao estado da lactose, podendo ser amorfa ou cristalina.

A análise exploratória aplicada aos dados adquiridos através da espectroscopia Raman permite observar de forma mais eficiente a transição vítrea da lactose nas amostras de WPC, o que indica que a técnica pode ser usada como uma potencial ferramenta de controle de qualidade de um parâmetro até então não monitorado pelos procedimentos analíticos convencionais durante o processo produtivo e/ou armazenamento do produto.

Analisando o gráfico dos pesos (Figura 13), é possível observar quais são as regiões dos espectros que mais contribuem para a distribuição das amostras no gráfico de escores. Dentre elas, destaca-se a região entre 1200 e 800  $\text{cm}^{-1}$ , tipicamente atribuída a modos vibracionais de carboidratos. Este resultado contribui para a utilização de tal região como marcadora na identificação da estrutura da lactose. As bandas na região de 2900  $\text{cm}^{-1}$  também

sofrem modificações devido à cristalização da lactose, porém a utilização desta região na análise exploratória mostrou-se menos eficiente que a região citada anteriormente. Podemos atribuir este fato ao perfil espectroscópico das amostras de WPC com lactose amorfa que tem uma única banda mais alongada e pouco definida na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$ .

FIGURA 13 - Gráfico dos pesos na CP1 *versus* números de onda da região espectral  $3500\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



#### 4.4 CONCLUSÃO

A produção de WPC é amplamente usual em diversos países. Porém, parâmetros tecnológicos podem ser modificados durante as operações unitárias principais, acarretando mudanças nas características estruturais do produto final que não são identificadas pelas atuais técnicas de controle de qualidade e, portanto, não são controladas. Os produtos desidratados obtidos no experimento apresentaram valor de atividade de água médio superior a 0,200, indicando que modificações nas suas características podem ocorrer em uma velocidade elevada durante o armazenamento. A espectroscopia Raman associada à quimiometria foi capaz de identificar as mudanças relacionadas à estrutura da lactose durante o processo produtivo e também no armazenamento do WPC devido às mudanças espectrais que ocorrem na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1200$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas aos modos vibracionais da lactose cristalina, sendo assim uma emergente ferramenta a ser utilizada como controle de qualidade destes produtos. A classificação dos WPCs quanto à estrutura da lactose permite não só inferir sobre a sua condição de processo, mas também sobre a sua condição de estocagem – parâmetros de extrema importância econômica e de padronização do produto –, além de ser possível monitorar a transição vítrea da lactose sem submeter a amostra à uma condição analítica que possa interferir no ambiente químico dos demais constituintes, como nas técnicas amplamente difundidas para esta avaliação.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADPI. American Dairy Products Institute. ***Ingredient Description Brochure***. Elmhurst, IL: ADPI, 2002.

ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, K.S; STEPHANI, R; OLIVEIRA, L.F.C. ***Application of FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Analysis for Determination Adulteration in Milk Powder***. Analytical Letters. 2012. V. 45. p. 1–14.

ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, K.S.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L.F.C. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. J. Raman Spectrosc. 2011, V. 42, p. 1548–1552.

ANANDHARAMAKRISHNAN,C.; RIELLY,C.D.; STAPLEY, A. G. F. Effects of Process Variables on the Denaturation of Whey Proteins during Spray Drying. In: ***Drying Technology***, v.25, p.799–807, 2007.

BAECHLER, R. *et al.* Physical changes in heat-treated whole milk powder. In: ***Lait***, v. 85, n. 4-5, p. 305-314, Jul-Oct, 2005.

BENZERDJEB, A.M; MOKHTARI, I.N.T; RAHAL, M.S. Normal coordinates analyses of disaccharides constituted by D-glucose, D-galactose and D-fructose units. In: ***Spectrochimica Acta Part A***, 68, p.284-299, 2007.

CARVALHO, A.F; MAUBOIS, J.-L. Applications of membrane technologies in the dairy industry. In: COIMBRA, J.S.R; TEIXEIRA, J.A. (Eds.) ***Engineering aspects of milk and dairy products***. Boca Raton: CRC Press, 2010, 256p.

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

DE WIT, J.N; KLARENBECK, G; ADAMSE, M. Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and compositions. In: ***Neth Milk Dairy J***, v.40, p.41-56, 1996.

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

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ***Milk***: determination of nitrogen content. Brussels: 1993. 12 p. (FIL 20B: 1993).

\_\_\_\_\_. *Milk*: determination of total solids content. Brussels: 1987. 2p. (FIL 21B: 1987).

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

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

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

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

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

NGARIZE, S; ADAMS, A; HOWELL, N.K.; Studies on egg albumen and whey protein interactions by FT-Raman spectroscopy and rheology. In: *Food Hydrocolloids*. 2004, v. 18, p. 49-59.

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

PERRONE, I. T; SIMEÃO, M; RODRIGUES JÚNIOR, P. H; STEPHANI, R; CARVALHO, A.F.D. Influence of pilot spray dryer settings on moisture and water activity of whole milk powder. In: *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 68, 5-9. Juiz de Fora, 2013.

SCHUCK, P; DOLIVET, A; JEANTET, R. *Analytical methods for dairy food and dairy powders*. Chichester: John Wiley & Sons, 2012, p.16-17.

SCHUCK, P; DOLIVET, A; MÉJEAN, S; JEANTET, R. Relative humidity of outlet air: the key parameter to optimize moisture content and water activity of dairy powders. In: *Dairy Science and Technology*, Rennes, v.88, p. 45-52, 2008.

TAMINE, A.Y. *Dairy Powders and Concentrated Products*. 1.ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2009.

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

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

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

THOMSEN, M. K. *et al.* Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 53, n. 18, p. 7082-7090, Sep 7 2005a.

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

\_\_\_\_\_. Water activity-temperature state diagram of amorphous lactose. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 23, p. 9182-9185, Nov 16 2005c.

WEHR, H.M; FRANK, J.F. Standard methods for the examination of dairy products. In: *American Public Health Association*. 17th ed. Washington: DC, 2004.

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

## 5 – AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EM ANALISADOR RÁPIDO DE VISCOSIDADE

### RESUMO

Sistemas proteicos (SP) são rotineiramente utilizados pelas indústrias brasileiras, com o objetivo de promover melhoria na textura, no rendimento e na palatabilidade dos alimentos processados. Entender o comportamento sinérgico entre as diferentes estruturas proteicas destes sistemas durante processamento térmico sob a influência do pH do meio permite alcançar melhor otimização de definição dos produtos e processos. A interpretação das reações e interações que ocorrem de forma simultânea entre os constituintes proteicos destes sistemas em dispersão durante o processamento térmico ainda é um grande desafio e, neste trabalho, foi feita através da observação das mudanças reológicas da viscosidade de arranque de 5 diferentes SP obtidos pela combinação de diferentes proporções de concentrado proteico de leite (MPC) e concentrado proteico de soro (WPC) em pH 5,0, 6,5 e 7,0, em processamento térmico de 85°C/15 min e 95°C/5 min no analisador rápido de viscosidade (RVA). A concentração sólido-líquido das soluções avaliadas foram 0,25 g.g<sup>-1</sup> e a concentração proteica 0,17 g.g<sup>-1</sup> em água. Dez parâmetros analíticos foram utilizados para caracterizar cada uma das rampas de viscosidade de arranque dos 35 experimentos conduzidos no planejamento misto 2x3x5 com a utilização da análise de componentes principais (PCA) na interpretação das similaridades de comportamento. O estudo demonstrou a clara influência do pH 5,5 na elevação de no mínimo 5°C na temperatura de início da viscosidade de arranque dos SP e o impacto das diferentes proporções entre o MPC/WPC acima de 15/85 em pH 7,0 no perfil das curvas viscográficas, tendo como principal agente o efeito sinérgico proveniente entre as reações e interações das caseínas com as soro-proteínas durante o processamento. Assim, este trabalho reforça a importância do RVA como um instrumento analítico utilizado na simulação de processos industriais envolvendo os SP e o uso da rampa de viscosidade de arranque como forma de interpretação das interações dos seus componentes em relação às modificações relacionadas à temperatura de tratamento.

Palavras-chave: WPC, MPC, RVA, Análise de componentes principais (PCA).

## 5.1 INTRODUÇÃO

As proteínas lácteas (MP) são importantes para a nutrição humana e promovem uma ampla variedade de propriedades dinâmicas funcionais, largamente exploradas pelas indústrias de alimentos, com o objetivo de proporcionar melhorias de textura, rendimento e palatabilidade aos produtos processados. Diferentes métodos de produção em escala industrial das MP têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos. Como resultado, uma grande variedade de produtos, especificamente designados para estas aplicações, estão sendo manufaturados pelas indústrias, sendo os mais importantes do ponto de vista industrial os produtos de alta concentração proteica como as caseínas, os caseinatos, os concentrados proteicos de soro (WPC), os isolados proteicos de soro (WPI), os concentrados proteicos de leite (MPC) e os isolados proteicos de leite (MPI). Os processos utilizados na manufatura destes produtos tendem a modificar a estrutura nativa das proteínas lácteas, podendo levar a novas interações proteína-proteína e, conseqüentemente, gerar impacto sobre a funcionalidade tecnológica das mesmas (SINGH, 2009).

MP são comumente adicionadas como ingredientes na fabricação de produtos lácteos formulados como os queijos processados, visando aumentar a concentração de proteínas e/ou rendimento do produto final, devido à composição. As MP têm sido utilizadas também para melhorar as características de textura de diferentes tipos de leites fermentados. O uso de MP em bebidas nutricionais está crescendo e, nestas aplicações, o MPC, por exemplo, contribui com ambas as frações proteicas do leite (caseína e proteínas do soro), na mesma proporção que o leite de origem, porém com concentração de lactose muito menor (BALDWIN e PEARCE, 2005). Já o WPC tem aplicação em produtos cárneos, bebidas, panificação e produtos infantis (KINSELLA, 1984; DE WIT, 1989). As principais características de funcionalidade deste produto estão relacionadas às proteínas do soro e incluem a forte interação com água, emulsificação, aeração, e geleificação. As funcionalidades destes produtos não dependem somente da composição, mas também dos vários processos a que são submetidos durante o processo de fabricação (DE WIT, 1989). O processo de conversão do leite ou do soro líquido em pó altera a natureza e o comportamento dos componentes do leite. Fatores que afetam a capacidade de absorção de água das proteínas lácteas incluem: composição; estrutura proteica e conformação; carga superficial e polaridade; presença de

carboidratos, lipídeos e sais; pH; força iônica; temperatura; grau de desnaturação e agregação; e formação de ligação dissulfídicas (DAMODARAN, 1996; GARCIA *et al.*, 1997; FOX e MCSWEENEY, 2003).

O entendimento das interações sinérgicas envolvidas e a avaliação do efeito das MP como ingredientes industriais ainda carece de um maior número de trabalhos buscando o desenvolvimento de uma melhor adequação da utilização destas proteínas dentro de cada perfil tecnológico desejado nas diversas linhas de processamento como, por exemplo, queijos processados. O entendimento da interação das MP proporciona à indústria alimentícia a obtenção de uma relação que possibilita melhor custo/benefício da utilização de cada tipo de proteína dentro das características desejadas no produto final, trazendo assim ao mercado produtos que utilizem como ingredientes tecnológicos diferentes combinações de sistemas proteicos em pó visando melhor aproveitamento da capacidade sinérgica das suas frações. Diante destas interações, o pH do meio apresenta-se como um grande interferente na intensidade e no tipo de reação ocorrida, influenciando na sinergia entre estas. A intensidade de desnaturação e a interação das diferentes proteínas ocorre de diferentes formas e intensidade quando se varia o valor de pH do meio em que estas se encontram (ANEMA, 2008). O desdobramento das frações proteicas das MP pode, direta e indiretamente, afetar as propriedades reológicas do sistema alimentar e impactar, positiva ou negativamente, na aceitação do consumidor de um produto lácteo.

O *Rapid Visco<sup>TM</sup> Analyser* (RVA<sup>TM</sup>) é um viscosímetro rotacional capaz de mensurar continuamente a viscosidade de uma amostra sob condições controladas de temperatura (BOOTH e BASON, 2007). É um instrumento com interface computacional, comumente utilizado para avaliar as propriedades intrínsecas à viscosidade dos amidos, cereais, massas e outros alimentos. A capacidade do RVA em suspender uma amostra no solvente, mantê-la em suspensão durante todo o teste e aplicar apropriada agitação que pode ser configurada conforme processo industrial, fazem com que o mesmo tenha grande valor em inúmeros processos de pesquisas. Ele é especialmente usual para testes de matérias que exigem relativos testes complexos, usando variações de temperatura e agitação, permitindo que o material demonstre as suas propriedades em relação à viscosidade. Este instrumento já vem sendo utilizado no desenvolvimento de produtos e também para examinar os efeitos do tratamento térmico em proteínas do leite, e a forma como as proteínas interagem com outros

ingredientes (METZGER *et al.*, 2002; PROW, 2004; KAPOOR *et al.*, 2004; KAPOOR *et al.*, 2005; PROW e METZGER, 2005; ONWULATA *et al.*, 2013).

Este trabalho vem avaliar a caracterização da variação de viscosidade durante a rampa de aquecimento de dispersões contendo diferentes proporções de WPC e MPC, em distintos valores de pH e condições térmicas. A avaliação das reações e interações provenientes da desnaturação térmica e interações proteicas ocorridas de forma sinérgicas foram realizadas através da interpretação de dez parâmetros analíticos relacionados à variação da evolução da viscosidade de arranque durante o início do processamento. Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral, a verificação da influência da variação nas proporções entre caseínas e proteínas do soro em misturas de SP em pó contendo WPC e MPC, nas propriedades físicas e reológicas destas bases para aplicação como ingredientes lácteos em diferentes valores de pH quando o processamento é simulado em analisador rápido de viscosidade.

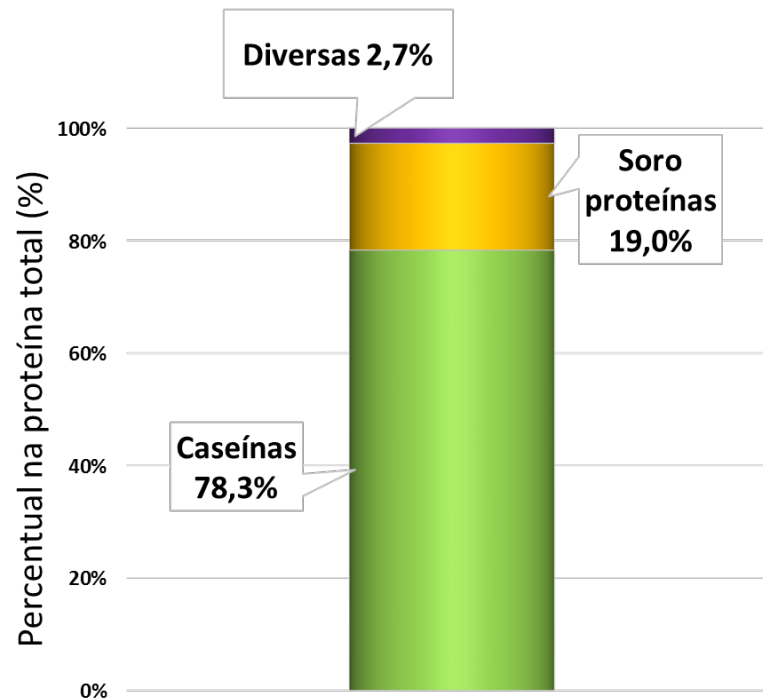


## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Amostras e preparo dos experimentos

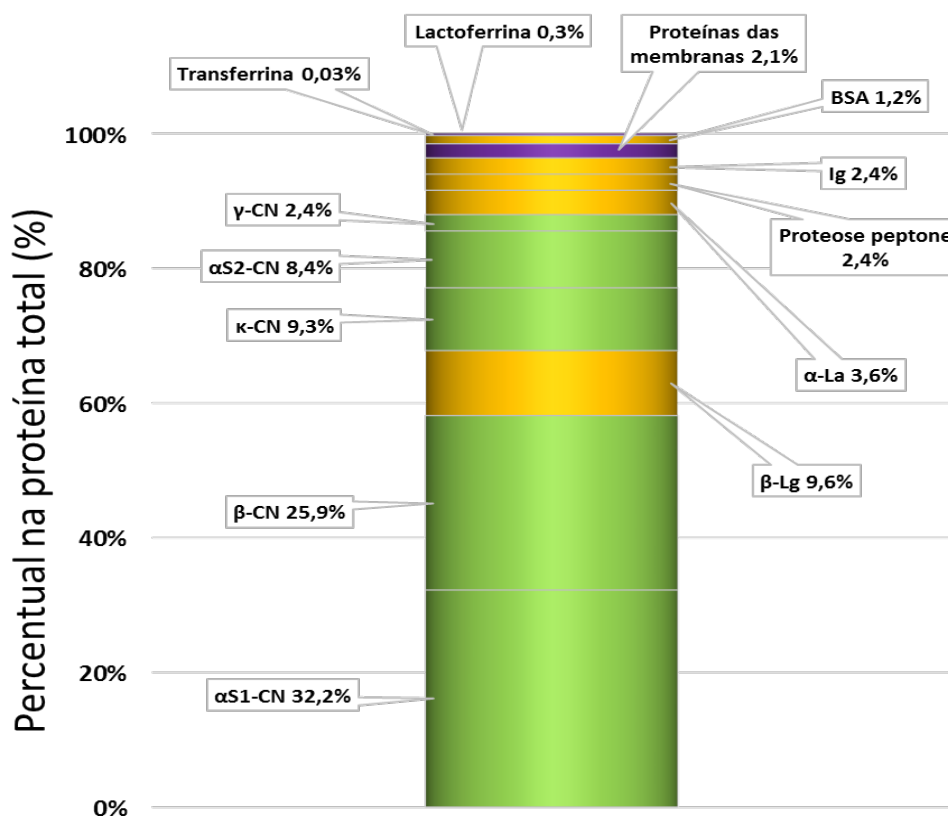
Foram selecionadas amostras industriais de WPC e MPC com referência comercial  $700 \text{ g.kg}^{-1}$  de proteína na base seca para a realização dos experimentos no RVA, devido ao interesse de se obter resultados aplicáveis ao uso dos mesmos como ingredientes lácteos. Os produtos foram gentilmente adquiridos e fornecidos pela empresa Gemacom Tech S/A tendo sido os mesmos importados dos EUA, devido ao fato de não existir produção no Brasil. A escolha do MPC é devido à sua composição proteica ser equivalente à do leite de origem, mantendo a proporção entre caseínas e proteínas do soro em aproximadamente 80/20 (Figuras 14 e 15). Já a escolha do WPC, se refere a um produto com contribuição exclusiva das proteínas do soro (Figura 16).

FIGURA 14 - Composição típica das proteínas do leite



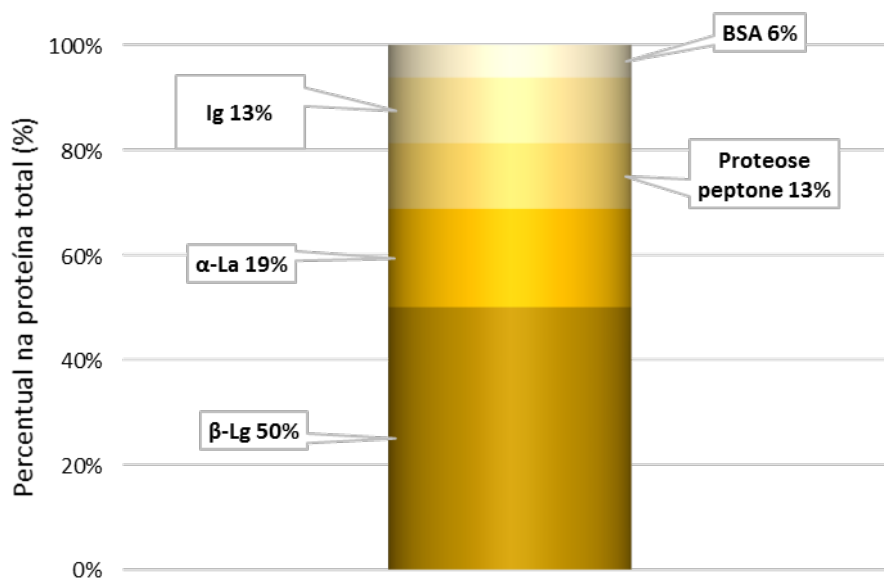
Fonte: ADAPTADO DE WALSTRA *et al.*, 2006, PELO PRÓPRIO AUTOR

FIGURA 15 - Composição típica das frações proteicas do leite



Fonte: ADAPTADO DE WALSTRA *et al.*, 2006, PELO PRÓPRIO AUTOR

FIGURA 16 - Composição típica das frações de soro proteínas do leite



Fonte: ADAPTADO DE WALSTRA *et al.*, 2006, PELO PRÓPRIO AUTOR

Os produtos foram analisados segundo os componentes de maior interesse para o estudo em questão. Assim, foram determinadas as seguintes análises para os produtos apresentados na Tabela 7:

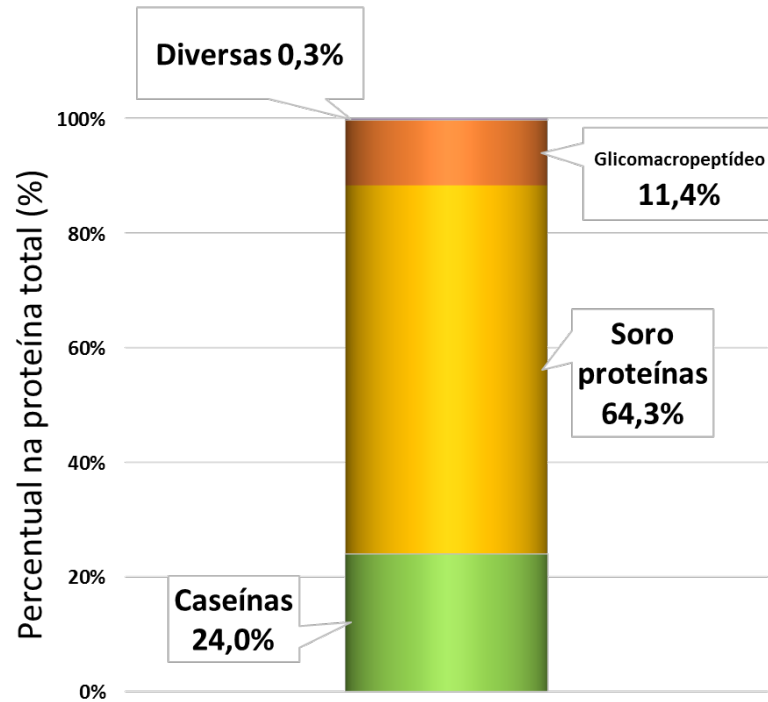
TABELA 7 – Análises físico-químicas dos concentrados proteicos

Análises	MPC	WPC
Gorduras totais	AOAC 989.05	AOAC 989.05
Umidade	AOAC 925.45	AOAC 925.45
Proteína total	AOAC 991.20	AOAC 991.20
Proteína na base seca	Cálculo	Cálculo
Lactose	Cálculo	Cálculo
RMF	AOAC 900.02	AOAC 900.02
pH	AOAC 981.12	AOAC 981.12

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

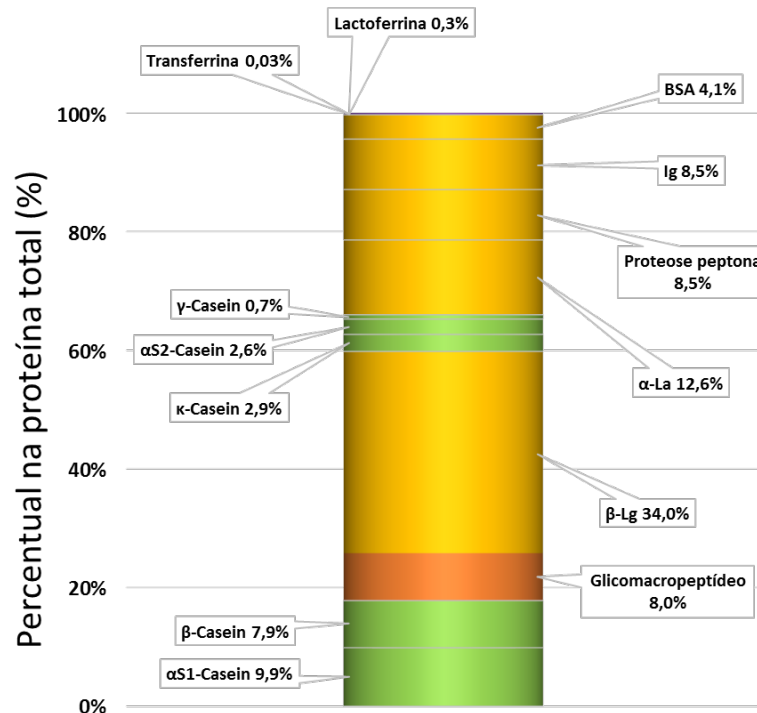
Com o objetivo de avaliar o efeito das diferentes proporções de MPC/WPC no comportamento reológico durante o processamento térmico, 5 amostras de SP em pó foram preparadas a partir de mistura a seco, conforme proporções apresentadas na Tabela 8. Optou-se por trabalhar na faixa de 0/100 até 30/70 de MPC/WPC, visando avaliar a influência da mudança gradual da proporção entre caseínas e soro proteínicas (~80/20), até próximo a uma inversão da proporção original do leite na amostra E (~24/76). A demonstração teórica deste SP está apresentada nas Figuras 17 e 18.

FIGURA 17 - Composição calculada das proteínas de um sistema proteico com 30% de MPC e 70% de WPC



Fonte: ADAPTADO DE WALSTRA *et al.*, 2006, PELO PRÓPRIO AUTOR

FIGURA 18 - Composição calculada das frações proteicas de um sistema proteico com 30% de MPC e 70% de WPC



Fonte: ADAPTADO DE WALSTRA *et al.*, 2006, PELO PRÓPRIO AUTOR

TABELA 8 – Proporções de MPC e WPC nas amostras de sistemas proteicos em pó preparados por mistura a seco

MPC/WPC (%)	Sistemas proteicos - SP				
	A	B	C	D	E
	0/100	7,5/92,5	15/85	22,5/77,5	30/70

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Conforme recomendação de Bennet *et al.* (2007), todas as amostras foram previamente hidratadas por 12 horas antes de serem submetidas ao RVA. Os ensaios foram realizados em duplicatas réplicas autênticas das amostras utilizando água como solvente, juntamente com hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ou ácido láctico 90% m.v<sup>-1</sup> para ajuste do pH. Todas as pesagens foram realizadas diretamente no copo de ensaio do RVA sempre calculando a dosagem para obter a concentração de 0,25g de base seca por grama de água (g base seca/g água) e quantidade final aproximada em 25,0 g por teste. Os produtos desidratados foram mantidos em embalagens herméticas devido às características higroscópicas das amostras, evitando assim absorção de umidade. Antes do preparo dos ensaios, análises de umidade foram feitas para se obter o cálculo exato da quantidade de amostra a ser utilizada devido a sua concentração de base seca. Para garantir a completa uniformização das soluções a serem analisadas, a rotação do RVA foi configurada para 104,7 rad.s<sup>-1</sup> (1000 rpm) durante os primeiros 60 segundos, a uma temperatura constante de 30°C e 15,7 rad.s<sup>-1</sup> (150 rpm) para o restante do tempo. As soluções tiveram o pH ajustado para 5,5, 6,5 e 7,0, com variação máxima aceitável de ± 0,1 unidades de pH.

### 5.2.2 Parâmetros do *Rapid Visco<sup>TM</sup> Analyser (RVA)*

Dois níveis de processamento térmico (médio e alto) foram utilizados para simular diferentes processamentos térmicos em cada experimento, sendo estes selecionados por serem os mais utilizados para o processamento de leites fermentados, *petit suisse*, creme de leite pasteurizado e bebidas lácteas aromatizadas pasteurizadas pelas indústrias de laticínios, 85°C por 15 minutos (médio) e 95°C por 5 minutos (alto). Para calcular o erro médio do modelo, também foram conduzidos experimentos a 90°C por 10 minutos considerado com ponto

central de  $X_1$  que, neste experimento, não apresenta interesse tecnológico como variável, sendo apenas ferramenta estatística do modelo.

O equipamento utilizado neste trabalho foi o modelo *Series 4* (RVA-4) da *Newport Scientific*. O software utilizado para coleta dos dados foi o *Thermocline for Windows*, TCW. As configurações das simulações de processamento térmico estão descritas nas tabelas 9, 10 e 11.

TABELA 9 – Configurações do processamento térmico nível médio (85°C por 15 minutos)

Tempo	Comando	Valor
0 min 00 s	Temperatura (°C)	30
0 min 00 s	Rotação (rad.s <sup>-1</sup> )	104,7
1 min 00 s	Rotação (rad.s <sup>-1</sup> )	15,7
1 min 00 s	Temperatura (°C)	30
16 min 00 s	Temperatura (°C)	85
31 min 00 s	Temperatura (°C)	85
46 min 00 s	Temperatura (°C)	30
50 min 00 s	Temperatura (°C)	30
50 min 01 s	Término	X

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

TABELA 10 – Configurações do processamento térmico ponto central (90°C por 10 minutos)

Tempo	Comando	Valor
0 min 00 s	Temperatura (°C)	30
0 min 00 s	Rotação (rad.s <sup>-1</sup> )	104,7
1 min 00 s	Rotação (rad.s <sup>-1</sup> )	15,7
1 min 00 s	Temperatura (°C)	30
17 min 40 s	Temperatura (°C)	90
27 min 40 s	Temperatura (°C)	90
44 min 20 s	Temperatura (°C)	30
48 min 20 s	Temperatura (°C)	30
48 min 21 s	Término	X

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

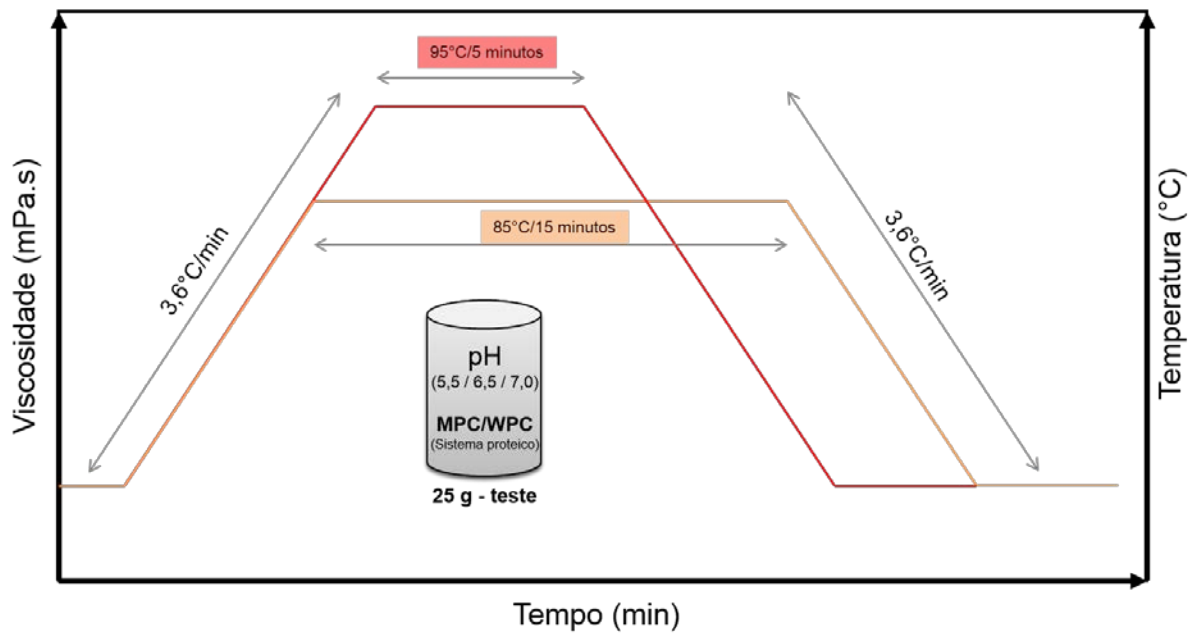
TABELA 11 – Configurações do processamento térmico nível alto (95°C por 5 minutos)

Tempo	Comando	Valor
0 min 00 s	Temperatura (°C)	30
0 min 00 s	Rotação (rad.s <sup>-1</sup> )	104,7
1 min 00 s	Rotação (rad.s <sup>-1</sup> )	15,7
1 min 00 s	Temperatura (°C)	30
19 min 00 s	Temperatura (°C)	95
24 min 00 s	Temperatura (°C)	95
42 min 00 s	Temperatura (°C)	30
46 min 00 s	Temperatura (°C)	30
46 min 01 s	Término	X

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para todos os três níveis de processamento térmico, o intervalo entre as leituras de viscosidade foi de 1 segundo. Os gradientes de aquecimento e resfriamento foram padronizados em 3,6°C por minuto. A figura 19 representa graficamente os parâmetros apresentados.

FIGURA 19 - Parâmetros configurados no RVA.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

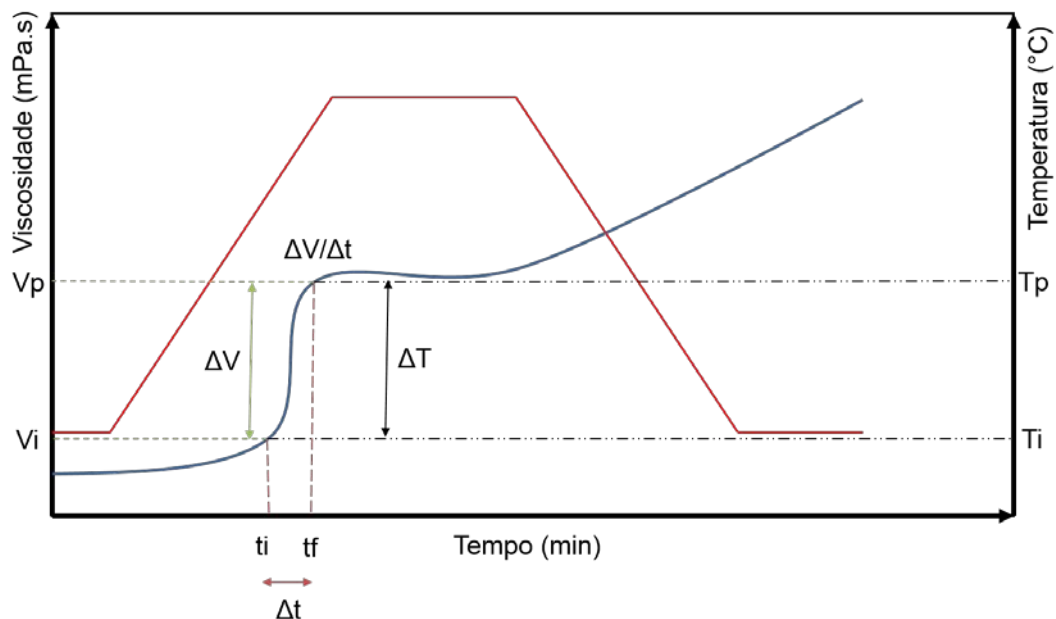
Os perfis viscográficos obtidos foram interpretados em relação a seis diferentes dados analíticos coletados e mais quatro calculados que estão descritos na Tabela 12. A figura 20 apresenta graficamente no perfil viscográfico os dados coletados e calculados.

TABELA 12 – Descrição dos dados coletados e calculados no perfil viscográfico

Dados	Identificação	Unidade
1	Viscosidade inicial – $V_i$	mPa.s
2	Viscosidade de pico – $V_p$	mPa.s
3	Viscosidade de arranque – $\Delta V$	mPa.s
4	Temperatura inicial do pico ( $T_i$ )	°C
5	Temperatura final do pico ( $T_p$ )	°C
6	Diferença de temperatura ( $\Delta T$ )	°C
7	Tempo inicial do pico ( $t_i$ )	Min
8	Tempo final do pico ( $t_f$ )	Min
9	Intervalo de tempo do pico ( $\Delta t$ )	Min
10	Relação viscosidade de arranque x Intervalo de tempo do pico ( $\Delta V / \Delta t$ )	mPa.s.min <sup>-1</sup>

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

FIGURA 20 - Parâmetros analíticos coletados: viscosidade inicial ( $V_i$ ), viscosidade de pico ( $V_p$ ), temperatura inicial de pico ( $T_i$ ), temperatura final de pico ( $T_p$ ), tempo inicial do pico ( $t_i$ ) e tempo final de pico ( $t_f$ ); parâmetros analíticos calculados: viscosidade de arranque ( $\Delta V$ ), diferença de temperatura ( $\Delta T$ ), intervalo de tempo do pico ( $\Delta t$ ) e relação viscosidade de arranque por intervalo de tempo do pico ( $\Delta V / \Delta t$ ).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



### 5.2.3 Planejamento misto 2x3x5

Para o estudo da avaliação entre a relação MPC/WPC, processamento térmico e pH nas condições simuladas de processamento térmico no RVA, foi realizado um planejamento misto 2x3x5. Os fatores selecionados estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – Fatores e níveis utilizados no planejamento misto 2x3x5

Fatores	Níveis				
	(-1)	(-0.5)	(0)	(0.5)	(1)
X <sub>1</sub> – Tratamento térmico	85°C/15min		90°C/10min		95°C/5min
X <sub>2</sub> – pH	5,5		6,5		7,0
X <sub>3</sub> – MPC / WPC (%)	0/100	7,5/92,5	15/85	22,5/77,5	30/70

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

MPC – concentrado proteico de leite; WPC – concentrado proteico de soro.

A Tabela 14 apresenta a matriz de planejamento, com as combinações dos níveis e dos fatores, onde os experimentos 31 a 35 são réplicas do ponto central. Os procedimentos foram realizados de forma aleatória por meio de sorteio.

TABELA 14 – Matriz do planejamento misto 2x3x5

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-0,5
3	-1	-1	0
4	-1	-1	0,5
5	-1	-1	1
6	-1	0	-1
7	-1	0	-0,5
8	-1	0	0
9	-1	0	0,5
10	-1	0	1
11	-1	1	-1
12	-1	1	-0,5
13	-1	1	0
14	-1	1	0,5
15	-1	1	1
16	1	-1	-1
17	1	-1	-0,5

Continua...

18	1	-1	0
19	1	-1	0,5
20	1	-1	1
21	1	0	-1
22	1	0	-0,5
23	1	0	0
24	1	0	0,5
25	1	0	1
26	1	1	-1
27	1	1	-0,5
28	1	1	0
29	1	1	0,5
30	1	1	1
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0

---

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 5.2.4 Análises dos resultados de RVA

Para a análise exploratória os resultados do RVA foram organizados em uma matriz 35x10 com os experimentos nas linhas e os seis dados coletados mais os quatro calculados dos perfis viscográficos nas colunas e, então, submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), a partir da matriz de covariância, utilizando PLS Toolbox v.2.9.2.9 (*Eigen Vector Research Inc.*, Wenatchee, WA), operando em ambiente MATLAB (R2007B, v. 7.5.0.342, Inc. A Mathworks, Natick, MA). Em seguida, os resultados foram pré-processados utilizando o dimensionamento para variância unitária (escala automática), visando corrigir as diferenças de escalas entre os resultados.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.3.1 Caracterização físico-química das amostras utilizadas no experimento

A composição das MP é um fator importante dentro do estudo reológico nas condições de processamento térmico. Com a determinação do teor de umidade de cada produto consegue-se utilizar uma quantidade fixa de sólidos totais a ser empregado em cada ensaio, eliminando assim a possibilidade de variação causada por diferentes teores de umidade. Assim, os cálculos de preparo das soluções utilizaram como referência o teor de sólidos totais de cada concentrado proteico, obtendo assim soluções referentes à matéria seca em água ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Outros dados importantes obtidos na caracterização química das amostras foram os teores de proteína e gordura. A proteína na base seca também é uma forma mais usual de trabalho com os concentrados proteicos, devido à característica de higroscopicidade dos mesmos e possibilidade de erro analítico devido ao ganho de umidade e, conseqüentemente, de massa do produto e diminuição percentual no teor de proteína total.

A tabela 15 mostra os teores de proteína, gorduras totais, umidade, lactose, resíduo mineral fixo e ainda o pH dos concentrados proteicos utilizados nas simulações de processamento térmico em RVA deste estudo, condizentes aos dados da bibliografia (SINGH, 2009).

TABELA 15 – Resultados das análises físico-químicas dos concentrados proteicos

Análises	WPC70	MPC70
Gorduras Totais ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	50,2	8
Umidade ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	50	58
Proteína Total ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	653,9	662,9
Proteína na base seca <sup>1</sup> ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	688,3	703,7
Lactose <sup>1</sup> ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	208,9	199,1
RMF ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	37	72
pH	6,4	6,9

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

<sup>1</sup> valores calculados.

Avaliando a tabela 16 é possível verificar a padronização do teor de proteína em todas as avaliações realizadas, onde partindo das concentrações proteicas apresentadas na tabela 15 e utilização da concentração de  $0,25\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de base seca em água na solução a ser utilizada no ensaio, obteve-se um teor constante de  $0,17\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína em cada grama de água utilizada na preparação da amostra.

**TABELA 16 – Teor de proteína nas soluções utilizadas para os ensaios no RVA**

Análises	A (0/100)	B (7,5/92,5)	C (15/85)	D (22,5/77,5)	E (30/70)
Proteína na base seca ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	688,3	689,5	690,6	691,8	692,9
Proteína na solução $0,25\text{g}\cdot\text{g}^{-1}(\text{g}\cdot\text{g}^{-1})^{**}$	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

\*\* valor calculado.

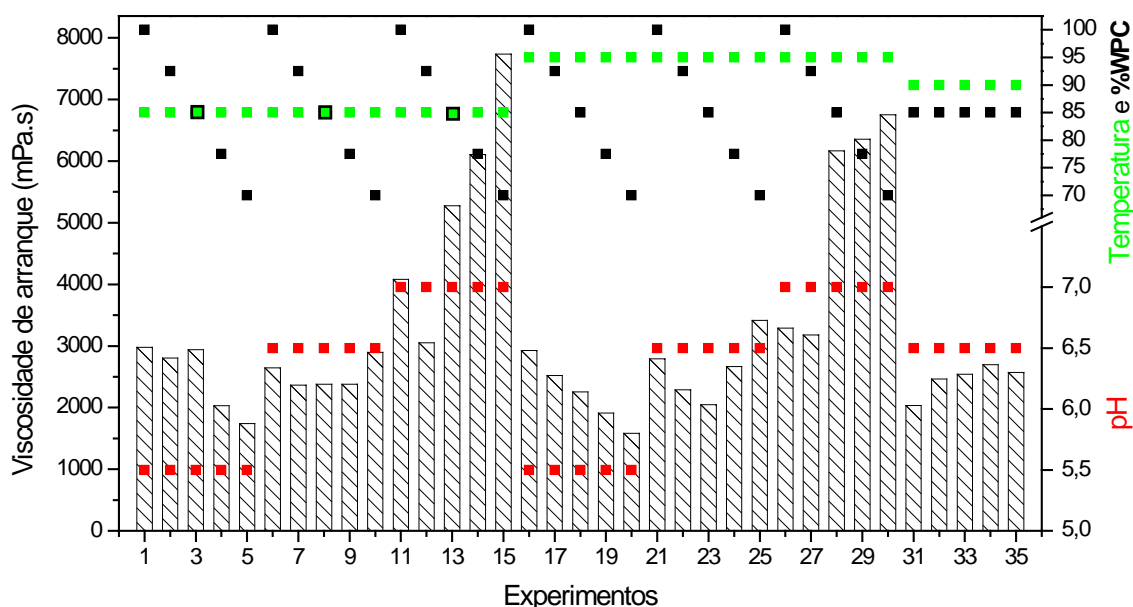
### 5.3.2 Caracterização analítica das rampas de viscosidade de arranque

O planejamento misto  $2 \times 3 \times 5$  foi realizado nas condições simuladas com as amostras e a tabela 17 apresenta a matriz de planejamento e os resultados.

Analisando os resultados da tabela 17, verifica-se que o maior valor de  $\Delta V$  obtido ( $7841\text{mPa}\cdot\text{s}$ ) foi com a amostra E em pH 7,0 e  $85^\circ\text{C}/15\text{min}$  (experimento 15) e o menor  $\Delta V$  ( $1581\text{mPa}\cdot\text{s}$ ) também foi com a amostra E em pH 5,5 e  $95^\circ\text{C}/5\text{min}$  (experimento 20). Para  $\Delta V/\Delta t$  o maior valor ( $2066\text{mPa}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^{-1}$ ) foi obtido com a amostra E em pH 7,0 e condição de  $95^\circ\text{C}/5\text{min}$  (experimento 30) e o menor  $\Delta V/\Delta t$  ( $323\text{mPa}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com a amostra E em pH 5,5 e condição de  $85^\circ\text{C}/15\text{min}$  (experimento 5). Estes resultados demonstram a influência destas variáveis na evolução da viscosidade.

A figura 21 apresenta de forma gráfica os resultados dos 35 experimentos em relação à viscosidade de arranque  $\Delta V$  demonstrando o efeito sinérgico entre os componentes das amostras C, D e E em pH 7,0 nos processamentos de média e alta temperatura, no incremento deste parâmetro reológico capturado pelo RVA.

FIGURA 21 - Gráfico dos 35 experimentos versus viscosidade de arranque -  $\Delta V$  (  $\backslash$  ) de acordo com a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) do tratamento térmico (  $\blacksquare$  ), concentração de WPC (%) nas amostras (  $\blacksquare$  ) e pH (  $\blacksquare$  ).



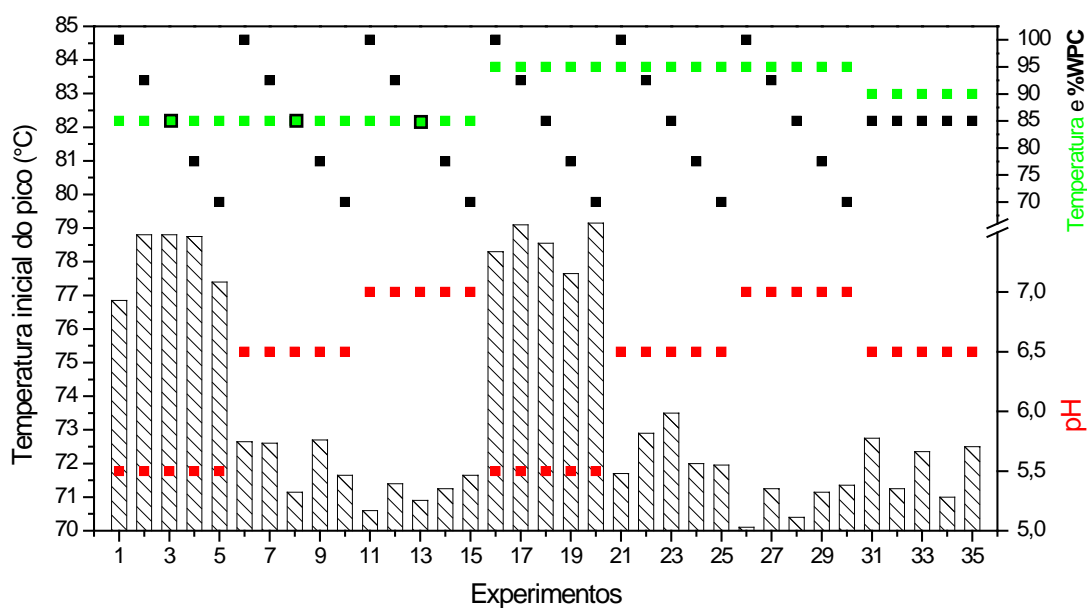
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

É possível deprender que o aumento da viscosidade está relacionado à diminuição da mobilidade das moléculas de água, devido a três fatores principais: aumento das interações eletrostáticas; maior exposição de grupos hidrofóbicos das proteínas; e formação de redes por interações proteicas. Podemos inferir que tais efeitos estão intimamente relacionados à desnaturação térmica das proteínas do soro dos SP durante o aquecimento e as interações que ocorrem de forma simultânea entre os constituintes destes sistemas em dispersão durante o processamento térmico. As diferenças nas viscosidades podem ser interpretadas também pelas mudanças de concentração das proteínas do soro e caseínas de acordo com a proporção de MPC/WPC das amostras preparadas, observando que maiores concentrações de MPC proporcionam maiores valores de viscosidade de arranque.

Alterações na conformação proteica podem afetar a termodinâmica de ligação com a água por alterar a disponibilidade de sítios polares ou sítios de hidratação. A transição da conformação globular compacta da molécula de proteína, para a conformação aleatória, resulta no aumento da área superficial disponível e exposição de peptídeos e cadeias laterais de aminoácidos (antes protegidos), desta forma, podem interagir com a água (KINSELLA, 1982).

A figura 22 apresenta os resultados dos experimentos em relação à temperatura inicial dos picos. É possível identificar que nos experimentos em pH 5,5 existe um aumento mínimo aproximado de 5°C em relação aos demais em pH 6,5 e 7,0, cuja discussão é apresentada na sessão 6.3.4.

FIGURA 22 - Gráfico dos 35 experimentos *versus* temperatura inicial do pico (°C) - Ti (▨) de acordo com a temperatura (°C) do tratamento térmico (■), concentração de WPC (%) nas amostras (■) e pH (■).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A figura 23 apresenta os perfis viscográficos dos experimentos das amostras A até E em pH, 5,5, 6,5 e 7,0 nos processamentos de interesse tecnológico deste estudo 85°C/15min e 95°C/5 min.

TABELA 17 – Matriz do planejamento misto 2X3X5 com os parâmetros analíticos coletados no RVA

Parâmetros analíticos coletados da rampa de aquecimento dos perfis viscosográficos													
#	X <sub>1</sub> (tratamento térmico)	X <sub>2</sub> (pH)	X <sub>3</sub> (MPC / WPC)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				Viscosidade inicial (Vi) mPa.s	Viscosidade de pico (Vp) mPa.s	Viscosidade de arranque (ΔV) mPa.s	Temperatura inicial do pico (Ti) °C	Temperatura final do pico (Tp) °C	Diferença de temperatura (ΔT) °C	Tempo inicial do pico (ti) min	Tempo final do pico (tf) min	Intervalo de tempo do pico (Δt) min	Relação viscosidade de arranque x Intervalo de tempo do pico (ΔV/Δt) mPa.s.min <sup>-1</sup>
1	85°C/15 min	5,5	A	184	3164	2980	76,85	85,00	8,15	13,82	18,05	4,23	704
2	85°C/15 min	5,5	B	184	2986	2802	78,80	85,00	6,20	14,33	18,70	4,37	642
3	85°C/15 min	5,5	C	7	2949	2942	78,80	85,05	6,25	14,33	19,67	5,34	551
4	85°C/15 min	5,5	D	122	2154	2032	78,75	85,00	6,25	14,33	19,22	4,88	416
5	85°C/15 min	5,5	E	63	1803	1740	77,40	85,00	7,60	13,95	19,33	5,38	323
6	85°C/15 min	6,5	A	97	2742	2645	72,65	85,05	12,40	12,67	16,25	3,58	738
7	85°C/15 min	6,5	B	123	2489	2366	72,60	84,90	12,30	12,65	16,40	3,75	631
8	85°C/15 min	6,5	C	69	2446	2377	71,15	85,05	13,90	12,28	16,10	3,82	623
9	85°C/15 min	6,5	D	96	2477	2381	72,70	85,10	12,40	12,68	16,10	3,42	697
10	85°C/15 min	6,5	E	41	2938	2897	71,65	84,95	13,30	12,42	16,35	3,93	737
11	85°C/15 min	7,0	A	149	4229	4080	70,60	85,00	14,40	12,10	16,23	4,13	987
12	85°C/15 min	7,0	B	118	3167	3049	71,40	82,85	11,45	12,35	15,42	3,07	993
13	85°C/15 min	7,0	C	43	5320	5277	70,90	84,00	13,10	11,90	15,48	3,58	1473
14	85°C/15 min	7,0	D	78	6183	6105	71,25	84,95	13,70	12,30	16,83	4,53	1347
15	85°C/15 min	7,0	E	105	7841	7736	71,65	84,90	13,25	12,42	16,37	3,95	1958
16	95°C/5min	5,5	A	185	3110	2925	78,30	88,45	10,15	14,40	17,18	2,78	1051
17	95°C/5min	5,5	B	182	2701	2519	79,10	88,05	8,95	14,63	17,05	2,42	1042

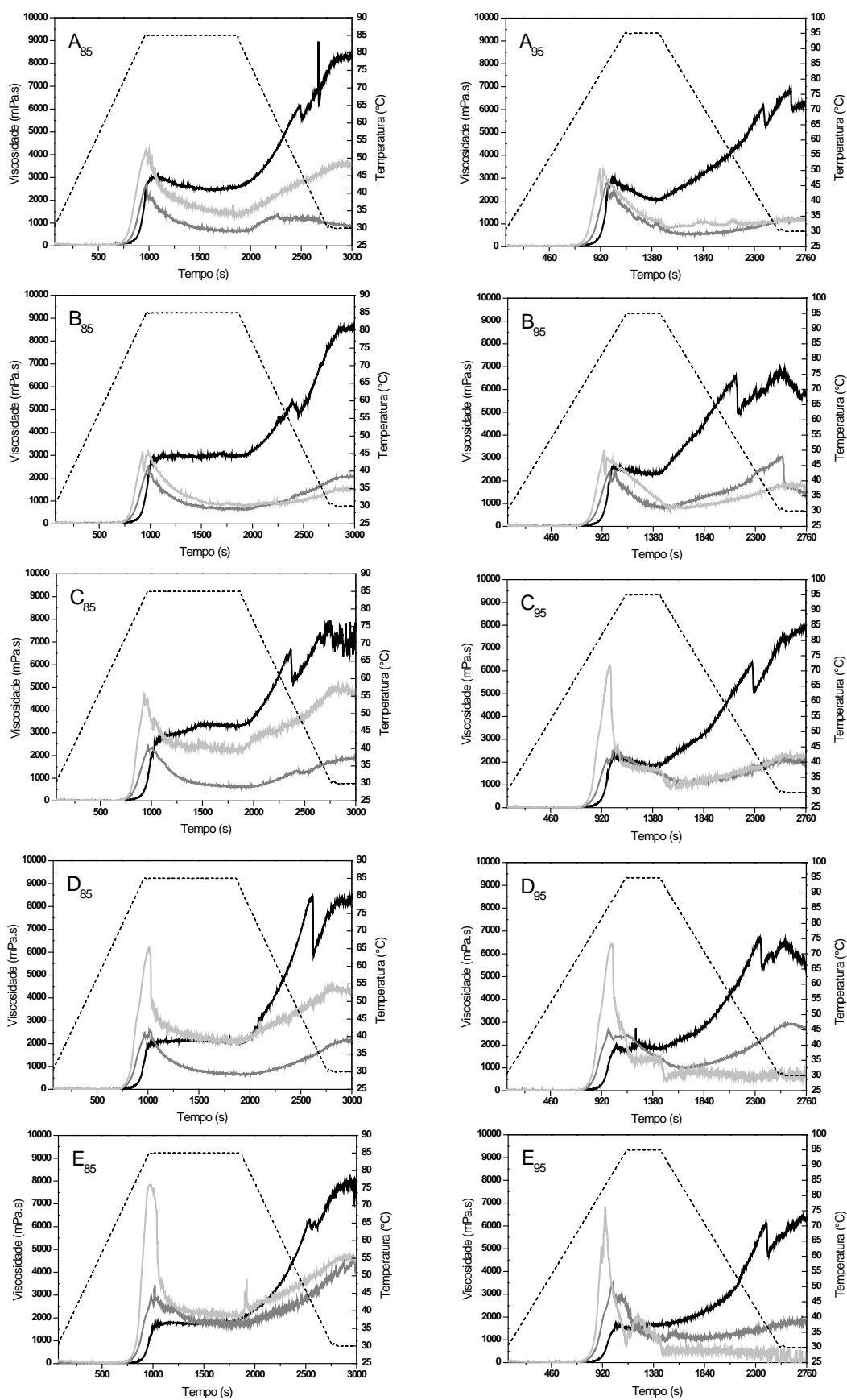
<b>18</b>	95°C/5min	5,5	C	146	2399	2253	78,55	88,15	9,60	14,47	17,08	2,62	861
<b>19</b>	95°C/5min	5,5	D	73	1983	1910	77,65	89,85	12,20	14,22	17,58	3,36	568
<b>20</b>	95°C/5min	5,5	E	127	1708	1581	79,15	89,15	10,00	14,63	17,40	2,77	571
<b>21</b>	95°C/5min	6,5	A	69	2861	2792	71,70	85,70	14,00	12,58	16,40	3,82	732
<b>22</b>	95°C/5min	6,5	B	131	2420	2289	72,90	85,85	12,95	12,90	16,47	3,57	642
<b>23</b>	95°C/5min	6,5	C	107	2150	2043	73,50	84,70	11,20	13,07	16,13	3,06	667
<b>24</b>	95°C/5min	6,5	D	49	2711	2662	72,00	85,50	13,50	12,65	16,37	3,72	716
<b>25</b>	95°C/5min	6,5	E	52	3467	3415	71,95	87,50	15,55	12,65	16,90	4,25	804
<b>26</b>	95°C/5min	7,0	A	110	3396	3286	70,10	81,45	11,35	12,12	15,27	3,15	1043
<b>27</b>	95°C/5min	7,0	B	106	3283	3177	71,25	82,65	11,40	12,45	15,58	3,13	1014
<b>28</b>	95°C/5min	7,0	C	54	6218	6164	70,40	86,40	16,00	12,20	16,62	4,42	1396
<b>29</b>	95°C/5min	7,0	D	62	6413	6351	71,15	87,55	16,40	12,43	16,93	4,50	1411
<b>30</b>	95°C/5min	7,0	E	102	6851	6749	71,35	83,20	11,85	12,48	15,75	3,27	2066
<b>31</b>	90°C/10min	6,5	C	113	2143	2030	72,75	84,85	12,10	12,92	16,23	3,31	613
<b>32</b>	90°C/10min	6,5	C	91	2553	2462	71,25	83,65	12,40	12,48	15,92	3,43	717
<b>33</b>	90°C/10min	6,5	C	132	2668	2536	72,35	83,65	11,30	12,77	15,92	3,15	804
<b>34</b>	90°C/10min	6,5	C	82	2773	2691	71,00	84,10	13,10	12,43	16,03	3,60	748
<b>35</b>	90°C/10min	6,5	C	136	2702	2566	72,50	83,65	11,15	12,83	15,93	3,10	829

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

MPC: Concentrado proteico de leite; WPC: concentrado proteico de soro; A: 0/100; B: 7,5/92,5; C: 15/85; D: 22,5/77,5; E: 30/7.



FIGURA 23 - Perfis viscográficos dos experimentos das amostras A até E (variável  $X_3$ ) nos tratamentos térmicos (variável  $X_1$ ) 85°C/15minutos ( $A_{85}$  –  $E_{85}$ ) e 95°C/5minutos ( $A_{95}$  –  $E_{95}$ ) nos diferentes pH (variável  $X_2$ ): 5,5 (—), 6,5 (—) e 7,0 (—).



### 5.3.3 Análise exploratória nas condições simuladas no RVA

Para melhor compreensão de todas as simulações realizadas no RVA empregadas no presente estudo realizou-se uma análise exploratória empregando a PCA. No modelo construído pela PCA foram escolhidos 4 componentes principais, com 96,22% da variância total capturada. A escolha das PC's foi baseada no gráfico de autovalores *versus* o número de componentes principais. Os dez parâmetros analíticos coletados e calculados nas rampas de aquecimento dos 35 perfis viscográficos obtidos no RVA foram utilizados para a composição da matriz 35x10. A Figura 24 mostra o gráfico de escores dos dois primeiros componentes, onde é possível notar a formação de três agrupamentos principais denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ . Além disso, a Figura 24 apresenta o gráfico de amostras *versus* scores CP1, sendo facilmente perceptível a identificação do CP1 em relação às características dos experimentos agrupados.

É possível identificar que o grupo  $\alpha$  é composto pelos experimentos 13, 14, 15, 28, 29 e 30. Estes são os experimentos com pH 7,0 das amostras C, D e E nos tratamentos térmicos 85°C/15 min e 95°C/ 5 min.

Também é possível identificar que o grupo  $\beta$  formado pelos experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 e 20. Estes são experimentos conduzidos em pH 5,5 de todas as amostras nos tratamentos térmicos 85°C/15 min e 95°C/ 5 min. A tabela 18 apresenta estas informações de forma resumida.

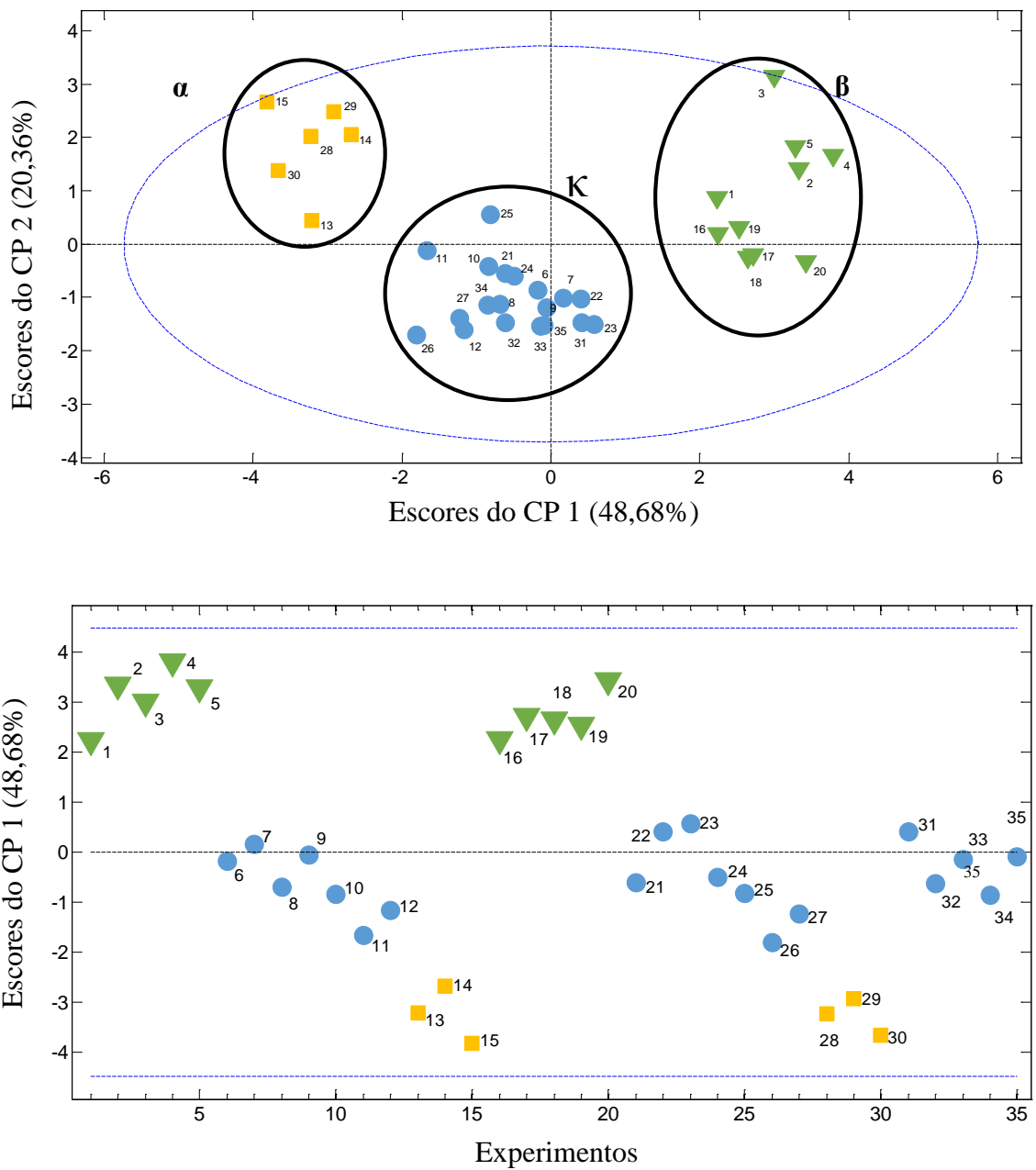
Na Figura 25 é apresentado o gráfico de pesos na CP1 de cada parâmetro analítico coletado e calculado, no qual é possível verificar que o intervalo de tempo do pico ( $\Delta t$ ), parâmetro 9, é o que tem menor influência no CP1.

Os experimentos agrupados em  $\alpha$  e  $\beta$  possuem comportamentos opostos durante a condição simulada no RVA. Enquanto  $\alpha$  apresenta as maiores tendências para a viscosidade de arranque  $\Delta V$  e  $\Delta V/\Delta t$ ,  $\beta$  apresenta as menores. Sendo possível atribuir este comportamento principalmente ao pH e a relação MPC/WPC. A demonstração gráfica da associação entre o planejamento misto 2x3x5 do experimento e os resultados da análise exploratória estão nas figuras 26 e 27.

No agrupamento  $\kappa$ , estão todos os experimentos em pH 6,5, independente do tratamento térmico e da composição do CP, além dos experimentos 11, 12, 26 e 27 das amostras A e B dos tratamentos térmicos 85°C/15 min e 95°C/5 min em pH 7,0, mostrando

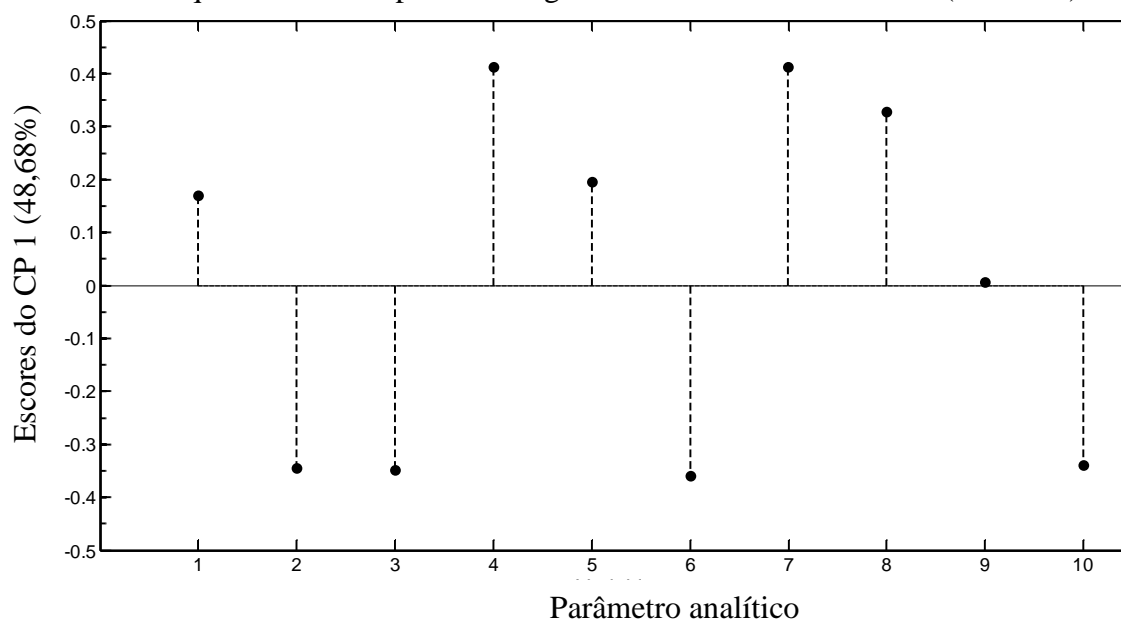
que o efeito sinérgico neste pH é diferenciado a partir da composição 15/85 MPC/WPC (amostras C, D, e E).

FIGURA 24 - Gráficos de escores CP1 *versus* CP2 e gráfico de amostras *versus* escores CP1 utilizando os 10 parâmetros analíticos coletados da rampa de aquecimento dos perfis viscográficos das amostras de WPC: grupo  $\alpha$  amostras C, D e E em pH 7,0 e tratamento térmico de 85°C/15min e 95°C/5min (■); grupo  $\beta$  amostras A, B, C, D e E em pH 5,5 e tratamento térmico 85°C/15min e 95°C/5min (▼); grupo  $\kappa$  demais amostras (●).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 25 - Gráfico dos pesos na PC 1 *versus* os 10 parâmetros analíticos coletados da rampa de aquecimento dos perfis viscográficos das amostras de WPC (variáveis).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

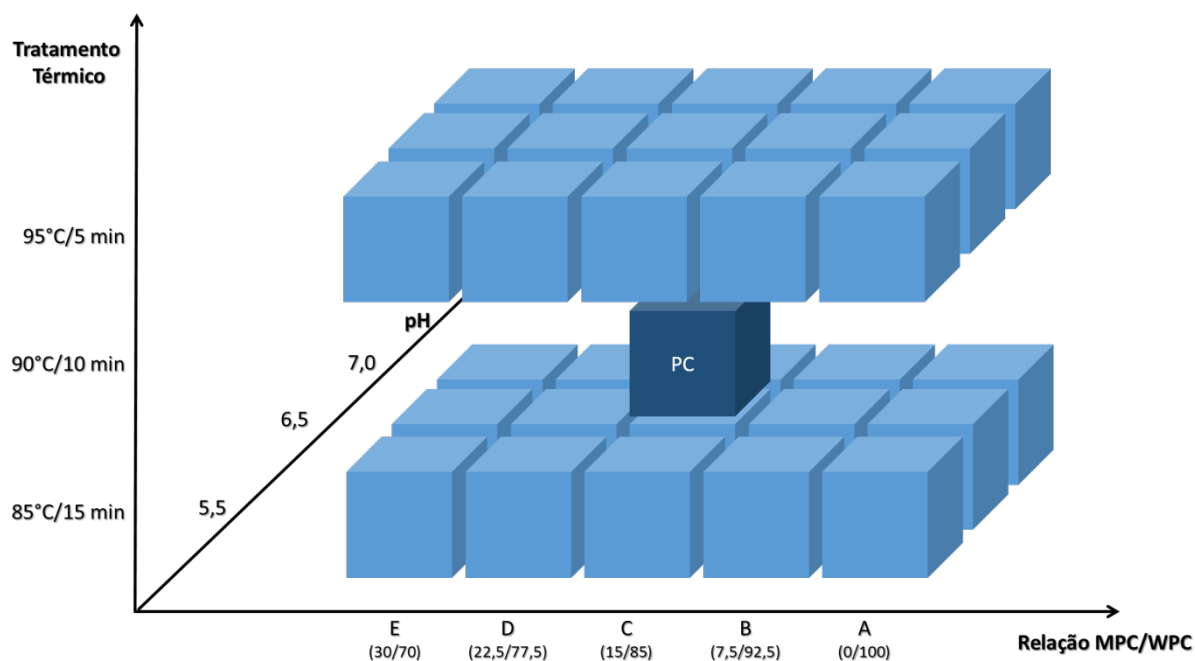
TABELA 18 – Resumo dos agrupamentos da análise exploratória

Agrupamento	Tratamentos térmicos	pH	Amostras
Grupo $\alpha$	85°C/15min	7,0	C
	95°C/5min		D
			E
Grupo $\beta$			A
	85°C/15min	5,5	B
	95°C/5min		C
			D
			E

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

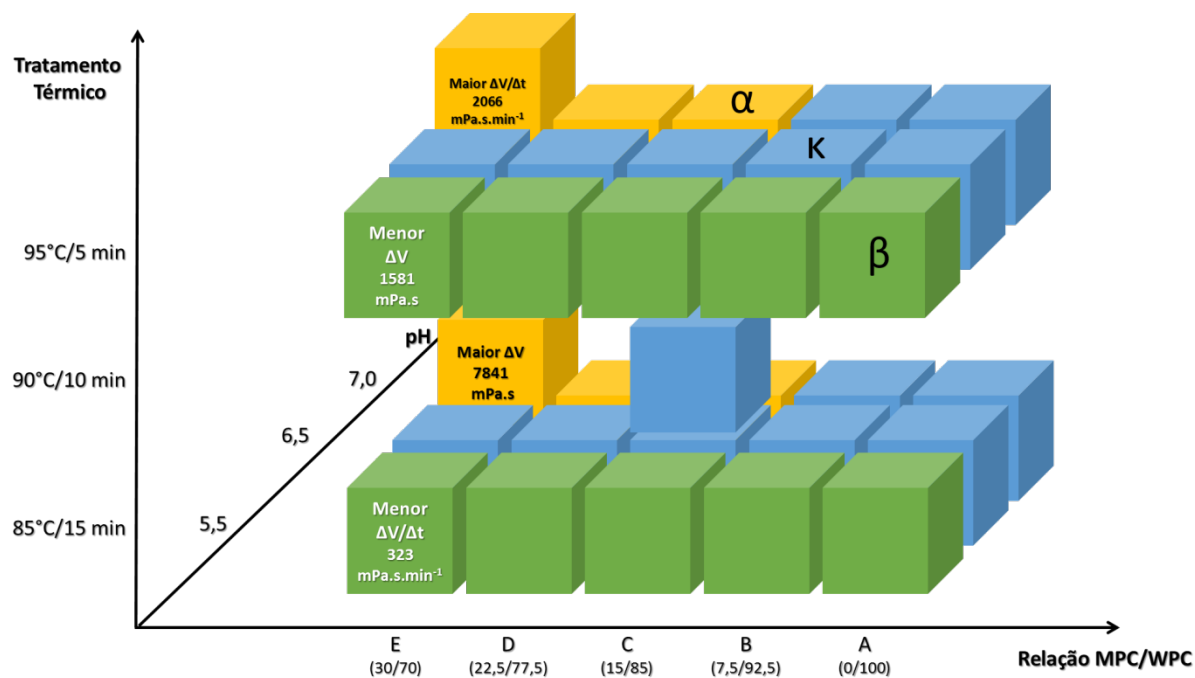
A: 0/100; B: 7,5/92,5; C: 15/85; D: 22,5/77,5; E: 30/70 – proporção de MPC/WPC respectivamente.

FIGURA 26 - Visualização gráfica do planejamento misto 2x3x5.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

FIGURA 27 - Visualização gráfica do planejamento misto 2x3x5 com os agrupamentos obtidos na análise exploratória.



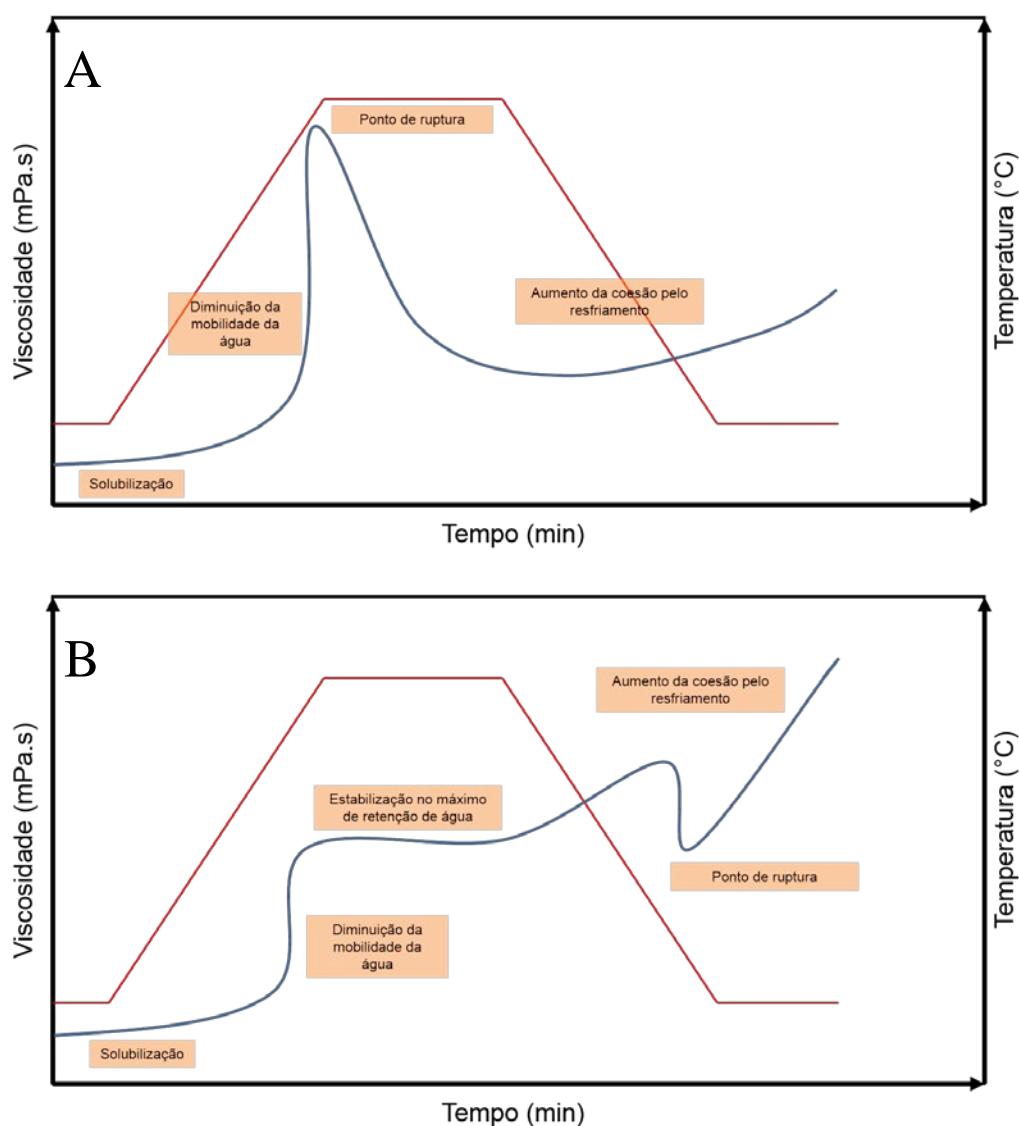
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 5.3.4 Interpretação e discussão dos comportamentos observados

Foram identificados dois principais perfis viscográficos dentro dos experimentos. Os mesmos são apresentados nas Figuras 28 A e B.

Com a análise exploratória é possível afirmar que o comportamento do perfil viscográfico das amostras na rampa de aquecimento tem dependência em relação à variação de pH, proporção entre MPC/WPC e o tratamento térmico aplicado nos níveis estudados.

FIGURAS 28 A e B - Interpretação do perfil viscográfico dos experimentos em  $\alpha$  com ponto de ruptura na rampa de aquecimento (A) e  $\beta$  com ponto de ruptura na rampa de resfriamento (B).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Assim, confirma-se o fato que quando as proteínas do soro sofrem aquecimento, reações competitivas e interdependentes ocorrem e a importância de cada reação é determinada pela condição de aquecimento e/ou composição/concentração de cada tipo de proteína e/ou ambiente químico. Considerando a composição do WPC, a reação de particular importância representa a desnaturação das soro proteínas e as interações destas com outras proteínas.

As características estruturais das proteínas em alimentos são afetadas por suas interações com água por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Assim, quando há maior proporção e ou exposição de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, as proteínas apresentam menor capacidade de hidratação do que quando é composta por aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas, que podem formar mais facilmente ligações de hidrogênio com a água (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Contudo, a água passa a apresentar menor mobilidade, pela exposição de grupos hidrofóbicos e, assim, ocorre o aumento da viscosidade. Dessa forma, as interações proteína-água afetam a estabilidade das moléculas e agrupamentos proteicos, como as micelas de caseína e as funcionalidades das proteínas em matérias-primas e produtos alimentícios (DAMODARAN, 1996).

As interações de vários grupos reativos, como tiol ou as porções hidrofóbicas expostas na superfície das moléculas de proteína, conduzem à formação de ligações intermoleculares covalentes ou não covalentes, que resultam em agregações proteicas e/ou polimerização. Essas mudanças moleculares alteram as características funcionais das proteínas como hidratação, solubilidade, viscosidade de soluções, formação de filmes, gelificação e adsorção na interface entre as fases aquosas e lipídicas (DAMODARAN, 1996).

O aumento rápido e expressivo da viscosidade das soluções durante o aquecimento no RVA, obtendo muitas vezes inclinações acentuadas de viscosidade, pode ser interpretado em relação à desnaturação das soro proteínas por serem consideradas como mudanças de cooperação: a ruptura de algumas das ligações no interior da molécula faz com que o restante dos enlaces se tornem menos estáveis e muitos se rompem simultaneamente. Isto explica porque a desnaturação ocorre em uma faixa muito estreita de temperatura e concentração (WALSTRA *et al.*, 2001).

Dannenberg e Kessler (1998) mostraram como a cinética de desnaturação térmica das proteínas do soro possui efeito significativo em temperaturas acima de 90 °C, principalmente na  $\beta$ -LG e  $\alpha$ -LA. A alteração na conformação proteica aumenta a área superficial disponível e expõe peptídeos e cadeias laterais de aminoácidos antes escondidos que, desta forma, podem

interagir com a água aumentando assim a viscosidade. Desta forma, pode-se atribuir o aumento da viscosidade das soluções durante o processamento à desnaturação térmica das proteínas do soro e suas interações mútuas ou com micelas de caseína, quando presentes no meio (amostras B até E).

Neste estudo, é possível inferir que o comportamento observado nos experimentos classificados em  $\alpha$ , tiveram grande influência devido ao ambiente químico (pH 7,0), pois é possível perceber que a velocidade do incremento de viscosidade do pico e a presença do ponto de ruptura (PR) estão relacionados a uma intensa desnaturação proteica, justificada pela maior ionização e atividade dos grupos  $-SH$  das cisteínas, em promover o desdobramento das conformações das proteínas globulares do soro durante o tratamento térmico. Na cadeia de peptídeo seu  $pK$  é de cerca de 9,5 a 25°C. Isto significa que a um pH de 6,1, 6,4, e 6,7, em média, 0,04%, 0,08% e 0,16% dos grupos, respectivamente, estão dissociado (WALSTRA *et al.*, 2006). Ao longo da faixa de pH 5,5-7,0 trabalhada no experimento, a carga líquida é negativa na maior parte das proteínas do soro do leite e aumenta com o pH (LAW e LEAVER, 2000). No pH 7,0, há uma forte presença de carga líquida negativa, proporcionando repulsão eletrostática intramolecular, que promove o desdobramento das moléculas de  $\beta$ -LG (principalmente) e  $\alpha$ -LA com grande velocidade durante o aquecimento, permitindo ainda a ocorrência de agregações resultantes de ligações intermoleculares hidrofóbicas, que podem levar à precipitação e, com isto, à perda da homogeneidade no compartimento de amostra do RVA indicada pela brusca queda de viscosidade, aqui identificada como PR.

Comportamento oposto pode ser observado nas amostras classificadas em  $\beta$ , pois devido ao pH 5,5, a desnaturação é retardada, comprovada pela maior temperatura do início dos picos, e as interações de agregações ocorrem de forma mais lenta, sendo perceptível pelos platos de viscosidade após o incremento de viscosidade.

Esta mesma avaliação foi observada por Law e Leaver (2000), que destacaram que a reação de desnaturação da  $\beta$ -LG e  $\alpha$ -LA é acentuada quando o pH do leite é incrementado e retardada quando o pH é reduzido. Outra observação em relação a este grupo de proteína é o aumento das interações hidrofóbicas ocorridas após a desnaturação o que representa um grande fator de impacto na perda de solubilidade destas proteínas.



#### 5.4 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, foi possível observar a influência do efeito sinérgico das proteínas lácteas existente na composição de diferentes sistemas proteicos obtidos da combinação de MPC e WPC, pela interpretação das diferentes respostas reológicas capturadas durante a rampa de viscosidade de arranque pelo RVA, durante processamento térmico sob a influência de diferentes valores de pH.

O pH 5,5 tem influência na temperatura de início do pico de viscosidade, elevando a mesma em aproximadamente 5°C, quando comparada ao pH 6,5 e 7,0, demonstrando clara influência deste parâmetro em relação às reações e interações proteicas dos SP submetidos a diferentes tratamentos térmicos.

O tipo de proteína presente nos SP influencia a resposta reológica capturada no RVA, obtendo-se valores mais altos de viscosidade de arranque no produto 30/70 em relação à proporção percentual de MPC/WPC em pH 7,0. De forma oposta, este mesmo produto apresenta os menores valores de viscosidade de arranque, porém em pH 5,5.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEMA, S.G. On heating milk  $\kappa$ -casein from the casein micelles can precede interactions with the denatured whey proteins. In: *Journal of Dairy Research*, 75, p. 415–421, 2008.

BALDWIN, A; PEARCE, D. Milk powder. In: ONWULATA, C. *Encapsulated and powdered foods*. Boca Raton, New York: Taylor e Francis, 2005. p.387-434.

BENNETT, L; POLLARD, A; ROSS, A.S. Characterizing the properties of protein-rich ingredients and foods. In: CROSBIE, G. B.; ROSS, A. S., eds. *The RVA Handbook*. United States of America: AACC International, 2007. cap. 8, p.95-112.

BOOTH, R; BASON, M. Principles of operation and experimental techniques. In: CROSBIE, G. B; ROSS, A. S., eds. *The RVA Handbook*. United States of America: AACC International, 2007. cap. 1, p.1-17.

DAMODARAN, S. Functional properties. In: NAKAI, S.; MODLER, H. W. *Food proteins: properties and characterization*. New York: VCH, 1996. p.167-234.

DANNENBERG, F.; KESSLER, H.G. Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. In: *J Food Sci*, v.53, p.258-263. 1998.

DE WIT, J.N. Functional properties of whey proteins. In: FOX, P.F. *Developments in food proteins*. London, Elsevier Science Publishers, 1989. v.4, p.285-321.

DE WIT, J.N; KLARENBECK, G; ADAMSE, M. Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and compositions. In: *Neth Milk Dairy J*, v.40, p.41-56, 1996.

FOX, P.F; MCSWEENEY, P.L.H. *Advanced Dairy Chemistry*. 3.ed. New York, Kluwer: Academic/Plenum Publisher, 2003. v.1.

GARCIA, M. C. *et al. Composition and characterization of soybean and related products*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Boca Raton, v. 37, n. 4, p. 361-391, jun. 1997.

KAPOOR, R; LEHTOLA, P; METZGER, L.E. Comparison of pilot-scale and rapid visco analyzer process cheese manufacture. In: *J. Dairy Sci*. 2004; 87: 2813–2821.

KAPOOR, R; METZGER, L.E. Small-scale manufacture of process cheese using a Rapid Visco Analyzer. In: *J. Dairy Sci*. 2005; 88: 3382–3391.

KINSELLA, J.E. Milk proteins: physico-chemical and functional properties. In: *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, v.21, p.197-262, 1984.

KINSELLA, J. E. Relationships between structure and functional properties of food proteins. In: FOX, P. F; CONDON, J. J. *Food proteins*. New York: Applied Science, 1982. p. 51-103.

LAW, A.J.R; LEAVER, J. Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk. In: *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 48, 672-679. 2000.

LAW, A.J.R.; LEAVER, J. Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk. In: *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 48, 672-679. 2000.

METZGER, L.E; KAPOOR, R; ROSENBERG, L.A; UPRTI, P. RVA: Process cheese manufacture. Aust. In: *J. Dairy Technol.* 2002; 57: 136.

ONWULATA, C.I; TUNICK, M.H; THOMAS-GAHRING, A.E. Rapid Visco Analysis of food protein pastes. In: *Journal of Food Processing and Preservation*, DOI:10.1111/jfpp.12188, 2013.

ORDÓÑEZ, J.A.P; CAMBERO, M.I.R; FERNÁNDEZ, L.A. *et al. Tecnologia de Alimentos*: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005. 294p.

PROW, L. A. *Development of a melt test for process cheese spread and process cheese product using the rapid visco analyzer (RVA)*. M.S. Thesis, University of Minnesota, St. Paul, 2004.

PROW, L.A; METZGER, L.E. Melt analysis of process cheese spread or product using a rapid visco analyzer. In: *J. Dairy Sci.* 2005; 88: 1277–1287.

SINGH, H. Protein interactions and functionality of milk protein products. In: CORREDIG, M. ed. *Dairy-derived ingredients*: food and nutraceutical uses. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, 2009. cap. 25, p.644-674.

WALSTRA, P; WOUTERS, J.T.M; GEURTS, T.J. *Dairy science and technology*. New York: CRC, 2006, p.229-232.

WALSTRA, P; GEURTS, T. J; NOOMEN, A; JELLEMA, A; VAN BOEKEL, M. A. J. S. *Dairy Technology*. Principles of milk properties and processes. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001. 730 p.

## 6 - CONCLUSÕES GERAIS

Industrialmente, é de grande importância o controle de qualidade de uma proteína láctea com parâmetros quantitativos bem definidos. Porém, também se faz imperativo o conhecimento de características complementares dos produtos, pois estas podem sofrer alterações pelo tipo de processamento na obtenção, sazonalidade e tempo de estocagem. Em muitos casos, a melhor opção é trabalhar com combinações de diferentes proteínas, obtidas por processos diferenciados que, quando combinadas, potencializam as suas propriedades industriais.

A espectroscopia Raman associada à quimiometria foi capaz de identificar as mudanças relacionadas à estrutura da lactose durante o processo produtivo e também no armazenamento do WPC devido às mudanças espectrais que ocorrem na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1200$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas aos modos vibracionais da lactose cristalina sendo, assim, uma emergente ferramenta a ser utilizada como controle de qualidade destes produtos. A classificação dos WPCs quanto à estrutura da lactose permite não só inferir sobre a sua condição de processo, mas também sobre a sua condição de estocagem – parâmetros de extrema importância econômica e de padronização do produto.

As propriedades reológicas dos alimentos dependem da interação da água com outros constituintes, especialmente com as macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos. O estudo da viscosidade de proteínas permite determinar a relação entre as interações das moléculas proteicas, as funcionalidades das mesmas e também as propriedades de processamento, as quais impactam diretamente na configuração das linhas de industrialização, no gasto energético e na otimização do uso das matérias-primas. A interpretação das propriedades viscográficas em *RVA* das proteínas lácteas combinadas (concentrado proteico de leite e concentrado proteico de soro), permitiu identificar os atributos tecnológicos proteicos intrínsecos mostrando a clara influência do pH 5,5 e 7,0 no incremento de viscosidade e também na temperatura inicial do pico.

## 7 - CONSIDERAÇÕES FINAS

O presente trabalho apresenta características singulares tanto no campo da ciência como no campo da inovação tecnológica industrial ao utilizar as relações institucionais público-privadas no desenvolvimento do projeto.

Na perspectiva da ciência, podemos ressaltar o caráter pioneiro do trabalho em utilizar a espectroscopia Raman como ferramenta para caracterizar o estado físico da lactose em concentrados proteicos de soro, durante o processo produtivo e também na estocagem. Há de se ressaltar que os resultados obtidos no trabalho demonstram um grande potencial para o desenvolvimento e utilização de instrumentos espectroscópicos específicos embarcados com a técnica Raman, com foco de utilização na indústria para o controle de qualidade de barreira (recebimento e expedição de materiais) e também de processo.

O trabalho proporciona também uma nova área de estudos para o sinergismo proteico ao utilizar 10 parâmetros analíticos para caracterizar o perfil viscográfico da rampa inicial de aquecimento de sistemas proteicos compostos por WPC : MPC em Analisador Rápido de Viscosidade. É imperativo mencionar que poucas ferramentas analíticas estão disponíveis para a compreensão dos efeitos do processamento sobre estes ingredientes amplamente empregados pelas indústrias de alimentos. O trabalho revelou um olhar singular na forma de explorar as características complementares do concentrado proteico de soro e suas propriedades tecno-funcionais quando em novos sistemas proteicos.

Este estudo abre caminhos para que os efeitos de variáveis como pH, gradientes de aquecimento e resfriamento, sistemas proteicos obtidos por diferentes frações e tempo de hidratação possam ser examinados em trabalhos futuros.

Na perspectiva da inovação tecnológica, podemos ressaltar também que a construção das relações institucionais, com base no modelo de compartilhamento de laboratórios, utilizada neste trabalho, mostrou-se um sistema amplamente viável, eficiente e customizado, para o desenvolvimento de tecnologias ainda não implantadas no parque industrial Brasileiro.

Tendo em vista que as abordagens do presente estudo e seus desdobramentos ocorrem em uma linha de pesquisa ainda em crescimento, o desenvolvimento deste projeto fortalece e amplia a linha de pesquisa em química de alimentos do curso de Pós-Graduação em Química da UFJF, sendo um estímulo à ampliação de um grupo de trabalho interinstitucional e multidisciplinar, em que diferentes abordagens, modelos e fundamentos contribuam para a

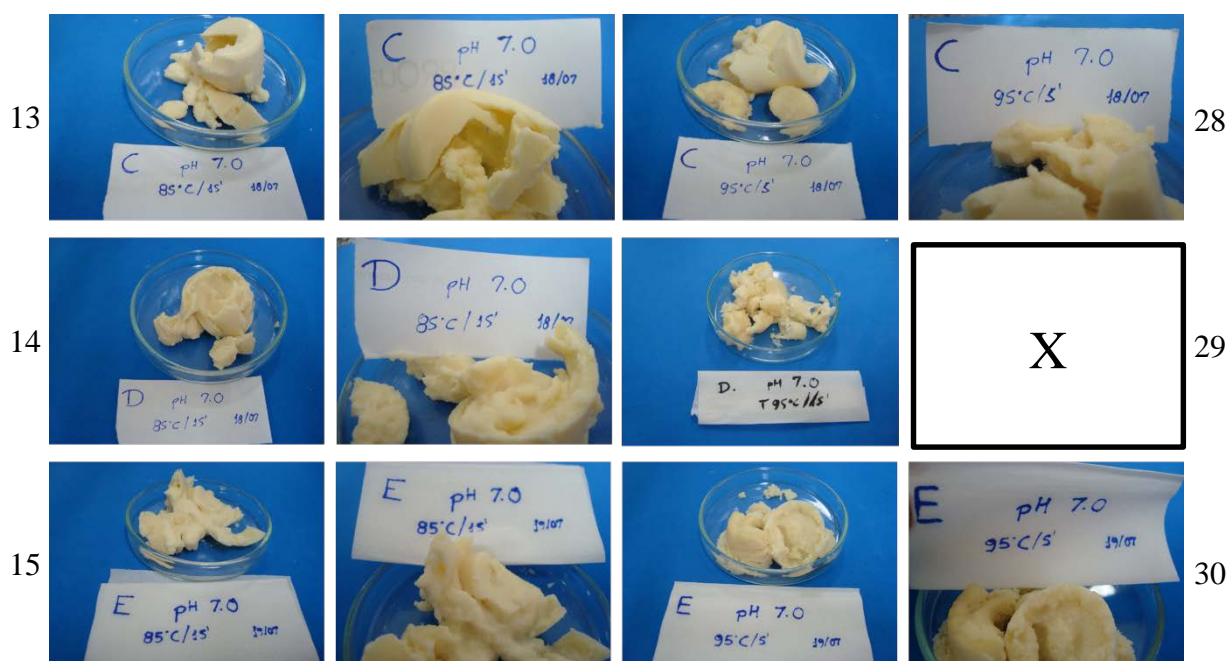
compreensão dos fenômenos relacionados às funcionalidades dos concentrados proteicos lácteos.

Por fim, esta área de pesquisa ainda é bastante carente tanto em termos de recursos humanos quanto de investimentos (tanto por parte dos órgãos de fomento quanto das instituições privadas), o que possibilita vislumbrar um futuro a curto e médio prazo muito interessante, no que tange às perspectivas de desenvolvimento de novas tecnologias, tanto de produção de novos materiais lácteos quanto de análise dos mesmos. Isto posto, a grande contribuição deste trabalho vem nesta direção, pois apresentamos tanto novos produtos, no que diz respeito aos sistemas proteicos aqui analisados, quanto da análise dos mesmos, via espectroscopia Raman ou por reologia.

## ANEXO A

Fotografias das dispersões dos sistemas proteicos em água dos experimentos 13, 14, 15, 28, 29 e 30, agrupados em  $\alpha$ , após o tratamento térmico em analisador rápido de viscosidade.

**Figura 1A** - Fotografias dos produtos após os experimentos em RVA, agrupados em  $\alpha$  no PCA: 13, 14, 15, 28, 29 e 30.

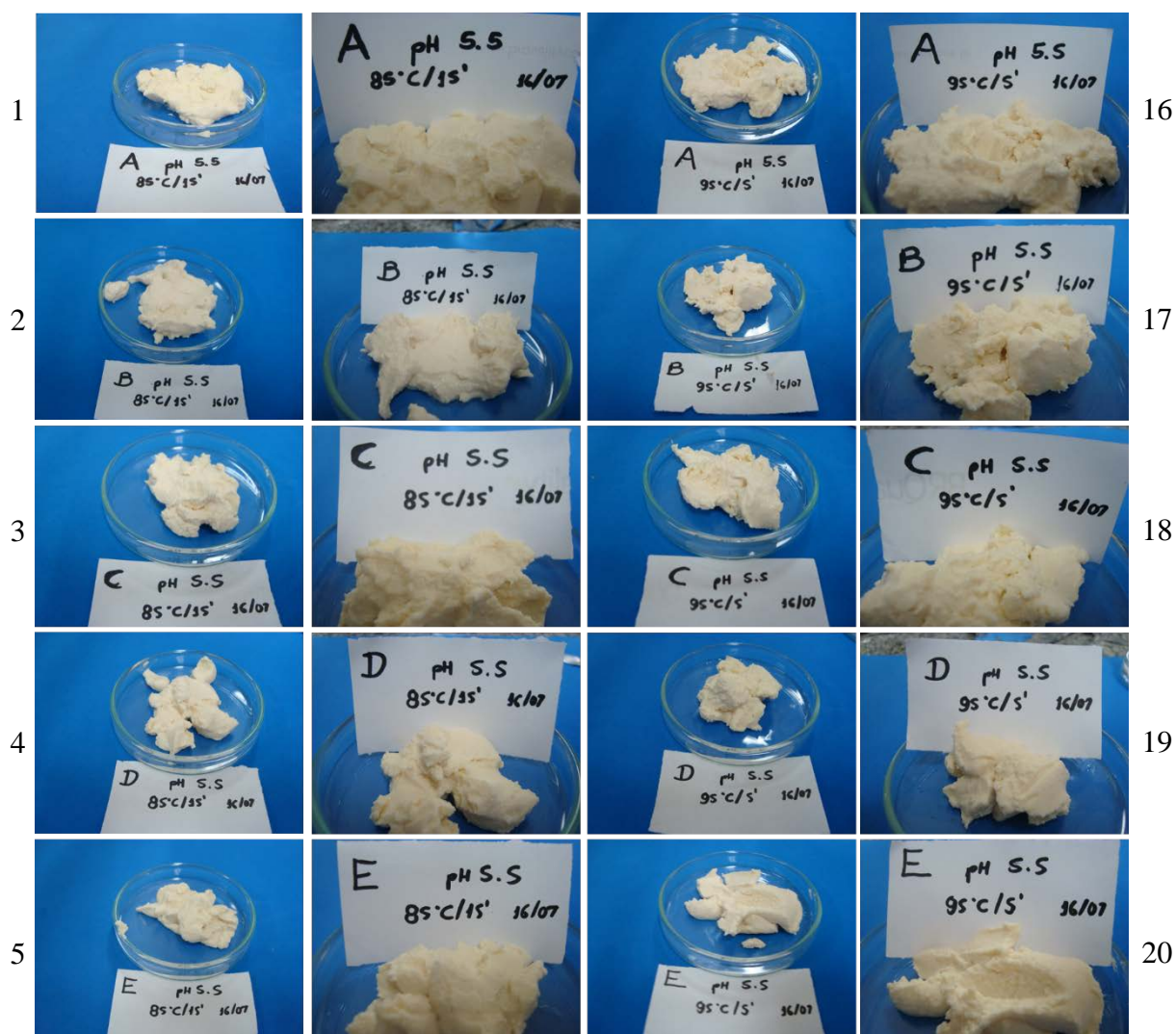


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

## ANEXO B

Fotografias das dispersões dos sistemas proteicos em água dos experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 e 20, agrupados em  $\beta$ , após o tratamento térmico em analisador rápido de viscosidade.

**Figura 2B** - Fotografias dos produtos após os experimentos em RVA, agrupados em  $\beta$  no PCA: 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 e 20.



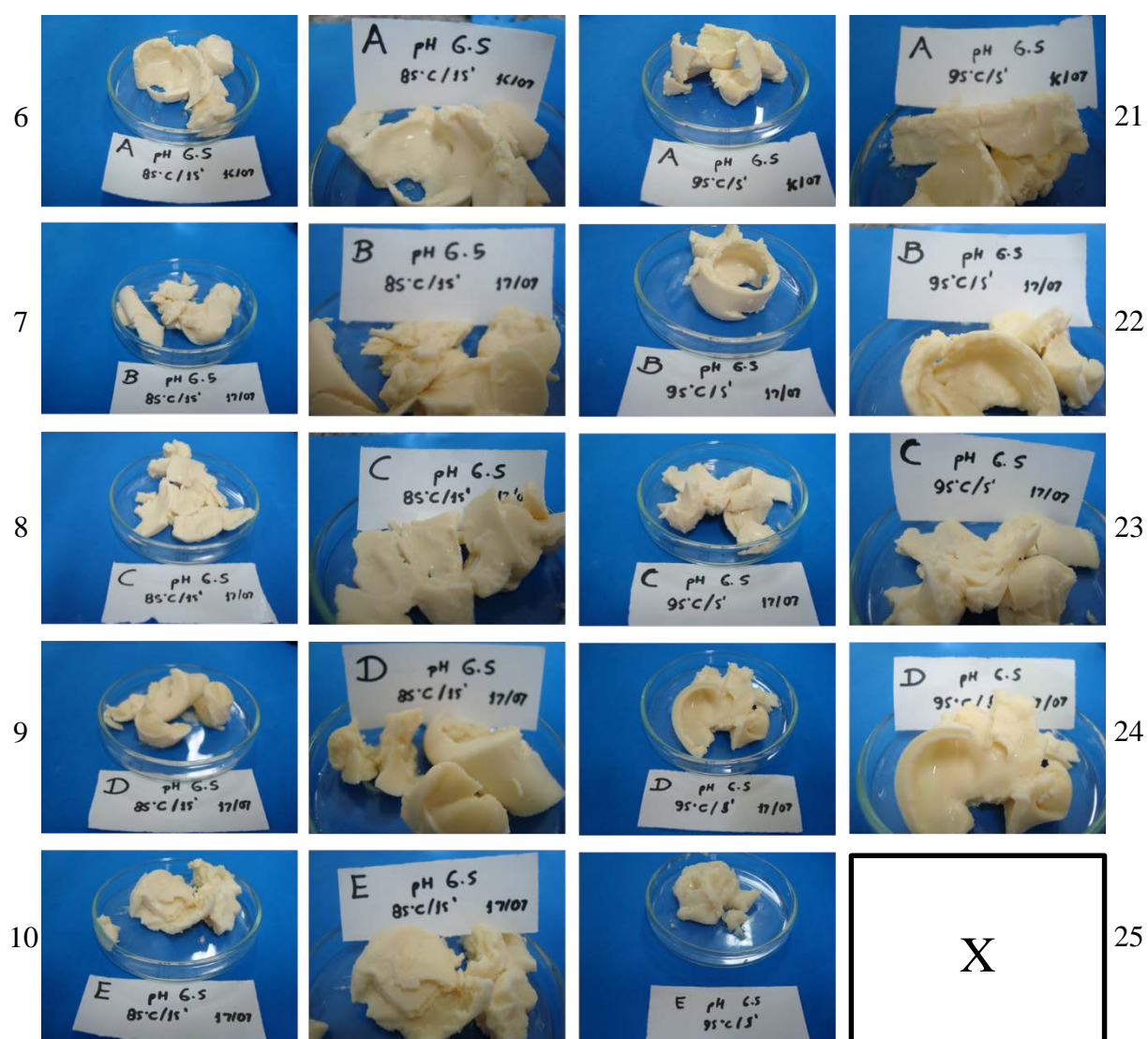
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



## ANEXO C

Fotografias das dispersões dos sistemas proteicos em água dos experimentos 6, 7, 8, 9, 10, 21, 22, 23, 24 e 25, agrupados em  $\kappa$ , após o tratamento térmico em analisador rápido de viscosidade.

**Figura 3C** - Fotografias dos produtos após os experimentos em RVA (pH 6,5), agrupados em  $\kappa$  no PCA: 6, 7, 8, 9, 10, 21, 22, 23, 24 e 25.

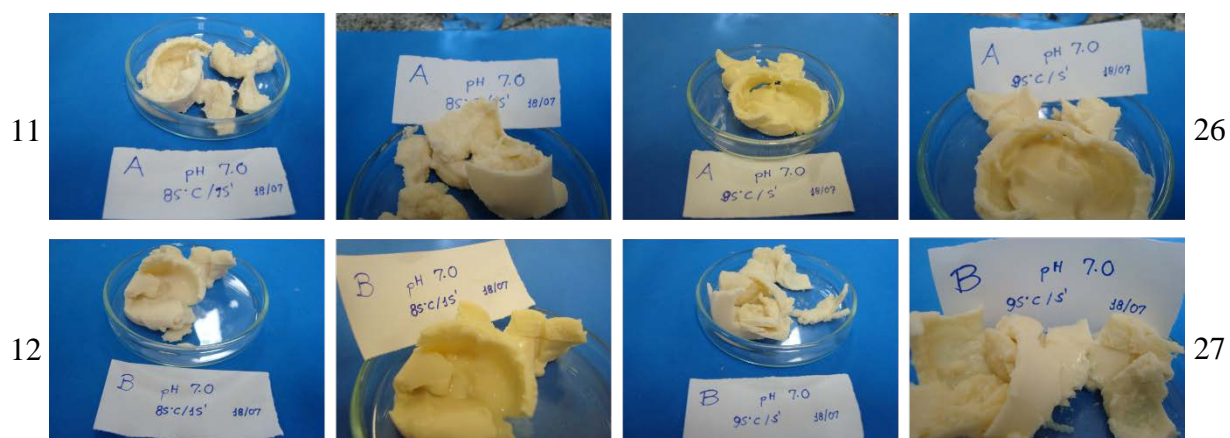


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

## ANEXO D

Fotografias das dispersões dos sistemas proteicos em água dos experimentos 11, 12, 26 e 27, agrupados em  $\kappa$ , após o tratamento térmico em analisador rápido de viscosidade.

**Figura 4D** - Fotografias dos produtos após os experimentos em RVA (pH 7,0), agrupados em  $\kappa$  no PCA: 11, 12, 26 e 27.

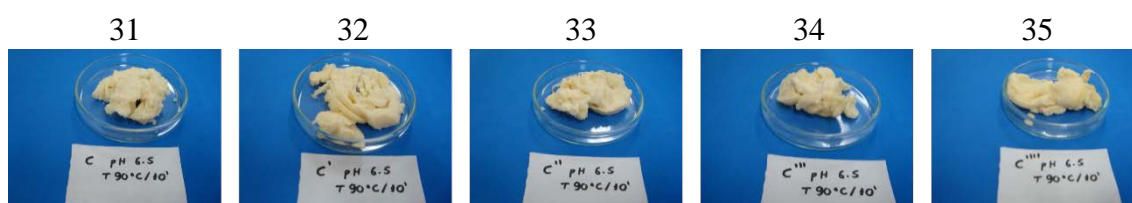


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

## ANEXO E

Fotografias das dispersões dos sistemas proteicos em água dos experimentos 31, 32, 33, 34 e 35, agrupados em  $\kappa$ , após o tratamento térmico em analisador rápido de viscosidade.

**Figura 5E** - Fotografias dos produtos após os experimentos em RVA (pH 6,5 e tratamento térmico 90°C/10 min), agrupados em  $\kappa$  no PCA: 31, 32, 33, 34 e 35.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

## ANEXO F

Fotografias comparando as dispersões dos sistemas proteicos em água após o tratamento térmico em analisador rápido de viscosidade.

**Figura 6F** - Fotografias dos produtos após os experimentos em pH 5,5, 6,5 e 7,0 com tratamento térmico 85°C/15 min.

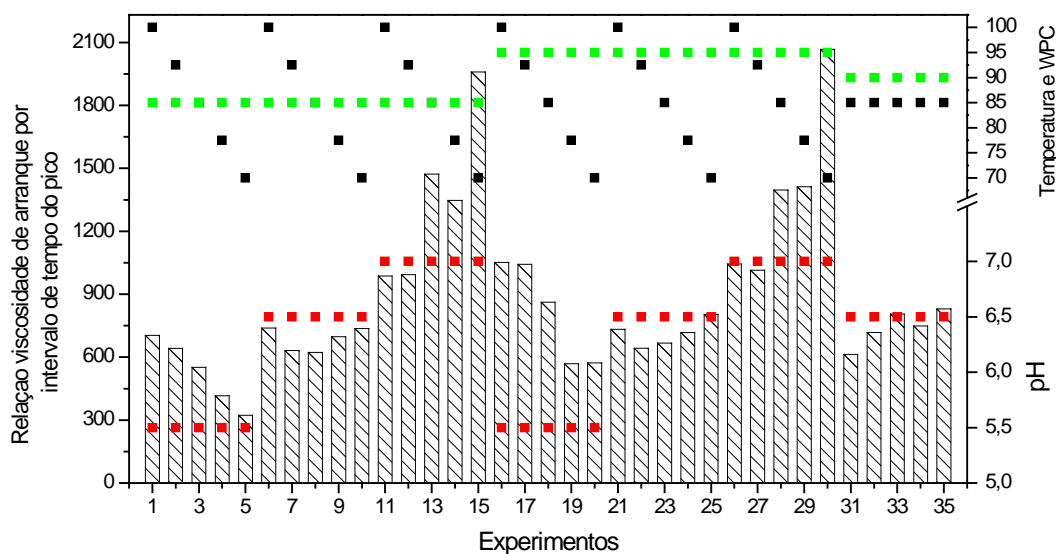


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

## ANEXO G

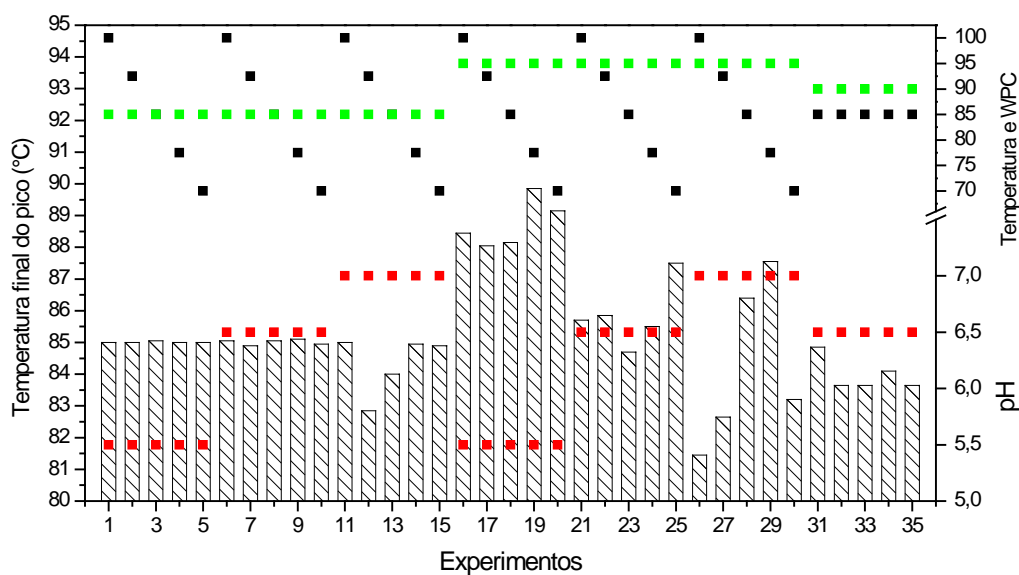
Gráfico visual dos dados obtidos dos 35 experimentos em RVA.

**Figura 7G** - Gráfico dos 35 experimentos em relação à viscosidade de arranque por intervalo de tempo do pico ( $\text{mPa.s.min}^{-1}$ ) -  $\Delta V/\Delta t$  (▨) de acordo com a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) do tratamento térmico (■), concentração de WPC (%) nas amostras (■) e pH (■).



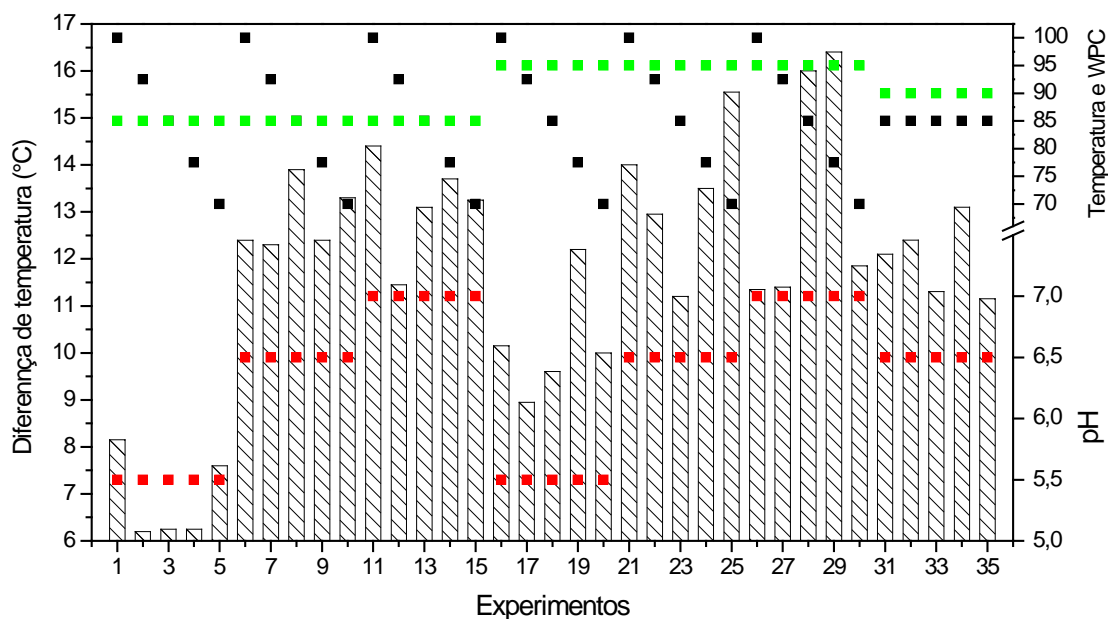
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

**Figura 8G** - Gráfico dos 35 experimentos em relação a temperatura final do pico ( $^{\circ}\text{C}$ ) -  $T_f$  (▨) de acordo com a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) do tratamento térmico (■), concentração de WPC (%) nas amostras (■) e pH (■).



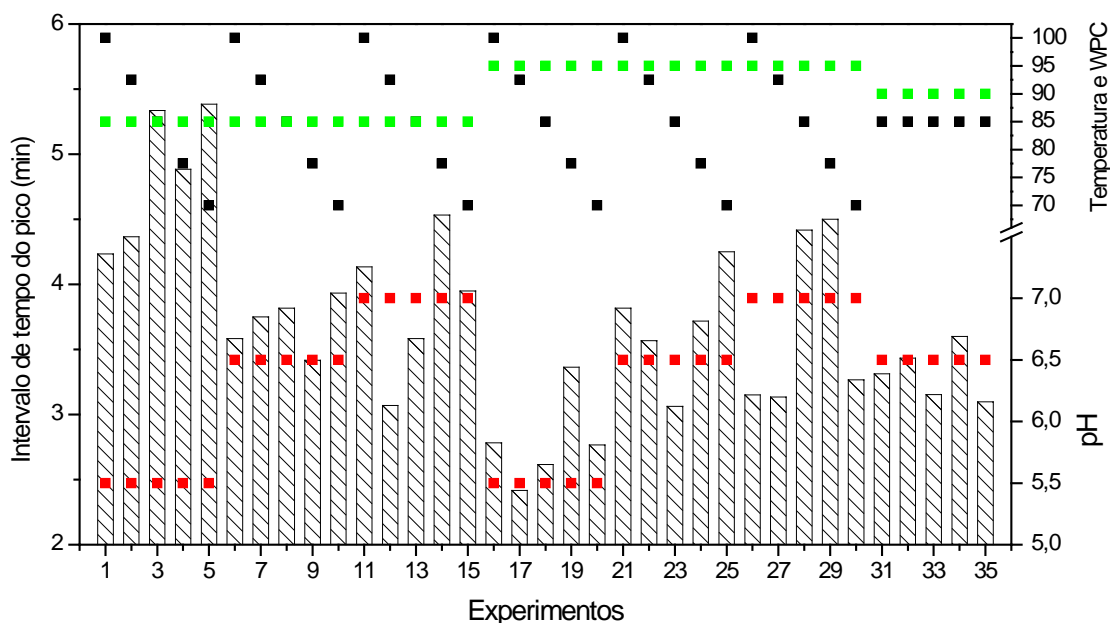
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

**Figura 9G** - Gráfico dos 35 experimentos em relação a diferença de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) -  $\Delta T$  (▨) de acordo com a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) do tratamento térmico (■), concentração de WPC (%) nas amostras (■) e pH (■).



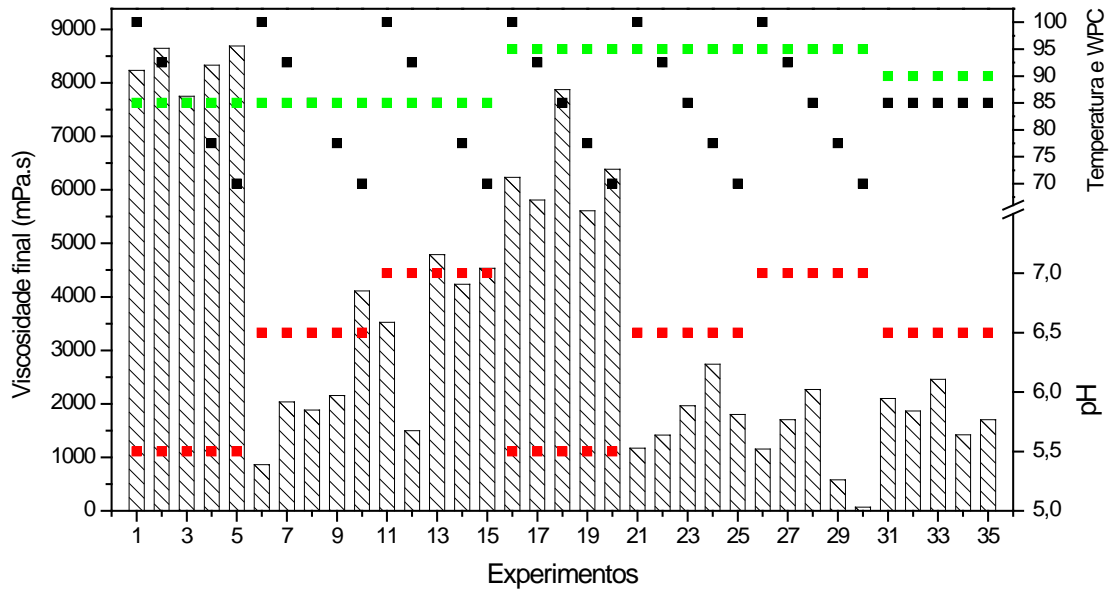
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

**Figura 10G** - Gráfico dos 35 experimentos em relação ao intervalo de tempo do pico (min) -  $\Delta t$  (▨) de acordo com a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) do tratamento térmico (■), concentração de WPC (%) nas amostras (■) e pH (■).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

**Figura 11G** - Gráfico dos 35 experimentos em relação a viscosidade final (mPa.s) - Vf (▨) de acordo com a temperatura (°C) do tratamento térmico (■), concentração de WPC (%) nas amostras (■) e pH (■).



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

## ANEXO H

### ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Os espectros fornecem as transições (diferenças de energia entre os níveis) e a partir destas medidas determinam-se as posições relativas dos níveis energéticos. No caso de moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Normalmente as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região das microondas.

Denomina-se espectroscopia vibracional a técnica de análise na qual se utiliza radiação eletromagnética para testar o comportamento vibracional de moléculas observando-se a absorção ou espalhamento dessa radiação.

Uma vez que as energias vibracionais das moléculas encontram-se na faixa de 0 a 60 kJ/mol, a absorção da radiação ocorre na faixa do infravermelho, entre 0 e 5000  $\text{cm}^{-1}$ , em uma das auto-frequências dos grupos moleculares, se o modo vibracional modifica o comprimento do dipolo elétrico correspondente. A observação direta da absorção de radiação por vibrações moleculares é, portanto, um experimento de espectroscopia de infravermelho.

As vibrações moleculares também podem ser estudadas por um experimento de espalhamento de radiação, usualmente na faixa da luz visível. Neste tipo de experimento a energia da radiação incidente é levemente modificada pela interação inelástica com os modos de vibração. A observação do espalhamento de luz por vibrações moleculares é denominada espectroscopia Raman.

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



espectroscopia no Infravermelho e a espectroscopia Raman são chamadas de técnicas complementares.

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

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

O espectro Raman é devido ao espalhamento inelástico de uma radiação monocromática que incide na molécula e o sinal está relacionado ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação. O efeito Raman envolve a interação do campo elétrico da radiação eletromagnética incidente (equação 1) com a distribuição da nuvem eletrônica da molécula:

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

onde  $E_0$  é a amplitude vibracional e  $\nu_0$  é a frequência da radiação incidente (frequência do laser).

A explicação clássica para o efeito Raman, também conhecida como a teoria Placzek, leva em conta uma radiação monocromática incidente agindo sobre a matéria; durante o tempo que a radiação interage com a matéria, ambas são conhecidas como um novo sistema, em que a energia total é a energia original do sistema, mais a energia da radiação incidente; isto é muito importante para compreender o efeito Raman, uma vez que não há absorção de energia pelo sistema, porque o nível de energia originado pela interação é chamado nível de virtual ( $r$ ), e existe apenas durante o tempo que a energia está interagindo com a matéria. O

campo elétrico oscilante induz na molécula um momento de dipolo oscilante  $P$  (equação 2), cuja frequência será a mesma do campo elétrico externo:

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

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

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

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

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

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

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

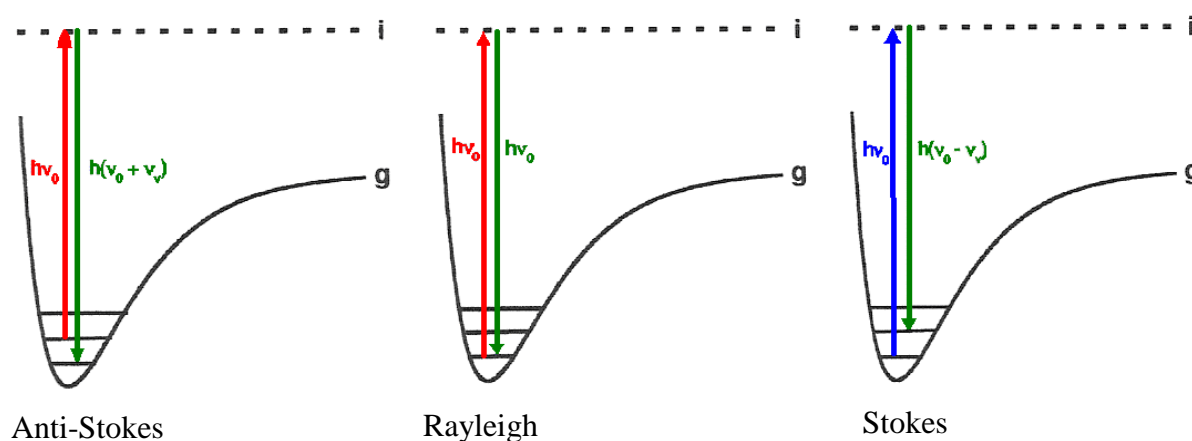
Combinando a equação 2, 3 e 4 obtemos:

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

De acordo com a previsão clássica, o primeiro termo contém somente a frequência da radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico), após a interação do fóton com a molécula, esta volta ao mesmo nível de energia inicial e o fóton é

espalhado sem modificação de frequência. Somente no segundo termo aparece o espalhamento Raman com frequências  $\nu_0 + \nu_v$  (espalhamento anti-Stokes) nesse caso o fóton encontra a molécula já num estado excitado e após a interação a molécula decai para o estado fundamental, essa diferença de energia é cedida ao fóton que é espalhado com energia  $h\nu_0 + e_v$ . No espalhamento Stokes de frequência  $\nu_0 - \nu_v$ , a molécula no estado fundamental sofre colisão com o fóton de energia  $h\nu_0$ , passa para um estado intermediário (virtual), pois não corresponde a nenhum estado estacionário da molécula, o estado virtual é um auto-estado do sistema molécula-radiação. Em seguida a molécula decai para um estado vibracional excitado de energia  $e_v$ ; o fóton espalhado  $h\nu_0 - e_v$ , tem energia menor que o incidente. Os espalhamentos elástico e inelástico (Stokes e anti-Stokes) podem ser representados esquematicamente de acordo com a Figura 12.

**Figura 12H** - Ilustração esquemática dos espalhamentos Raman e Rayleigh.



Fonte: ALMEIDA, 2010

Para frequências baixas as intensidades Stokes e anti-Stokes são comparáveis, mas para frequências mais altas é difícil observar as bandas anti-Stokes, uma vez que, a população do estado excitado que origina as bandas anti-Stokes, é muito menor que a população do estado fundamental para energias menores. Essa relação pode ser mostrada com a função de distribuição de Boltzmann, que comprova que as bandas anti-Stokes apresentam menor intensidade do que as bandas Stokes em temperaturas medianas. Isto é verificado experimentalmente e a relação entre as intensidades anti-Stokes (AS) e Stokes (S) é dada por:

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

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

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

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

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

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

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

ou seja, é necessário que ocorra uma variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada q em relação a sua posição de equilíbrio. A polarizabilidade é uma propriedade tensorial (estabelece uma relação linear entre vetores P e E) que determina a atividade dos modos vibracionais na espectroscopia Raman.

A segunda condição é:

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

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

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

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

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

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

Na equação acima,  $h$  é a constante de Planck,  $r$  descreve um conjunto de estados que pertence a molécula não perturbada,  $\nu_{rm}$  e  $\nu_m$  correspondem as frequências dos estados denotados por  $m$  e  $n$ ,  $\nu_0$  é a frequência da radiação incidente,  $\mu_{nr}$  e  $\mu_{rm}$  são os momentos de transição. O numerador do primeiro termo entre colchetes corresponde à passagem do estado inicial  $m$  para um estado intermediário  $r$ , e deste para o estado final  $n$ .

Quando a energia do fóton de excitação é próximo da energia de uma transição permitida, o denominador do primeiro termo diminui e o termo aumenta, causando grande

aumento de  $\alpha_{m,n}$ , e como consequência, produz uma intensificação do sinal Raman. Esse efeito é conhecido como Raman ressonante. Para o entendimento dessas mudanças torna-se necessário a utilização do formalismo vibrônico para o efeito Raman introduzido por A. C. Albrecht.

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

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

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.R. **Avaliação da qualidade e variedade de leite em pó e leite condensado por espectroscopia Raman e análise multivariada**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010.

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

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

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

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

## PUBLICAÇÕES RELACIONADAS



**British Journal of Applied Science & Technology**  
7(1): XX-XX, 2015, Article no.BJAST.2015.126  
ISSN: 2231-0843



SCIENCEDOMAIN *international*  
[www.sciencedomain.org](http://www.sciencedomain.org)

### Study of Thermal Behaviour of Milk Protein Products Using a Chemometric Approach

Rodrigo Stephani<sup>1\*</sup>, Mariana Ramos de Almeida<sup>2</sup>,  
Marcone Augusto L. de Oliveira<sup>3</sup>, Luiz Fernando Cappa de Oliveira<sup>3</sup>,  
Ítalo Tuler Perrone<sup>4</sup> and Paulo Henrique Fonseca da Silva<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Research, Development and Innovation, Gemacom Tech, Bruno Simili 380, Juiz de Fora, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Unicamp, Campus Universitário 13083-970, Campinas, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, Campus Universitário 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Food and Technology, Federal University of Viçosa, Campus Universitário 36570-000, Viçosa, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Nutrition, Federal University of Juiz de Fora, Campus Universitário 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil.

#### Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author RS designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol, and wrote the first draft of the manuscript and managed literature searches. Authors MRA, MALO, LFCO, ITP, PHFS managed the analyses of the study, literature searches and in the discussion of the results. All authors read and approved the final manuscript.

#### Article Information

DOI: 10.9734/BJAST/2015/15372

#### Editor(s):

(1)  
(2)

#### Reviewers:

(1)  
(2)  
(3)  
(4)  
(5)

Complete Peer review History:

Original Research Article

Received 22<sup>nd</sup> November 2014  
Accepted 2<sup>nd</sup> January 2015  
Published 21<sup>st</sup> January 2015

\*Corresponding author: E-mail: [rodrigo@gemacomtech.com](mailto:rodrigo@gemacomtech.com), [mariana.ramos@ice.ufjf.br](mailto:mariana.ramos@ice.ufjf.br);

**ESTUDO DA VISCOSIDADE DE SOLUÇÕES PROTEICAS  
ATRAVÉS DO ANALISADOR RÁPIDO DE VISCOSIDADE (RVA)****Study of the viscosity of protein solutions through the rapid viscosity  
analyzer (RVA)**

*Maura P. Alves<sup>1</sup>, Ítalo T. Perrone<sup>1\*</sup>, Alisson Borges de Souza<sup>2</sup>, Rodrigo Stephani<sup>2</sup>,  
Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto<sup>3</sup>, Antônio F. de Carvalho<sup>1</sup>*

**RESUMO**

Este trabalho objetivou determinar pelo analisador rápido de viscosidade (RVA) as curvas de viscosidade de soluções preparadas a partir de concentrados proteicos de soro (CPSs) e determinar o tempo ideal de tratamento térmico visando à obtenção da viscosidade máxima nesta etapa. Os CPSs, produzidos a partir de amostras de soro submetidas inicialmente a tratamentos térmicos e de microfiltração, apresentaram composição centesimal compatível com padrões internacionais com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras apenas para o teor de gordura. Pela análise dos perfis viscográficos observou-se que os CPSs produzidos a partir de soro microfiltrado apresentaram valores de viscosidade mais altos que aqueles submetidos ao tratamento térmico para todos os dados coletados. Além disso, o tempo ideal de tratamento térmico das soluções de CPSs visando maximizar a viscosidade durante o aquecimento foi de, aproximadamente, 10 minutos. Os resultados possibilitam a aplicação dos CPSs pelas indústrias alimentícias considerando a característica desejada no produto final, sendo que o RVA mostrou-se uma ferramenta apropriada para estudo de funcionalidade desses concentrados.

**Palavras-chave:** química de leite; tratamento térmico; soro proteínas.

**ABSTRACT**

This study aimed to determine viscosity curves prepared from whey protein concentrates (WPCs) by the rapid viscosity analyzer (RVA) and determine the optimal

- 
- 1 Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Av. P.H. Rolfs, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: italo.perrone@ufv.br
  - 2 Gemacom Tech, Juiz de Fora, MG, Brasil.
  - 3 Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Unidade Regional Epamig Zona da Mata, Viçosa, MG, Brasil.
- \* Autor para correspondência.

**Recebido / Received: 08/07/2013**

**Aprovado / Approved: 14/02/2014**



## SÚMULA CURRICULAR

### 1 DADOS PESSOAIS

**Nome:** Rodrigo Stephani

**Local e data de nascimento:** Juiz de Fora – MG, 14 de agosto de 1982.

### 2 EDUCAÇÃO

2.1 **Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG**, Juiz de Fora/MG – Curso técnico/profissionalizante em Leite e Derivados (Técnico em Laticínios) **1997-2000**.

2.2 **Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora/MG – Graduação em Química (Licenciatura) **2001-2006**.

2.3 **Universidade Federal de Lavras**, Lavras/MG – Especialização em Carne, Leite e Ovos (Latu Sensu) **2006-2007**.

2.4 **Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora/MG – Mestrado profissionalizante em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados **2009-2010**.

### 3 OCUPAÇÃO

3.1 **Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG**, Juiz de Fora/MG – Professor do curso técnico/profissionalizante em Leite e Derivados (Técnico em Laticínios) **2002-2005**.

3.2 **Tate & Lyle Gemacom Tech S/A**, Juiz de Fora/MG – Gerente Técnico (Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação / Aplicação de Produtos / Suporte Técnico) **2005 – atual**.

### 4 PRODUÇÕES

#### 4.1 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. SILVA, F.L; FERREIRA, H. A. L; SOUZA, A.B; ALMEIDA, D.F; **STEPHANI, R**; PIROZI, M.R; CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T. Production of dulce de leche: The effect of starch addition. **Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie / Food Science + Technology**, 2014.

2. Campos, N. S; **STEPHANI, R**; de SOUZA, R. A; PERRONE, I. T; CARVALHO, A. F; OLIVEIRA, L. F. C. Utilização do Glicosímetro Accu-Chek Para a Determinação de Lactose em Produtos Lácteos. **Revista Virtual de Química**, 2014.

3 CAMPOS, N; OLIVEIRA, K; ALMEIDA, M; STEPHANI, R; OLIVERIA, L.F.C. de. Classification of Frankfurters by FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Methods. *Molecules* (Basel. Online) **JCR**, v. 19, p. 18980-18992, 2014.

4. ALVES, M.P; PERRONE, Í.T.; SOUZA, A.B. de; **STEPHANI, R**; PINTO, C.L. de O; CARVALHO, A.F. de. Estudo da viscosidade de soluções proteicas através do Analisador Rápido de Viscosidade (RVA). In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 77-88. Juiz de Fora, 2014.
5. SOUZA, A.B. de; COSTA JÚNIOR, L.C.G; PERRONE, Í.T; **STEPHANI, R**; ALMEIDA, D.F. Parâmetros de textura em queijos processados: influência da utilização de concentrados proteicos de leite e de soro. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 181-192. Juiz de Fora, 2014.
6. PERRONE, I. T; SIMEAO, M.; RODRIGUES JUNIOR, P. H.; **STEPHANI, R**.; CARVALHO, A. F. Influence of pilot spray dryer settings on moisture and water activity of whole milk powder. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 5-9. Juiz de Fora, 2013.
7. ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, K. de S; **STEPHANI, R**.; OLIVEIRA, L.F.C; OLIVEIRA, L.F.C. de. Application of FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Analysis for Determination of Adulteration in Milk Powder. In: **Analytical Letters**, v. 45, p. 2589-2602, 2012.
8. SOUZA, V.R. de; CARNEIRO, J.D.S; PINTO, S.M; SOUZA, A.B. de; **STEPHANI, R**. Effect of concentration of fat in the physical, chemical and sensory petit suisse cheese produced with retention of serum. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 20-28. Juiz de Fora, 2012.
9. PERRONE, Í.T; **STEPHANI, R**; NEVES, B. dos S; SÁ, J.F.O. de; CARVALHO, A.F. de. Technological control attributes for doce de leite production. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 42-51. Juiz de Fora, 2012.
10. **STEPHANI, R**; PERRONE, Í.T. Mass balance applied to the sweetened condensed milk technology: theoretical considerations. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 49-56. Juiz de Fora, 2012.
11. ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, K. de S; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C. de. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. In: **Journal of Raman Spectroscopy JCR**, v. 42, p. 1548-1552, 2011.
12. **STEPHANI, R**; NEVES, H. de C; SOUZA, A.B; PERRONE, I.T; SILVA, P.H.F. Caracterização físico-química do creme de leite UHT comercializado no Brasil. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, p. 25-29. Juiz de Fora, 2011.
13. ALMEIDA, M.R; **STEPHANI, R**; SANTOS, H.F. dos; OLIVEIRA, L.F.C. de. Spectroscopic and Theoretical Study of the Azo -Dye E124 in Condensate Phase: Evidence of a Dominant Hydrazo Form. In: **The Journal of Physical Chemistry. A**, v. 114, p. 526-534, 2010.
14. ALMEIDA, M.R; ALVES, R.S; NASCIMBEM, L.B.L.R; **STEPHANI, R**; POPPI, R.J; OLIVEIRA, L.F.C. de. Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy

and multivariate calibration analysis. In: **Analytical and Bioanalytical Chemistry JCR**, v. 397, p. 2693-2701, 2010.

15. OLIVEIRA, L.F.C. de; MAURÍCIO, A.P; BRANDÃO, A.R; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, C.I.R; GONÇALVES, R.R; BARBOSA, A.J; BARUD, H.S; MESSADDEQ, Y; RIBEIRO, S.J.L. Amorphous manganese polyphosphates: preparation, characterization and incorporation of azo dyes. In: **Journal of Sol-Gel Science and Technology JCR**, v. 50, p. 158-163, 2009.

16. COLOMBO, M; PERRONE, I.T; **STEPHANI, R**; SILVA, P.H.F. da. Avaliação da viscosidade durante a fabricação do doce de leite tradicional adicionado de amido de milho nativo. In: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 7-13. Juiz de Fora, 2009.

#### 4.2 LIVROS PUBLICADOS/ORGANIZADOS OU EDIÇÕES

1. SOUZA, A. B; ALMEIDA, D.F; PINHEIRO, L.C; **STEPHANI, R**. **Manual do meio ambiente**. 1. ed. Juiz de Fora: Do autor, 2014. 56p.

2. CARVALHO, A. F; NEVES, B. dos S; PERRONE, I.T; **STEPHANI, R**; VIEIRA, S. D. A. **Sinopse dos trabalhos apresentados no primeiro curso de leites concentrados e desidratados**. 1.ed. Juiz de Fora: Templo, 2013. v.1, 176p.

3. PERRONE, I.T; **STEPHANI, R**; NEVES, B. dos S. **Doce de Leite Aspectos Tecnológicos**. 1.ed. Juiz de fora: Ítalo Tuler Perrone, 2011. v.1, 185p .

4. ALMEIDA, D.F; NEVES, H. de C; **STEPHANI, R**. **Manual de boas práticas de fabricação em alimentos**. 2.ed. Juiz de Fora: Rodrigo Stephani, 2011. v.1, 47p .

#### 4.3 CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

1. PERRONE, I.T; **STEPHANI, R**. Instalações e equipamentos para o processamento de leite condensado. In: RENHE, I.R; PERRONE, I.T.; SILVA, P.H.F. (Org.). **Leite condensado: identidade, qualidade e tecnologia**. 1.ed. Juiz de Fora: Templo, 2011, v. 1, p.59-78.

2. **STEPHANI, R**; PERRONE, I.T. Balanço de massa aplicado a tecnologia de produção do leite condensado. In: RENHE, I.R; PERRONE, I.T.; SILVA, P.H.F. (Org.). **Leite condensado: identidade, qualidade e tecnologia**. 1.ed. Juiz de Fora: Templo, 2011, v. 1, p.109-130.

#### 4.4 TEXTOS EM JORNAIS DE NOTÍCIAS/REVISTAS

1. CAMPOS, N.S; OLIVEIRA, K. de S; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C. de. Espectroscopia Raman e Quimiometria – Emergentes ferramentas analíticas para produtos cárneos. In: **Anuário – Revista Nacional da Carne**, p. 108 – 114. São Paulo, 01 jul. 2014.

2. SOUZA, A. B; ALMEIDA, D.F; **STEPHANI, R**; NEVES, H. de C. Efeitos das proteínas lácteas nas propriedades tecno-funcionais de alimentos processados termicamente. In: **Revista Food Ingredients Brasil**, p.41-43. São Paulo, 17 mar. 2014.
3. SOUZA, A.B; ALMEIDA, D.F; GAMA NETO, G; **STEPHANI, R**; NEVES, H. de C. Importância dos amidos modificados nos alimentos processados: ingrediente em perspectiva. In: **Revista Aditivos e Ingredientes**, p. 28 – 32. São Paulo, 20 jun. 2013.
4. SOUZA, V.R; SOUZA, A.B; ALMEIDA, D.F; **STEPHANI, R**. Determinação da potência e doçura equivalente de edulcorantes. In: **Revista Food Ingredients Brasil**, p.34-36. São Paulo, 07 jan. 2013.
5. ALMEIDA, M.R.; OLIVEIRA, K. de S; SOARES, R.B; **STEPHANI, R**; PERRONE, I.T; OLIVEIRA, L.F.C. de. Espectroscopia Raman. In: **Leite & Derivados**, v. 1, p. 68-76. São Paulo, 2011.
6. NEVES, H. de C; **STEPHANI, R**; CARVALHO, G.R; GUIMARAES, M.F.M. O setor agroindustrial do leite no Brasil. In: **Leite & Derivados**, v. 19, p. 26-31. São Paulo, 2010.
7. SOUZA, A. B; **STEPHANI, R**; PERRONE, Í.T; SILVA, P.H.F. Proteínas lácteas tailor-made com ênfase no comportamento térmico. In: **Revista Food Ingredients Brasil**, p.70-72. São Paulo, 11 jun. 2012.
8. **STEPHANI, R**. Azo corantes – estrutura e implicações tecnológicas em alimentos. In: **Revista Food Ingredients Brasil**, p. 54 – 55. São Paulo, 03 ago. 2009.

#### 4.5 RESUMOS EXPANDIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. SILVA, F.L; FERREIRA, H.A.L; SOUZA, A.B; ALMEIDA, D.F; **STEPHANI, R**; PIROZI, M.R; CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T. Estudo do comportamento da viscosidade em soluções modelo de doce de leite por meio do Determinador Rápido de Viscosidade (RVA). In: **Simpósio 30 anos IDS Brasil**. Juiz de Fora. Anais do Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014.
2. MOREIRA, L.B.O; RODRIGUES JUNIOR, P.H; NEVES, I.C.O; VALICENTE, V.M; MARIZ, T.B; PINTO, M.S; **STEPHANI, R**; CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T. Efeito da adição de hidróxido de potássio sobre as características do Concentrado Proteico de Soro (CPS). In: **Simpósio 30 anos IDSBrasil**, 2014, Juiz de Fora. Anais do Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014.
3. PINTO, M.S; RODRIGUES JUNIOR, P.H; NEVES, L; MARTINS, M; **STEPHANI, R**; CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T. Microestrutura de leite em pó integral e desnatado, compostos lácteos e concentrados proteicos do soro. In: **Simpósio 30 anos IDSBrasil**, 2014, Juiz de Fora. Anais do Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014.
4. MOREIRA, R.O; RODRIGUES JUNIOR, P.H; MARTINS, M; **STEPHANI, R**; CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T. Caracterização da composição de permeado, retentado e concentrado proteico de soro (CPS) obtidos em escala piloto. In: **Simpósio 30 anos IDSBrasil**, 2014, Juiz de Fora. Anais do Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014.

5. ALMEIDA, C.E.R; OLIVEIRA, K. de S; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C. de; PERRONE, I.T. Avaliação de leite em pó integral adulterado com soro por espectroscopia Raman. In: **Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014**, Juiz de Fora. Anais do Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014.
6. OLIVEIRA, K. de S; ALMEIDA, C.E.R; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C. de; PERRONE, I.T. Avaliação de amostras de WPC armazenadas em diferentes condições por espectroscopia Raman. In: **Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014**, Juiz de Fora. Anais do Simpósio 30 anos IDSBrasil, 2014.
7. RODRIGUES JUNIOR, P.H; SIMEAO, M; PERRONE, I.T; CARVALHO, A.F; **STEPHANI, R**; MOREIRA, R.S. Determinação e avaliação de atributos microscópicos, físico químicos e reológicos de leite condensado. In: **29 Congresso Nacional de Laticínios**, 2012, Juiz de Fora. Anais do 29 Congresso Nacional de Laticínios, 2012.
8. GAMA NETO, G; PERRONE, Í.T; MOREIRA, R.S; RODRIGUES JUNIOR, P.H; **STEPHANI, R**; SIMEAO, M. Aspectos tecnológicos da produção de doce de leite a partir de leite microfiltrado. In: **29 Congresso Nacional de Laticínios**, 2012, Juiz de Fora. Anais do 29 Congresso Nacional de Laticínios, 2012.
9. ALMEIDA, M.R; ALVES, R.S; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C. de. Avaliação da Qualidade de Leite em Pó por Espectroscopia Raman. In: **26 Congresso Nacional de Laticínios**, 2009, Juiz de Fora-MG. Anais do 26 Congresso Nacional de Laticínios, 2009.

#### 4.6 RESUMNOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. SILVA, P.H.F; FRANCISQUINI, J.D.A; OLIVEIRA, L.N; PEREIRA, J.P.F; **STEPHANI, R**. Dulce de leche: Physical-chemical and rheological characteristics. In: **World Dairy Summit 2013 – International Dairy Federation**. Yokohama. World Dairy Summit 2013. Yokohama: Japanese National Committee of International Dairy Federation, 2013. P-ST014-P-ST014.
2. **STEPHANI, R**; SILVA, P.H.F; ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, L.F.C. de; PERRONE, I. T. Behavior of dairy protein in different simulated conditions of thermal processing. In: **5th International symposium on spray dried products**, 2012, Saint Malo. Proceedings of the 5th International symposium on spray dried dairy products, 2012.
3. BARROSO, T.D.B; CAMPOS, N.S; **STEPHANI, R**; PERRONE, I.T; OLIVEIRA, L.F.C de. Estudos espectroscópicos de concentrados proteicos obtidos de diferentes tratamentos térmicos do soro de leite. In: **Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2012, Ouro Preto. Anais do Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2012.
4. OLIVEIRA, K. de S; CAMPOS, N.S; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C. de. Análise de amostras de queijo Parmesão empregando espectroscopia Raman e Análise de Componentes Principais. In: **EnBraER**, 2011, Belo Horizonte. Anais EnBraER 2011, 2011.
5. ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, K. de S; **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C. de. Raman spectroscopy as a tool for monitoring the lactose in milk powder crystallization. In: **VIII**

**Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, 2010, São Carlos-SP. VIII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages – VIII BMCFCB, 2010, 2010.

6. OLIVEIRA, K. de S; ALMEIDA, M.R; OLIVEIRA, L.F.C. de; **STEPHANI, R.** Uma metodologia para “*Screening Analysis*” de leite em pó utilizando espectroscopia Raman e análise multivariada. In: **XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-MG**, 2010, Viçosa-MG. XXIV Encontro Regional SBQ-MG, 2010.

7. ALMEIDA, M.R; ALVES, R.S; NASCIMBEM, L.B.L.R; **STEPHANI, R;** POPPI, R.J; OLIVEIRA, L.F.C. de. Determinação do teor de amilose em amidos utilizando espectroscopia Raman e calibração multivariada. In: **15 ENQA e 3 CIAQA**, 2009, Salvador. 15 Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

8. ALMEIDA, M.R; ALVES, R.S; NASCIMBEM, L.B.L.R; **STEPHANI, R;** POPPI, R.J; OLIVEIRA, L.F.C. de. Espectroscopia FT-Raman e análise multivariada: ferramentas para identificação de origem de amidos. In: **23 Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química em Minas Gerais**, 2009, Juiz de Fora-MG. 23 ERSBQ-MG, 2009, 2009.

9. ALMEIDA, M.R; ALVES, R.S; **STEPHANI, R;** OLIVEIRA, L.F.C. de. Aplicação da espectroscopia Raman na identificação da autenticidade de leite em pó. In: **Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman**, 2009, São Pedro. I ENBRAER, 2009, 2009.

10. ALMEIDA, M.R; **STEPHANI, R;** SANTOS, H.F; OLIVEIRA, L. F. C. de. Caracterização espectroscópica e cálculos teóricos do corante alimentício E124 (Ponceau 4R). In: **31a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008, Águas de Lindóia. Resumos da 31a. Reunião Anual da SBQ. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2008. v. 1. p. 414-1-414-1.

11. ALMEIDA, M.R; **STEPHANI, R;** SANTOS, H. F; OLIVEIRA, L.F.C. de. Caracterização Vibracional do Corante E124 por Espectroscopia Raman e Cálculos Teóricos. In: **XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2007, Uberlândia. XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2007, 2007.

12. BRANDAO, A.R; **STEPHANI, R;** OLIVEIRA, L. F. C. de. Caracterização espectroscópica de coacervatos de Mn(II) dopados com Tartrazina (E 102) e Vermelho Bordeaux-S (E 123).. In: **29a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 29a. RASBQ. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2006. v. 1, p. 46-46.

13. OLIVEIRA, C.I.R; **STEPHANI, R;** OLIVEIRA, L. F. C. de. Utilização do coacervato de manganês como meio suporte para indicador de pH. In: **26 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino Americano de Química**, 2004, Salvador. Anais da 26 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino Americano de Química, 2004.

#### 4.7 APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

1. SOUZA, A.B; COSTA JÚNIOR, L.C.G; **STEPHANI, R;** PINTO, M.S; CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T; COSTA, R. **Evaluation of the viscosity profile during simulated conditions of thermal processing**. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

2. SILVA, F; FERREIRA, H.A.L; PINTO, M.S; **STEPHANI, R**; CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T. **Evaluation of dulce de leche produced with different starches**. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. ALVES, M; MARTINS, M; RODRIGUES JUNIOR, P.H; MOREIRA, R.O; MENDES, G; PINTO, M.S; **STEPHANI, R**; PERRONE, I.T; CARVALHO, A.F. **The effect of technological production stages on the viscosity of whey protein solutions**. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).
4. **STEPHANI, R. Utilização de proteínas lácteas e suas interações durante processamento térmico**. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
5. **STEPHANI, R. Uso de aditivos em laticínios**. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
6. **STEPHANI, R. Produtividade na indústria: participação dos ingredientes na sustentabilidade e inovação dos processos produtivos**. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
7. **STEPHANI, R. Utilização de proteínas lácteas e suas interações durante processamento térmico**. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
8. **STEPHANI, R. Produtividade na indústria: sustentabilidade e inovação**. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
9. **STEPHANI, R. Química dos alimentos**. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
10. **STEPHANI, R. Microestrutura dos lácteos processados**. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
11. **STEPHANI, R. Inovação tecnológica e novas tendências do mercado de lácteos**. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
12. **STEPHANI, R. Aspectos de qualidade para o processamento do leite na indústria**. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
13. **STEPHANI, R. Amidos – breve história de quase tudo**. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
14. **STEPHANI, R. Microestrutura dos alimentos processados – ampla área de atuação do profissional em química**. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
15. SILVA, P. H. F. da; **STEPHANI, R**; NEVES, H. de C; PERRONE, I.T. **Technological properties of powdered dairy ingredients in different simulated conditions of thermal processing in RVA**. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

16. ALMEIDA, M.R; **STEPHANI, R**; SILVA, P.H.F; OLIVEIRA, L.F.C. de. *FT-Raman spectroscopy in quality control of milk powder during shelf life*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).
17. **STEPHANI, R**; SILVA, P.H.F; PERRONE, I.T; NEVES, H. de C. **Utilização do Analisador Rápido de Viscosidade (RVA) como simulador de processamento para lácteos**. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
18. PERRONE, I. T; **STEPHANI, R**; MAGALHÃES, F.A.R; COSTA JÚNIOR, L.C.G; PAULA, J.C.J. **Relação entre teor de sólidos solúveis e graus baumé em leite integral e desnatado**. 2009. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
19. **STEPHANI, R**. **Polímeros biológicos**: implicações tecnológicas na indústria de alimentos. 2009. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
20. ALMEIDA, M.R; **STEPHANI, R**; SANTOS, H.F; OLIVEIRA, L.F.C. de. **Caracterização Vibracional do Corante E 124 por Espectroscopia Raman e Cálculos Teóricos**. 2007. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
21. **STEPHANI, R**; PERRONE, I.T. **Doce de leite para exportação**. 2005. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
22. **STEPHANI, R**. Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de leite e soro de ricota. 2005. (Apresentação de Trabalho/Outra).
23. **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, M. A. L. **Determinação de Nitrato e Nitrito em leite e soro de leite por eletroforese capilar de zona**. 2005. (Apresentação de Trabalho/Outra).

#### 4.8 OUTRAS PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

1. PERRONE, I.T; **STEPHANI, R**. **Tecnologia de fabricação de doce de leite e leite condensado**. Juiz de Fora: EPAMIG, 2011 (Extensão e Ensino).
2. PERRONE, I.T; **STEPHANI, R**. **Caderno de aulas práticas de doce de leite**. Juiz de Fora: EPAMIG, 2004 (Extensão e ensino).

#### 5 WEBSITES

1. **STEPHANI, R**. **Dairy Spray Dryer**. 2015; Tema: Localização das torres de secagem de leite e derivados. (Site).
2. **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C de. **IV ENBRAER**. 2014; Tema: IV Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman. (Site).
3. **STEPHANI, R**; OLIVEIRA, L.F.C de. **Repositório Espectroscópico**. 2014; Tema: Repositório Nacional de Dados Espectroscópicos. (Site).
4. **STEPHANI, R**; MANCINI, R.C; **FELCT**. 2014; Tema: Fábrica Escola de Laticínios Cândido Tostes. (Site).



5. **STEPHANI, R. Plataforma Inovação Aberta Gemacom Tech.** 2014; Tema: Open Innovation. (Site).
6. **STEPHANI, R. Alambique Guarani.** 2014; Tema: Site institucional. (Site).
7. **STEPHANI, R; NEVES, H. de C; SOUZA, A. B; GAMA NETO, G; ALMEIDA, D.F. Healthy Drops.** 2013; Tema: Alimentos liofilizados prontos para consumo. (Site).
8. **STEPHANI, R; PERRONE, I.T; CARVALHO, A.F. Simpósio 30 Anos.** 2013; Tema: Tecnologia de Produtos Concentrados e Desidratados do Leite. (Site).
9. **STEPHANI, R. Stephani & Cia.** 2013; Tema: Site Institucional. (Site).
10. **STEPHANI, R; NEVES, H. de C. Árvore do Leite.** 2011; Tema: Árvore Genealógica do Leite e Derivados. (Site).

## **6 DE MAIS TIPOS DE PRODUÇÃO TÉCNICA**

1. **STEPHANI, R. Nivelamento de Procedimentos e Atualização Técnica de Derivados do Leite – Queijos.** 2012. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. **STEPHANI, R; PERRONE, I.T. Tecnologia de fabricação de doce de leite e leite condensado.** 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
3. **STEPHANI, R. Reciclagem global em Laticínios.** 2005. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
4. **STEPHANI, R; PERRONE, I.T; LEMOS, A.M. Introdução à Tecnologia de Produtos Lácteos Concentrados e Desidratados.** 2005. (Curso de curta duração ministrado/Outra).
5. **STEPHANI, R. Tecnologia de fabricação de doce de leite para profissionais da indústria.** 2004. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
6. **STEPHANI, R. Reciclagem global em laticínios.** 2004. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
7. **STEPHANI, R. Reciclagem global em laticínios.** 2004. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

## **7 DE MAIS TRABALHOS**

1. **STEPHANI, R. Doce de Leite para Exportação.** 2005 (Palestra Ministrada)

## **8 ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS**

1. CARVALHO, A.F; PERRONE, I.T; **STEPHANI, R**; TEODORO, V.A.M. **2 Simpósio sobre Tecnologia de Lácteos Concentrados e Desidratados**. 2014. (Outro).
2. **STEPHANI, R**. **XXII Congresso Nacional de Laticínios**. 2005. (Congresso).
3. **STEPHANI, R**. **27 EXPOMAQ – Exposição de Máquinas e Equipamentos**. 1999. (Exposição).