

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E  
DERIVADOS

**Israel Novaes de Moura**

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM *WHEY*  
*PROTEIN* POR ESPECTROSCÓPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA E  
RESOLVIDA NO TEMPO**

Juiz de Fora  
2017

**Israel Novaes de Moura**

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES EM *WHEY*  
*PROTEIN* POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA E  
RESOLVIDA NO TEMPO**

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Furtado

Co-orientador: Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos

Juiz de Fora  
2017

de Moura, Israel Novaes.

Caracterização e identificação de adulterações em *Whey Protein* por espectroscopia de fluorescência estacionária e resolvida no tempo / Israel Novaes de Moura – 2017.

77 p. : II

Orientador: Marco Antônio Furtado

Co-orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos.

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017.

1. *Whey Protein*. 2. Soro. 3. Espectroscopia. 4. Fluorescência. 5. Fluorescência resolvida no tempo. I. Furtado, Marco Antônio, oriente. II. Dos Anjos, Virgílio de Carvalho, co-orient. III. Título.

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ADULTERAÇÕES  
EM *WHEY PROTEIN* POR ESPECTROSCOPIA DE  
FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA E RESOLVIDA NO TEMPO**

Israel Novaes de Moura

**ORIENTADOR : Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado**

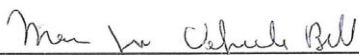
Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em: 04/08/2017



---

Dra. Sandra Maria Pinto



---

Dra. Maria Jose Vallenzuella



---

Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos

---

Dr. Marco Antônio Moreira Furtado

A minha esposa Soraia que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando meu crescimento profissional, a minha mãe por suas incansáveis orações, ao meu pai (in memoriam) que sentiria muito orgulho de mais uma etapa vencida, aos meus filhos Lucas e Sara. Dedico

## AGRADECIMENTOS

Foi um percurso longo e laborioso para concluir mais esta etapa, contudo foi de grande valia para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca permitir em nenhum momento que eu desistisse ao longo do trajeto.

À Faculdade de Farmácia e Bioquímica- UFJF, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes e à Embrapa Gado de Leite, do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade que me foi dada de ingressar no curso de mestrado.

Ao meu orientador Marco Antônio pelos seus ensinamentos e compreensão nas horas difíceis. Agradeço.

Ao meu co-orientador Virgílio dos Anjos pela paciência e tolerância. Agradeço por sua disponibilidade, por seus ensinamentos valiosos e por sua amizade.

A Thamires e Mariana que me ajudaram na operacionalização dos equipamentos, especialmente ao Dr. Jonathan e Dra. Cristina que em muito contribuíram para melhoria e finalização desta dissertação.

Aos colegas do mestrado pela amizade e companheirismo.

A minha esposa meu grande amor por estar sempre ao meu lado compartilhando meus objetivos, e incentivando-me a prosseguir e ir sempre um pouco mais além.

Aos membros da banca examinadora, pela presença e colaboração.

A todos, meu muito obrigado!

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a caracterização e eficácia de diferentes técnicas da espectroscopia de fluorescência na detecção de adulterações em formulações de *Whey Protein* concentrado (WPC) em pó, a partir de sua mistura com substâncias de diferentes origens. Foram estudados dois diferentes lotes de WPC provenientes do mesmo fornecedor. Adulterações foram realizadas a partir da adição individual de Cafeína (Tratamento 1), Creatina (Tratamento 2) e Lactose (Tratamento 3) a 30% (m/m) em WPC e submetidas às análises de espectroscopia de fluorescência estacionária e resolvida no tempo, utilizando-se os comprimentos de onda de excitação de 275 e 335 nm. Quando excitadas a 275 nm, as amostras apresentaram pico de emissão a 335 nm aproximadamente, com uma banda de emissão em torno de 380 nm, característica apenas na amostra contendo cafeína, enquanto lactose e creatina não induziram alterações no espectro do WPC. Quando excitadas a 335 nm, as amostras apresentam picos de emissão com máximo em 425 e 470 nm, sem diferenciação por simples observação do espectro. Análise da distância Euclidiana evidenciou que, quando excitadas a 275 nm, os espectros completos dos tratamentos 2 e 3 foram semelhantes ao Controle 1 enquanto o Tratamento 1 foi diferente. Já na excitação a 335 nm todos os espectros foram semelhantes. Análise de Componentes Principais (PCA) confirmou a diferenciação do Tratamento 1 a 275 nm mas foi inconclusiva com a excitação de 335 nm, porém determinou pontos de interesse para estudos das derivadas dos espectros. Com as derivadas, foi possível a diferenciação entre os Tratamentos 2 e 3 nos dois comprimentos de onda, com enfoque em comprimentos de ondas específicos que podem ser decisivos na diferenciação das adulterações. Em relação a espectroscopia resolvida no tempo, o Tratamento 1 demonstrou valores da intensidade média do tempo de vida de emissão superior aos tratamentos 2 e 3 nos dois comprimentos de onda de excitação empregados. A adulteração com cafeína foi realizada na amostra Controle 2 e foi observado resultado semelhante quando comparada ao Controle 1. De maneira geral, a aplicação das técnicas de espectroscopia de fluorescência estacionária e resolvida no tempo possibilitou a caracterização das amostras utilizadas no estudo. Além disso, possibilitou a observação de diferenças entre as amostras controles e aquelas adulteradas, especialmente a adicionada de cafeína e excitada no comprimento de onda 275 nm, com ajuda de ferramentas matemáticas. Os resultados aqui obtidos corroboram com o fato de que as técnicas empregadas podem ser importantes na detecção de fraudes em produtos lácteos.

**Palavras-chave:** *Whey Protein*; Soro; Espectroscopia; Fluorescência; Fluorescência resolvida no tempo.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the characterization and efficacy of different fluorescence spectroscopy techniques in the detection of adulterations in formulations of Whey Protein Concentrate (WPC) powder, from its mixture with substances of different origins. Two different batches of WPC from the same supplier were studied. Adulterations were performed from the individual addition of Caffeine (Treatment 1), Creatine (Treatment 2) and Lactose (Treatment 3) at 30% (w / w) in WPC and subjected to stationary fluorescence spectroscopy and time-resolved fluorescence, using the excitation wavelengths of 275 and 335 nm. When excited at 275 nm, the samples showed an emission peak at approximately 335 nm, with an emission band around 380 nm, characteristic only in the sample containing caffeine, while lactose and creatine did not induce alterations in the WPC spectrum. When excited at 335 nm, the samples showed peak emission at 425 and 470 nm, without differentiation by simple observation of the spectrum. Euclidean distance analysis showed that, when excited at 275 nm, the complete spectra of treatments 2 and 3 were similar to Control 1 while Treatment 1 was different. Regarding the excitation at 335 nm, all spectra were similar. Principal Component Analysis (PCA) confirmed the differentiation of Treatment 1 at 275 nm but it was inconclusive with 335 nm excitation, however, it determined points of interest for spectra derivative studies. With the derivatives, it was possible to differentiate between Treatments 2 and 3 in the two wavelengths, focusing on specific wavelengths that can be decisive in the differentiation of adulterations. In relation to time resolved fluorescence spectroscopy, Treatment 1 demonstrated values of the mean emission lifetime higher over Treatments 2 and 3 at the two excitation wavelengths employed. The caffeine adulteration was performed in the Control 2 sample and a similar result was observed when compared to Control 1. In general, the application of stationary and time resolved fluorescence spectroscopy techniques allowed the characterization of the samples used in the study. In addition, it made possible the observation of differences between the control and adulterated samples, especially the one with caffeine added and excited at the wavelength 275 nm, with the help of mathematical tools. The results obtained here corroborate the fact that the techniques employed may be important in the detection of fraud in dairy products.

**Keywords:** Whey Protein; Whey; Spectroscopy; Fluorescence; Time-resolved Fluorescence.



## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Figura 1</b>  | Sistema de secagem por pulverização ( <i>Spray Dryer</i> )  | <b>18</b> |
| <b>Figura 2</b>  | Estrutura química da cafeína  | <b>23</b> |
| <b>Figura 3</b>  | Síntese da creatina   | <b>25</b> |
| <b>Figura 4</b>  | Diagrama de Jablonski   | <b>28</b> |
| <b>Figura 5</b>  | Histograma de pulsos de laser para medidas por TCSPC  | <b>29</b> |
| <b>Figura 6</b>  | Queda exponencial de contagem de fótons em função do tempo (TCSPC)  | <b>30</b> |
| <b>Figura 7</b>  | Espectros de emissão da amostra Controle 1 com excitações fixadas nos comprimentos de onda de 275, 290, 305, 320 e 335 nm.  | <b>37</b> |
| <b>Figura 8</b>  | Figura 8: Espectros de emissão da amostra Controle 1 e dos adulterantes puros (cafeína, creatina e lactose). Comprimentos de onda de excitação: (A) 275 nm e (B) 335 nm.  | <b>38</b> |
| <b>Figura 9</b>  | Espectro de emissão da fluorescência da amostra Controle 1 e das adulteradas com adição de 30% de cafeína (Tratamentos 1), 30% de creatina (Tratamento 2) e 30% de lactose (Tratamento 3). (A) - excitação fixada em 275 nm, (B) - excitação fixada em 335 nm.  | <b>40</b> |
| <b>Figura 10</b> | Espectros de emissão normalizados da amostra Controle 1 de <i>Whey Protein</i> concentrado e as adulterações nele realizadas. (A) - Excitação a 275 nm, (B) - Excitação a 335 nm.   | <b>47</b> |
| <b>Figura 11</b> | Análise de componentes principais dos espectros de fluorescência das amostras de <i>Whey Protein</i> concentrado (Controle 1) e adulteradas a partir da adição de 30% em massa de Cafeína (Tratamento 1), Creatina (Tratamento 2) e Lactose (Tratamento 3). Excitação a 275 nm. (A) Correlação entre as amostras ( <i>scores</i> ); (B) Influência dos comprimentos de onda ( <i>loadings</i> ) | <b>52</b> |
| <b>Figura 12</b> | <i>Loadings</i> (pesos) sobre os comprimentos de onda de emissão utilizados na análise de componentes principais das amostras Controle 1, Tratamentos 1, 2 e 3, quando excitadas em 275 nm.   | <b>53</b> |
| <b>Figura 13</b> | Análise de componentes principais dos espectros de fluorescência das amostras de <i>whey protein</i> Controle 1 e adulteradas a partir da adição de 30% em massa de Cafeína (Tratamento 1), Creatina (Tratamento 2) e Lactose (Tratamento 3). Excitação a 335 nm. (A) Correlação entre as amostras ( <i>scores</i> ); (B) Influência dos comprimentos de onda ( <i>loadings</i> )               | <b>55</b> |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Figura 14</b> | <i>Loadings</i> (pesos) sobre os comprimentos de onda utilizados na análise de componentes principais das amostras Controle 1, Tratamentos 1, 2 e 3, quando excitadas em 355 nm.  | <b>56</b> |
| <b>Figura 15</b> | Comparação entre as transformações de primeira derivada dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2 (A), e 3 (B).<br>Excitação com 275 nm.  | <b>58</b> |
| <b>Figura 16</b> | Comparação entre as transformações de segunda derivada dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2 (A), e 3 (B).<br>Excitação com 335 nm.   | <b>59</b> |
| <b>Figura 17</b> | Comparação entre as transformações de primeira (A) e segunda (B) derivadas dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2, e 3, no intervalo entre 420 e 440 nm com evidência de pontos de diferenciação das amostras. Excitação com 275 nm. | <b>60</b> |
| <b>Figura 18</b> | Comparação entre as derivadas primeira dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os tratamentos 2 (A), e 3 (B). Excitação com 335 nm.  | <b>61</b> |
| <b>Figura 19</b> | Comparação entre as transformações de segunda derivada dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2 (A), e 3 (B).<br>Excitação com 335 nm.   | <b>62</b> |
| <b>Figura 20</b> | Comparação entre os espectros de emissão referentes as primeiras (A) e segundas (B) derivadas, obtidos com as amostras Controle 1 e os Tratamentos 2, e 3 com evidência de possíveis pontos de diferenciação das amostras. Excitação com 335 nm.                    | <b>63</b> |
| <b>Figura 21</b> | Espectros de emissão da fluorescência com excitação fixada (A) 275 nm e (B) 335 nm dos Controles 1 e 2 e com cafeína a 30% em massa (Tratamento 2 e 4)  | <b>65</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Tabela 1</b>  | Distribuição dos componentes do leite entre coalho e soro.  | <b>16</b> |
| <b>Tabela 2</b>  | Composição típica de concentrados protéicos de soro.  | <b>17</b> |
| <b>Tabela 3</b>  | Perfil de macronutrientes em 100 g de WPC.  | <b>19</b> |
| <b>Tabela 4</b>  | Quantificação de aminoácidos nas proteínas presentes no WPC.  | <b>20</b> |
| <b>Tabela 5</b>  | Testes de Qualidade do WPC – Controle 1.  | <b>31</b> |
| <b>Tabela 6</b>  | Testes de Qualidade do WPC – Controle 2.  | <b>32</b> |
| <b>Tabela 7</b>  | Definição dos tratamentos de acordo com o WPC e adulterante utilizado.  | <b>33</b> |
| <b>Tabela 8</b>  | Parâmetros obtidos com aplicação da equação 1, referente à excitação /emissão (275/335 nm), do Controle 1 e Tratamentos 1, 2 e 3.                             | <b>43</b> |
| <b>Tabela 9</b>  | Parâmetros obtidos com aplicação da equação 2, referente à excitação /emissão (335/420 nm), do Controle 1 e Tratamentos 1, 2 e 3.                             | <b>44</b> |
| <b>Tabela 10</b> | Parâmetros obtidos com aplicação da equação 1, referente à excitação/emissão (335/470 nm), do Controle 1 e Tratamentos 1, 2 e 3.                              | <b>45</b> |
| <b>Tabela 11</b> | Distância Euclidiana obtida entre as comparações dos espectros completos das amostras adulteradas em relação ao <i>Whey Protein</i> concentrado (Controle 1). | <b>50</b> |
| <b>Tabela 12</b> | Porcentagem da variância calculada pela análise de componentes principais. Excitação a 275 nm.  | <b>51</b> |
| <b>Tabela 13</b> | Porcentagem da variância calculada pela análise de componentes principais. Excitação a 335 nm.  | <b>54</b> |
| <b>Tabela 14</b> | Distância Euclidiana obtida entre as comparações dos espectros completos das amostras.  | <b>66</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|       |   |
|-------|---|
| ATP   | Adenosina trifosfato                            |
| ELISA | Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay            |
| FADH  | Dinucleótido de flavina e adenina reduzido      |
| g     | grama   |
| Kg    | Kilograma                                       |
| Kh    | Kilohertz                                       |
| Kv    | Kilovolt  |
| mg    | miligrama                                       |
| ml    | mililitro                                       |
| NADH  | Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido |
| nm    | nanomêtro                                       |
| ns    | nanosegundo                                     |
| pH    | potencial Hidrogeniônico                        |
| ps    | picosegundo                                     |
| TCSPC | Time-Correlated Single Photon Counting          |
| UFC   | Unidade formador de colônia                     |
| WPC   | WHEY Protein concentrado                        |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 12 |
| 2 OBJETIVOS.....  | 15 |
| 2.1 Objetivos gerais.....   | 15 |
| 2.2 Objetivos específicos.....  | 15 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA.....  | 16 |
| 3.1 Leite e Soro de Leite.....  | 16 |
| 3.2 Caracterização e Propriedades Funcionais do <i>Whey Protein</i> .....         | 18 |
| 3.3 Adulterantes e Fraudes.....   | 22 |
| 3.3.1 Cafeína.....  | 22 |
| 3.3.2 Creatina.....   | 24 |
| 3.3.3 Lactose.....  | 25 |
| 3.4 Espectroscopia.....   | 26 |
| 3.4.1 Espectroscopia de Luminescência.....  | 27 |
| 3.4.2 Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo - TCSPC.....             | 29 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 31 |
| 4.1 Obtenção e preparo das amostras.....  | 31 |
| 4.2 Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo.....                       | 33 |
| 4.3 Espectroscopia de Fluorescência no Estado Estacionário.....                   | 34 |
| 4.4 Tratamento estatístico dos dados.....   | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 37 |
| 5.1 Estudo Teste – Espectros de Emissão.....                                      | 37 |
| 5.2 Estudo Final.....   | 42 |
| 5.2.1 Fluorescência Resolvida no Tempo.....                                       | 42 |
| 5.2.2 Espectroscopia de Fluorescência Estacionária.....                           | 46 |
| 5.2.3 Análise de Componentes Principais – PCA.....                                | 50 |
| 5.3 Cálculo das derivadas.....  | 57 |
| 5.4 Adulterações com cafeína no <i>Whey Protein</i> concentrado (Controle 2)..... | 64 |
| 6 CONCLUSÕES.....   | 67 |
| 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....   | 68 |
| REFERÊNCIAS.....  | 69 |

## 1 INTRODUÇÃO

No mercado tem-se uma grande procura por suplementos alimentares, em especial os protéicos, objetivando a obtenção de maior rendimento no anabolismo de proteínas por parte dos consumidores. Dentre os suplementos proteicos, um dos mais bem elaborados no mercado é o *Whey Protein* (concentrado de proteínas de soro do leite) (HARAGUCHI et al., 2006).

O *Whey Protein* é considerado por muitos a melhor proteína existente e é hoje, talvez o suplemento mais conhecido no mundo. Sua recomendação é comum não só para atletas e praticantes de atividade física que procuram aumento de desempenho, mas também para qualquer pessoa que esteja buscando uma vida mais saudável e que esteja preocupada com a boa forma física. Assim, é um produto amplamente consumido por frequentadores de academias e afins, bem como por atletas profissionais (INMETRO, 2014).

Apesar da exigência rigorosa da legislação à garantia de qualidade destes produtos, em 2014 a Anvisa havia proibido a distribuição e comercialização de vários lotes de *Whey Protein* comercializado no território nacional, por constatar diferenças significativas entre os componentes presentes e as informações contidas nos rótulos, por detecção de vários componentes adicionados ao produto e não declarados, como cafeína, proteínas de outra origem que não láctea e carboidratos (INMETRO, 2014).

Substâncias como cafeína, creatina e a lactose podem estar presentes no *Whey Protein*, sem a sua devida informação no rótulo, tornando imprescindível a melhoria das metodologias para identificação de substâncias em alimentos. De acordo com Braga (2000), a cafeína é um alcalóide presente de várias formas em chás, café, cacau que age sobre o sistema nervoso central, provocando aumento no estado de vigília, alívio de cansaço, aumento do metabolismo e da diurese. A cafeína é utilizada em exercícios de endurance produzindo efeitos ergogênicos, que pode ser explicado principalmente pela estimulação do sistema nervoso e mobilização de ácidos graxos livres. A creatina melhora o desempenho físico para práticas esportivas de forma rápida após seu consumo (BEMBEM e LAMONT, 2005), sendo muito utilizada por praticantes de musculação para aumentar força e massa muscular (SOUZA JÚNIOR et al., 2007). Segundo Medeiros e colaboradores (2010), muitos indivíduos fisicamente ativos, frequentadores de academia, atletas e fisiculturistas fazem uso deste suplemento visando melhor desempenho físico, aumentando a capacidade trabalho e potência muscular. No caso dos açúcares, a lactose é o principal carboidrato do leite e se encontra no soro em torno de 70% e no leite em pó em torno 5% (MORIWAC, 2000). É muito usada na indústria farmacêutica como excipiente para enchimento de cápsulas e compactação de

comprimidos nas formulações (ORDONEZ, 2005), sendo um importante (e barato) composto comumente utilizado em adulterações de pós.

O processo de monitoramento contínuo da qualidade é uma exigência incontestável da indústria de alimentos moderna e da legislação brasileira (JANKOVSKÁ, 2003). É de responsabilidade total das empresas produtoras destes suplementos alimentares, garantir que sejam seguros e que todas as informações contidas nos rótulos sejam verdadeiras, mesmo que o monitoramento e controle de qualidade venha gerar elevados custos para a empresa (Brasil, 2003). Para isto a indústria tem incorporado em seus processos de análise para controle de qualidade, métodos instrumentais rápidos e mais precisos em substituição às técnicas antigas. A espectroscopia tem sido largamente utilizada para análise de substâncias químicas em alimentos. Na espectroscopia, estuda-se a interação da radiação eletromagnética com a matéria, determinando os diferentes níveis de energia e suas transições atômicas e moleculares, não alterando a estrutura das amostras (OLIVEIRA, 2011). Dentre as técnicas espectroscópicas já utilizadas estão a espectroscopia por absorção/transmissão no infravermelho, Raman e Infravermelho por reflexão total atenuada (ATR) (MORGANO, 2005; FERRÃO, 2004).

Em estudo realizado por Karoui e Baerdemaeker (2007), foi analisado o potencial uso de técnicas não destrutivas, como a espectroscopia no infravermelho pelo MIR e NIR, a fluorescência e a ressonância magnética nuclear, associadas a ferramentas estatísticas, com o objetivo de garantir a identificação de substâncias constituintes de produtos lácteos, de modo a assegurar sua qualidade. Este estudo revelou uma boa aplicabilidade destas tecnologias na identificação de fraudes no leite. A espectroscopia de infravermelho foi utilizada na identificação de fraudes em produtos lácteos como descrito no trabalho de Balalin e Smirnov (2011). Os autores constataram a presença de melamina em leite em pó, inclusive em produtos para uso infantil. Outro estudo realizado por Cassoli (2010) utilizando o FTIR, demonstrou fraudes em leite cru por adição de bicarbonato de sódio, citrato de cálcio e soro.

Em relação a espectroscopia de luminescência há décadas é utilizada para a caracterização de diferentes sucos de frutas, como sucos de maçã, tomate (PETRUS, 1988), laranja (AMMARI, REDJDAL e RUTLEDGE, 2015), óleos vegetais (GUZMÁN et al., 2015), bebidas alcólicas (MARKECHOV, MÁJEK e SÁDECKÁ, 2014), e também na identificação de adulterantes (PETRUS e ATTAWAY, 1980; PETRUS, FELLERS e ANDERSON, 1984). Sletten et al. (2005) compararam o uso de imunoensaio baseado em fluorescência resolvida no tempo e o teste de ELISA na detecção de caseína em alimentos como purê de batata instantâneo, mistura para bolos e mistura de temperos. Os resultados

obtidos pelos autores, porém, não proveram melhoramentos sobre a técnica enzimática de detecção da caseína. Assim, informações sobre o uso da espectroscopia de luminescência resolvida no tempo como ferramenta de detecção de fraudes em alimentos ainda é escassa.

O *Whey Protein* é um produto derivado lácteo com características nutricionais importantes, podendo ser administrado a pessoas com deficiências nutricionais ou atletas profissionais ou amadores. Assim, é mandatório que a qualidade e segurança destes suplementos seja assegurada. A hipótese deste trabalho é que é possível a detecção de adulterações em formulações de *Whey Protein* em pó com substâncias de diferentes origens a partir da utilização de metodologias que exigem pouca manipulação, sejam eficientes e de baixo custo como a espectroscopia de fluorescência. Este é um método promissor de análise de qualidade de alimentos, tanto durante o processo de fabricação, como o produto final.

Os resultados obtidos a partir deste trabalho podem contribuir para o potencial uso de diferentes técnicas de espectroscopia de fluorescência na análise de produtos alimentares, visando melhorias no processo de controle de qualidade e também contribuir, para que no futuro, a metodologia seja parte integrante de protocolos de controle de qualidade de produtos lácteos de indústria e laboratórios oficiais de análise de alimentos.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar a caracterização e eficácia de técnicas espectroscópicas de fluorescência para detecção de adulterações em *Whey Protein*, como uma ferramenta adicional de aferição de controle de qualidade do produto.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar amostras de *Whey Protein* pura e adicionadas de cafeína, creatina e lactose pela técnica de espectroscopia por fluorescência resolvida no tempo, TCSPC – *Time Resolved Single Photon Counting* e avaliar as diferenças, visando detecção de adulteração.
- Avaliar a técnica espectroscópica de fluorescência estacionária para detecção de adulteração de *Whey Protein* por adição de cafeína, creatina e lactose.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Leite e Soro de Leite

O leite é um líquido esbranquiçado produzido por glândulas mamárias, com elevado valor nutritivo capaz de satisfazer as necessidades nutricionais dos recém-nascidos de qualquer espécie de mamíferos, incluindo humanos. É uma emulsão constituída de uma fase líquida e partículas sólidas em suspensão (SGARBIERI,1996), sendo constituído por aproximadamente 87,5% de água, sendo o percentual restante distribuído em carboidratos (principalmente a lactose), gordura, proteínas, minerais e vitaminas (RODRIGUES ,2001).

A fração aquosa do leite é denominada soro, obtido após a formação do coalho por precipitação da caseína durante o processo de fabricação do queijo, através da coagulação enzimática, obtendo o soro doce. Possui os mesmos componentes do leite, em proporção diferente (FITZSIMONS et al., 2006). Em média, cada 10 litros de leite produz-se 1 kilo de queijo, resultando numa sobra de 9 litros de soro líquido, na qual retêm praticamente todos sólidos como lactose, proteínas e minerais (JELEN, 1992). A distribuição dos componentes do leite entre a massa obtida após a coagulação e o soro está descrita na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Distribuição dos componentes do leite entre Massa Coagulada e soro

| Componente %     | Leite | Massa<br>Coagulada | Soro |
|------------------|-------|--------------------|------|
| Água             | 87,3  | 6,5                | 80,8 |
| Gordura          | 3,7   | 3,5                | 0,2  |
| Lactose          | 4,7   | 0,3                | 4,4  |
| Caseína          | 3,0   | 2,6                | 0,4  |
| Demais proteínas | 0,4   | Traços             | 0,4  |
| Minerais         | 0,7   | 0,1                | 0,6  |

Fonte: (KIRK; SAWYER, 1991).

Os constituintes do soro do leite estão listados na Tabela 2 abaixo. Quando está na forma líquida, apresenta uma proporção de 93% de água para 0,6% de proteínas, tornando imprescindível a concentração do produto, de modo a se obter as desejadas propriedades funcionais. Além disso, o produto concentrado tem um valor comercial 3 à 10 vezes maior que o soro em pó (HUFFMAN, 1996).

Tabela 2: Composição típica de concentrados protéicos de soro

| <b>Componente</b> | <b>WPC35<br/>(%)</b> | <b>WPC50<br/>(%)</b> | <b>WPC80<br/>(%)</b> | <b>Alfa-lactoalbumina<br/>(%)</b> | <b>Isolado<br/>(%)</b> |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Proteína          | 34 a 35              | 53                   | 80                   | 85 a 90                           | >90                    |
| Lactose           | 53                   | 35                   | 7                    | -                                 | 1                      |
| Gordura           | 4                    | 5                    | 4 a 7                | -                                 | 1                      |
| Cinzas            | 8                    | 7                    | 4 a 7                | -                                 | 3                      |

WPC: Proteína do soro concentrada

Fonte: Adaptado de Huffman (1996).

O método mais utilizado para a concentração das proteínas do soro é a ultrafiltração. Segundo Baldasso (2008), a ultrafiltração promove a retirada da água seletivamente através da membrana semi-permeável sem aplicação de calor, preservando então os nutrientes do soro. Por meio da ultrafiltração, pode-se obter concentrado proteico contendo de 35 a 80% de proteínas, ou isolado proteico, contendo mais de 90% de proteínas. O que resulta é um produto de elevado valor nutricional largamente utilizado como suplemento alimentar, conhecido por *Whey Protein* (PEREIRA et al., 2003).

Após a ultrafiltração procede-se à secagem por pulverização do concentrado no *Spray Dryer* (Figura 1). A secagem ocorre em três etapas: primeiramente ocorre dispersão pelo atomizador, de modo a ampliar a superfície de contato das gotículas de soro; em seguida, há a aplicação de corrente de ar quente para que haja uma troca de calor na câmara de secagem; e finalmente, ocorre a evaporação para obtenção do soro seco, em pó (OLIVEIRA, 2010).

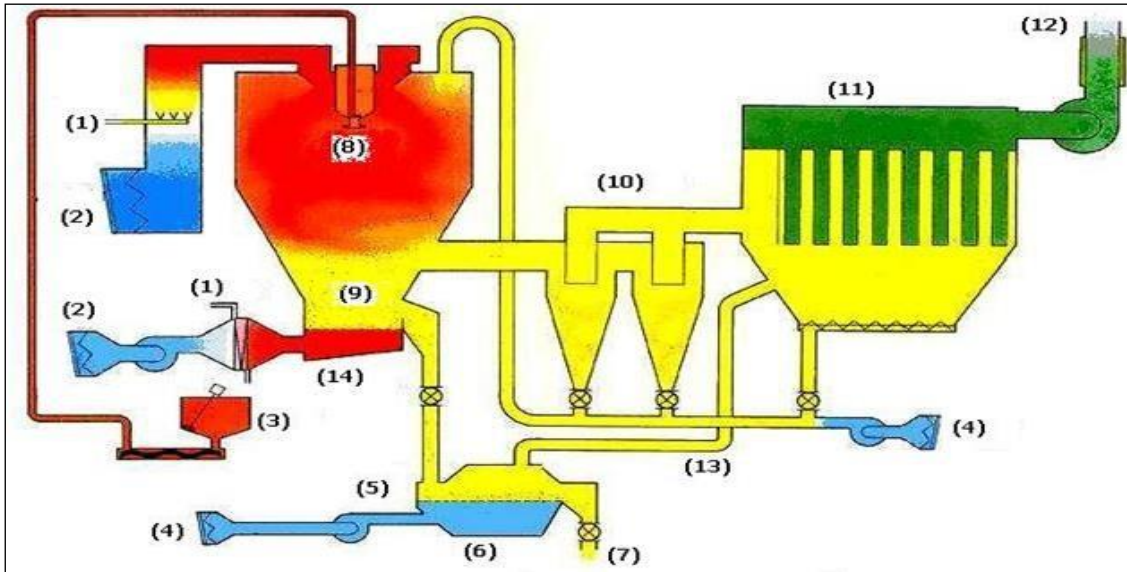


Figura 1: Sistema de secagem por pulverização (*Spray Dryer*).

(1)-Ar Quente; (2)-Entrada de Ar; (3)-Bomba de Alimentação; (4)-Introdução de Ar para Resfriamento do Produto; (5)-Produto Seco Frio; (6)-Leito Fluidizado; (7)-Produto Final Seco; (8)-Bico de Atomização-Spray; (9)-Câmara de Produto Atomizado (névoa); (10)-Ciclone de Recuperação; (11)-Filtro de Ar Invertido; (12)-Saída de Ar; (13)-Produto Recuperado; (14)-Leito Fluidizado de Aglomeração.

Fonte: Adaptado de Rosa, Tsukada e Freitas (2006).

### 3.2 Caracterização e Propriedades Funcionais do *Whey Protein*

Existem no mercado vários produtos cuja base são as proteínas do soro de leite, que são concentrados protéicos do soro (WPC – *Whey Protein Concentrate*), os isolados proteicos (WPI – *Whey Protein Isolate*) e os hidrolisados (WPH – *Whey Protein Hidrolized*). Os concentrados apresentam uma concentração proteica variando entre 25 e 89%, com remoção de constituintes não proteicos e redução lactose. Os isolados proteicos apresentam de 90 a 95% de proteínas com gordura e lactose em quantidades mínimas, ou mesmo ausentes. O hidrolisado contém uma fração concentrada e isolada, porém as proteínas são quebradas em peptídeos menores, com alto valor nutricional, boa digestibilidade e baixa alergenicidade (TERADA et al., 2009).

Em relação ao WPC, além de seu alto valor nutricional, seu custo é menor que os outros tipos tornando um produto de mais fácil acesso pela população. A título ilustrativo, as tabelas 3 e 4 apresentam valores referentes ao perfil de macronutrientes em 100g de WPC e o perfil de aminoácidos presentes em 1 g de proteína no WPC, respectivamente. O *Whey*

*Protein* é formado por proteínas com alto teor de aminoácidos essenciais, dentre eles os de cadeia ramificada. A hidrólise dessas proteínas leva também a formação de peptídeos com atividade biológica, atuando por exemplo como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, imunomoduladores, e como adjuvantes em fatores de crescimento.

Tabela 3: Perfil de macronutrientes em 100 g de WPC.

| Macronutrientes em 100g de CPS | Quantidade em (g) |
|--------------------------------|-------------------|
| Proteína                       | 80                |
| Gordura                        | 7                 |
| Carboidrato                    | 8                 |

Fonte: HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006

Tabela 4: Quantificação de aminoácidos nas proteínas presentes no WPC

| Aminoácidos     | mg/g de WPC |
|-----------------|-------------|
| Alanina         | 4,9         |
| Arginina        | 2,4         |
| Asparagina      | 3,8         |
| Ácido aspártico | 10,7        |
| Cisteína        | 1,7         |
| Glutamina       | 3,4         |
| Ácido glutâmico | 15,4        |
| Glicina         | 1,7         |
| Histidina       | 1,7         |
| Isoleucina      | 4,7         |
| Leucina         | 11,8        |
| Lisina          | 9,5         |
| Metionina       | 3,1         |
| Fenilalanina    | 3,0         |
| Prolina         | 4,2         |
| Serina          | 3,9         |
| Treonina        | 4,6         |
| Triptofano      | 1,3         |
| Tirosina        | 3,4         |
| Valina          | 4,7         |

Fonte: (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006).

As proteínas do soro possuem uma estrutura globular, na qual contêm pontes de dissulfeto, que lhe conferem estabilidade estrutural. As principais são: beta-lactoglobulinas (BLG), alfa-lacotoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Igs) e glicomacropéptídeos (GMP). Todas variando em tamanho, massa molecular, estrutura e função biológica.

Os constituintes do WPC possuem muitas propriedades funcionais que podem beneficiar a saúde. Dentre elas, destacam-se a ação de modulação metabólica do organismo, inibição ou retardamento de doenças e também retardamento no envelhecimento precoce. Fato que corrobora com o intenso consumo do produto por praticantes de academias esportivas envolvidos em treino de resistência e por pessoas idosas que buscam melhor

qualidade e prolongamento de vida (HARAGUCHI et al., 2006). Várias das propriedades funcionais são dependentes da estrutura molecular de suas proteínas, as quais devem permanecer intactas após seu processo de fabricação (SGARBIERI, 2004).

As proteínas do soro de leite são fontes de aminoácidos essenciais, incluindo os BCAA (*Branched Chain Amino Acids*), que propiciam um aumento de massa magra e melhoram o desempenho muscular em atletas de alto rendimento (CARRILHO, 2013). O termo BCAA se refere a 3 aminoácidos essenciais, de cadeia ramificada, leucina, valina e isoleucina, relacionados a performance atlética do indivíduo. Estes aminoácidos se constituem aproximadamente de 15% das proteínas dos músculos, sendo muito utilizados por atletas para acelerar a recuperação de lesões musculares, através de uma prevenção do catabolismo muscular por excesso de esforço, além de se apresentar como fonte energética para possível queda de glicemia em exercícios prolongados (VAN HALL et al., 1998).

Estudos têm demonstrado a atividade imunomoduladora das proteínas do *Whey Protein*, devido à sua capacidade de estimular a produção de IgM, e concomitantemente o aumento da concentração de glutatona no baço (SGARBIERI,2004). Pacientes portadores do vírus HIV que tomaram doses diárias de 10 a 40 g tiveram aumento do número de linfócitos TCD4, além de aumento de peso de 3 a 7 Kg após três meses de suplementação com WPC (SGARBIERI, 2004).

As proteínas do soro apresentam também atividade contra o vírus da hepatite C e também ação bactericida contra o microrganismo *Helicobacter pylori* (IKEDA et al.,1998). No tocante a uma ação anticâncer, as proteínas do soro concentrado tiveram efeitos eficazes para inibir o aparecimento de tumores de cólon com eficácia superior, quando comparada à caseína, proteínas da carne e soja (MCINTOSH, 2001).

Estudos realizados em ratos revelaram que proteínas do soro do leite bovino conferem proteção ao sistema cardiovascular, por reduziram os níveis de triacilgliceróis e colesterol sérico e hepático (NAGAOKA et al., 1992). Peptídeos derivados das proteínas apresentam ação hipotensora, graças à ação inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina, além de apresentarem ação antiagregante plaquetária (TAKANO, 1992; LEONIL, 2001).

### 3.3 Adulterantes e Fraudes

A autenticidade em alimentos é um problema no Brasil, e também no mercado mundial. Com o objetivo de auferir maiores lucros, muitos fabricantes praticam adulterações em produtos alimentícios, por acrescentar substâncias estranhas ao produto ou mesmo subtração de seus componentes, com conseqüente baixa qualidade dos mesmos, além de colocar em risco a saúde dos consumidores (BEHMER, 1999).

A adulteração intencional ou acidental em produtos alimentícios no Brasil é de difícil detecção pelas autoridades sanitárias. Assim, a garantia da qualidade e segurança alimentar fica comprometida. As agências governamentais e os laboratórios oficiais necessitam cada vez mais de métodos eficientes, sensíveis e baratos, a fim da detecção precoce destas não conformidades (WANG et al., 2009). Segundo Oliveira et al. (2009), as adulterações em alimentos ocorrem comumente por adição de produtos de baixo custo e que dificultem sua detecção por técnicas laboratoriais simples. O fato de não existir uma legislação muito bem definida em relação aos teores dos constituintes de suplementos alimentares corrobora para a prática da fraude.

A resolução RDC/ANVISA nº 18 de 27 de abril de 2010 (BRASIL, 2010), dispõe sobre alimentos para atletas, e define os requisitos para que um produto seja considerado suplemento proteico para atletas deverá conter no mínimo 10 g de proteína por porção, de acordo com Inciso I Artigo 8º. Já a resolução RDC/ANVISA nº 360 de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003), é um regulamento técnico que dispõe sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando a rotulagem obrigatória, com todas as informações verdadeiras. Suspeitas de adulterações no suplemento *Whey Protein*, obrigam a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a coletar e realizar testes de qualidade para averiguação da conformidade com o que está declarado no rótulo dos fabricantes. Dentre as situações de não conformidade encontram a detecção de substâncias não declaradas como cafeína, lactose (também presente no soro em pó), creatina, maltodextrina, proteínas vegetais como a de soja, entre outras (INMETRO, 2014).

#### 3.3.1 Cafeína

As metilxantinas são metabólitos secundários provenientes de várias plantas utilizadas como fontes alimentícias. São substâncias estimulantes não alcólicas, tônicas e revigorantes (como café, chocolate e guaraná), que são consumidas no mundo todo na forma de



preparações caseiras ou produtos industrializados. Estas substâncias são consideradas como os psicoativos mais consumidos no mundo (FREDHOLM et al.; 1999).

A cafeína, de estrutura química representada na Figura 2, é um pseudoalcalóide identificado como 1,3,7 trimetilxantina, derivada da base púrica adenina. É consumida como fármaco por uma pequena parcela da população e também na forma de bebida alimentícia não alcoólica. Aproximadamente uma porção de 170 ml de café contém em média 80 mg de cafeína, e uma lata de refrigerante de cola em torno de 38 mg (ANDRADE et al., 1995).

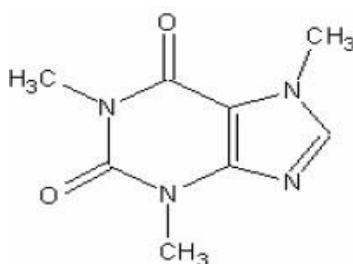


Figura 2: Estrutura química da cafeína

Fonte: SIMÕES (2010).

A cafeína apresenta ampla atividade biológica. Pode induzir alterações, no sistema cardiovascular, na homeostase do cálcio, e principalmente no sistema nervoso central, podendo afetar o comportamento humano aumentando a capacidade de alerta e reduzindo a sensação de fadiga. Nawrot et al. (2003), mostrou que o consumo de cafeína de no máximo 4,6 mg/kg de massa de um indivíduo adulto saudável, não está relacionado a seus efeitos adversos como irritabilidade, arritmia, taquicardia, distúrbios do sono e gastrointestinais. A dose letal de cafeína é estimada entre 5 à 10g para um adulto. Entretanto, casos fatais são raros, com relatos de concentrações plasmáticas acima de 80µg/ml.

Como droga estimulante pode ser usada equivocadamente em atividades desportivas (DE MARIA; MOREIRA, 2007). A cafeína também é utilizada como suplemento ergogênico em exercícios físicos de longa duração com a finalidade de retardar a fadiga muscular e aumentar o desempenho atlético, estimulando a oxidação da gordura e poupando oxidação de carboidratos, resultando em maior desempenho físico (SINCLAIR & GEIGER,2000).

Em 2003 a cafeína integrava a lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping. Atualmente a mesma agência a retirou da lista de substâncias proibidas, devido à dificuldade de se estabelecer concentrações limite para ser considerada como doping (WADA, 2010).

### 3.3.2 Creatina

A creatina é uma amina nitrogenada, também chamada ácido acético alfa-metilguanidina. Foi identificada em 1835 pelo cientista Michel Chevreu, sendo confirmada anos mais tarde como constituinte dos alimentos de origem animal, (DEMANT; RHODES, 1999). Possui um importante papel no metabolismo energético, uma vez que é um substrato para formação de ATP. Durante o metabolismo energético, dentre as diversas maneiras de se obter energia sob a forma de ATP (como a glicólise, a oxidação de carboidratos e lipídeos), o uso da creatina fosforilada (fosfocreatina) como substrato é importante, devido à velocidade de formação do ATP, mesmo que em menor concentração comparado com as outras reações metabólicas (que são definitivamente mais lentas) (SAHLIN, TONKONOJI e SÖDERLUND, 1998). A suplementação de creatina gera um incremento da fosfocreatina e creatina no músculo esquelético e no tecido nervoso, facilitando e aumentando a capacidade de geração energética, frente a um estímulo como, por exemplo, exercício físico (CASEY et al., 1996). Um terço da creatina extra que chega ao músculo está na forma fosforilada e dois terços desta creatina estão predominantemente na forma livre (VANDENBERGHE et al., 1997).

É utilizada no tratamento de doenças musculares, falência coronária congestiva, atrofia muscular, doenças mitocondriais, distrofias musculares, artrite (ANDREASSEN et al., 2001). Fuld e colaboradores em 2005 demonstraram que pacientes com obstrução pulmonar crônica tiveram seu quadro clínico melhorado, devido ao fortalecimento da musculatura periférica com o uso da creatina. Dentre as reações adversas relacionadas à suplementação, é citada na literatura a manifestação de disfunções renais e hepáticas, câibras musculares e desidratação (PRITCHARD e KAIRA, 1998)

A creatina é sintetizada a partir da glicina, arginina e metionina (BEMBEN; LAMONT, 2005). Sua biossíntese está ilustrada na figura abaixo e se inicia com a transferência do grupamento amino da arginina para a glicina, seguida da ação da enzima glicina amidinotransferase, resultando em guanidinoacetato e ornitina. Pela ação da guanidinoacetatometiltransferase ocorre a metilação do guanidinoacetato pela s-adenosil-metionina, resultando na creatina apresentada na Figura 3 (FELDMAN, 1999).

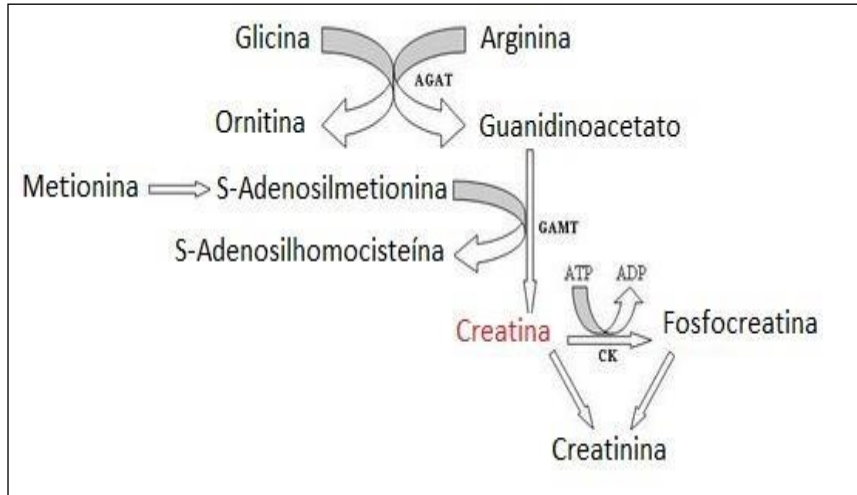


Figura 3: Síntese da creatina

Fonte: FELDMAN (1999).

Uma dieta normal fornece aproximadamente 1 g diária de creatina, através do consumo de alimentos de origem animal, sendo que a dose diária recomendada é de 2g. Além do aporte pela dieta, o organismo produz 1 g diária nos rins, pâncreas e fígado (CALFEE e FADALE, 2006). Independentemente da fonte, seja suplementada, endógena ou dieta normal, aproximadamente 95% da creatina é absorvida pelos músculos esqueléticos (SHAO e HATHCOCK, 2006), enquanto uma pequena fração é armazenada no cérebro, testículos, fígado e pulmões (GREEN et al., 1996).

### 3.3.3 Lactose

A lactose é o principal carboidrato do leite. Sua estrutura consiste em uma molécula de dissacarídeo formada por uma molécula de glicose unida a uma molécula de galactose por ligação beta 1,4 glicosídica. A lactose apresenta o fenômeno da mutarotação que é uma alteração sofrida na sua conformação espacial, na qual a forma estrutural de alfa-lactose pode ser convertida na forma estrutural de beta-lactose, através de uma mudança da hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor (PERRONE, 2010). Seu metabolismo é baseado na reação de hidrólise enzimática pela lactase, gerando glicose e galactose. Nos processos industriais, a lactase utilizada é de origem microbiana, que resulta em aproximadamente 95% da lactose hidrolisada em aproximadamente duas horas de incubação. Se a digestão não ocorre normalmente, a lactose contida no leite permanece inalterada e não será absorvida pelo intestino, sofrendo fermentação pela microbiota intestinal (ARAUJO, 2011). Os produtos

resultantes de sua hidrólise, glicose e galactose, além de apresentarem sabor mais adocicado e melhor solubilidade, também minimizam os problemas apresentados por consumidores intolerantes à lactose (KIBBE, 2000).

O processo de secagem de soro de leite, ou mesmo do concentrado proteico do soro de leite, compreende a formação da lactose amorfa e altamente higroscópica. Se esta secagem for realizada sem uma prévia cristalização haverá uma forte tendência de agregar as partículas coloidais (GANZLE, HAASE e JELEN, 2008). Pode estar presente em produtos lácteos sob duas formas cristalinas: a alfa hidratada e a beta anidra.

A lactose em sua forma de pó apresenta-se como partículas cristalinas brancas, com propriedades edulcorantes com sabor adocicado e inodoro. A adição de lactose ao *Whey Protein* pode levar a melhor aceitação do produto devido a estas características, entretanto, a proporção de carboidratos e proteína estaria alterada e deve constar no rótulo do produto. Dependendo das concentrações, incluindo os desvios não contabilizados pela legislação, o produto pode não atingir as concentrações mínimas requeridas para ser classificada como WPC. A lactose é bastante utilizada na indústria farmacêutica como excipiente na formulação de cápsulas e comprimidos, e na indústria alimentícia é utilizada para o preparo de alimentos de uso infantil.

### **3.4 Espectroscopia**

O fenômeno da espectroscopia começou quando Isaac Newton, em 1672, observou na parede de um ambiente escuro, a imagem refletida de bandas coloridas originárias da luz do sol que atravessava o orifício na parede e incidia diretamente em um prisma de vidro. Colocou uma lente entre o prisma e a parede, percebeu que as cores da imagem refletidas na parede tinham sua área de superfície aumentada. Em seguida, um novo prisma foi colocado entre a parede e o vidro e constatou que se a dispersão da luz fosse cumulativa, a imagem das cores aumentava, e se as dispersões fossem opostas formava-se a luz branca. A este conjunto de bandas coloridas deu-se o nome espectro (COSTA, 2003).

No ano de 1800 Willian Herchel observa a radiação infravermelha, devido ao surgimento de calor em diferentes bandas coloridas. Utilizou um prisma e termômetros para medição das diferentes temperaturas correspondentes às bandas de cores, verificando que a temperatura aumentava da cor violeta para vermelho no espectro da luz solar que atravessava o prisma. Verificou que as temperaturas mais altas estavam além da coloração vermelha, e era invisível. Recebeu então a denominação de radiação invisível do infravermelho (BIGGS;

JOHNSSON e SJAUNJA, 1987). Em 1827, J. Hershel utilizou uma fenda mais estreita e fonte de luz chama oriunda da queima de vários elementos. Verificou bandas de cores distintas, que possibilitou a identificação de cada um deles. Surge a espectroscopia (COSTA, 2003).

O termo espectroscopia se aplica a métodos analíticos de vários materiais, através da interação de radiações eletromagnéticas com a matéria sólida, líquida ou gasosa, variando no espectro eletromagnético nas faixas do ultravioleta, do visível e infravermelho. Esta interação ocorre por absorção, espalhamento, emissão e reflexão da radiação incidente. O espectro gerado representa graficamente a interação de absorção, emissão ou espalhamento da radiação em função do comprimento de onda da radiação (CARMO, 2011).

A espectroscopia é utilizada para determinação dos níveis de energia dos átomos uma vez que a ligação entre dois átomos compreende também diferentes tipos de energia. As energias eletrônicas, a vibracional e a translacional, estão relacionadas a determinadas regiões nos espectros de ultravioleta, infravermelho e micro-ondas (SALA, 2008). Para que ocorra absorção energética pela molécula, é primordial que a radiação incidente provoque excitação dos modos vibracionais. A energia absorvida corresponderá a diferença entre os dois níveis vibracionais, em um determinado comprimento de onda específico (ALMEIDA, 2009). Para espécies moleculares onde existem várias ligações químicas, as transições eletrônicas implicam em alteração da energia dos elétrons de valência nos orbitais moleculares (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 1992).

A espectroscopia de absorção seja no visível ou ultravioleta oferece várias aplicações na caracterização de compostos orgânicos para identificação de grupos funcionais moleculares. Certos compostos orgânicos, além de absorverem energia através dos seus cromóforos, também apresentam como característica a capacidade de emitir uma parte desta energia absorvida na forma de luminescência (LAKOWICZ, 1999).

### **3.4.1 Espectroscopia de Luminescência**

É um método analítico que tem sido muito utilizado para caracterizar substâncias de difícil identificação. Se constitui em uma metodologia de fácil manuseio, rápida, altamente sensível com capacidade de detecção numa escala de grandeza até  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; razões pelas quais é muito utilizada nas áreas farmacêutica, biológica, ambiental e industrial (ARANCIBA, 2003).

O fenômeno da luminescência é uma característica de materiais puramente de emissão óptica de energia, em um comprimento de onda maior que o comprimento de onda da fonte

irradiante de excitação. Dependendo da fonte de energia de excitação tem-se sua classificação como fluorescência, fosforescência e quimiluminescência (TURRO, 1991). As moléculas em seu estado fundamental têm seu nível energético vibracional mais baixo ( $S_0$ ), porém quando absorvem um quantum de energia de uma fonte de luz, ocorre migração de elétrons para níveis de maior energia. Após este fenômeno de absorção do quantum de energia, os elétrons voltam ao seu estado fundamental, ocorrendo assim uma remissão de parte da energia absorvida do singlete ( $S_1$ ), sendo denominada neste caso de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Na figura 4 pode-se observar um diagrama esquemático do fenômeno da luminescência.



Figura 4: Diagrama de Jablonski.

Fonte: Adaptado de Lakowicz (2006)

Os espectros de fluorescência variam de acordo com as informações que se almejam obter das amostras. Existem três principais espectros: os de emissão, os de excitação e os de excitação e emissão sincronizados. Para obtenção da emissão de uma amostra, é necessário excitá-la no comprimento de onda fixo e promover a medição da intensidade de energia reemitida em ampla faixa de comprimentos de onda. A representação gráfica das intensidades reemitidas em função do comprimento de onda representa o espectro de emissão. O espectro de excitação faz-se de maneira oposta ao espectro de emissão, ou seja, o comprimento de onda de excitação é variável e o comprimento de onda de emissão permanece constante (PARKER, 1968). Já no caso de um espectro sincronizado, é necessária a varredura simultânea de comprimentos de onda de excitação e de emissão, dentro de um intervalo de comprimento de onda constante. Este tipo de espectro é largamente aplicado para se avaliar amostras com vários fluoróforos (LLOYD, 1977).

### 3.4.2 Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo – TCSPC

O decaimento e a luminescência típica de compostos orgânicos são muito rápidos, e duram alguns ps ou até dezenas de ns, o que limita a gravação de sinal elétrico luminoso emitido num dado tempo. Fatores limitantes a serem consideradas são: a energia da luz emitida pode ser muito fraca para criar uma tensão considerável para o fluxo óptico; o próprio sinal de emissão ser muito suave para uma amostragem analógica; ocorrência de perdas ópticas no trajeto; a ocorrência de fotobranqueamento com uma excitação mais forte; e até mesmo características peculiares como a sensibilidade do próprio detector. Estas dificuldades são aumentadas quando as amostras são constituídas de poucas moléculas, ou até mesmo moléculas únicas. Para superar estes problemas pode-se realizar a análise do tempo de decaimento da fluorescência através da metodologia de contagem de fóton único resolvida no tempo (*Time-Correlated Single Photon Counting – TCSPC*). Nesta técnica, a partir da excitação repetida por pulsos de luz incidente na amostra desejada, torna-se possível a coleta de dados de vários ciclos de excitação-emissão, mesmo com poucos fótons. Obtém-se assim a montagem de um perfil de decaimento do sinal de fluorescência. O tempo é cronometrado por fótons únicos de forma periódica, usando como referência o pulso de excitação correspondente ao fóton emitido (WAHL, 2014).

As medidas experimentais de fluorescência resolvida no tempo apresentam histogramas típicos com queda exponencial das contagens em posteriores marcações de tempo conforme figura abaixo. As figuras 5 e 6 ilustram como é formado o histograma de contagem.

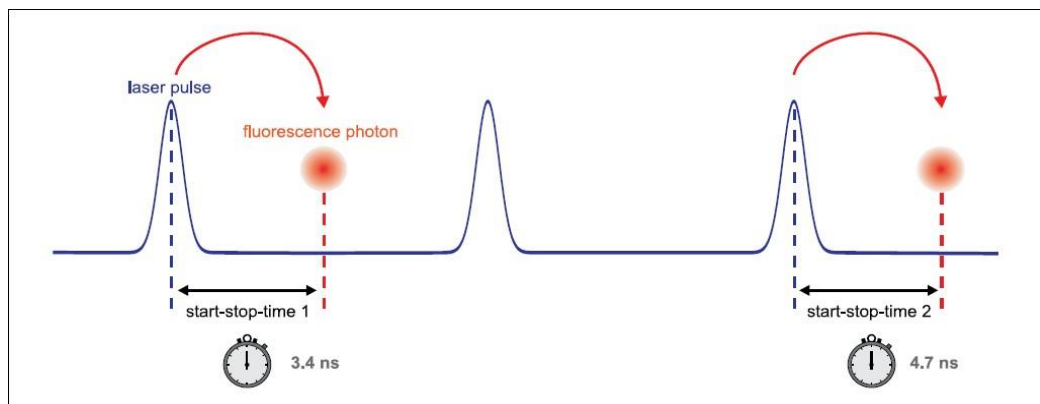


Figura 5: Histograma de pulsos de laser para medidas por TCSPC.

Fonte: WAHL (2014).

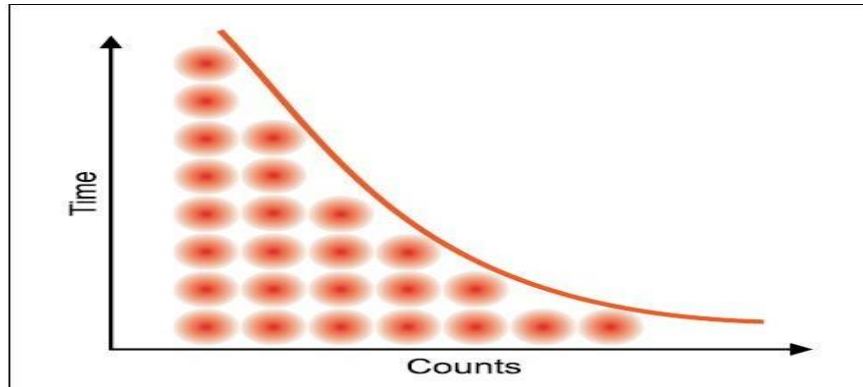


Figura 6: Queda exponencial de contagem de fótons em função do tempo (TCSPC).

Fonte: (WAHL, 2014).

Na literatura, há poucos trabalhos caracterizando produtos alimentares através desta metodologia. Recentemente, Brandao et al. (2017a; 2017b; 2017c) publicaram resultados da aplicação desta metodologia em pesquisas caracterizando leites de diversas fontes, teores de gordura e adulterações.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e preparo das amostras

Foi utilizado *Whey Protein* puro, livre de flavorizantes e edulcorantes, concentrado e adquirido em farmácia de manipulação da cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Dois lotes diferentes do mesmo fornecedor, de procedência nacional, foram denominados de Controle 1 e 2 e considerados como “padrões”. São produtos constituídos por um pó uniforme, de coloração branco a amarelado, com odor lácteo característico, sem grumos, e sem adição de flavorizantes e corantes. As Tabelas 5 e 6 apresentam os testes de qualidade fornecidos pelo laudo de Controle de Qualidade do fornecedor.

Tabela 5: Testes de Qualidade do WPC – Controle 1

| TESTES                       | ESPECIFICAÇÕES          | RESULTADOS     |
|------------------------------|-------------------------|----------------|
| Perda por dessecação         | $\leq 4,5$ ( 2hs/105°C) | 3,53%          |
| pH                           | 6,0-6,6                 | 6,56           |
| Cinzas                       | $\leq 3,5\%$            | 2,90%          |
| Lactose                      | $\leq 5,0\%$            | 5,00%          |
| Gordura                      | $\leq 8,0\%$            | 7,80%          |
| ADPI                         | $\leq$ disco B          | A              |
| Proteína                     | $\geq 75,0\%$           | 75,50%         |
| TESTES MICROBIOLÓGICOS       |                         |                |
| CTB                          | $\leq 50000$ UFC/gr     | $< 1000$ UFC/g |
| Fungos/Leveduras             | $\leq 50$ UFC/gr        | $< 10$ UFC/g   |
| Coliformes Totais            | $\leq 100$ UFC/gr       | $< 10$ UFC/g   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $\leq 100$ UFC/gr       | $< 10$ UFC/g   |
| Coliformes Termotolerantes   | $\leq 10$ UFC/gr        | $< 10$ UFC/gr  |

Tabela 6: Testes de Qualidade do WPC – Controle 2

| TESTES                        | ESPECIFICAÇÕES         | RESULTADOS       |
|-------------------------------|------------------------|------------------|
| Perda por dessecação          | $\leq 4,5$ (2hs/105°C) | 3,57%            |
| pH                            | 6,0-6,6                | 6,55             |
| Cinzas                        | $\leq 3,5\%$           | 3,11%            |
| Lactose                       | $\leq 5,0\%$           | 5,00%            |
| Gordura                       | $\leq 8,0\%$           | 7,00%            |
| ADPI                          | $\leq$ disco B         | A                |
| Proteína                      | $\geq 75,0\%$          | 76,00%           |
| <b>TESTES MICROBIOLÓGICOS</b> |                        |                  |
| CTB                           | $\leq 50000$ UFC/gr    | $< 50000$ UFC/gr |
| Fungos/Leveduras              | $\leq 50$ UFC/gr       | $< 10$ UFC/gr    |
| Coliformes Totais             | $\leq 100$ UFC/gr      | $< 10$ UFC/gr    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | $\leq 100$ UFC/gr      | $< 10$ UFC/gr    |
| Coliformes Termotolerantes    | $\leq 10$ UFC/gr       | $< 10$ UFC/gr    |

Adulterações foram realizadas nos dois tipos de *Whey Protein* concentrado (Controle 1 e 2) através da adição de cafeína, lactose e creatina na proporção de 30% (m/m). Os adulterantes também foram adquiridos em farmácia de manipulação no comércio local de Juiz de Fora. A montagem do planejamento experimental está descrita na Tabela 7.

Tabela 7: Definição dos tratamentos de acordo com o WPC e adulterante utilizado

| Tratamento   | Adulterante (% de substituição) |          |         |
|--------------|---------------------------------|----------|---------|
|              | Cafeína                         | Creatina | Lactose |
| Controle 1   | 0                               | 0        | 0       |
| Controle 2   | 0                               | 0        | 0       |
| Tratamento 1 | 30                              | 0        | 0       |
| Tratamento 2 | 0                               | 30       | 0       |
| Tratamento 3 | 0                               | 0        | 30      |
| Tratamento 4 | 30                              | 0        | 0       |
| Tratamento 5 | 0                               | 30       | 0       |
| Tratamento 6 | 0                               | 0        | 30      |

Controle 1:(WPC Puro Fagron); Controle 2:(WPC Puro Lote); Tratamento 1:(Controle 1 70% + Cafeína 30%); Tratamento 2:(Controle 1 70% + Creatina30%); Tratamento 3: (Controle 1 70% + Lactose 30%); Tratamento 4:(Controle 2 70% + Cafeína 30%); Tratamento 5: (Controle 2 70% + Creatina 30%); Tratamento 6: ( Controle 2 70% + Lactose 30%).

Para todos os tratamentos e amostras controle foram confeccionadas pastilhas de 130 mg, através da utilização de uma prensa hidráulica automatizada (Atlas<sup>TM</sup> Power Hydraulic Press T25, SPECAC INC, Fort Washington, PA, USA), trabalhando com 3 toneladas durante 1 segundo. Previamente à prensagem, os constituintes foram pesados, em balança analítica nas corretas proporções apresentadas na Tabela 7 e procedeu-se com uma homogeneização das misturas com gral e pistilo por 30 segundos. As pastilhas geradas possuíam dimensão de diâmetro e espessura de 1 mm, as quais foram posteriormente analisadas através da espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo e espectroscopia de fluorescência.

#### 4.2 Espectroscopia de Fluorescência Resolvida no Tempo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Espectroscopia de Materiais do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As curvas de decaimento da intensidade da fluorescência foram medidas baseadas no método da contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC), utilizando como fonte de excitação uma lâmpada ultra rápida de nanosegundos (nF920 Ultrafast Nanosecond Flashlamp, Edinburgh Instruments, Livingston, UK) preenchidas com gás hidrogênio, sempre utilizando uma pressão entre 0,4 e 0,7 bar, frequência de 40 kHz e tensão de 6,8 kV. A

aquisição da emissão de fótons detectados foi realizada em espectrômetro modelo FL920, Edinburgh Instruments (Livingston, UK) com fotomultiplicador sensível ao azul.

Medidas foram realizadas em dois comprimentos de onda de excitação, sendo obtidas três emissões distintas, ou seja, excitação em 275 nm, gerando emissão de fluorescência em 335 nm; e excitação em 335 nm com emissões ocorrendo em 420 e 470 nm.

Os decaimentos exponenciais obtidos foram ajustados por deconvolução da curva com a função de resposta do instrumento e a confiabilidade do ajuste foi adquirida através do qui-quadrado reduzido, utilizando o *software* F900 da Edinburgh Instruments. As equações 1 e 2 representam os modelos exponenciais utilizados. A equação 1 foi utilizada para o ajuste dos decaimentos advindos das emissões em 335 e 470 nm. Já a equação 2 foi aplicada no ajuste relacionado às emissões em 420 nm.

$$Ajuste(t) = A + B_1 \exp^{-t/T_1} + B_2 \exp^{-t/T_2} + B_3 \exp^{-t/T_3} \quad (1)$$

$$Ajuste(t) = A + B_1 \exp^{-t/T_1} + B_2 \exp^{-t/T_2} + B_3 \exp^{-t/T_3} + B_4 \exp^{-t/T_4} \quad (2)$$

Onde  $A$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  e  $B_4$ , são coeficientes das equações e  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  e  $T_4$  são os tempos de vida de decaimento.

A partir dos resultados do ajuste dos decaimentos experimentais, calculou-se a intensidade média de tempo de vida através da equação 3 (BRANDAO et al., 2017a).

$$\langle T_i \rangle = \frac{\sum_i B_i T_i^2}{\sum_i B_i T_i} \quad (3)$$

Onde  $\langle T_i \rangle$  é a intensidade média de tempo de vida,  $B_i$  são coeficientes obtidos pelo ajuste dos decaimentos referentes à cada  $i$ -ésimo tempo de vida.

### 4.3 Espectroscopia de Fluorescência no Estado Estacionário

As aquisições de dados da detecção da emissão de fótons foram realizadas no mesmo espectrômetro (FL920) com fotomultiplicador sensível ao azul, utilizando o software F900 da Edinburgh Instruments. A fonte de excitação utilizada foi uma lâmpada ultra rápida de

nanossegundos (nF920), preenchida com gás hidrogênio. O tempo de exposição à fonte foi de 0,1 segundo, e para cada emissão, o resultado obtido foi a soma de 3 varreduras.

Primeiramente procedeu-se um estudo teste para avaliação dos melhores comprimentos de onda a serem utilizados. Os parâmetros do mapeamento de emissão das medidas de luminescência para varredura da excitação foram previamente avaliados no estudo teste aplicado ao *Whey Protein* concentrado (Controle 1), com excitações fixadas em comprimentos de onda de 275, 290, 305, 320 e 335 nm, com varredura de emissão entre 300 e 650 nm, com passos de 1 nm.

Após estudo teste, foi utilizado nos tratamentos e amostras controle, a excitação em 275 nm, gerando varredura de emissão entre 300 e 550 nm, com passos de 1 nm; e excitação em 335 nm, com varredura de emissão entre 360 e 645 nm, com passos de 1 nm.

#### 4.4 Tratamento estatístico dos dados

No estudo estatístico foi aplicada análise de medidas de similaridade, através da correlação da medida de distância vetorial entre os sinais de emissão de duas amostras, ou seja, pela Distância Euclidiana. Cada vetor corresponde ao valor de intensidade obtido no espectrômetro. Os vetores foram normalizados para a análise das distâncias de modo que tivessem média zero e variância (e desvio-padrão) igual a 1, de acordo com a equação 4.

$$y_i^N = \frac{y_i - \bar{y}}{s} \quad (4)$$

Onde  $y_i^N$  é o valor normalizado do  $i$ -ésimo elemento do vetor,  $y_i$  é o valor não normalizado do  $i$ -ésimo elemento do vetor,  $\bar{y}$  é a média de todos os elementos do vetor; e  $s$  é o desvio padrão calculado a partir de todos os elementos do vetor.

A Distância Euclidiana (distância geométrica) entre as curvas (vetores) é uma medida invariante a translações, porém assume covariâncias iguais entre as classes e em geral não é invariante às transformações lineares (Costa, 1999). É a métrica mais utilizada na prática (ALMEIDA, 2004) e é calculada de acordo com a equação 5.

$$d(x, y) = \sqrt{\sum (I1_i - I2_i)^2} \quad (5)$$

Onde  $I_1$  é a intensidade do espectro 1 e  $I_2$  é a intensidade do espectro 2, ambas no comprimento de onda  $\lambda$ .

A distância padrão é considerada uma medida simples da dispersão das informações pontuais ao redor de um centro médio (TARTARUGA,2008). Em estatística, a técnica da elipse de desvio padrão proporciona o conhecimento da dispersão espacial dos dados e é muito útil para a comparação de distribuições em diferentes tratamentos. De acordo com Tartaruga (2008), cada elipse define um espaço tridimensional e é definida por meio de três parâmetros: ângulo de rotação, dispersão ao longo do maior eixo e dispersão ao longo do menor eixo. O eixo maior define a direção de máxima, ou seja, a maior variabilidade da distribuição, enquanto, o menor eixo é perpendicular ao eixo anterior e define a menor variabilidade. Pode-se definir o número de desvios padrão para representar a abrangência da elipse de desvio padrão, que podem ser de um, dois ou três desvios. Assim, para uma distribuição de tipo normal dos pontos dos dados ao redor do centro médio tem-se que: uma elipse de um desvio padrão cobrirá, aproximadamente, 68% dos centróides do espaço analisado; de dois desvios padrão cobrirá, aproximadamente, 95% dos centróides; e de três desvios padrão cobrirá, aproximadamente, 99% dos centróides.

Com os dados normalizados com média 0 e desvio padrão 1, se a distância calculada entre as curvas for menor que dois desvios padrões, tem-se que, de acordo com a técnica da elipse de desvios padrões, 95% dos dados da distribuição podem ser considerados semelhantes entre si. Acima deste valor, diferentes (TARTARUGA, 2008).

Os dados foram processados através do software SAS Studio (Versão 4.3).

Os espectros de luminescência normalizados para as análises das distâncias foram submetidos a cálculos de análise de componentes principais (PCA) utilizando o software MINITAB 16. A análise de componentes principais é discriminatória e utiliza dados em forma de matriz onde as linhas correspondem aos espectros das amostras e as colunas aos comprimentos de onda. A matriz de dados é decomposta em duas matrizes. A matriz de “scores” contém dados sobre as novas coordenadas dos componentes principais enquanto na matriz de pesos (“loadings”) estão informações sobre a importância de cada comprimento de onda no “score” de cada PC. Por convenção, o primeiro componente principal (PC1) é o que descreve a maior parte da informação a respeito das amostras (no caso, variação da intensidade de fluorescência). Os próximos componentes, ou seja, PC2, PC3 e assim por diante, descrevem o máximo de informação que não é explicada pelo componente principal anterior (BALLABIO; TODESCHINI, 2009).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo Teste Espectros de Emissão

Em análise preliminar utilizando a amostra Controle 1, foram analisados os mapas de emissão com excitações fixadas em 275, 290, 305, 320 e 335 nm. Os espectros de emissão foram obtidos na faixa entre 300 e 650 nm (Figura 7).

Análise Preliminar do *Whey Protein* puro:

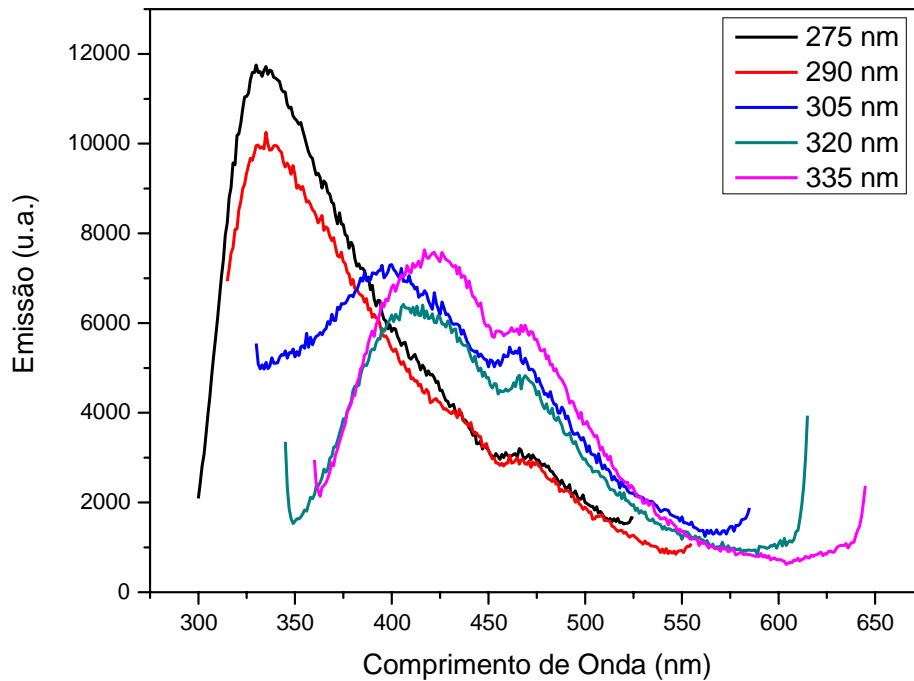
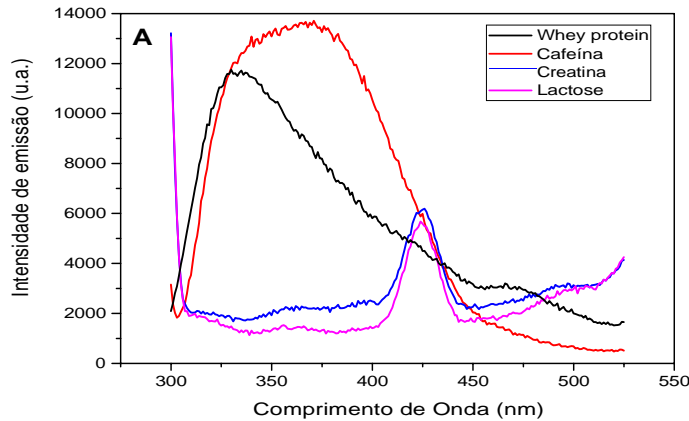


Figura 7: Espectros de emissão da amostra Controle 1 com excitações fixadas nos comprimentos de onda de 275, 290, 305, 320 e 335 nm. Fonte: o autor.

Dentre os vários comprimentos de onda de excitação, pode ser observado na Figura 7 que as emissões obtidas com as excitações em 275 e 335 nm foram as que apresentaram os maiores picos de energia. Dessa forma, as análises para avaliação da adição dos compostos adulterantes às amostras controle foram estudadas nestes comprimentos de onda de excitação.

Como caracterizações preliminares, os adulterantes foram testados de forma a se obter seus espectros de emissão para os comprimentos de onda fixados em 275 nm e 335 nm (Figura 8A e 8B).

Análise Preliminar *Whey Protein* Puro mais adulterantes puros 275nm:



Análise Preliminar *Whey Protein* Puro mais adulterantes puros 335nm:

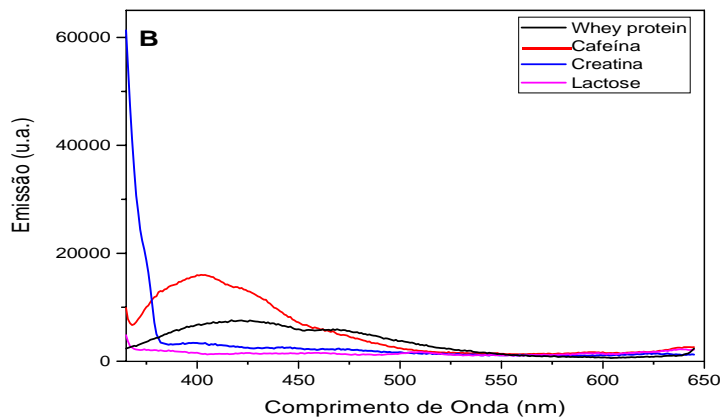


Figura 8: Espectros de emissão da amostra Controle 1 e dos adulterantes puros (caféina, creatina e lactose). Comprimentos de onda de excitação: (A) 275 nm e (B) 335 nm. Fonte: o autor.

Pode-se observar pela Figura 8A que tanto a creatina quanto a lactose, apresentaram picos de emissão em torno de 425 nm. A cafeína, por outro lado, mostrou-se com emissão intensa em ampla faixa de comprimento de onda (entre 300 e 440 nm aproximadamente).



Nos espectros de emissão gerados pela excitação em 335 nm (Figura 8B), os adulterantes creatina e lactose não apresentaram picos de emissão. Já a cafeína apresentou um pico de baixa intensidade abrangendo a faixa de aproximadamente 370 nm a 500 nm.

A partir da adição de cafeína, creatina e lactose ao Controle 1, foi realizada a análise espectral, representada na Figura 9.

Espectros obtidos com adulterações de cafeína, creatina e lactose ao *Whey Protein*

(A) excitação fixada em 275 nm, (B) - excitação fixada em 335 nm:

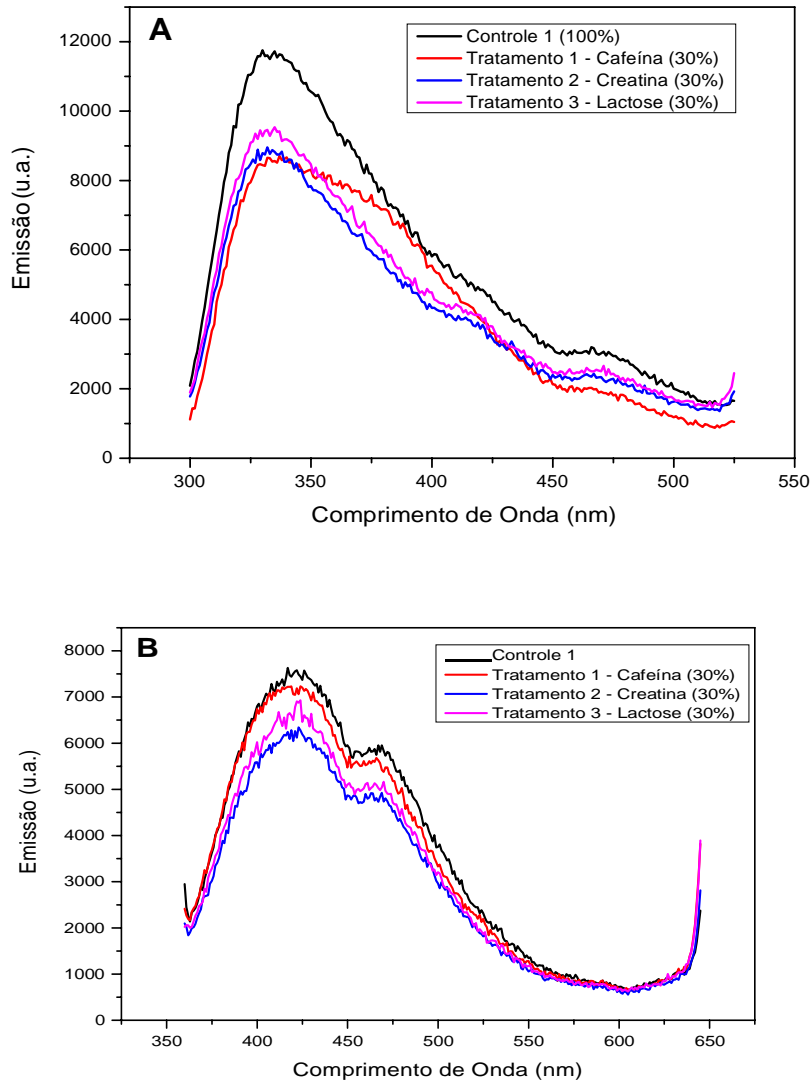


Figura 9: Espectro de emissão da fluorescência da amostra Controle 1 e das adulteradas com adição de 30% de cafeína (Tratamentos 1), 30% de creatina (Tratamento 2) e 30% de lactose (Tratamento 3). (A) - excitação fixada em 275 nm, (B) - excitação fixada em 335 nm. Fonte: o autor.

Para a excitação em 275 nm (Figura 9A), verificou-se claramente uma banda de emissão em torno de 380 nm na amostra contendo 30% de cafeína. Lactose e creatina não apresentaram picos ou bandas como indicativo de sua presença. Em relação à excitação em 335 nm (Figura 9B), as curvas demonstraram comportamento semelhante em todos os casos, não sendo possível a diferenciação por simples observação do perfil espectral. Observa-se que para as duas excitações utilizadas, as intensidades de emissões se mostram sempre menores nas amostras adulteradas (Tratamentos 1, 2 e 3) quando comparadas com a intensidade da

fluorescência obtida com a amostra Controle 1. Segundo Guevara (2010), em uma amostra, pode ocorrer interações entre um fluoróforo e outra substância presente no sistema, gerando uma fluorescência reduzida (supressão), resultado de um processo de desativação. Ainda, o autor relata que para soluções de altas concentrações, pode haver formação de compostos constituídos por várias moléculas fluorescentes (dímeros ou polímeros maiores), o que pode gerar alterações nos espectros e diminuir a intensidade de fluorescência. No caso da cafeína por exemplo, é relatada a influência na intensidade de fluorescência de diferentes fluoróforos em solução, podendo atuar como ativadora, ou seja, aumentando a intensidade (MAHAPATRA et al., 2012; McKEMY et al., 2000), mas também como supressora (KRÍŠKO et al., 2005).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a fluorescência é uma técnica eficaz para demonstrar os espectros de excitação e emissão de concentrados de leite em pó. Contudo, há na literatura poucos trabalhos demonstrando o seu uso na avaliação da qualidade dos alimentos (NOVALES, 1996). Quando ocorre a medição de fluorescência em amostras de alimentos, compostos químicos presentes naturalmente em sua matriz induzem emissão de fluorescência. Em derivados do leite, diversas substâncias contribuem para a fluorescência, tais como, riboflavina, vitamina A, aminoácidos aromáticos, produtos de reação de Maillard, produtos de oxidação lipídica, coenzimas (e.g. NADH), entre outros. Cada molécula tem um espectro característico de excitação e emissão, que pode ser usado para separar e identificar moléculas e também diferenciar substituições e conformações na mesma molécula (ANDERSEN, 2008).

Kulmyrzaev (2005) utilizou espectroscopia de fluorescência em leite submetidos à suaves aquecimentos e demonstrou fluoróforos naturais do leite como os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, e também algumas coenzimas como o NADH e FADH. Após uma excitação de 250 nm do leite, conseguiu-se o registro do espectro de emissão entre 280 e 480 nm com máxima fluorescência obtida em 342 nm, a qual foi atribuída à presença do aminoácido triptofano. Neste trabalho, ao excitar as amostras de *Whey Protein* concentrado com 275 nm, houve um máximo de emissão em torno de 335 nm, o que também pode ser atribuído à presença deste aminoácido na amostra, visto que segundo Pulgarín et al. (2005), os dois aminoácidos fluorescentes tirosina e triptofano, os quais estão presentes na fração solúvel de leite, são responsáveis pela fluorescência intrínseca do *Whey*. Apesar da faixa espectral de emissão entre 280 a 360 nm ser conhecida na literatura por atribuição a diferentes aminoácidos (CHRISTENSEN et al, 2006) e o pico obtido em 335 nm ter longa extensão, o ponto máximo está mais próximo dos valores atribuídos ao triptofano (357 nm com excitação

em 280 nm) do que tirosina (302 nm com excitação em 276 nm), evidenciando a influência do triptofano na fluorescência obtida. Além disso, o espectro de fluorescência das amostras de *Whey Protein* concentrado obtidas a 275 nm de excitação (Figura 9A), é muito semelhante ao espectro de  $\alpha$ -lactoalbumina (uma das proteínas presentes no *Whey Protein*, fonte de triptofano) descrito por Christensen et al. (2006).

Em relação a excitação com 335 nm (Figura 9B), dois picos de emissão foram obtidos nas amostras, um com máximo em aproximadamente 425 nm e outro em 460 nm. Ullah et al. (2017) obtiveram intensas bandas de emissão em 410 nm ao analisar leite de vaca e de búfala ao excitar a amostra com comprimento de onda de 320 nm. Os autores atribuíram este pico à presença de vitamina B6 e vitamina A, uma vez que ambos compostos fluorescem nestas posições. Apesar do processo de secagem do soro do leite durante a fabricação do *Whey Protein*, o produto analisado em pó ainda apresenta aproximadamente 7% de teor de gorduras de acordo com a informação presente no rótulo (tabela 6). Sendo a vitamina A lipossolúvel, é provável que este pico esteja relacionado a sua presença no produto. Além disso, a presença de beta-caroteno foi também evidenciada por Ullah et al. (2017), com pico de emissão aos arredores de 440 nm quando o leite foi excitado com 350 nm. O pico aqui observado em 460 nm sob excitação de 335 nm pode também estar alinhado a presença do também lipossolúvel beta-caroteno na amostra.

## 5.2 Estudo Final

### 5.2.1 Fluorescência Resolvida no Tempo

A fluorescência resolvida no tempo para este trabalho baseou-se no TCSPC, através da construção de curva de decaimento da intensidade da fluorescência, após detecção de um único fóton num intervalo de tempo.

As Tabelas 8, 9 e 10 apresentam os parâmetros das equações ajustadas, obtidos quando referentes às excitações/emissões de 275/335 nm, 335/420 nm e 335/470 nm, respectivamente.

Tabela 8: Parâmetros obtidos com aplicação da equação 1, referente à excitação /emissão (275/335 nm), do Controle 1 e Tratamentos 1, 2 e 3.

| Parâmetros     | Excitação/emissão (275/335 nm) |               |                |               |
|----------------|--------------------------------|---------------|----------------|---------------|
|                | Controle 1                     | Tratamento 1  | Tratamento 2   | Tratamento 3  |
| T1 (ns)        | 0,48 ± 0,03                    | 0,30 ± 0,02   | 0,43 ± 0,03    | 0,58 ± 0,03   |
| T2 (ns)        | 2,10 ± 0,06                    | 2,12 ± 0,04   | 2,09 ± 0,05    | 2,28 ± 0,06   |
| T3 (ns)        | 4,38 ± 0,06                    | 4,83 ± 0,05   | 4,51 ± 0,06    | 4,71 ± 0,07   |
| <T>            | 2,46 ± 0,05                    | 2,68 ± 0,04   | 2,51 ± 0,04    | 2,52 ± 0,04   |
| A              | 0,12                           | 0,16          | 0,14           | 0,12          |
| B1             | 0,08 ± 0,003                   | 0,128 ± 0,009 | 0,083 ± 0,004  | 0,068 ± 0,02  |
| B2             | 0,044 ± 0,001                  | 0,045 ± 0,006 | 0,049 ± 0,0009 | 0,047 ± 0,001 |
| B3             | 0,013 ± 0,0009                 | 0,014 ± 0,006 | 0,013 ± 0,0007 | 0,01 ± 0,0008 |
| B1 (%)         | 20,49                          | 18,55         | 18,32          | 19,88         |
| B2 (%)         | 49,05                          | 47,46         | 51,96          | 54,67         |
| B3 (%)         | 30,46                          | 33,99         | 29,72          | 25,46         |
| X <sup>2</sup> | 0,82                           | 0,84          | 0,71           | 0,71          |

<T> - Intensidade média do tempo de vida

Para a excitação/emissão (275/335 nm), apresentada na Tabela 8, os decaimentos comportaram-se como uma exponencial tripla. No Tratamento 1 foram observadas as maiores diferenças em relação ao Controle 1 (*Whey Protein* concentrado), apresentando um tempo de vida curto de 0,30 ns, um tempo de vida médio de 2,12 ns e um tempo de vida mais longo de 4,83 ns. Para o Tratamento 1, a intensidade média do tempo de vida foi de 2,68 ns, o que corresponde à uma diferença de 9,1% em relação ao Controle 1, porém levando em consideração o tempo de vida T1 para o tratamento 1 (0,30ns) com o Controle 1 (0,48ns) tem-se um diferença de 62%. Já para os Tratamentos 2 e 3, a diferença da intensidade média do tempo de vida foi de 2,0% e 2,6%, respectivamente. Porém levando em consideração o tempo de vida T1 do tratamento 2 (0,43ns) com o Controle 1(0,48ns) tem-se uma diferença de 10,4%, o tempo de vida T1 do tratamento 3 (0,58ns) com o Controle 1(0,48ns) tem-se uma diferença de 17,2%. Portanto pode-se constatar que a adulteração com 30% de cafeína trouxe uma maior influência sobre o tempo de vida da amostra quando comparado com as adulterações com creatina (30%) e lactose (30%). Provavelmente a cafeína tem um maior poder de alteração dos fluoróforos presentes na amostra (MAHAPATRA et al., 2012; KRIŠKO et al., 2005; McKEMY et al., 2000). Brandao et. al., (2017), ao trabalhar com

fluorescência resolvida no tempo para classificar e avaliar a composição de leites em pó integral, desnatado e semidesnatado, constatou que a intensidade média de tempo de vida aumentou do leite desnatado para o integral em 114,4 %, indicando possíveis alterações nos fluoróforos causadas pela concentração de glóbulos de gordura.

Tabela 9: Parâmetros obtidos com aplicação da equação 2, referente à excitação/emissão (335/420 nm), do Controle 1 e Tratamentos 1, 2 e 3.

| Parâmetros     | Excitação/emissão (335/420 nm) |                |                 |                |
|----------------|--------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
|                | Controle 1                     | Tratamento 1   | Tratamento 2    | Tratamento 3   |
| T1 (ns)        | 0,14 ± 0,06                    | 0,09 ± 0,02    | 0,17 ± 0,02     | 0,06 ± 0,01    |
| T2 (ns)        | 1,95 ± 0,07                    | 2,10 ± 0,06    | 2,30 ± 0,08     | 2,02 ± 0,06    |
| T3 (ns)        | 6,29 ± 0,12                    | 6,42 ± 0,01    | 6,56 ± 0,14     | 6,2 ± 0,11     |
| T4 (ns)        | 14,50 ± 0,37                   | 15,32 ± 0,04   | 15,30 ± 0,45    | 14,9 ± 0,36    |
| <T>            | 5,25 ± 0,06                    | 5,41 ± 0,02    | 5,33 ± 0,08     | 5,37 ± 0,04    |
| A              | 0,142                          | -0,084         | -0,001          | -0,076         |
| B1             | 0,269 ± 0,115                  | 0,442 ± 0,08   | 0,249 ± 0,03    | 0,639 ± 0,1    |
| B2             | 0,032 ± 0,0006                 | 0,032 ± 0,0005 | 0,029 ± 0,0005  | 0,028 ± 0,0005 |
| B3             | 0,020 ± 0,0004                 | 0,020 ± 0,0005 | 0,020 ± 0,0006  | 0,021 ± 0,0005 |
| B4             | 0,002 ± 0,0002                 | 0,002 ± 0,0002 | 0,0017 ± 0,0002 | 0,002 ± 0,0002 |
| B1 (%)         | 14,48                          | 14,71          | 15,44           | 14,76          |
| B2 (%)         | 24,65                          | 25,8           | 25,19           | 22,37          |
| B3 (%)         | 49,78                          | 49,63          | 49,80           | 51,90          |
| B4 (%)         | 11,09                          | 9,85           | 9,57            | 10,97          |
| X <sup>2</sup> | 1,2                            | 1,1            | 1,1             | 1,1            |

<T> - Intensidade média do tempo de vida.

Tabela 10: Parâmetros obtidos com aplicação da equação 1, referente à excitação/emissão (335/470 nm), do Controle 1 e Tratamentos 1, 2 e 3.

| Parâmetros     | Excitação/emissão (335/470 nm) |                |                |                |
|----------------|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                | Controle 1                     | Tratamento 1   | Tratamento 2   | Tratamento 3   |
| T1 (ns)        | 0,61 ± 0,02                    | 0,62 ± 0,02    | 0,52 ± 0,02    | 0,35 ± 0,01    |
| T2 (ns)        | 4,65 ± 0,05                    | 4,70 ± 0,05    | 4,60 ± 0,04    | 4,42 ± 0,04    |
| T3 (ns)        | 11,40 ± 0,09                   | 11,60 ± 0,09   | 11,44 ± 0,08   | 11,26 ± 0,07   |
| <T>            | 6,05 ± 0,04                    | 6,16 ± 0,04    | 6,02 ± 0,04    | 6,07 ± 0,02    |
| A              | 0,758                          | 0,887          | 0,892          | 0,992          |
| B1             | 0,082 ± 0,002                  | 0,081 ± 0,002  | 0,096 ± 0,002  | 0,139 ± 0,006  |
| B2             | 0,033 ± 0,0002                 | 0,033 ± 0,0002 | 0,034 ± 0,0002 | 0,034 ± 0,0002 |
| B3             | 0,008 ± 0,0002                 | 0,008 ± 0,0002 | 0,008 ± 0,0002 | 0,009 ± 0,0002 |
| B1 (%)         | 16,73                          | 16,89          | 16,70          | 16,29          |
| B2 (%)         | 51,79                          | 52,66          | 51,70          | 50,36          |
| B3 (%)         | 31,48                          | 30,45          | 31,61          | 33,35          |
| X <sup>2</sup> | 1,6                            | 1,7            | 1,7            | 1,9            |

<T> - Intensidade média do tempo de vida

Para a excitação em 335 nm (Tabelas 9 e 10), os decaimentos foram bem ajustados em uma exponencial quádrupla (para emissão em 420 nm) e tripla (para emissão em 470 nm). Nas duas emissões geradas com a excitação em 335 nm, os maiores tempos de vida de emissão foram novamente observados no Tratamento 1 (adulterante caféina). Neste, a intensidade média do tempo de vida foi de 5,41 ns (Tabela 9) e 6,16 ns (Tabela 10), referentes às emissões em 420 nm e 470 nm, respectivamente. Estes valores correspondem a uma diferença de 2,9% e 1,8%, quando comparados à intensidade média do tempo de vida dos respectivos tratamentos controle. Comparando-se com a Tabela 8, nas Tabelas 9 e 10 pode-se constatar que os aumentos percentuais nas intensidades de tempos de vida de emissão das amostras adulteradas foram menores quando excitadas em 335 nm.

Segundo Lemos, Aliyu e Hungerford (2012), a aplicação da espectroscopia resolvida no tempo é bastante versátil no uso com produtos lácteos e na caracterização de alimentos em geral, bem como em relação à aspectos relacionados à sua segurança, como no caso de adulterações. Brandao et al. (2017) utilizou a técnica de fluorescência resolvida no tempo para classificar e determinar a composição de leite em pó de vaca e cabra. Foram utilizadas as excitações de 270 nm e 315 nm, obtendo-se emissões em 335 nm e 468 nm, respectivamente,

sendo possível diferenciar os dois tipos de leite. Os tempos de vida observados para o leite em pó de vaca foram sempre maiores do que os obtidos com o leite em pó de cabra.

De uma maneira geral, neste trabalho, a caracterização das amostras pela espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo evidenciou diferenças entre a amostra controle e aquelas adulteradas, especialmente a adicionada de cafeína e excitada no comprimento de onda 275 nm. Os resultados aqui obtidos corroboram com fato de que a técnica do TCSPC pode ser importante na detecção de fraudes em produtos lácteos.

### **5.2.2 Espectroscopia de fluorescência estacionária**

Os espectros de fluorescência para *Whey Protein* concentrado (Controle 1) bem como seus tratamentos a partir das adições com teores de 30% de cafeína (Tratamento 1), 30% de creatina (Tratamento 2) e 30% lactose (Tratamento 3) obtidos com as excitações em 275 nm e 335 nm estão apresentados na Figura 10A e 10B, respectivamente. Nas figuras, os espectros foram normalizados de modo que o de máximo de fluorescência obtido em cada caso, tenha o valor igual a 1, na tentativa de evidenciar apenas diferenças significativas entre as amostras.

Espectros obtidos com adulterações de cafeína, creatina e lactose ao *Whey Protein* após normalização (A) - Excitação a 275 nm, (B) - Excitação a 335 nm:



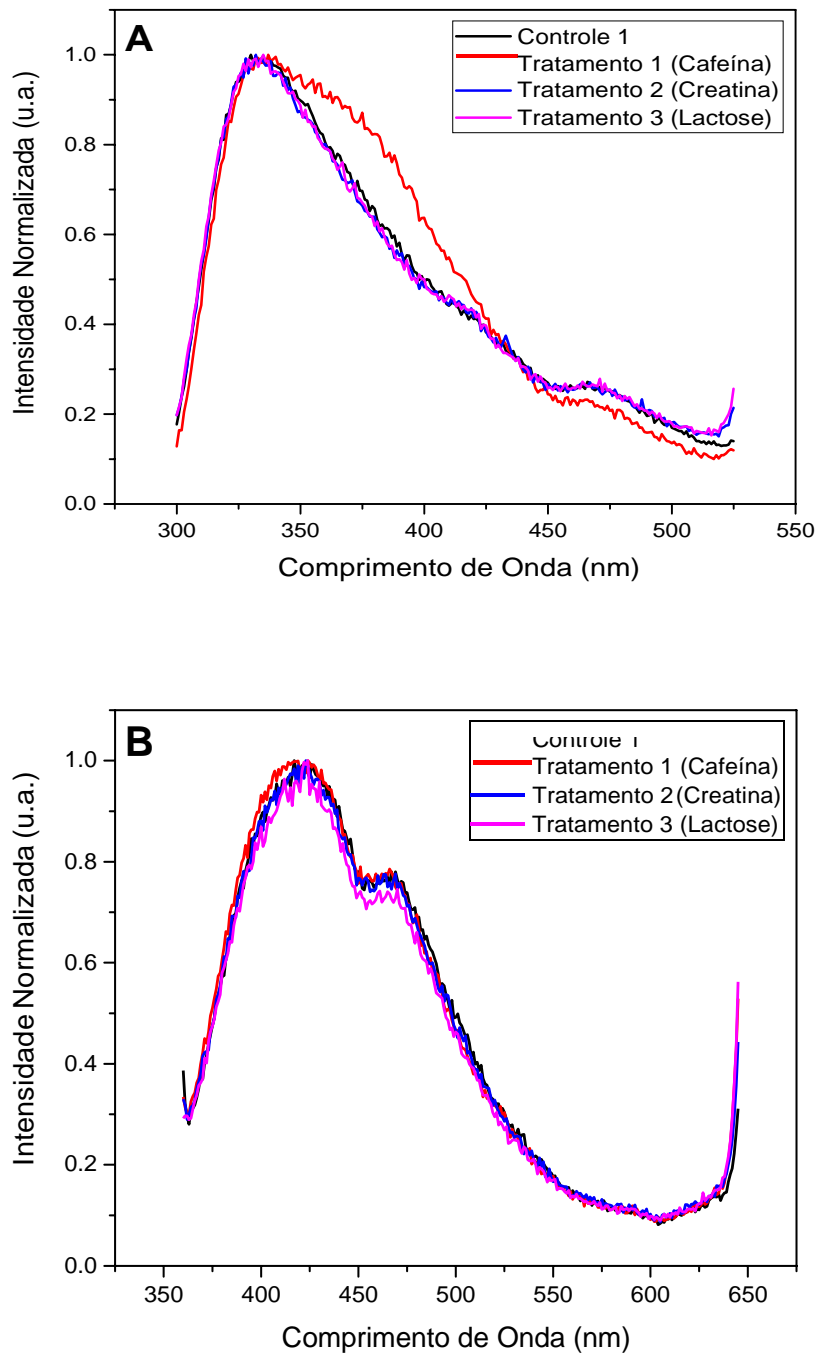


Figura 10: Espectros de emissão normalizados da amostra Controle 1 de *Whey Protein* concentrado e as adulterações nele realizadas. (A) - Excitação a 275 nm, (B) - Excitação a 335 nm. Fonte: o autor.

Pela Figura 10A pode-se constatar que para a excitação das amostras em 275 nm, o espectro de emissão apresentou um pico acentuado centrado em 335 nm e duas oscilações (Ombros - *shoulders*) aproximadamente em 425 nm e 470 nm. Comportamento semelhante foi observado por Pulgarín et al. (2005), ao analisar o espectro de fluorescência de *Wheis* obtidos de diferentes leites (vaca, ovelha, cabra e ser humano). Em todos os *Wheis* foi observado um pico de alta intensidade para uma excitação de 282 nm, gerando uma emissão em 331 nm. Brandao et al. (2017), ao utilizar a espectroscopia de fluorescência para autenticar e classificar diferentes leites em pó, observou um pico acentuado de emissão centrado aproximadamente em 335 nm.

No estudo aqui presente, dentre as amostras, a adulterada com cafeína (Tratamento 1) apresentou uma forma no espectro de luminescência diferente do Controle 1 na faixa de comprimento de onda de aproximadamente 325 nm a 430 nm. Esta faixa corresponde na Figura 8A praticamente a banda de pico da cafeína, podendo-se observar que nos comprimentos de onda de 325 nm e 430 nm os valores de emissão do Controle 1 e Tratamento 1 são bastante parecidos. Dentro desta faixa, as propriedades de emissões inerentes à cafeína trouxeram alterações no espectro de emissão do Tratamento 1.

Os espectros de emissão das amostras adicionadas de creatina (Tratamento 2) e lactose (Tratamento 3) se apresentaram muito semelhantes ao Controle 1, não sendo possível detectar visualmente as adulterações através do espectro de luminescência. Apesar de a creatina e lactose terem apresentado picos de emissão em torno de 430 nm (Figura 8A), quando excitadas em 275 nm, este comportamento não foi observado nas amostras adulteradas com estes compostos (Figura 10A). Entretanto, na Figura 10A, ao se observar a faixa de 430 nm a 530 nm, as intensidades de emissões referentes ao Tratamento 1 (Cafeína), se mostraram sempre menores do que aquelas observadas para a amostra Controle 1 e as adulteradas com creatina e lactose (Tratamento 2 e 3). Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que no espectro de emissão dos constituintes puros (Figura 8A), nesta faixa, as intensidades de emissões da creatina e lactose apresentam uma tendência de aumento, enquanto para cafeína há queda. Em grande parte da banda compreendida entre 430 nm a 530 nm, as emissões da creatina e lactose são maiores do que a da cafeína.

Na Figura 10A, apesar de os espectros dos tratamentos 2 e 3 terem sido muito semelhantes ao do controle 1, no final da banda de emissão estudada (praticamente de 510 a 525 nm), houve uma visual diferenciação. A inclinação das curvas, derivada primeira, referente às amostras com creatina e lactose (Tratamento 2 e 3) se apresentaram semelhantes, com valores de 0,01301 e 0,01295, respectivamente. Já a amostra adulterada com cafeína

(Tratamento 1), apresentou uma inclinação semelhante ao controle 1, com valores de 0,00471 e 0,00544, respectivamente. Então, pela inclinação das curvas espectrais, há indícios de que ao final do espectro, não há uma influência da adição de cafeína à amostra de *Whey Protein* concentrado, mas apresenta evidências da adulteração com as substâncias creatina e lactose. Por outro lado, o comportamento do final do espectro pode estar relacionado também aos harmônicos de difração de segunda ordem proveniente da fonte de emissão.

A excitação em 335 nm (Figura 10B) proporcionou um espectro com dois picos de emissão localizados em aproximadamente 425 nm e 475 nm, entretanto não possibilitou uma diferenciação das amostras, nem mesmo aquela adicionada de cafeína (Tratamento 1). Este comportamento pode estar relacionado ao fato de a cafeína pura quando excitada em 335 nm ter um pico de emissão muito baixo (Figura 8B) quando comparado ao pico gerado com uma excitação de 275 nm (Figura 8A). Segundo Chen e Kohler (2012) ao trabalharem com cafeína em solução aquosa constataram que o espectro de absorção no UV/vis apresentou máxima absorção para um comprimento de onda de 273 nm.

Em relação aos outros adulterantes (creatina e lactose), pela Figura 8B eles não apresentaram nenhum pico de emissão quando excitados em 335 nm, sendo assim o uso do comprimento de onda de 335 nm não possibilitou a detecção das adulterações pela simples observação do espectro de luminescência.

A Tabela 11 consta os valores calculados da distância Euclidiana entre os espectros. Para esta análise, a normalização foi realizada de modo a se obter média igual a zero e desvio padrão igual a 1, como descrito no item 4.5 deste documento, facilitando os cálculos de determinação de semelhança entre os espectros. A título ilustrativo, os perfis espectrais são os mesmos. Foi adotado um critério qualitativo baseado na semelhança entre espectros completos, através do cálculo da distância Euclidiana, como apresentado na equação 3. O critério adotado foi que, após a nova normalização dos dados, valores de distância entre pares de espectros abaixo de 2 (ou seja, até dois desvios padrões de valor unitário) foram considerados semelhantes. Para aqueles com distância igual ou maior que 2 considerou-se que são diferentes entre si.

Tabela 11: Distância Euclidiana obtida entre as comparações dos espectros completos das amostras adulteradas em relação ao *Whey Protein* concentrado (Controle 1).

| Comparações entre os espectros | Excitação (nm) | Distância Euclidiana |
|--------------------------------|----------------|----------------------|
| Tratamento 1 – Controle 1      | 275            | 3,30                 |
| Tratamento 2 – Controle 1      | 275            | 0,81                 |
| Tratamento 3 – Controle 1      | 275            | 0,98                 |
| Tratamento 1 – Controle 1      | 335            | 1,50                 |
| Tratamento 2 – Controle 1      | 335            | 1,02                 |
| Tratamento 3 – Controle 1      | 335            | 1,59                 |

Os dados da distância Euclidiana apresentados na Tabela 11 puderam validar as observações visuais dos espectros da Figura 10A e 10B. Para a excitação de 275 nm, apenas a comparação entre o Tratamento 1 com o Controle 1 revelou distância euclidiana maior que 2 desvios padrões, significando que o espectro completo da amostra contendo cafeína diferencia-se do Controle 1. Os tratamentos 2 e 3 podem ser considerados semelhantes à amostra controle 1 pela análise realizada. Com relação a excitação em 335 nm não se obteve diferenciação significativa entre nenhum dos tratamentos e a amostra controle 1.

### 5.2.3 Análise de Componentes Principais - PCA

Para confirmar a diferenciação realizada visualmente através dos espectros de fluorescência (Figura 10A e 10B) e pelos cálculos de distância Euclidiana (Tabela 11), foi realizada a análise de componentes principais (PCA). A Tabela 12 mostra os resultados do PCA da matriz proveniente dos espectros de fluorescência (normalizados de acordo com os cálculos de distância Euclidiana) do *Whey Protein* concentrado (Controle 1) e os adulterados com 30% de cafeína, 30% de creatina ou 30% de lactose, para a excitação de 275 nm (dados equivalentes aos da Figura 10A).

No conjunto de dados estudados, o primeiro (PC1) e o segundo (PC2) componentes principais, já descrevem acima de 90% da variância acumulada dos espectros. A Figura 11 representa o gráfico de *scores* (separação entre as amostras – Fig. 11A) e de *loadings* (influência dos comprimentos de onda no posicionamento das amostras no gráfico de *scores* – Fig. 11B). A Figura 12 mostra os pesos referentes ao gráfico de *loadings* (Figura 11B) em relação aos comprimentos de onda de emissão.

Tabela 12: Porcentagem da variância calculada pela análise de componentes principais.

Excitação a 275 nm.

| Componente Principal | Variância (%) | Variância Acumulada (%) |
|----------------------|---------------|-------------------------|
| 1                    | 77,3          | 77,3                    |
| 2                    | 14,1          | 91,3                    |
| 3                    | 8,7           | 100,0                   |

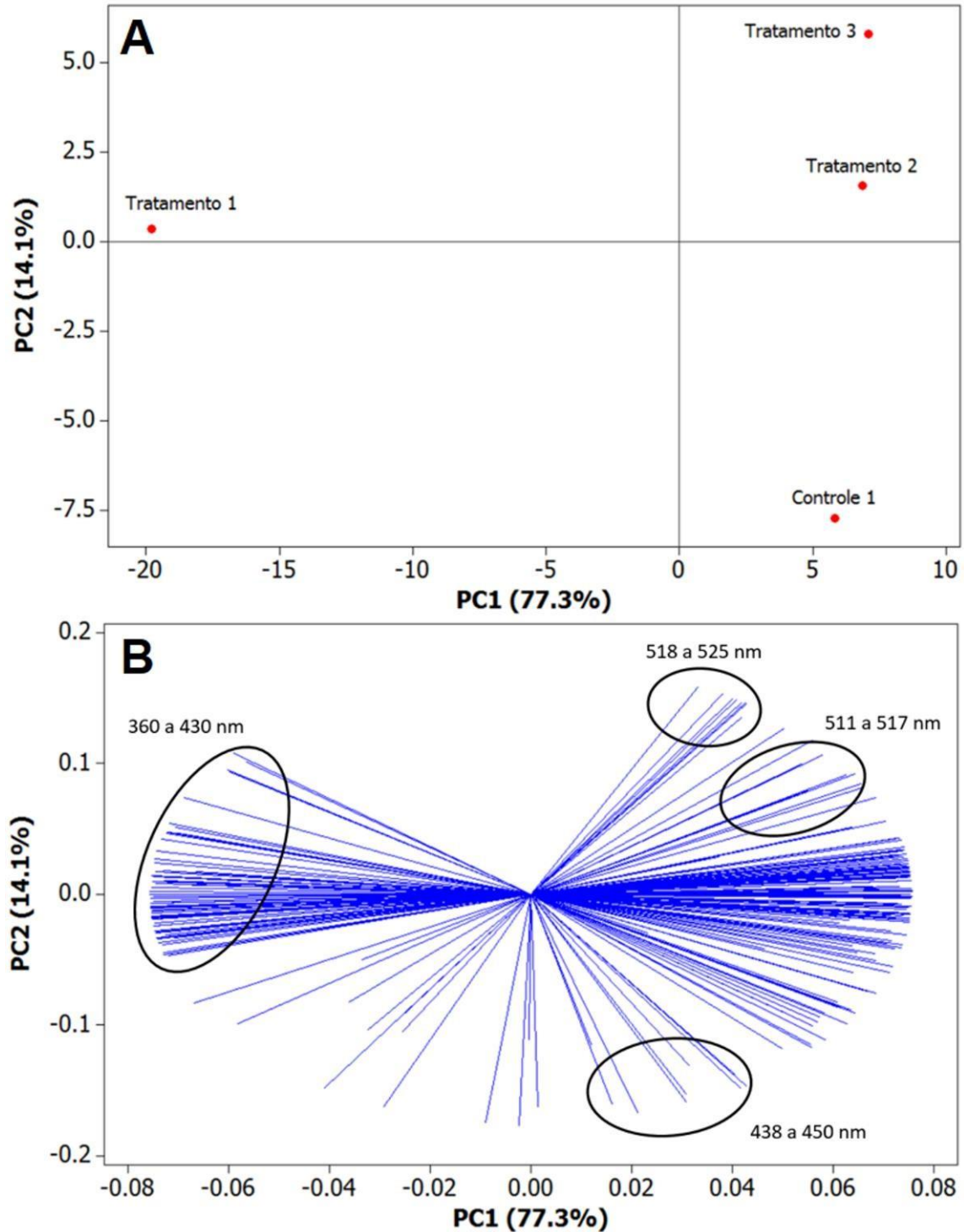


Figura 11: Análise de componentes principais dos espectros de fluorescência das amostras de *Whey Protein* concentrado (Controle 1) e adulteradas a partir da adição de 30% em massa de Cafeína (Tratamento 1), Creatina (Tratamento 2) e Lactose (Tratamento 3). Excitação a 275 nm. (A) Correlação entre as amostras (*scores*); (B) Influência dos comprimentos de onda (*loadings*). Fonte: o autor.

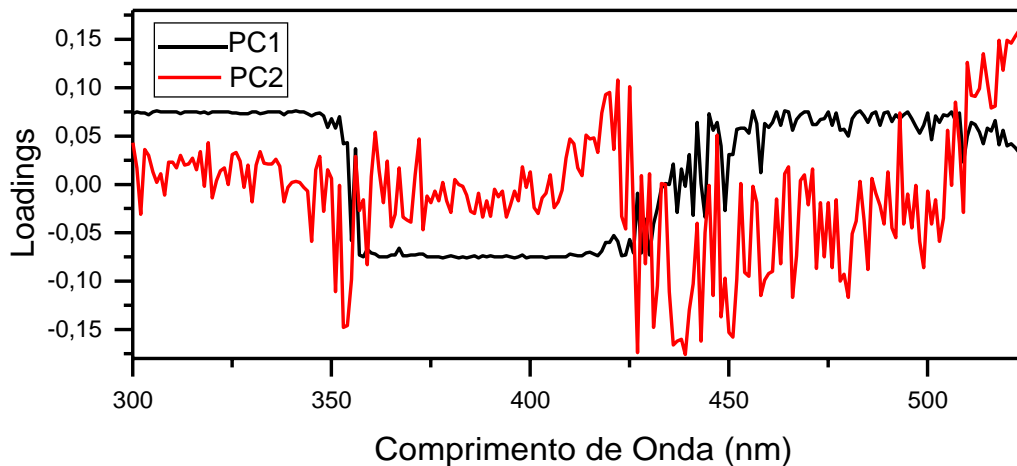


Figura 12: *Loadings* (pesos) sobre os comprimentos de onda de emissão utilizados na análise de componentes principais das amostras Controle 1, Tratamentos 1, 2 e 3, quando excitadas em 275 nm. Fonte: o autor

Utilizando os espectros completos, foi possível uma clara separação das amostras no gráfico dos *scores* (Figura 11A). Em relação ao PC1, observa-se uma clara distinção da amostra contendo cafeína (Tratamento 1) das demais. Este fato confirma as observações anteriores. Devido a semelhança entre os espectros, as amostras Controle 1 e os Tratamentos 2 e 3 revelaram-se intimamente correlacionadas em relação ao PC1.

Pode-se observar que a faixa compreendida entre 360 a 430 nm, foi a principal responsável pelo posicionamento distinto da amostra do Tratamento 1 em relação às demais, como pode ser confirmado pelo gráfico de *loadings* (Figura 11B) e pela Figura 12, a qual apresenta PC1 com pesos negativos intensos e PC2 no início da escala positiva. Além disso, a região acima de 410 nm demonstra ser a que mais influencia a diferenciação entre as amostras Controle 1 e os tratamentos 2 e 3. Por outro lado, em relação ao componente secundário, que explica em torno de 14% da variabilidade dos espectros, pode-se observar uma diferenciação entre o Controle 1 e os outros tratamentos (Figura 11). A principal faixa de comprimento de onda que caracteriza o posicionamento da amostra Controle 1 é entre 438 a 450 nm (Figura 11B). Na Figura 12, pode-se observar o comportamento positivo do PC1 e negativo de PC2, confirmando o posicionamento da amostra Controle 1. O final do intervalo de medida, ou seja, entre 510 nm até 525 nm foi o responsável pela leve diferenciação observada entre os Tratamentos 2 e 3, onde pode-se observar PC1 e PC2 na escala positiva da Figura 12.

Como o comprimento de onda da excitação foi de 275 nm, a faixa em torno de 550 nm pode revelar intensidade de sinal proveniente da fonte de excitação (harmônicos de difração

de segunda ordem), levando a diagnósticos falsos positivos. Portanto, apesar da análise de componentes principais ter mostrado uma diferenciação da amostra Controle 1 em relação ao Tratamento 2 (creatina) e 3 (lactose), não se pode afirmar que este resultado seja conclusivo.

Da mesma forma, tem-se a análise PCA dos espectros obtidos com excitação em 335 nm. A Tabela 13 mostra os resultados do PCA da matriz proveniente dos espectros de fluorescência dos *Whey Protein* concentrado (Controle 1) e adulterados com 30% de cafeína, creatina e lactose. Neste caso, o primeiro (PC1) e o segundo (PC2) componentes principais, já descrevem acima de 75% da variância acumulada dos espectros. A Figura 13 representa o gráfico de *scores* (separação entre as amostras) e de *loadings* (influência dos comprimentos de onda no posicionamento das amostras no gráfico de *scores*).

Tabela 13: Porcentagem da variância calculada pela análise de componentes principais. Excitação a 335 nm.

| Componente Principal | Variância (%) | Variância Acumulada (%) |
|----------------------|---------------|-------------------------|
| 1                    | 49,2          | 49,2                    |
| 2                    | 26,6          | 75,8                    |
| 3                    | 24,2          | 100,0                   |



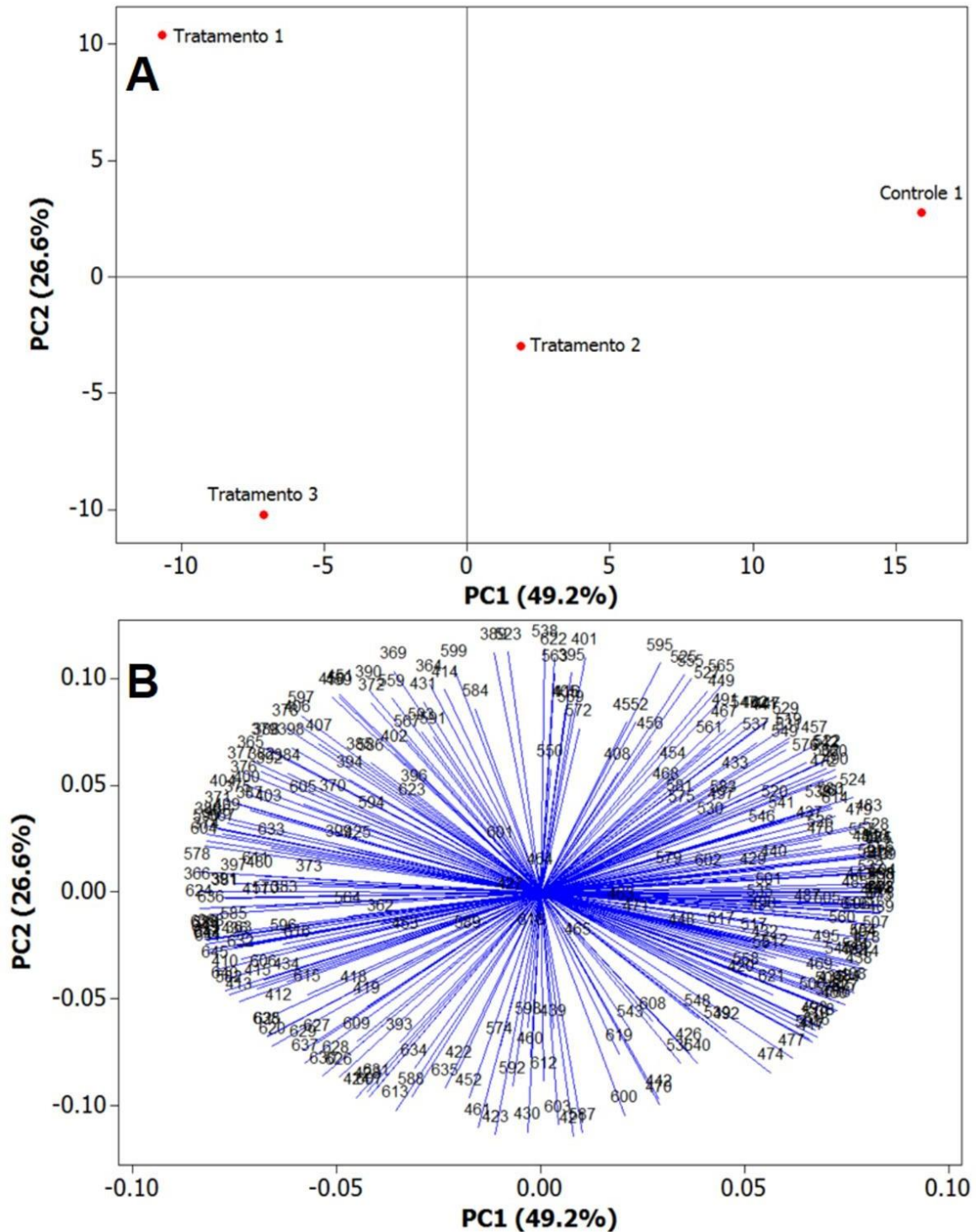


Figura 13: Análise de componentes principais dos espectros de fluorescência das amostras de whey protein Controle 1 e adulteradas a partir da adição de 30% em massa de Cafeína (Tratamento 1), Creatina (Tratamento 2) e Lactose (Tratamento 3). Excitação a 335 nm. (A) Correlação entre as amostras (*scores*); (B) Influência dos comprimentos de onda (*loadings*).  
Fonte: o autor.

Como visto anteriormente, os espectros obtidos através da excitação em 335 nm foram muitos semelhantes (Figura 10B) e não apresentaram diferenças significativas em relação aos cálculos de distância euclidiana. De acordo com a PCA, apesar da separação entre as amostras (Fig. 13A), de acordo o gráfico de *loadings* (Fig. 13B), houve uma distribuição homogênea dos comprimentos de onda influenciando os dois componentes principais de maior variabilidade, como era esperado.

A Figura 14 mostra os pesos referentes ao gráfico de *loadings* (Figura 13B) em relação aos comprimentos de onda. Pode-se observar que a faixa compreendida entre 366 a 410 nm, foi novamente a responsável pelo posicionamento da amostra Tratamento 1, já que se encontra na escala negativa do PC1 e positiva no PC2. O tratamento 3 parece sofrer influência de comprimentos de onda próximos a 415, uma vez que neste ponto ambos componentes se encontram na escala negativa. A partir de 415 nm ocorre aumento do peso dos comprimentos de onda no PC1 até aproximadamente 450 nm, enquanto o PC2 varia consideravelmente. Pode-se observar que os tratamentos 1 e 3 estão mais correlacionados entre si perante o PC1 na escala negativa. Já o tratamento 2 se encontra na escala positiva do PC1 e negativa do PC2. Logo, a amostra tratamento 2 pode sofrer maior influência dos comprimentos de onda próximos a 440 nm e também entre 460 e 525 nm, já que nesta faixa o PC1 se encontra positivo enquanto PC2 negativo. A partir deste ponto, a análise é dificultada.

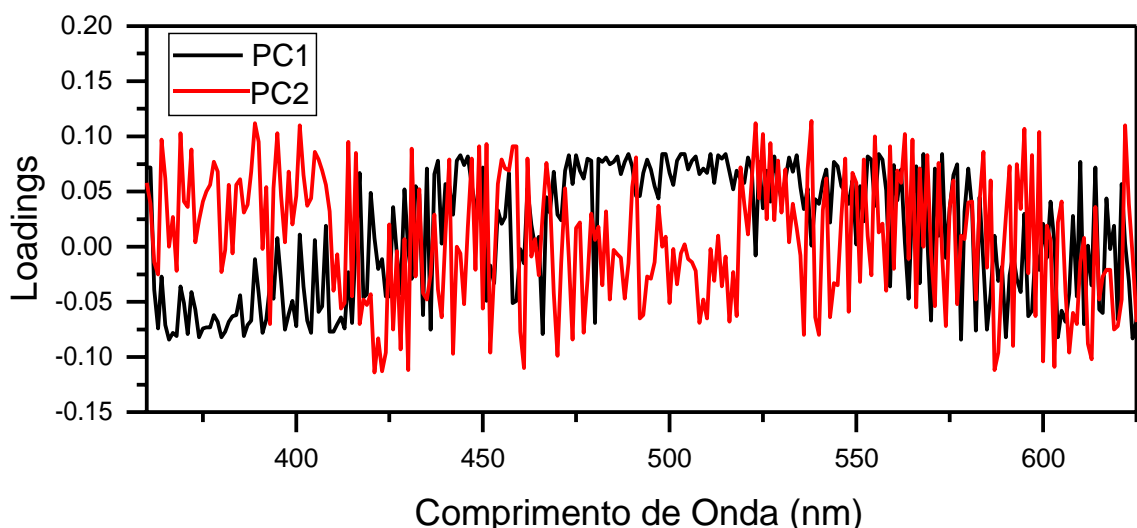


Figura 14: *Loadings* (pesos) sobre os comprimentos de onda utilizados na análise de componentes principais das amostras Controle 1, Tratamentos 1, 2 e 3, quando excitadas em 335 nm. Fonte: o autor.

Pode-se observar pela Figura 18 que a faixa compreendida entre 366 a 410 nm, foi a responsável pelo posicionamento da amostra do Tratamento 1, já que se encontra na escala negativa do PC1 e positiva no PC2. O Tratamento 3 parece sofrer influência de comprimentos de onda próximos a 415 nm, uma vez que neste ponto ambos componentes se encontram na escala negativa. A partir de 415 nm ocorre aumento do peso dos comprimentos de onda no PC1 até aproximadamente 450 nm, enquanto o PC2 varia consideravelmente. Pode-se observar que os Tratamentos 1 e 3 estão mais correlacionados entre si perante o PC1 na escala negativa. Já o tratamento 2 se encontra na escala positiva do PC1 e negativa do PC2. Logo, a amostra do Tratamento 2 pode sofrer maior influência dos comprimentos de onda próximos a 440 nm e também entre 460 e 525 nm, já que nesta faixa o PC1 se encontra positivo enquanto PC2 negativo. A partir deste ponto, a análise se torna mais difícil devido ao fato de a influência dos comprimentos de onda ter uma difícil diferenciação.

Apesar da análise de componentes principais dos espectros excitados a 335 nm ser inconclusiva, ela revela parâmetros de interesse, ou seja, os principais comprimentos de onda onde provavelmente pode-se encontrar diferenças entre os tratamentos e o controle.

### 5.3 Cálculo das derivadas

Para evidenciar diferenças entre os espectros, foram calculadas as derivadas primeira e segunda em regiões específicas. Uma vez que a cafeína foi facilmente identificada utilizando o comprimento de onda de 275 nm, esta não foi utilizada para as comparações das derivadas a seguir.

A região de emissão com comprimento de onda acima de 375 nm revelou-se de maior importância para o diagnóstico das adulterações com lactose e creatina, de acordo com o observado na análise de componentes principais, quando as amostras foram excitadas a 275 nm. Já nas amostras excitadas em 335 nm, a região acima de 425 nm foi utilizada.

Na Figura 15, tem-se a comparação entre as faixas espectrais provenientes da primeira derivada dos espectros dos Tratamentos 2 e 3, com a amostra Controle 1. No caso da adição de creatina (Tratamento 2 – Figura 15A), o cálculo da distância Euclidiana revelou valor de 7,7, indicando a diferenciação entre as amostras. Da mesma forma, quando adicionada lactose (Tratamento 3 – Figura 15B), as curvas de primeira derivada foram diferenciadas já que a distância foi equivalente a 7,4.

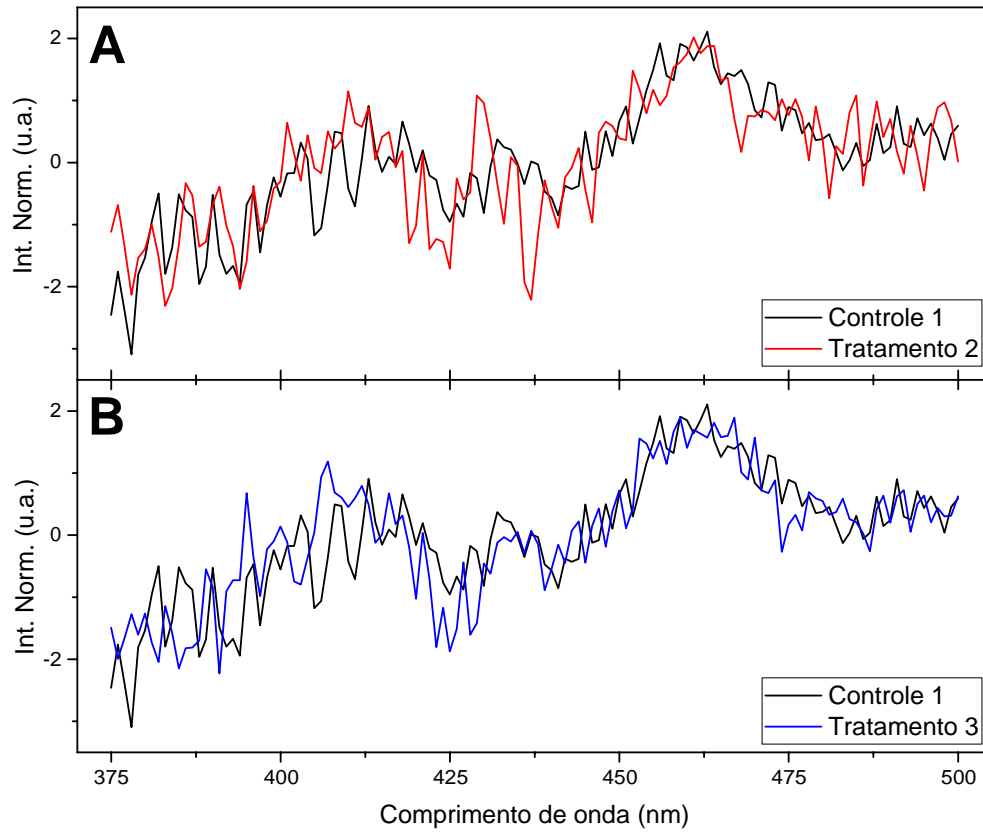


Figura 15: Comparação entre as transformações de primeira derivada dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2 (A), e 3 (B). Excitação com 275 nm. Fonte: o autor.

No caso da transformação por segunda derivada, apresentada na Figura 16, foi possível a diferenciação entre os tratamentos através do cálculo da distância Euclidiana. Para as comparações entre a amostra Controle 1 e os Tratamentos 2 (Figura 16A) e 3 (Figura 16B), foram obtidas distâncias de 13,2 e 13,9, respectivamente.

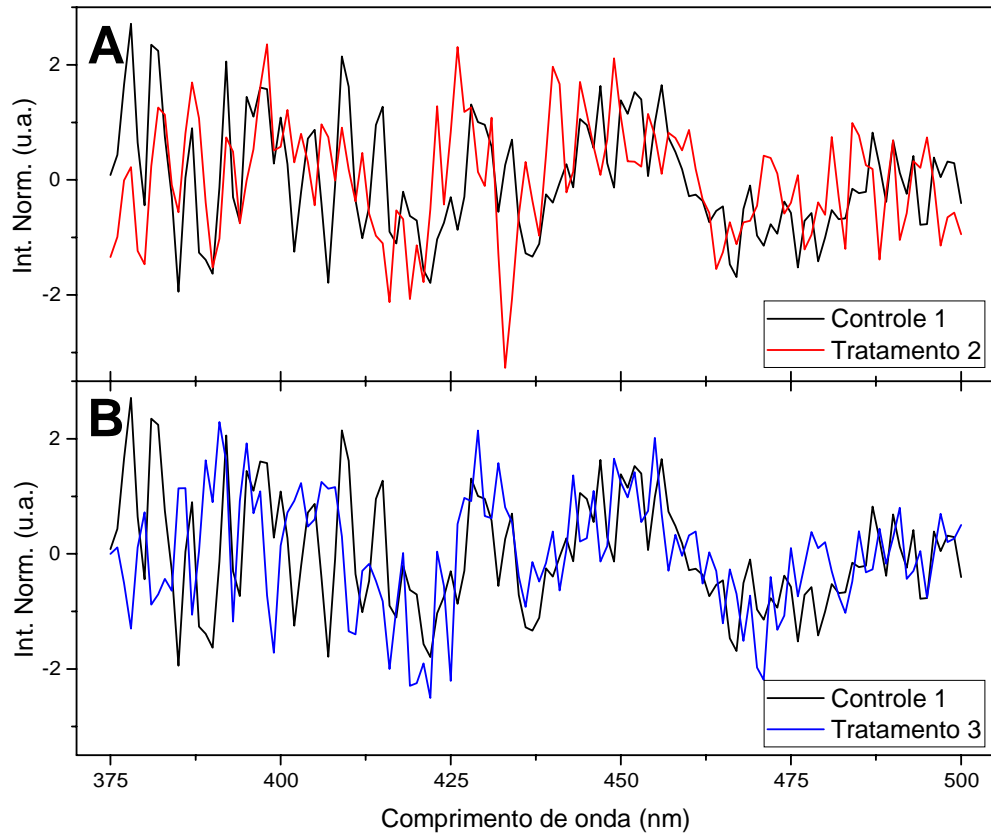


Figura 16: Comparação entre as transformações de segunda derivada dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2 (A), e 3 (B). Excitação com 335 nm. Fonte: o autor.

No caso da excitação em 275 nm, as derivadas demonstram que é possível a diferenciação dos Tratamentos 2 e 3 ao Controle 1, porém para a identificação do adulterante é necessário a confirmação de que as derivadas dos espectros dos tratamentos são significativamente diferentes. O resultado obtido para as distâncias Euclidianas entre os Tratamentos 2 e 3 foi 8,3 e 10,4 para a primeira e segunda derivadas, respectivamente; isto é, acima de 2, confirmando o pressuposto.

Quando excitadas a 275 nm, a lactose e a creatina puras apresentam em seus espectros de emissão um pico no comprimento de onda em torno de 430 nm (Figura 8A).

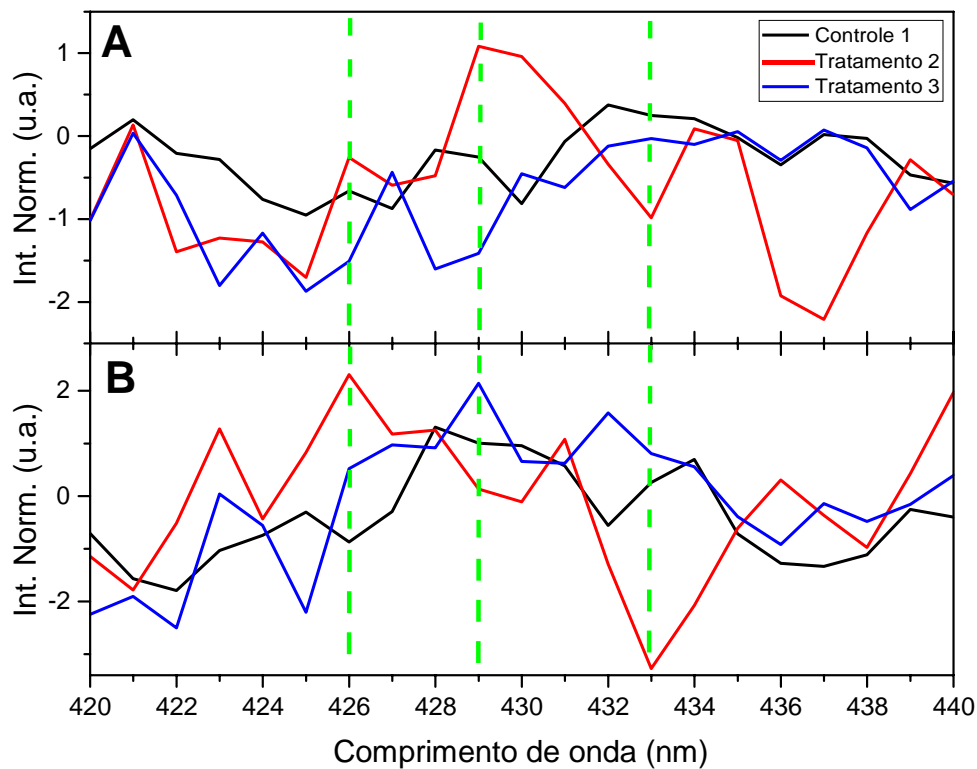


Figura 17: Comparação entre as transformações de primeira (A) e segunda (B) derivadas dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2, e 3, no intervalo entre 420 e 440 nm com evidência de pontos de diferenciação das amostras. Excitação com 275 nm. Fonte: o autor.

Na Figura 17A e 17B, ao redor de 430 nm, três comprimentos de onda de emissão (426 nm, 429 nm e 433 nm) chamam a atenção para uma possível diferenciação entre as amostras. Nestes pontos localizam-se numericamente as maiores diferenças entre as intensidades das derivadas primeira e segunda. Como exemplo, em 429 nm, os valores da intensidade normalizada da primeira derivada para os Tratamentos 2, Controle 1 e Tratamento 3 são respectivamente 1,08, -0,26 e -1,42, indicando possível ponto de interesse para diferenciar os tratamentos. Entretanto, não se pode afirmar que estes pontos são efetivamente onde as diferenças são significativas. É necessário um estudo específico para se obter a robustez necessária para a análise estatística pontual para se ter uma conclusão efetiva das diferenças encontradas.

Os resultados dos espectros de emissão das primeira e segunda derivadas obtidos com a excitação de 335 nm podem ser observados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

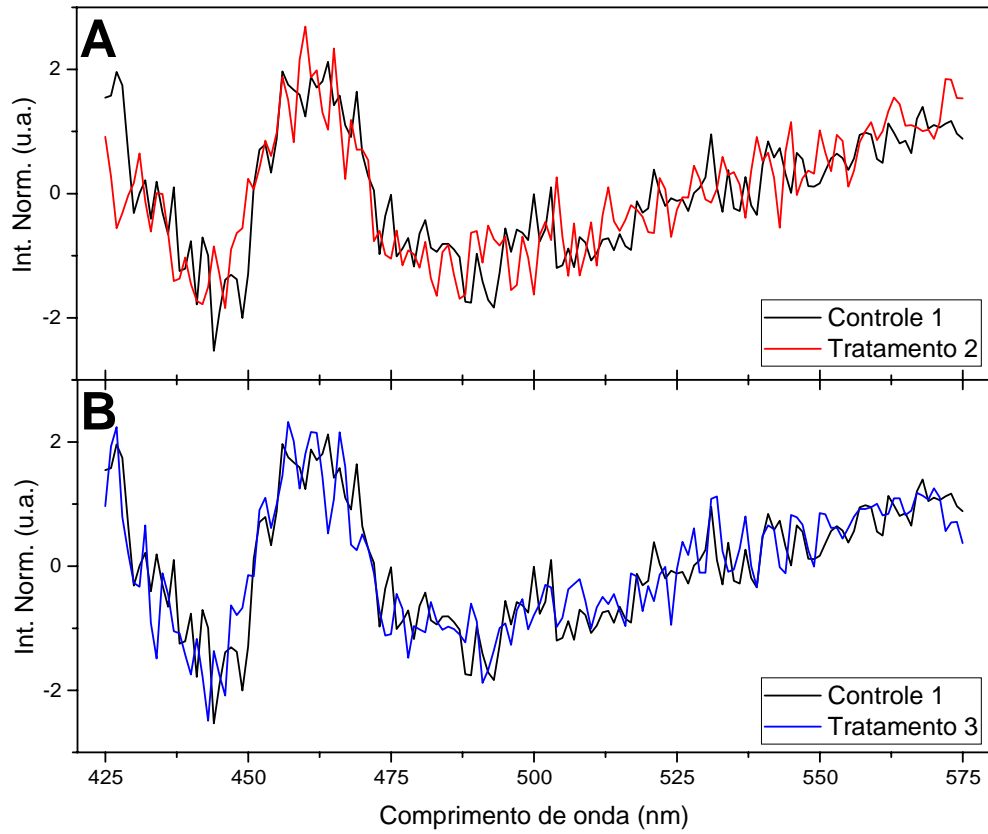


Figura 18: Comparação entre as derivadas primeira dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os Tratamentos 2 (A), e 3 (B). Excitação com 335 nm. Fonte: o autor.

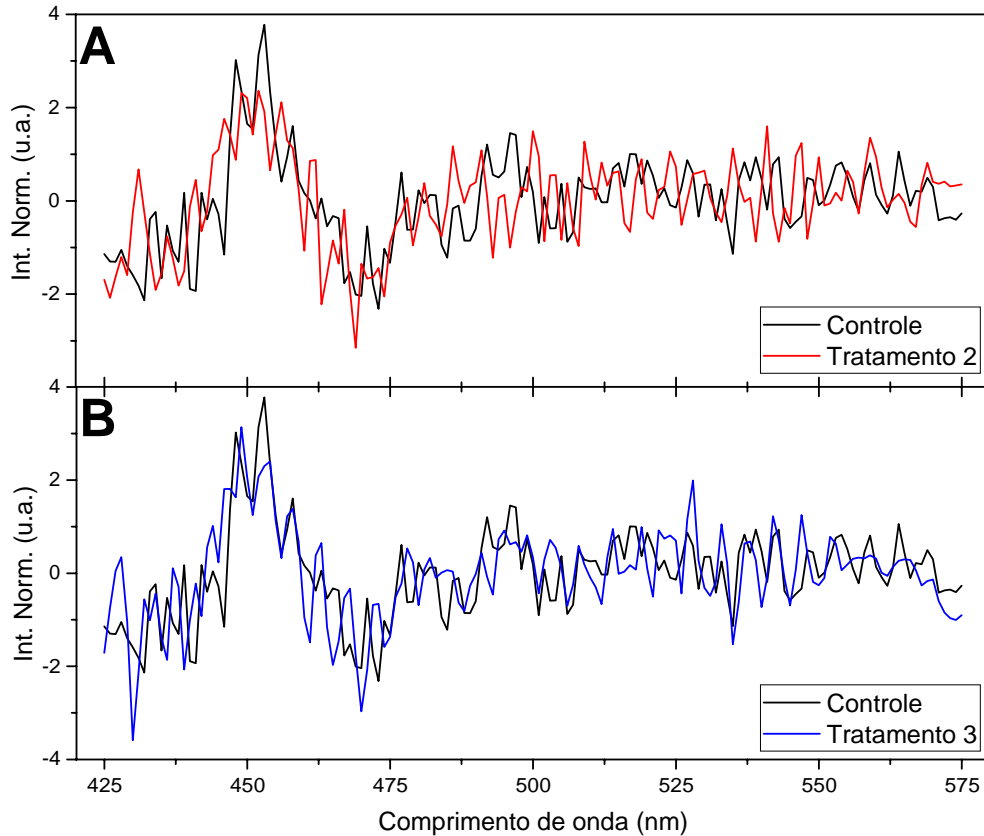


Figura 19: Comparação entre as transformações de segunda derivada dos espectros de emissão das amostras Controle 1 com os tratamentos 2 (A), e 3 (B). Excitação com 335 nm. Fonte: o autor.

De maneira semelhante à anterior, os espectros transformados, quando comparados ao da amostra Controle 1, resultam em distâncias Euclidianas de valor superior a 2, sendo possível a discriminação entre os tratamentos. Para a primeira derivada das comparações entre Controle 1 e Tratamento 2 (Fig. 17A), e Controle 1 e Tratamento 3 (Fig. 17B), as distâncias calculadas foram de 8,2 e 6,5, respectivamente. No caso da segunda derivada, os cálculos revelaram valores de 12,4 (Controle 1 *versus* Tratamento 2 – Fig. 18A) e 10,1 (Controle 1 *versus* Tratamento 3 – Fig. 18B).

As Figuras 20A e 20B apresentam uma análise comparativa das primeira e segunda derivadas do Controle 1 conjuntamente com os Tratamentos 2 e 3.



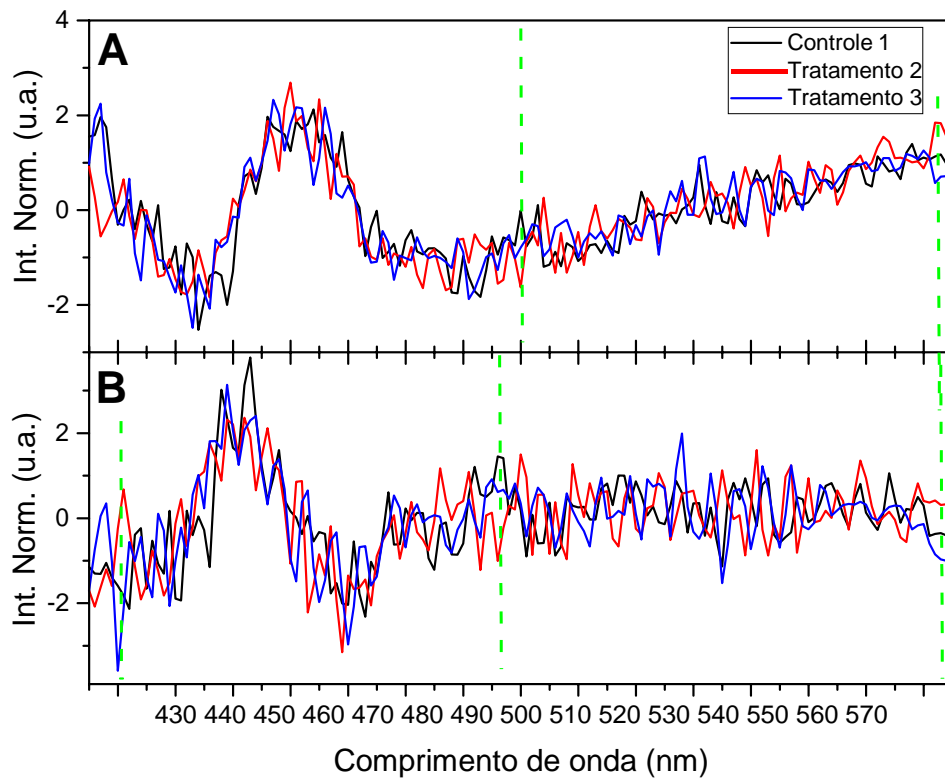


Figura 20: Comparação entre os espectros de emissão referentes as primeiras (A) e segundas (B) derivadas, obtidos com as amostras Controle 1 e os Tratamentos 2, e 3 com evidência de possíveis pontos de diferenciação das amostras. Excitação com 335 nm. Fonte: o autor.

De acordo com a Figura 20, comparando-se os Tratamentos 2 e 3, a distância euclidiana de 4,7 foi obtida para as primeiras derivadas e 11,3 para as segundas, o que significa que, de maneira semelhante à anterior, os cálculos das derivadas em 335 nm demonstraram que é possível detectar alterações nas amostras. Além disso, ao analisar os espectros nos arredores de 570 nm, é possível evidenciar comprimentos de ondas em que há indicativos de diferenciação entre as amostras – Controle 1, Tratamento 2 e Tratamento 3 (Figura 20). Quando excitadas a 335 nm, a lactose e a creatina puras apresentam pouca ou nenhuma emissão em seus espectros (Figura 8B). Dessa forma, sem a robustez necessária, não se pode concluir que os comprimentos de onda indicados na Figura 20 sejam efetivamente pontos de referência para a discriminação entre os tratamentos, mas sim, sugestivos de que a análise qualitativa é possível, mesmo quando os adulterantes emitem pouca ou nenhuma fluorescência no comprimento de onda especificado.

#### **5.4 Adultrações com cafeína no *Whey Protein* concentrado (Controle 2)**

Como diferenças explícitas foram observadas somente na amostra adulterada com cafeína excitada a 275 nm, a adultração do *Whey Protein* concentrado (Controle 2) foi realizada com apenas esta substância.

Na Figura 21 observa-se os espectros das comparações entre as amostras controle e seus respectivos tratamentos com adição de 30% de Cafeína.

Espectros obtidos do Controle 1 com adultração de cafeína ( tratamento 1), e com do Controle 2 com adultração de cafeína (tratamento 4) (A) - Excitação a 275 nm, (B) - Excitação a 335 nm:

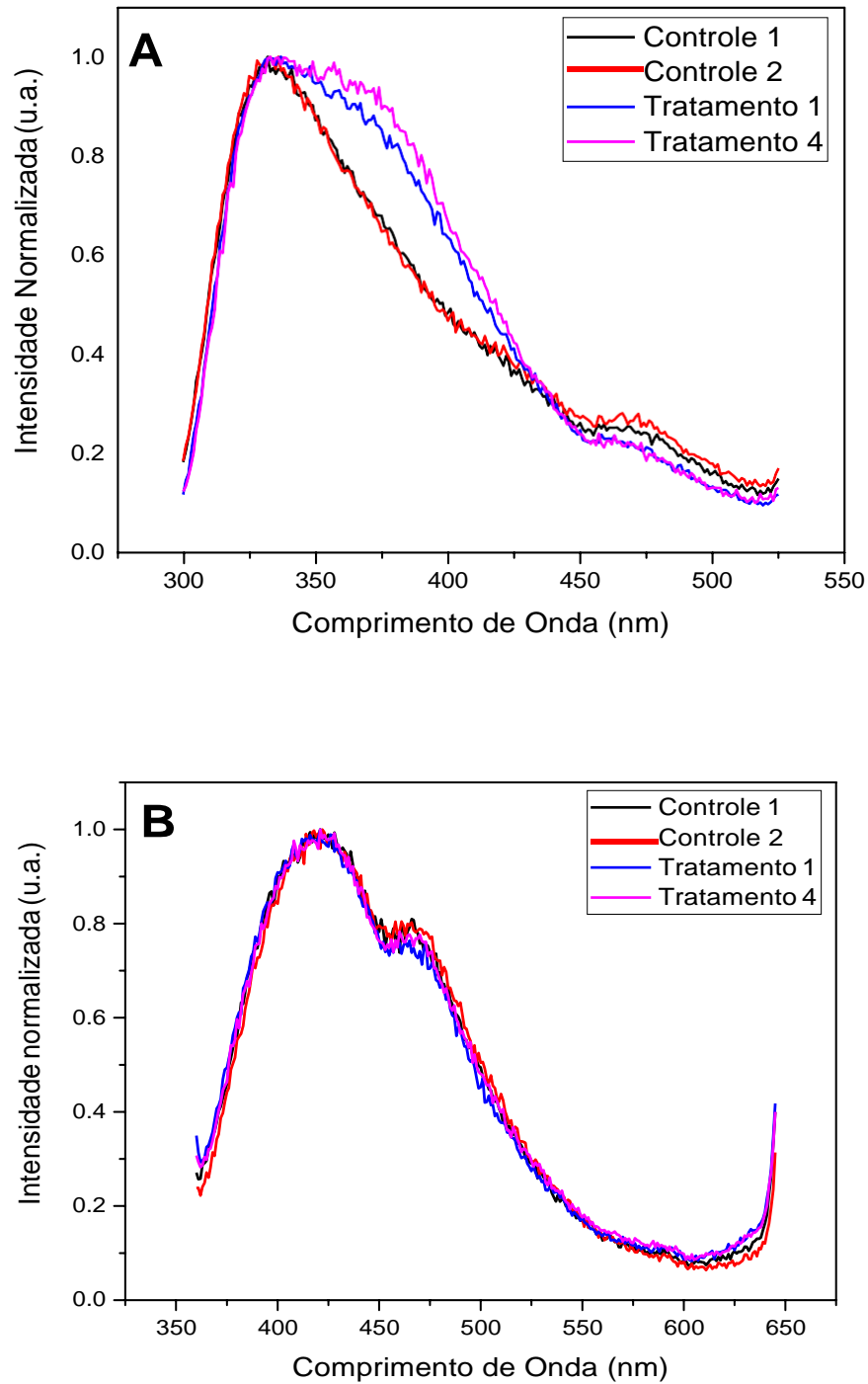


Figura 21: Espectros de emissão da fluorescência com excitação fixada (A) 275 nm e (B) 335 nm dos Controles 1 e 2 e com cafeína a 30% em massa (Tratamento 2 e 4). Fonte: o autor.

Na Figura 21A observa-se que assim como ocorrido com o Tratamento 1, a adição de cafeína no Controle 2 (Tratamento 4) demonstra clara alteração do espectro de emissão na faixa entre 325 a 430 nm, quando excitada em 275nm. Com relação a excitação em 335 nm

(Figura 21B), não foi possível observar alterações provocadas pela adição da cafeína em nenhum dos controles. Resultado esperado a partir das observações realizadas nas análises preliminares.

Para a análise das amostras de *Whey Protein* concentrado (Controle 1 e Controle 2), adicionados com cafeína, foi feita a soma quadrática nos picos de excitação em 275 nm (Figura 19A) e 335 nm (Figura 19B), apresentada na Tabela 14 abaixo.

Tabela 14: Distância Euclidiana obtida entre as comparações dos espectros completos das amostras.

| Comparações entre os espectros | Excitação (nm) | Distância Euclidiana |
|--------------------------------|----------------|----------------------|
| Controle 1 – Controle 2        | 275            | 0,75                 |
| Controle 1 – Controle 2        | 335            | 1,26                 |
| Tratamento 1 – Controle 1      | 275            | 3,30                 |
| Tratamento 1 – Controle 1      | 335            | 1,50                 |
| Tratamento 4 – Controle 2      | 275            | 4,79                 |
| Tratamento 4 – Controle 2      | 335            | 1,36                 |
| Tratamento 1 – Tratamento 4    | 275            | 1,95                 |
| Tratamento 1 – Tratamento 4    | 335            | 0,88                 |

Controle 1: (WPC Fagron puro); Controle 2: (WPC Puro Lote); Tratamento 1: (WPC 70% + Cafeína 30%); Tratamento 4: (WPC Puro Lote + Cafeína 30%).

Comparando-se os dois *Wheis* controles, observa-se distâncias euclidianas menores que 2, indicando que são estatisticamente semelhantes. Já ao comparar cada *Whey* controle com e os seus respectivos tratamentos adicionados de cafeína, observa-se que na excitação de 275 nm, foram os únicos com distâncias euclidianas maiores que 2, ou seja, a prática da adição da cafeína gera produtos com espectros diferentes. O espectro de emissão do Tratamento 1 comparado ao Controle 1 possui distância euclidiana de 3,3 e o Tratamento 4 comparado ao Controle 2 a distância é de 4,79.

A comparação dos tratamentos com adição (Tratamento 1 *versus* Tratamento 4), tanto para a excitação de 275 nm quanto para a de 335 nm, mostrou não apresentar diferenças significativas, pois os valores encontrados são menores que 2. Este fato indica que a adição de cafeína nas amostras de *Whey* (Controle 1 e 2) proporcionou semelhante alteração nos espectros gerados

## 6 CONCLUSÕES

A espectroscopia de fluorescência estacionária evidenciou indícios de fraudes em *Whey Protein* pela adição de creatina, lactose e principalmente pela adição de cafeína.

Foi possível demonstrar alterações nas amostras adulteradas com creatina e lactose somente após a aplicação de derivadas de primeira e segunda ordem, quando excitadas em 275nm e 335nm.

Estatisticamente, através da análise de medidas de similaridade feita com a distância euclidiana aplicada em toda faixa dos espectros, a amostra com cafeína foi a única que se diferenciou do controle.

O tratamento matemático através do cálculo das derivadas mostrou ser uma importante alternativa para uma análise mais criteriosa das adulterações no *Whey Protein*.

A fluorescência resolvida no tempo também evidenciou indícios de fraude em *Whey Protein* pela adição de creatina e lactose e cafeína, principalmente quando observados os tempos de vida T1.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nesta pesquisa foi possível verificar a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo na avaliação de adulterações de *Whey Protein* concentrado com adição de cafeína, creatina e lactose. Como sugestões para trabalhos futuros pode-se citar:

- Avaliar adulterações através de uma ampla faixa de concentração dos adulterantes (planejamento experimental), com o objetivo de demonstrar a sensibilidade da detecção pela técnica da espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo;
- Ampliar os estudos já realizados com as técnicas de espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, combinando-as com a técnica da espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FTIR-ATR), a qual é considerada uma ferramenta de análise útil e aplicável na detecção de fraudes em alimentos em geral.
- Acoplar ao equipamento de TCSPC acessórios de fontes de luz para resolução de picosegundos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. **Curso de Econometria Espacial Aplicada**. ESALQ-USP: Piracicaba, 2004.
- ALMEIDA, F. **Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- AMMARI, F.; REDJDAL, L.; RUTLEDGE, D. N. Detection of orange juice frauds using front-face fluorescence spectroscopy and independent components analysis. **Food Chemistry**, v. 168, p. 211-217, 2015.
- ANDRADE, J. B.; PINHEIRO, H. L. C.; LOPES, W. A.; MARTINS, S.; AMORIM, A. M. M.; BRANDÃO, A. M. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas-SP, Brasil, v. 18, p. 379-381, 1995.
- ANDERSEN, C. M.; MORTENSEN, G. Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, n. 3, 2008.
- ANDREASSEN, O. A.; DEDEOGLU, A.; FERRANTE, R. J.; JENKINS, B. G.; FERRANTE, K. L.; THOMAS, M.; FRIEDLICH, A.; BROWNE, S. E.; SCHILLING, G.; BORCHELT, D. R.; HERSCH, S. M.; ROSS, C. A.; BEAL, M. F. Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, n. 3, p. 479-491, 2001.
- ARANCIBIA, J. A.; ESCANDAR, G. M. **Two diferente strategies for the fluorimetric determination of piroxicam in serum**. *Talanta*, v. 60, n. 6, p. 1113-1121, 2003.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: Teoria e prática**. 5.ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2011, p. 332-333.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 360**. Aprova o Regulamento Técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Resolução de Diretoria Colegiada. Brasília, 23 de dezembro de 2003.
- \_\_\_\_\_. **RDC nº 18**. Dispõe sobre alimentos para atletas. Resolução de Diretoria Colegiada. Brasília, 27 de outubro de 2010.
- BALALIN, R. M.; SMIRNOV, S. V. **Melamine detection by mid-and near –infrared (MIR/NIR) spectroscopy: a quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder**. *Talanta*, v. 85, n. 1, 2011, p. 562-568.
- BALLABIO, D.; TODESCHINI, R. Multivariate Classification for Qualitative Analysis. In: **Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**. Ed. Da-Wen Sun. Academic Press. Elsevier. Oxford, UK, 2009.
- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179 p. Dissertação de Mestrado

– Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BEMBEN, M. J.; LAMONT, H. S. Creatine Supplementation and Exercise Performance: Recent Findings. **Sports Med**, v. 35, n. 2, p. 107-125, 2005.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações - produção, industrialização e análise. 13ed. São Paulo: Nobel, 1999. 320p.

BIGGS, D. A.; JOHNSON, G.; SJAUNJA, L. O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infrared absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 2008, p. 21-29, 1987.

BRAGA, L. C.; ALVES, M. P. A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de endurance. **Rev. Bras Cien e Mov**, v. 8, n. 3, p. 33-37, 2000.

BRANDAO, M. P.; DOS ANJOS, V. C.; BELL, M. J. V. Time resolved fluorescence of cow and goat milk powder. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 193-199, 2017.

\_\_\_\_\_. Time resolved fluorescence of milk powders - A pilot study. **International Dairy Journal**, v. 64, p. 31-36, 2017.

BRASIL. **Decreto-Lei n. 136/2003**. Diário da República — I SÉRIE-A, v. 147, n. 28, p. 3724, 2003.

CALFEE, R.; FADALE, P. Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. **Pediatrics**, v. 117, p. 577-589, 2006.

CARMO, A. P. **Influência de nanopartículas metálicas e semicondutoras em vidros dopados com terras-raras para aplicações fotônicas**. Tese (Doutorado em Física). Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora-MG, 2011.

CARRILHO, L. H.; Benefícios da utilização da proteína do soro de leite Whey Protein. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo, v. 7, n. 40, p.195-203, Jul/Ago., 2013. ISSN 1981-9927.

CASEY, A., et al. Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 1, p. 31-37, 1996.

CASSOLI, L. D.; SARTORI, B.; ZAMPAR, A.; MACHADO, P. F. An assessment of Fourier transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. **International journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 4, p. 480-485, nov. 2010.

COSTA, J. A. F. **Classificação Automática e Análise de Dados por Redes Neurais Auto-Organizáveis**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC/Unicamp), 1999.



COSTA, A. M. A. **Para que serve a espectroscopia?** Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, n. 88, p. 72-77, 2003.

CHEN, J.; KOHLER, B.. Ultrafast nonradiative decay by hypoxanthine and several methylxanthines in aqueous and acetonitrile solution. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 30, p. 10677-10682, 2012.

CHRISTENSEM, J.; NOERGAARD, L.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 6, p. 1979-1994, 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p.99-105, 2007.

DEMANT, T. W.; RHODES, E. C. Effects of creatine supplementation on exercise performance. **Sports Med**, v. 28, n. 1, p. 49-60, jul, 1999.

FELDMAN, E. B. Creatine: a dietary supplement and ergogenic aid. **Nutr. Rev.**, v. 57, n. 2, p. 45-50, 1999.

FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, K.; HOLMEN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 83-133, 1999.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M. et al. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 4, p. 62-69, 2006.

FULD, J. P., et al. Creatine supplementation during pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 60, n. 7, p. 531-537, 2005.

GANZLE, M. G., HAASE, G., JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, jul. 2008.

GREEN, A. L.; SIMPSON, E. S.; LITTLEWOOD, J. S.; MacDONALD, I. A.; GREENHAFF, P. L. Carbohydrate ingestion augments creatine retention during creatine feeding in humans. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 158, n. 2, p. 195-202, 1996.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 19, n. 4, jul./ago., p. 479-488, 2006.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Feb, 1996.

IKEDA, M.; SUGIYAMA, K.; TANAKA, T; TANAKA, K.; SEKIHARA, H.; SHIMOTOHNO, K. et al. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured hepatocytes. **Biochem Biophys Res Com**; v. 245, p. 549-553, 1998.

INMETRO. **Programa de Análise de Produtos. Relatório Final sobre Análise em Suplementos Proteicos para Atletas/Whey Protein**, Rio de Janeiro, 13.maio.2014.

JANKOVSKÁ, R.; SUSTOVÁ, K. Analysis of Cow Milk by Near-infrared Spectroscopy. **Czech Journal of Food Science**, v. 21, p. 123-128, 2003.

JELLEN, P. Whey cheeses and beverages. **Whey and Lactose Processing**, Zadow eds., Elsevier Applied Science, 1992.

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

KIBBE, A. H. **Pharmaceutical excipients**. 3 ed. London: American Pharmaceutical Association, 2000.

KULMYRZAEV, A. A.; LEVIEUX, D.; DUFOUR, E. Front-Face Fluorescence Spectroscopy Allows the Characterization of Mild Heat Treatments Applied to Milk. Relations with the Denaturation of Milk Proteins J. Agric. **Food Chem**, v. 53, p. 502-507, 2005.

KRISKO, A. et al. A study of caffeine binding to human serum albumin. **Croatica chemica acta**, v. 78, n. 1, p. 71-77, 2005.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd Edition. Springer Science + Business Media (2006).

LÉONIL, J.; BOS, C.; MAUBOIS, J. L.; TOMÉ, D. **Protéines in lait, Nutrition et santé**. Paris: Tec. & Doc., p. 45-83, 2001.

LEMOS, M. A.; ALIYU, M. M.; HUNGERFORD, Graham. Observation of the location and form of anthocyanin in purple potato using time-resolved fluorescence. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 16, p. 61-68, 2012.

LLOYD, J.B.F. **Nature Physical Science**, n. 231, p.64, 1977.

MAHAPATRA, Ajit Kumar et al. Fluorescence sensing of caffeine in aqueous solution with carbazole-based probe and imaging application in live cells. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 17, p. 5379-5383, 2012.

MARCKECHOVÁ, D.; MAJEK, P.; SADECKÁ J. Fluorescence spectroscopy and multivariate methods for the determination of brandy adulteration with mixed wine spirit. **Food Chemistry**, v.159, p. 193-199, 2014.

McINTOSH, G. H.; LE LEU, R K. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. **Nutr Res**, v. 21, p. 1053-1066, 2001.

MEDEIROS, R. J. D.; FERREIRA, A. C. D.; SANTOS, A. A. S.; FERREIRA, J. J. A.; CARVALHO, L. C.; SOUSA, M. S. C. Efeitos da Suplementação de Creatina na Força

Máxima e na Amplitude do Eletromiograma de Mulheres Fisicamente Ativas. **Rev Bras Med Esporte**, Niterói-RJ, v. 16, n. 5, p. 353-357, 2010.

MORGANO, M. A; FARIA, C. G; FERRÃO, M. F. Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.

MORIWAC, C.; MATIOLI, G. Influência da  $\beta$ -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama, v. 4, n. 3, p. 283-290, 2000.

NAGAOKA, S.; KANAMURU, Y.; KUZUYA, Y.; KOJIMA, T.; TOMOTSU, K. Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. **Biosci Biotech Bioch**, v. 56, p. 1484-1485, 1992.

NAWROT, P.; JORDAN, S.; EASTWOOD, J.; ROTSTEIN, J.; HUGENHOLTZ, A.; FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. **Food Addit Contam**, v. 20, p. 1-30, 2003.

NOVALES, B; BERTRAND, D; DEVAUX, M. F; ROBERT, P; SIRE, A. Multispectral fluorescence imaging for the identification of food products. **J Sei Food Agric**, v. 71, p. 376-382, 1996.

OLIVEIRA, R. C. S. et al. Evaluation of the potential of SPME- GC – MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. **Journal of food composition and analysis**, Dan Diego, v. 22 n. 1, p. 257-261, Jan.2009.

OLIVEIRA, M. C. P. P. **Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared)**: validação da análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite. Dissertação (Mestrado em veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Rev. bras. farmacogn** [online], v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.  
ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Artmed, 2005. 279p.

PARKER, C. A. **Photoluminescence of solutions**, Elsevier, 1968 Amsterdam, p. 544.

PERRONE, I. T. **Soro de leite**: concentração, cristalização da lactose e secagem. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

PETRUS, D. R.; ATTAWAY J. A. Visible and ultraviolet absorption and fluorescence excitation and emission characteristics of Florida orange juice and orange pulp wash: Detection of adulteration. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, p. 1317-1331, 1980.

PETRUS, D. R.; FELLERS, P. L.; ANDERSON, H. E. Orange juice adulteration: Detection and quality effects of dilution, added orange pulpwash, turmeric and sorbate. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1438-1443, 1984.

PETRUS, D. R. Visible and ultraviolet absorption and fluorescence spectral characteristics of apple juice, cranberry juice cocktail, tomato and grape juices, grape jelly and strawberry preserves. **Adulteration of fruit juice beverages**. Edited by Steven Nagy, John A. Attaway e Martha E. Rhodes: 211, 1988.

PEREIRA, R. F.; LAJOLO, F. M.; HIRSCHBRUCH, M. D. Consumo de suplementos por alunos de academias de ginástica em São Paulo. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 265-272, 2003.

PRITCHARD, N. R.; KAIRA, P. A. Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. **Lancet**, v. 25, n. 351 (9111), p. 1252-1253, apr. 1998.

PULGARÍN, José A. Murillo; MOLINA, Aurelia Alañón; PARDO, M. Teresa Alañón. Fluorescence characteristics of several whey samples subjected to different treatments and conditions. **Analytica chimica acta**, v. 536, n. 1, p. 153-158, 2005.

RODRIGUES, P. H. M. Fatores não microbiológicos afetando acidez do leite e outras características. 1º Curso Online Sobre Qualidade do Leite. **MilkPoint**. Instituto Fernando Costa, 2001. Disponível em: <<http://www.agripoint.com.br/curso/qualidade-leite/>>. Acessado em: 20.jun.2017.

SAHLIN, K.; TONKONOJI, M.; SÖDERLUND, K. Energy supply and muscle fatigue in humans. **Acta Physiol. Scand.**, v. 162, n. 3, p. 261-266, 1998.

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

Sletten, G. B. et al. **A comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA in the detection of casein in foodstuffs**, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, out/dez., 2004.

SHAO, A.; HATHCOCK, J. N. **Risk assessment for creatine monohydrate**. Council for Responsible Nutrition, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 836 p., 2002.

SINCLAIR, C. J. D.; GEIGER, J. D. Caffeine use in sport: a pharmacological review. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 40, n. 1, p. 71-79, 2000.

SLETTEN, G. B. et al. **A comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA in the detection of casein in foodstuffs**, 2005.

SOUZA JUNIOR, T. P.; DUBAS, J. P.; PEREIRA, B.; OLIVEIRA, P. R. Suplementação de creatina e treinamento de força: alterações na resultante de força máxima dinâmica e variáveis antropométricas em universitários submetidos a oito semanas de treinamento de força (hipertrofia). **Rev Bras Med Esporte**, Niterói, v. 13, n. 5, p. 303-309, 2007.

TAKANO, T. Milk derived paptides and hypertension reduction. **Int Dairy J**, v. 8, p. 375-881, 1998.

TARTARUGA, I. G. P. Análise espacial da centralidade e da dispersão da população do Estado do Rio Grande do Sul de 1970 a 2000: notas preliminares. In: **Anais do Encontro Nacional de Estudos Populacionais**, n. 16, 2008, Caxambu-MG. Disponível em: <[http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2008/docspdf/ABEP2008\\_1152.pdf](http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2008/docspdf/ABEP2008_1152.pdf)>.

TERADA, L. C.; GODOI, M. R.; MONTEIRO, T. L.; SILVA, T. C. V. Efeitos metabólicos da suplementação do Whey Protein em praticantes de exercícios com pesos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo, v. 3. n. 16. p. 295-304, jul./ago.; 2009. ISSN 1981-9927.

TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. University Science Books: California, 1991.

ULLAH, R. et al. Identification of cow and buffalo milk based on Beta carotene and vitamin-A concentration using fluorescence spectroscopy. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0178055, 2017.

VANDENBERGHE, K., GILLIS, N., Van HECKE, P., Van LEEMPUTTE, M., VANGERVEN, L., HESPEL, P. Long term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v. 83, n. 6, p. 2055-2063, 1997.

WADA. World Anti Doping Agency. **The 2010 prohibited list international standard**. Disponível em: <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/>. Acesso em: 20 de junho 2017.

WAHL M. **Time Correlated Single Photon Counting**. Disponível em :<<http://www.picoquant.com>>. Acesso em: 10.abr.2017.

WANG, J. et al. Fourier transform Infrared Spectroscopy for Kona Coffe authentication. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 5, p. 385-391, 2009.