

PAULO HENRIQUE RODRIGUES JÚNIOR

**UTILIZAÇÃO DE FT-RAMAN E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS NA
DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE FRAUDE POR MALTODEXTRINA E
HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITE EM PÓ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696u
2015

Rodrigues Júnior, Paulo Henrique, 1991-
Utilização de FT-Raman e ferramentas quimiométricas na
determinação rápida de fraude por maltodextrina e hidrólise da
lactose em leite em pó / Paulo Henrique Rodrigues Júnior. –
Viçosa, MG, 2015.
xi, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 37-43.

1. Leite em pó - Adulteração. 2. Lactose. 3. Maltodextrina.
4. Raman, Espectroscopia. 5. Quimiometria. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 637.127

PAULO HENRIQUE RODRIGUES JÚNIOR

**UTILIZAÇÃO DE FT-RAMAN E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS NA
DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE FRAUDE POR MALTODEXTRINA E
HIDRÓLISE DA LACTOSE EM LEITE EM PÓ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de abril de 2015.

Naaman Francisco Nogueira Silva

Pierre Schuck

Michele da Silva Pinto
(Coorientadora)

Ítalo Tuler Perrone
(Coorientador)

Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

Aos meus melhores amigos, meus pais

Paulinho e Sayonara.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me conduzido por estes caminhos nem sempre tão fáceis, mas gratificantes a cada instante. Por ter me colocado sempre em companhia de pessoas tão especiais capazes de despertar sempre o melhor de mim e me incentivar sempre a ir mais longe.

Aos meus pais por manterem durante toda minha caminhada o exercício diário de me educar e ensinar a me portar nas mais diversas situações da vida, por terem proporcionado todas as condições para que eu pudesse crescer como pessoa, como estudante e como profissional e por todo o amor, o mais precioso bem que fez e faz toda a diferença em cada um dos meus dias.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos por todas as oportunidades, estrutura, disciplinas e pelo excelente curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a esta pesquisa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao prof. Antônio Fernandes pela orientação, pela amizade, por todos os ensinamentos, mas principalmente por ter acreditado em meu potencial quando nem mesmo eu acreditava.

Ao prof. Ítalo Perrone pela orientação, por todo o conhecimento na área de secagem da qual tanto gostamos, pela amizade e pela parceria em todos projetos, experimentos, aulas, cursos e até mesmo no futebol.

À prof. Ana Clarissa pelos ensinamentos de físico-química em leite e derivados, pelas contribuições ao projeto e pela coorientação.

Aos bolsistas Larissa, Vinicius, Márcio, Thais, Jane e aos estagiários Ariel e Angélica por todo apoio, amizade e pelo trabalho durante os experimentos.

Ao Laboratório de Leite e Derivados por toda a estrutura, a todos os estudantes: Michele, Naaman, Rosangela, Maura, Maria Betânia, Mayra, Fernanda, Renam, Moisés, Vinícius, Larissa, Rafael, Guilherme, Márcio,

Cleuber, Cássio, Beatriz, Juana, Gabi Kishimoto, Thais, Marciano, enfim, toda a equipe com quem passei a maior parte do tempo nestes últimos 4 anos, seja estudando, trabalhando, sorrindo, reclamando ou tomando café.

Ao Laticínio Funarbe e todos os colaboradores pela disponibilidade do espaço, da matéria-prima e contribuições nos dias de experimento.

Ao Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular por todo o amparo e estrutura, ao prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira pela acolhida, paciência e pelos conhecimentos transmitidos, e aos seus orientados, em especial o bolsista Carlos Eduardo e a mestranda Kamila, por toda dedicação durante os experimentos e prontidão para tirar minhas muitas dúvidas.

A Gemacom Tech pela parceria e disponibilidade de equipamentos e ao Rodrigo Stephani pelos ensinamentos, contribuições ao projeto e grande apoio.

A todos os grandes amigos Vinícius e Renam e pela grande amizade, pela força, pelo apoio, e em especial ao William Xisto pelos sorrisos e pelas horas perdidas no videogame.

As turmas de pelada, em especial ao Real Master, à pelada da GEO, a peladinha Effie Rolfs e à pelada do DTA, pelas amizades e pelos momentos de lazer e diversão.

Ao meu irmão Nathan pela amizade, respeito, amor em todos os momentos, seja nas discussões ou principalmente nas diversões.

A toda minha família: Meus avôs, tios, primos, cunhadas e sogros por todo apoio.

A minha noiva e em breve futura esposa Jéssica, por mesmo na distância, me dar todo o apoio, carinho, sorrisos e amor, pela compreensão, cumplicidade e por sempre acreditar em mim.

Muito obrigado.

BIOGRAFIA

PAULO HENRIQUE RODRIGUES JÚNIOR, filho de Paulo Henrique Rodrigues e Saionara Poletto Rodrigues, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 21 de junho de 1991.

Em março de 2009 iniciou o curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, e graduou-se em março de 2013. Em abril deste mesmo ano, iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de Mestrado, submetendo-se a defesa de dissertação em abril de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. LEITE EM PÓ	4
3.2. FRAUDES EM PRODUTOS LÁCTEOS.....	6
3.3. PRODUTOS DE BAIXO TEOR DE LACTOSE	7
3.4. ESPECTROSCOPIA RAMAN	10
3.5. FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. FABRICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	16
4.2. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN	19
4.3. PRÉ-TRATAMENTO DOS ESPECTROS	20
4.4. ANÁLISE MULTIVARIADA	21
4.5. AVALIAÇÃO DOS MODELOS	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. ANÁLISE QUALITATIVA DOS ESPECTROS OBTIDOS	23
5.1.1. Caracterização quanto a presença de maltodextrina.....	23
5.1.2. Caracterização quanto a presença de lactose	25
5.2. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	27
5.3. ANÁLISE DISCRIMINATÓRIA COM O MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS.....	29
5.3.1. Classificação das amostras adulteradas	29
5.3.2. Classificação das amostras com baixo teor de lactose	31
6. CONCLUSÕES	34
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1 - Principais componentes estruturais da maltodextrina. Fonte: Kennedy; Knill e Taylor (1995).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2 – Componentes estruturais da α-lactose e β-lactose.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3 – Fluxograma de fabricação das amostras.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 4 – Espectrômetro RFS 100 FT-Raman (Bruker).....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5 – Organização dos dados multivariados em uma matriz a partir do espectro Raman. Fonte: Almeida (2010).....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6 – Espectros FT-Raman de leite em pó (A), leite em pó com 10% (B), 30% (C) e 50% de adição de maltodextrina (D), assim como o espectro de maltodextrina pura (E).....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 7 – Espectros FT-Raman de leite em pó (A) e leite em pó com baixo teor de lactose (B).....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 8 – Gráfico de escores de PC1 versus PC2 das amostras de leite em pó (■), leite em pó com maltodextrina (■), leite em pó com baixo teor de lactose (▼) e leite em pó com baixo teor de lactose adicionado de maltodextrina (▼).....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 9 – Gráfico de Loadings / Pesos de PC1 e PC2 versus Número de onda para as amostras de leite em pó.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 10 – Resultados do modelo PLS-DA para treinamento, mostrando as amostras sem fraude (●) e amostras adulteradas (■); Resultados para avaliação, mostrando as amostras sem fraude (◆) e amostras adulteradas (▼).....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 11 – Curva ROC, sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA obtido para classificação das amostras adulteradas.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 12 – Resultados do modelo PLS-DA para treinamento, mostrando as amostras de leite em pó integral (●) e amostras com baixo teor de lactose (■); Resultados para avaliação, mostrando as amostras de leite em pó integral (▼) e amostras com baixo teor de lactose (◆).....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 13 – Curva ROC, sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA obtido para classificação quanto a presença de lactose.....</i>	<i>33</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Identificação das amostras analisadas e quanto ao conteúdo de lactose e teor de maltodextrina.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2 – Principais números de onda e suas respectivas tentativas de atribuição (Almeida et al. 2011; Chien-Ju, Lupoi & Smith, 2011; McGoverin et al. 2010.).....</i>	<i>26</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DE – Dextrose equivalente

FT – Transformada de Fourier

Ge – Germânio

GH – Grau de hidrólise

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IN – Instrução normativa

LV – Variável Latente

Nd:YAG – Neodímio:Granada de ítrio e alumínio

PC – Componente Principal

PCA – Análise de Componentes Principais

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLS – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

PLS-DA – Análise discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

ROC – Recepção característica do operador

δ – Deformação angular

v – Estiramento

τ – Torção

RESUMO

RODRIGUES JÚNIOR, Paulo Henrique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2015. **Utilização de FT-Raman e ferramentas quimiométricas na determinação rápida de fraude por maltodextrina e hidrólise da lactose em leite em pó.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Ítalo Tuler Perrone, Michele da Silva Pinto e Ana Clarissa dos Santos Pires.

No presente trabalho, a espectroscopia FT-Raman foi explorada como um método rápido para avaliar a presença de lactose e identificar fraude por adição de maltodextrina (2.5 – 50.0%) em leite em pó. Através dos espectros Raman foi possível diferenciar as amostras de leite em pó sem a necessidade de preparação das amostras, enquanto os métodos de controle de qualidade tradicionais, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são relativamente lentos e trabalhosos. Espectros Raman foram obtidos de amostras de leite em pó com alto e baixo teor de lactose, ambos com e sem adição de maltodextrina, totalizando 45 amostras em 4 tipos de tratamentos. Foram observadas diferenças entre os espectros das amostras quanto ao teor de lactose, assim como quanto a presença do adulterante. Como complemento, foram empregadas análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) a fim de classificar as amostras. Os modelos PLS-DA desenvolvidos permitiram classificar todas as amostras, tanto em relação ao teor de lactose quanto à presença de maltodextrina. Os resultados demonstraram a utilidade da técnica de espectroscopia Raman em combinação com a quimiometria para determinar a presença de lactose e de maltodextrina nas amostras de leite em pó.

ABSTRACT

RODRIGUES JÚNIOR, Paulo Henrique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2015. **FT-Raman and chemometric tools for rapid determination of fraud by addition of maltodextrin and presence of lactose in milk powder.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Ítalo Tuler Perrone, Michele da Silva Pinto and Ana Clarissa dos Santos Pires.

In this work, FT-Raman spectroscopy has been explored as a quick screening method to evaluate the presence of lactose and identify milk powder samples adulterated with maltodextrin (2.5 – 50.0%). Raman measurements can differentiate samples of milk powder, without the need for sample preparation, while traditional quality control methods, including high performance liquid chromatography, are cumbersome and slow. FT-Raman spectra were obtained from samples of high lactose and low lactose milk powder, both without and with addition of maltodextrin. Differences were observed between the spectra involved in identifying samples with low lactose content, as well as adulterated samples. In addition, exploratory data analysis using Raman spectroscopy and principal components analysis (PCA) and multivariate analysis was also developed to classify samples of milk powder with PCA and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The PLS-DA models obtained allowed to classify all samples, both in relation to the content of lactose and the presence of maltodextrin. These results demonstrate the utility of FT-Raman spectroscopy in combination with chemometrics to infer about the quality of milk powder.

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento completo para o ser humano devido a sua riqueza de nutrientes e possui um papel importante na dieta de grande parte das pessoas, sendo amplamente comercializado e consumido no mundo inteiro. Do mesmo modo, o leite em pó possui grande importância na alimentação da população e na economia mundial. Os principais motivos de se produzir leite em pó estão relacionados a extensão da vida de prateleira do leite em pó e facilidade de transporte e estocagem, o que possibilita a utilização do produto em períodos de escassez de leite fresco. Portanto uma política comercial regulamentadora é importante para o leite em pó.

Apesar de o leite não ser uma matéria-prima de alto custo, a grande quantidade comercializada em todo o mundo o torna, do ponto de vista econômico, um alvo atraente para criminosos cometerem fraudes. Geralmente a composição do leite é alterada pela adição de produtos mais baratos, podendo estes serem ou não de origem láctea, e em seguida a mistura resultante é vendida como leite. A substituição de qualquer constituinte do leite com substâncias de diferentes origens é uma prática considerada fraude, independentemente se esta substituição aumentar o valor nutricional do produto final.

De acordo com Ferrão et al. (2007), uma fraude comum no Brasil é caracterizada pela adição de pequenas quantidades de maltodextrina em leite adulterado com, por exemplo, proteínas do soro e gordura, a fim de corrigir a densidade e crioscopia do leite líquido e então após a secagem oferecer aos clientes a mistura como se fosse leite em pó integral. É importante frisar que alguns produtos lácteos, como fórmulas infantis, podem legalmente conter maltodextrina, assim como amido e outros derivados, porém estes produtos são especificamente regulamentados. A adulteração de leite em pó com maltodextrina é uma prática conhecida, mas não é muito abordada na literatura, e torna-se potencialmente perigosa por não poder ser identificada por meio de técnicas simples e rápidas. Os métodos existentes para a análise de carboidratos em produtos lácteos, são baseados em cromatografia líquida e gasosa, e têm como principal desvantagem de serem trabalhosos ou demorados.

Produtos de baixo teor de lactose ou sem lactose têm sido comercializado com êxito pela indústria de laticínios, sendo estes destinados a pessoas que possuem o problema de intolerância a lactose que é caracterizado por desconfortos gastrointestinais após o consumo de produtos com certa quantidade de lactose. Os produtos delactosados necessitam de técnicas para certificar a eficiência do processo de hidrólise da lactose, para garantir que o produto não vai causar mal-estar ao consumidor intolerante. A técnica mais comum para a determinação de lactose em leite em pó tem sido a HPLC. Outros métodos incluem titulação de oxirredução e determinação em espectrofotômetro. Estas análises são caras ou muito trabalhosas, exigindo um elevado grau de preparação das amostras, dificultando o uso diário na indústria para garantia da qualidade de leite em pó.

Nas últimas décadas foram desenvolvidos métodos espectroscópicos auxiliados por ferramentas quimiométricas para avaliar a qualidade dos produtos lácteos. Apesar das inúmeras aplicações da espectroscopia Raman para produtos lácteos, ainda são poucos os estudos sobre a qualidade do leite em pó usando FT-Raman, que oferece algumas vantagens para a caracterização de alimentos quando comparada a outras técnicas. Para exemplificar, temos que a espectroscopia Raman não é uma técnica destrutiva, não requer a preparação da amostra (poupando assim tempo e reagentes) e pode determinar mais do que um componente de cada vez.

A utilização de espectroscopia de Raman foi descrita com sucesso na caracterização de vários produtos alimentares, incluindo leite em pó, com grande contribuição da quimiometria na análise dos espectros. O uso de ferramentas quimiométricas baseiam-se principalmente em análises exploratórias, reconhecimento de padrões e em análises discriminantes que demonstram a possibilidade de processar e interpretar dados analíticos.

Neste estudo, um método alternativo e rápido para a detecção qualitativa de maltodextrina em leite em pó e classificação das amostras quanto ao teor de lactose foi desenvolvido empregando espectroscopia FT-Raman e ferramentas quimiométricas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Determinar a presença de maltodextrina nas amostras de leite em pó por meio da espectroscopia FT-Raman e ferramentas quimiométricas.
- Classificar as amostras de leite em pó quanto ao teor de lactose por meio da espectroscopia FT-Raman e ferramentas quimiométricas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir amostras de leite com baixo teor de lactose por meio da adição de enzima b-galactosidase.
- Realizar a secagem do leite integral e do leite hidrolisado em spray dryer escala piloto.
- Adicionar maltodextrina ao leite em pó integral e leite em pó com baixo teor de lactose de forma a obter amostras com concentrações definidas de adulterante.
- Obter os espectros vibracionais das amostras em Espectrômetro FT-Raman.
- Submeter os espectros Raman a um pré-processamento para minimizar problemas relacionados a variação da linha base, melhorar a relação sinal ruído e permitir melhor visualização das bandas.
- Aplicar a análise de componentes principais aos espectros pré-tratados obtidos.
- Aplicar a análise discriminante por mínimos quadrados parciais aos espectros pré-tratados obtidos.
- Avaliar os modelos PLS-DA obtidos por meio da porcentagem de classificações corretas, sensibilidade e especificidade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. LEITE EM PÓ

Segundo o RIISPOA (BRASIL, 1952), o leite é definido como o produto normal obtido pela ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma secreção de pH próximo à neutralidade (6,50 a 6,70), que se constitui uma emulsão de gorduras e água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas, em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas e outras proteínas. É composto basicamente de cerca de 87,3 % de água, 4,6 % de carboidratos, 3,9 % de gordura, 3,2 % de proteínas e 0,7 % de vitaminas e sais minerais, sendo seu valor energético igual a 67 kcal / 100 g (WALSTRA, 2006).

O leite em pó é definido como o produto obtido pela desidratação do leite integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. Pode ser classificado quanto ao teor de gordura, intensidade do tratamento térmico, umectabilidade e dispersibilidade (instantâneo ou não instantâneo). Segundo consta na legislação, deve ter aspecto uniforme, sem a presença de grumos ou substâncias macro e microscopicamente visíveis, cor branca amarelada, sabor e odor agradável não rançoso, semelhante ao leite fluido (BRASIL, 1997).

O leite em pó deve conter somente as proteínas, açúcares, gorduras e outras substâncias minerais do leite e nas mesmas proporções relativas, salvo quando ocorrer modificações originadas por um processo tecnologicamente adequado. Como aditivos são unicamente aceitos a lecitina, utilizada como agente emulsionante na elaboração de leites instantâneos, e alguns anti-umectantes (silicato de alumínio, silicato de cálcio, fosfato tri cálcico, dióxido de silício, carbonato de cálcio e carbonato de magnésio), que são restritos a leite em pó utilizado em máquinas de venda automática, todos estes com proporção máxima estabelecida (BRASIL, 1997).

O processo de secagem mais utilizado é o “spray-drying”. Este processo é realizado basicamente em duas etapas: evaporação da água em evaporadores a vácuo para obtenção de leite concentrado e secagem por atomização do concentrado em câmara de secagem até obtenção do pó. A evaporação a vácuo consiste na retirada de água por meio do fornecimento de energia na forma de calor ao leite sob uma pressão inferior a pressão atmosférica. Este processo promove a evaporação em temperaturas entre 40 °C e 75 °C, o que minimiza as modificações causadas aos constituintes devido ao aquecimento. A evaporação a vácuo possibilita que o leite seja concentrado a teores de sólidos lácteos entre 45 % e 55 %, com um custo energético por quilograma de água evaporada até vinte vezes inferior ao processo de retirada de água em spray dryer (SCHUCK et al., 2010).

A secagem por atomização consiste na remoção de parte da água do produto, permitindo armazenamento e conservação por mais tempo e a redução dos custos logísticos, sendo frequentemente a técnica mais utilizada para desidratação de produtos lácteos (SCHUCK, 2002). É a operação mais importante para conservação de lácteos que possibilita a produção de leite ou soro em pó a partir do leite ou soro, com perdas nutricionais mínimas (KNIPSCHILDT e ANDERSEN, 1994).

O princípio da secagem de um líquido em “spray dryer” consiste em pulverizar o produto no interior de uma câmara de secagem, na forma de pequenas gotículas, em uma corrente de ar quente para obtenção de um pó (CARIC´ et al., 2009). Quando um produto é colocado em uma corrente de ar com baixa umidade relativa e temperatura elevada (em média 200 °C), espontaneamente é formada uma diferença de temperatura e pressão parcial da água entre o alimento e o ar, conseqüentemente ocorrerá uma transferência de energia na forma de calor do ar para o produto e uma transferência de água do produto para o ar (SCHUCK et al., 2010).

A etapa de atomização é de grande importância na operação de secagem, na qual ocorre a formação de gotículas a partir de um líquido, aumentando a área de troca entre o produto e o ar quente (CALL e SOLLOHUB, 2010). As principais funções da atomização são produzir gotículas do produto com grande relação superfície-massa, resultando em

elevada taxa de evaporação e produzir partículas com tamanho, densidade e forma desejadas (SCHUCK, 2009).

3.2. FRAUDES EM PRODUTOS LÁCTEOS

Devido à grande demanda e as variações de preços que ocorrem com as flutuações sazonais, o leite e seus derivados são alvos de adulterações. Essas adulterações são praticadas com a adição de ingredientes não permitidos para reduzir os custos do produto final. O impacto econômico provocado por esse tipo de fraude é a concorrência desleal entre empresas, prejudicando empresas sérias, principalmente nos casos de licitações públicas, uma vez que o leite é largamente utilizado em programas sociais, na merenda escolar, na suplementação alimentar de gestantes e nutrízes, e na alimentação de convalescentes e idosos (VARGAS, 2009).

No Brasil, uma das fraudes mais praticadas é a adição de soro de queijo ao leite, porém outros adulterantes têm sido encontrados no leite, como maltose, sacarose, amido, maltodextrina, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio. A faixa de fraude no leite varia de 20 a 25 %, onde o consumidor não percebe diferença no sabor, mas pode chegar até 60 % (BORIN et al., 2006).

Um aditivo comumente adicionado é o amido, um polissacarídeo formado por resíduos de α -D-glicose, composto por duas macromoléculas, a amilose e a amilopectina. O amido é adicionado para ajustar a densidade e a crioscopia do leite adulterado com água. Este produto é muito utilizado pelas indústrias alimentícias, sendo de baixo valor comercial e fácil acesso (ALMEIDA, 2011).

Um derivado do amido comumente utilizado em fraudes é a maltodextrina, podendo ser adicionada no leite antes da secagem, ou misturada ao pó. Maltodextrinas consistem de uma mistura de sacarídeos com uma ampla distribuição do peso molecular entre polissacarídeos e oligossacarídeos e estão disponíveis no mercado na forma de pó, podendo também ser encontrado como soluções concentradas (CHRONAKIS, 1998). A maltodextrina é produzida pela hidrólise do amido (α -amilase) e possui uma

média de 5 a 10 unidades de glicose/molécula em sua estrutura, como pode ser visto na Figura 1. (ROBIN et al., 1974).

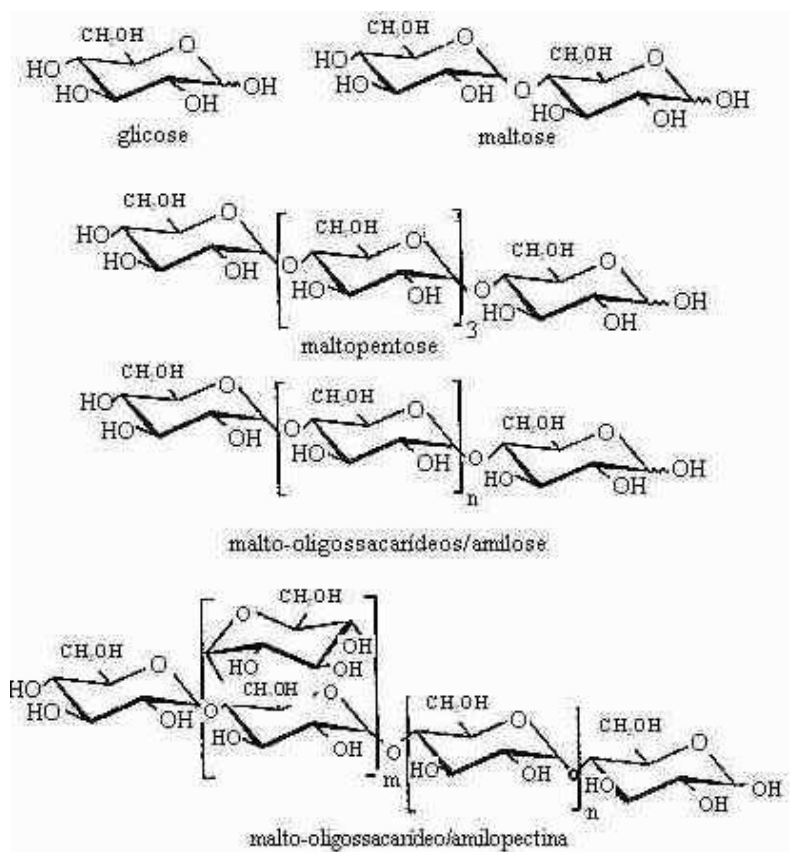


Figura 1 - Principais componentes estruturais da maltodextrina. Fonte: Kennedy; Knill e Taylor (1995).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprovou através da IN 14 (BRASIL, 2007) o método para detecção de maltodextrina em leite. Trata-se de cromatografia em camada fina, aplicável para identificação de dissacarídeos ou oligossacarídeos. A cromatografia em camada fina, utilizando solventes e reveladores apropriados, permite a identificação eluindo-se as manchas na camada delgada e determinando colorimetricamente a presença ou ausência de carboidratos de interesse.

3.3. PRODUTOS DE BAIXO TEOR DE LACTOSE

A lactose, carboidrato característico do leite, é um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos galactose e glicose, unidos por ligação

(1-4), é encontrada nas duas formas: alfa e beta. Estes dois isômeros estão representados na Figura 2.

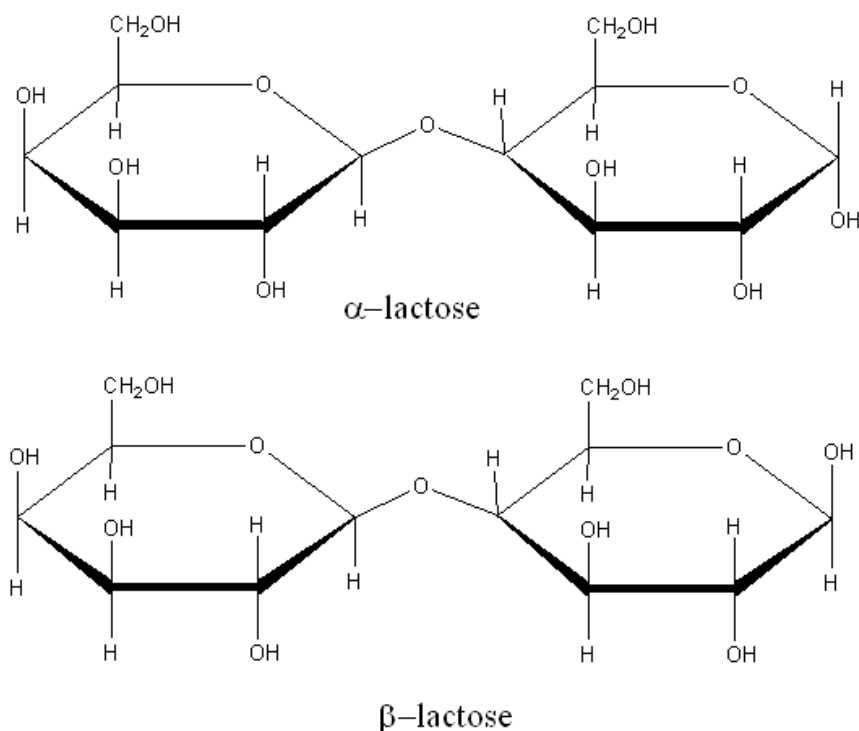


Figura 2 – Componentes estruturais da α -lactose e β -lactose.

Apesar de ser um açúcar, a lactose tem baixo poder adoçante quando se compara ao poder de doçura da frutose, sacarose, glicose e galactose. A lactose é encontrada no leite em diferentes concentrações dependendo da espécie de mamífero: em 100 ml de leite de vaca estão contidos 4,6 gramas, enquanto na mesma quantidade de leite humano tem-se 6,8 gramas (BACELAR JÚNIOR, KASHIWABARA & NAKAOKA, 2013).

A lactose tem o mesmo peso molecular da sacarose da qual difere, contudo, na configuração molecular, no poder edulcorante, na solubilidade e no poder redutor. A lactose é cerca de dez vezes menos solúvel que a sacarose (VALSECHI, 2001). Esta característica pode causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento de alguns produtos na indústria de laticínios. A lactose também apresenta um baixo poder adoçante. Isto faz da hidrólise da lactose uma possibilidade atrativa para a obtenção de um xarope mais doce contendo glicose e galactose (SANTOS, LADERO & GARCÍA-OCHOA, 1998).

As intolerâncias alimentares são quaisquer respostas diferentes de caráter não imunológico a um determinado alimento, e que também não tenham base psicológica. Elas podem resultar de diferentes tipos de mecanismos etiológicos e fisiopatológicos: ativadas pela ação de toxinas e agentes metabólicos ou ainda algum tipo de erro metabólico por deficiência enzimática. Dentre as intolerâncias alimentares se destaca a intolerância a lactose, que atinge cerca de 75 % da população mundial (BACELAR JÚNIOR, KASHIWABARA & NAKAOKA, 2013).

A intolerância à lactose é a incapacidade de digerir lactose, principal carboidrato do leite, resultado da deficiência ou ausência da enzima intestinal chamada β -galactosidase ou, simplesmente, lactase. Esta enzima possibilita a quebra da molécula deste carboidrato em monossacarídeos (galactose e glicose), facilitando a sua absorção pelo intestino. No Brasil, 58 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir a lactose pela deficiência da enzima lactase no intestino (LONGO, 2006).

A β -galactosidase é uma enzima que se situa nas microvilosidades do enterócito (tipo de célula epitelial) que é responsável pela hidrólise da lactose, fonte de energia para microrganismos do cólon. Quando ocorre uma deficiência desta enzima, a lactose é fermentada a ácido láctico, metano (CH_4) e gás hidrogênio (H_2). Este gás produzido cria um desconforto por distensão intestinal e pelo problema de flatulência (MORIOWAKI e MATIOLI, 2000). A indústria de laticínios tem dado especial atenção ao desenvolvimento de produtos contendo baixo teor de lactose, visando atender aos consumidores que apresentam má absorção ou intolerância à lactose (LONGO, 2006).

O leite com teor reduzido de lactose pode apresentar um decréscimo aproximado de até 95 % no teor de lactose total (CUNHA e SOARES, 2007). Produtos lácteos que apresentam teores reduzidos de lactose enquadram-se no regulamento técnico referente às informações sobre alimentos para fins especiais, que podem ser definidos como “formulações ou processados, nos quais se introduzem modificações no conteúdo de nutrientes, adequados à utilização em dietas, diferenciadas ou opcionais, atendendo às necessidades das pessoas em condições metabólicas e fisiológicas especiais” (BRASIL, 1998).

O uso da enzima β -galactosidase para hidrolisar a lactose em produtos lácteos é a principal alternativa para os consumidores que são intolerantes à lactose. Geralmente a β -galactosidase pode ser adicionada em quantidade indicada pelo fornecedor. A temperatura ótima é de até 40 °C, mas esta temperatura é ideal para proliferação de microrganismos patogênicos no leite. Portanto o tempo de reação não deve ultrapassar 4 horas (KOCIÁN, 1988; PROZYN, 2004).

O método baseado na depressão do ponto de congelamento só é válido para verificar a hidrólise da lactose e fornece um valor aproximado de teor de lactose, não se aplicando para determinar o teor de lactose de um produto acabado. Para garantir a ausência de lactose em um produto são indicados os métodos baseados em cromatografia, especialmente HPLC (ZHANG, CAO & YE, 2011).

3.4. ESPECTROSCOPIA RAMAN

A interação da radiação eletromagnética com os eletros e núcleos das moléculas dão origem a uma série de técnicas espectroscópicas, baseadas na absorção, emissão e nos processos de espalhamento. Estas técnicas oferecem a possibilidade de obter informações sobre a estrutura molecular, níveis de energia, ligações químicas, identificação e quantificação de elementos químicos e moléculas (SALA, 2008).

A técnica de espectroscopia Raman é uma das técnicas ópticas que despontam na literatura como ferramenta de análise dos componentes moleculares de diferentes materiais. Por ser de natureza vibracional, apresenta como característica espectros de emissão com bandas estreitas em posições correspondentes às vibrações das ligações nas moléculas presentes na amostra. Pode ser considerada uma “impressão digital” da molécula fornecendo informações que nenhuma outra técnica óptica é capaz de fornecer (SILVEIRA, 2008).

As técnicas espectroscópicas vêm sendo aplicadas em amostras sólidas, líquidas e em alguns gases, dentre materiais orgânicos e inorgânicos. Esta técnica fornece informações importantes sobre a estrutura

das moléculas e sobre a interação com moléculas vizinhas, podendo deste modo ser utilizada na identificação de moléculas presentes em um composto, e assim fornecer uma análise qualitativa e quantitativa de sua composição (ALCANTARA, 2002).

O efeito Raman que ocorre nesta espectroscopia é fundamentado basicamente na troca de energia entre luz (radiação eletromagnética) incidente e a matéria irradiada. Quando uma molécula é irradiada por uma radiação eletromagnética, esta radiação pode ser absorvida ou espalhada (SALA, 2008). Em Raman, o que é estudado é a radiação espalhada pela matéria. Este espalhamento pode ser da mesma frequência da radiação incidente, o que é denominado espalhamento elástico, ou pode sofrer uma mudança na frequência em relação a radiação incidente, o que é chamado espalhamento inelástico. O efeito Raman é definido como espalhamento inelástico de radiação eletromagnética monocromática que interage com as moléculas. Sendo assim, a frequência de radiação espalhada é diferente da radiação incidente (RAMAN e KRISHNAN, 1928).

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste em uma série de picos ou faixas, correspondendo cada um ao modo vibracional característico daquela molécula. Portanto, cada molécula apresenta um espectro Raman característico fornecendo a “impressão digital” de uma substância. Sua composição molecular pode ser determinada, possibilitando caracterizar a variação interatômica estrutural das moléculas presentes nos materiais avaliados (SOCRATES, 2004).

Os espectros Raman são obtidos irradiando-se uma amostra com uma fonte de radiação eletromagnética no visível ou no infravermelho próximo. Durante a irradiação, o espectro da radiação espalhada de modo inelástico é medido em um espectrômetro adequado e corresponde tipicamente entre 10^{-9} a 10^{-6} de todo espalhamento observado, sendo que a maioria do espalhamento se dá de modo elástico, e por essa razão fica difícil observar o espalhamento Raman sem uma intensa fonte de excitação monocromática e um detector sensível (ANGEL et al., 1995).

A quantidade e a qualidade das informações que podem ser extraídas de um espectro dependem de alguns fatores: características da fonte de radiação utilizada para excitar as amostras, dentre estes fatores destacam-

se a potência e o comprimento de onda do laser; da forma de coleta do sinal proveniente da amostra após a interação, como tempo de aquisição; resolução temporal ou espectral do instrumento de dispersão (espectrógrafo) utilizado, e do tipo e sensibilidade do detector do sinal, além das propriedades físicas e coeficiente de espalhamento da amostra em análise (AFSETH; WOLD & SEGTMAN, 2006; ALCÂNTARA, 2002).

No caso, FT (Fourier transform ou transformada de Fourier) caracteriza-se pela substituição das convencionais redes de difração por espelhos refletores (interferômetro de Michelson) para separar os feixes e conduzi-los ao detector. Isto gera um interferograma, que apesar de conter toda a informação fornecida pelo espectrômetro sob um dado conjunto de condições, não se apresenta de uma forma útil para o operador. Essa informação é convertida em espectro, relacionando-se as intensidades com as respectivas frequências, através da transformada de Fourier (FACÃO, 1999). O interferograma é, portanto, formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam ao interferômetro e possui todas as informações espectrais da amostra. Apresenta como principais vantagens uma maior relação sinal/ruído, melhor precisão e exatidão em termos de comprimento de onda e o fato de todos os sinais da fonte alcançarem o detector simultaneamente, tornando possível a obtenção de todo o espectro de uma só vez e, com essa economia de tempo, sendo possível aumentar o número de varreduras (“scans”) para maximizar a razão sinal/ruído (LUZ, 2003)

Schulz e Baranska, (2007) demonstraram a possibilidade de utilização de técnicas vibracionais (particularmente a FT-Raman e espectroscopia no infravermelho) como ferramentas úteis para a elucidação da estrutura química e controle de qualidade de produtos em diversas aplicações industriais, como por exemplo detecção de compostos que evidenciem fraude em um produto, apresentando como principais vantagens em relação a outras técnicas o fato de não ser destrutiva, não necessitar de preparo ou tratamento para a amostra e rápida obtenção dos resultados, sendo a maioria dos estudos em associação com ferramentas quimiométricas.

A técnica de espectroscopia Raman, restrita por um longo tempo à investigação acadêmica, aos poucos desponta como uma técnica inovadora

na área de controle de qualidade. O objetivo final é utilizar a técnica como controle de qualidade “in line” e “at line”, possibilitando conhecimento das características da amostra durante o processamento industrial (OLSEN et al., 2007).

3.5. FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

A quimiometria utiliza métodos matemáticos e estatísticos para a análise de dados multivariados com o objetivo de extrair informação, melhorar e otimizar medidas de processos químicos. Nos dados multivariados, diversas variáveis são analisadas simultaneamente. O uso das ferramentas quimiométricas tornou possível o processamento e interpretação de dados que antes seriam impossíveis de serem analisados, isso se deve ao aumento da capacidade de processamento dos computadores, da instrumentação analítica e da habilidade de adquirir dados rapidamente (BARROS NETO et al., 2006).

Para utilização das ferramentas quimiométricas os dados químicos são, geralmente, arranjados na forma de tabelas ou matrizes de dados, as linhas representam as amostras e as colunas referem-se as variáveis (exemplo, intensidade Raman em diferentes números de onda). Durante uma análise, uma grande quantidade de dados pode ser obtida. Espectros Raman coletados para 45 amostras na faixa de 3500 a 50 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} compõem uma matriz de dados de dimensões 45 x 1790 = 80550 números. Desta forma, se faz necessária uma maneira de extrair informações importantes de matrizes de dados com tais dimensões. Dentre as ferramentas quimiométricas mais utilizadas estão a calibração multivariada e reconhecimento de padrões, onde destacam-se os métodos de análise de componentes principais (PCA, do inglês, principal component analysis) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, partial least squares discriminant analysis) (ALMEIDA, 2011).

Os métodos de reconhecimento de padrões permitem identificar similaridades e diferenças nas propriedades das amostras e/ou variáveis e

classificá-las de acordo com tais características. O objetivo do reconhecimento de padrões é extrair a informação útil de um conjunto de dados complexos. Existem várias ferramentas disponíveis para conseguir informação de um conjunto de dados, estas são divididas em dois segmentos: treinamento não-supervisionado e supervisionado. Os treinamentos não-supervisionados são métodos que não requerem nenhuma suposição inicial sobre a estrutura dos dados, o objetivo é encontrar agrupamentos naturais. A análise por componentes principais é um dos métodos mais utilizados e difundidos para esse tipo de estudo (BRERETON, 2003).

Os métodos supervisionados são aqueles que necessitam de alguma suposição inicial sobre o sistema em estudo, são empregados para prever se uma amostra pertence a uma determinada classe previamente estabelecida, exemplo: SIMCA (do inglês, soft independent modeling of class analogy) e mais recente a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (BARKER e RAYENS, 2003).

O objetivo da PCA é transformar grandes matrizes de dados em matrizes menores que podem ser facilmente interpretadas, permitindo extrair o máximo de informação. A PCA converte as informações obtidas em gráficos que mostram a relação entre as amostras e entre as variáveis do sistema em estudo. Para representação de duas ou três variáveis é possível representar as amostras graficamente sem a utilização da PCA, mas acima de 3 variáveis torna-se necessário o uso da ferramenta quimiométrica para obter a correlação entre as variáveis e as amostras (RIBEIRO, 2007).

Geometricamente a PCA pode ser definida como uma técnica de projeção, na qual a matriz X é projetada num subespaço de dimensões reduzidas. A PCA faz uma decomposição da matriz de dados em termos da soma de várias matrizes de posto 1, na qual posto significa um número que expressa a dimensionalidade da matriz. O novo conjunto de variáveis é a combinação linear das variáveis originais. A PCA tenta agrupar aquelas variáveis que estão altamente correlacionadas numa nova variável chamada de componente principal. Usualmente a grande fração da variância é descrita nos primeiros componentes principais, sendo possível visualizar os dados pelo gráfico dos escores de um componente contra o outro. O gráfico de escores mostra similaridade e as diferenças entre as amostras e o gráfico

dos pesos mostra a contribuição de cada variável original para o modelo das componentes principais (SENA et al., 2000).

A PLS-DA é uma técnica que combina as propriedades da regressão por mínimos quadrados parciais com o poder de uma técnica de classificação. A principal vantagem dos modelos PLS-DA é que as principais fontes de variabilidade dos dados são modeladas pelas variáveis latentes e seus escores e pesos associados, permitindo a visualização e entendimento de diferentes padrões e associações dos dados. Para a determinação do número correto de variáveis latentes, o método mais utilizado consiste na validação cruzada, onde cada amostra de um conjunto de dados é utilizada para validação, o processo é repetido até que todas as amostras tenham sido retiradas e testadas (BARKER e RAYENS, 2003).

A PLS-DA segue o mesmo princípio do PLS, neste método a variável simulada (matriz Y) descreve a classe da amostra empregando valores zero ou um. A classe de uma nova amostra é determinada através do valor previsto (0 ou 1) pelo PLS-DA. Os valores previstos pelo modelo PLS-DA são zero e um; entretanto, observa-se que os valores se aproximam destes. É calculado um valor limite entre os valores previstos, onde amostras acima deste valor indicam que estas pertencem à classe modelada (RIBEIRO, SALVA & FERREIRA, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. FABRICAÇÃO DAS AMOSTRAS

O leite utilizado neste trabalho foi obtido de um laticínio localizado na cidade de Viçosa – MG, onde foi submetido ao tratamento térmico de pasteurização (75 °C / 15 s) e permaneceu estocado à 4 °C em câmara fria até sua utilização. Para a fabricação das amostras de leite em pó integral, o leite foi retirado da câmara fria e então procedeu-se a secagem em “spray dryer”. Para as amostras com baixo teor de lactose, o leite foi retirado da câmara fria e aquecido até a temperatura de 38 °C, temperatura ótima de atuação da enzima β -galactosidase (GODO-YNL2, DANISCO) utilizada. A enzima foi adicionada na concentração de 0.8 gramas por litro de produto, sendo a % de hidrólise acompanhada por crioscopia (Crioscópio ITR MK540), por meio da equação [1] descrita abaixo (MOREIRA et al., 2009).

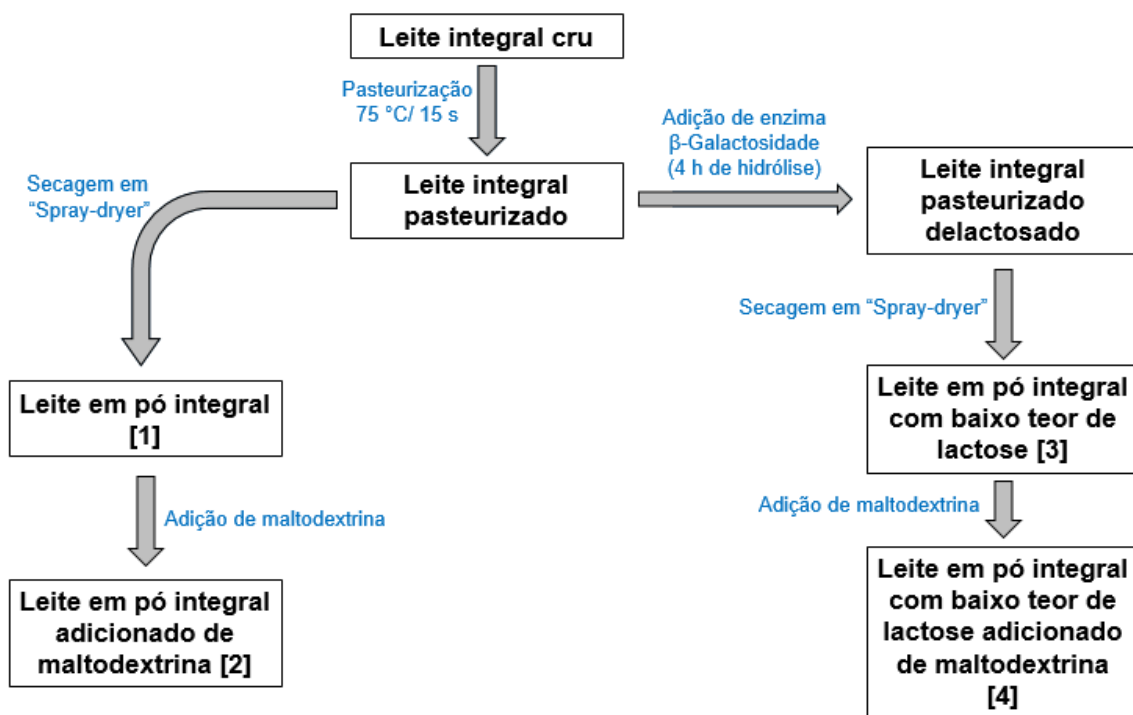
$$GH = (350,877 \times \text{Crioscopia final}) - (\text{Crioscopia Inicial})/0,00285) \quad (1)$$

A meta de hidrólise foi estabelecida em 90%, sendo alcançada com tempo médio de 4 horas para as amostras. Após esta etapa o leite foi então submetido a secagem em spray.

Para ambos os tratamentos utilizou-se o Spray dryer (modelo MSD 1.0, Marca LM Brasil) em escala piloto. Os parâmetros de secagem foram em média 160 °C de temperatura do ar de secagem, 90 °C de temperatura do ar de saída e 0.8 L / h de fluxo de produto. Ao final da secagem para cada amostra, todo o pó foi coletado do equipamento, embalado e estocado a temperatura controlada de 25 °C e ao abrigo da luz, a fim de minimizar a velocidade de reações químicas, como reações de Maillard e oxidação de lipídios.

Para a obtenção das amostras adulteradas, foram escolhidas ao acaso amostras de leite em pó integral e leite em pó com baixo teor de lactose. A fraude ocorreu pela mistura de maltodextrina (Globe Plus Maltodextrin 10 DE, Ingredion) diretamente aos pós, variando a concentração do adulterante

entre 2.5 e 50 %. Cada componente foi pesado usando uma balança analítica (Shimadzu AX200), sendo a amostra resultante homogeneizada utilizando almofariz e pistilo de ágata. Os pós foram embalados e estocados no ambiente controlado e permaneceram em média 5 dias até serem analisados por meio da espectroscopia. A Figura 3 mostra o fluxograma de fabricação



das amostras.

Figura 3 – Fluxograma de fabricação das amostras.

Foram produzidas 24 amostras de leite em pó integral, das quais 13 foram adulteradas com maltodextrina, e 21 amostras de leite em pó com baixo teor de lactose, onde 12 foram adulteradas, totalizando 45 amostras (com conteúdo de 200 gramas em média para cada amostra) divididas em 4 tratamentos. Na Tabela 1 encontram-se a identificação e a composição de cada amostra.

Tabela 1 – Identificação das amostras analisadas e quanto ao conteúdo de lactose e teor de maltodextrina

Amostra	Tipo	Maltodextrina	Amostra	Tipo	Maltodextrina
1	Leite em pó comum	Não	24	Leite em pó comum	50,00 /
2	Leite em pó comum	Não	25	Leite em pó delactosado	Não
3	Leite em pó comum	Não	26	Leite em pó delactosado	Não
4	Leite em pó comum	Não	27	Leite em pó delactosado	Não
5	Leite em pó comum	Não	28	Leite em pó delactosado	Não
6	Leite em pó comum	Não	29	Leite em pó delactosado	Não
7	Leite em pó comum	Não	30	Leite em pó delactosado	Não
8	Leite em pó comum	Não	31	Leite em pó delactosado	Não
9	Leite em pó comum	Não	32	Leite em pó delactosado	Não
10	Leite em pó comum	Não	33	Leite em pó delactosado	Não
11	Leite em pó comum	Não	34	Leite em pó delactosado	2,50 /
12	Leite em pó comum	2,50 /	35	Leite em pó delactosado	5,00 /
13	Leite em pó comum	5,00 /	36	Leite em pó delactosado	7,50 /
14	Leite em pó comum	7,50 /	37	Leite em pó delactosado	10,00 /
15	Leite em pó comum	10,00 /	38	Leite em pó delactosado	15,00 /
16	Leite em pó comum	12,50 /	39	Leite em pó delactosado	20,00 /
17	Leite em pó comum	15,00 /	40	Leite em pó delactosado	25,00 /
18	Leite em pó comum	20,00 /	41	Leite em pó delactosado	30,00 /
19	Leite em pó comum	25,00 /	42	Leite em pó delactosado	35,00 /
20	Leite em pó comum	30,00 /	43	Leite em pó delactosado	40,00 /
21	Leite em pó comum	35,00 /	44	Leite em pó delactosado	45,00 /
22	Leite em pó comum	40,00 /	45	Leite em pó delactosado	50,00 /
23	Leite em pó comum	45,00 /			

4.2. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN

Os espectros Raman das amostras foram obtidos em um espectrômetro RFS 100 FT-Raman (Bruker), demonstrado na Figura 4, equipado com detector de Ge, refrigerado com nitrogênio líquido e linha de excitação em 1064 nm, empregando laser Nd:YAG. A potência do laser deste equipamento é de no máximo 500 mW, podendo ser eletronicamente ajustada para cada tipo de amostra a ser estudada. Neste trabalho, a potência de saída foi ajustada em 60 mW. Esta potência foi escolhida para que o sinal Raman obtido fosse o mais intenso sem que houvesse aquecimento ou degradação das amostras. As medidas foram feitas com resolução de 4 cm^{-1} , faixa espectral de $3500\text{ a }50\text{ cm}^{-1}$ e 512 acumulações, com um tempo de análise de aproximadamente 15 minutos.



Figura 4 – *Espectrômetro RFS 100 FT-Raman (Bruker).*

Em todos os espectros obtidos, as amostras não passaram por nenhum preparo prévio, sendo levadas diretamente da embalagem ao porta amostras do equipamento com o auxílio de uma espátula. Para a obtenção dos espectros foram utilizados menos que 1 grama de cada amostra. Ao

término de cada análise, a amostra foi recolocada na devida embalagem. Entre cada análise o porta amostras foi limpo com álcool 70 °GL e papel.

Foi utilizado o software Opus 6.0 (Bruker Optik Ettlingen, Alemanha) para a aquisição dos dados espectrais.

Além dos espectros de todas as amostras, foi obtido o espectro da amostra de maltodextrina pura, em duplicata, para fins de comparação e composição da base de dados, totalizando 47 espectros.

4.3. PRÉ-TRATAMENTO DOS ESPECTROS

Para a aplicação dos métodos multivariados utilizou-se o software MATLAB 7.5. Primeiramente os espectros Raman foram dispostos em forma de matriz em uma planilha, onde as linhas representam as amostras e as colunas exibem a intensidade Raman em cada número de onda, como mostrado na Figura 5. Antes da realização de qualquer análise os espectros foram normalizados conforme a equação [2] abaixo:

$$x_{i,norm} = \frac{x_i}{\sum_{j=1}^n |x_{i,j}|} \quad (2)$$

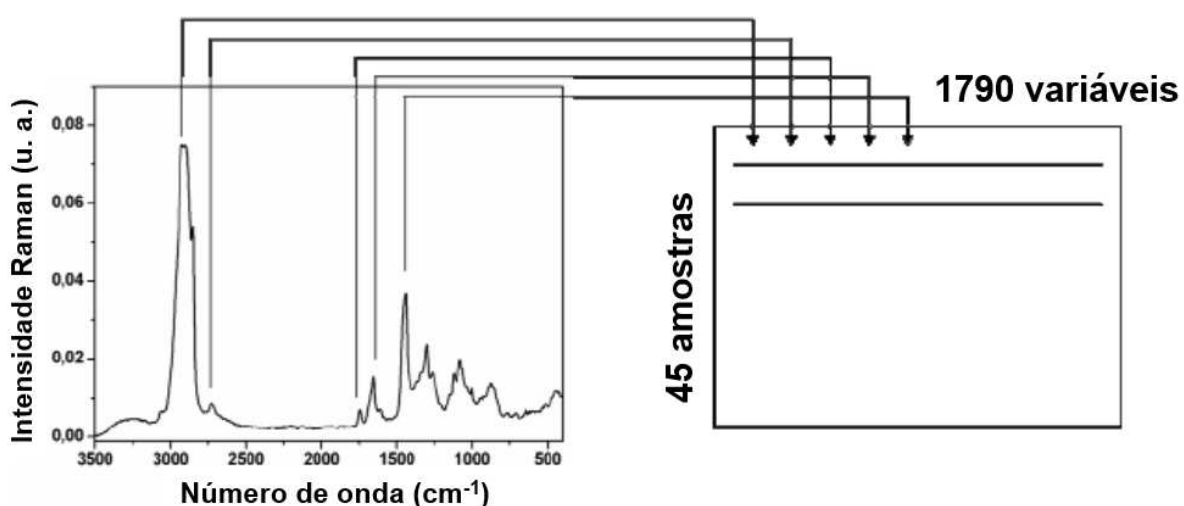


Figura 5 – Organização dos dados multivariados em uma matriz a partir do espectro Raman. Fonte: Almeida (2010).

Obteve-se a segunda derivada dos espectros usando o algoritmo de suavização Savitzky-Golay (1964) com uma janela de 15 pontos e polinômio de segunda ordem. As derivadas são muito úteis para melhorar a resolução visual dos picos, entretanto, podem aumentar os ruídos. Dessa forma, o algoritmo foi aplicado para suavizar e melhorar a relação sinal/ruído após derivação. Os dados foram centrados na média, ou seja, cada valor da variável foi subtraído pela média das variáveis (Equação 3):

$$x_{(i,j)cm} = x_{i,j} - \bar{x}_j \quad (3)$$

4.4. ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise exploratória dos dados foi feita através da PCA, onde o número de componentes principais foi decidido pela análise do gráfico de autovalores versus o número de PC's (componentes principais). A PCA foi empregada para o conjunto total de amostras com o objetivo de averiguar se as mesmas se dividiriam em grupos distintos de acordo com os tratamentos aplicados às amostras.

Foram realizados dois tratamentos supervisionados distintos entre si feitos por meio de PLS-DA no conjunto total de amostras, o primeiro com o objetivo de classificar as amostras quanto a presença ou ausência de lactose e o segundo com o objetivo de classificar as amostras quanto a presença ou ausência do adulterante.

Para o primeiro modelo PLS-DA, os dados espectrais foram aleatoriamente subdivididos em dois grupos: treinamento (dois terços das amostras) e avaliação (um terço das amostras). Para cada grupo de amostras, foi criada uma matriz fictícia contendo o valor 0 nas linhas correspondentes as amostras com baixo teor de lactose e 1 nas linhas correspondentes as amostras com teor normal de lactose.

Para o segundo modelo PLS-DA o conjunto de dados foi subdividido novamente em 2 grupos de forma totalmente independente em relação ao outro modelo. Procedeu-se da mesma forma, porém na matriz fictícia utilizou-

se o valor 0 para as amostras sem a presença de adulterante e 1 para as amostras fraudadas.

O número de variáveis latentes foi calculado por meio da validação cruzada, pelo método “leave one out”.

4.5. AVALIAÇÃO DOS MODELOS

O desempenho dos modelos PLS-DA foi avaliada em termos da classificação correta das amostras (quantidade de predições corretas em relação ao total de amostras), sensibilidade (capacidade do modelo em reconhecer as amostras de uma determinada classe como pertencentes a esta classe) e especificidade (capacidade de reconhecer as amostras que não pertencem a determinada classe como não pertencentes a esta classe), de acordo com Alvarez-Guerra et al. (2010), sendo estes dois últimos parâmetros obtidos pelo ponto de corte na curva ROC (LÓPEZ et al., 2014), fornecida pelo software MATLAB.

Neste tipo de avaliação, são obtidas curvas de sensibilidade e especificidade para a classificação das amostras com base no valor do limiar de classificação. A determinação deste valor limiar está relacionada ao poder de classificação do modelo em estudo e pode ser feita de modo a obter maior sensibilidade, maior especificidade, maior taxa de classificação ou equilíbrio entre os valores. Neste trabalho, foi adotado o valor médio entre as variáveis dependentes da matriz fictícia (0 ou 1), próximo de 0,5, que é valor limite adotado pelos modelos para a distinção das classes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE QUALITATIVA DOS ESPECTROS OBTIDOS

5.1.1. Caracterização quanto a presença de maltodextrina

O espectro Raman de maltodextrina pura, leite em pó integral, e leite em pó adicionado de maltodextrina (10, 30, e 50 %), identificados pelos números 1, 15, 20 e 24 são mostrados na Figura 6.

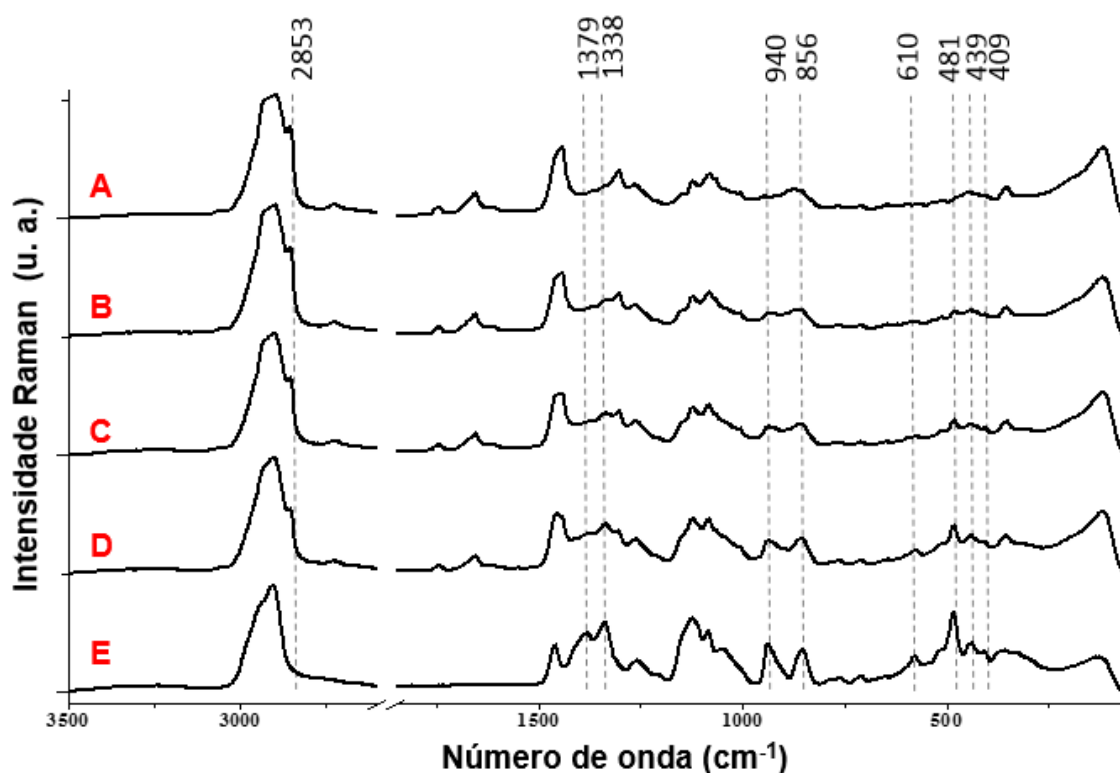


Figura 6 – Espectros FT-Raman de leite em pó (A), leite em pó com 10% (B), 30% (C) e 50% de adição de maltodextrina (D), assim como o espectro de maltodextrina pura (E).

A maltodextrina é um resultado da hidrólise do amido, e assim seu espectro é muito próximo do espectro das moléculas de amilose e amilopectina. As bandas principais deste agente adulterante estão na região entre 1400 e 400 cm^{-1} , que corresponde a deformações endo e exocíclicas (GELDER et al. 2007). A maioria destas bandas são devido a vibrações envolvendo átomos de hidrogénio. Na região entre 1400 e 1380 cm^{-1} é

possível observar o acoplamento dos modos de deformação de C-C-H e C-O-H, enquanto a região entre 1340 e 1200 cm^{-1} contém contribuições de outros modos de vibração, tais como estiramentos de C-O e C-C e deformações de C-C-H, C-O-H, e C-C-H (ALMEIDA et al., 2010).

De acordo com Berzerdjeb et al. (2007), a região de 1200 a 800 cm^{-1} é bem característica de estiramentos de C-O e C-C e deformação de C-O-C, referindo-se à ligação glicosídica; Esta região é também conhecida como a impressão digital desse tipo de ligação, ou região anomérica (NIKONENKO et al., 2005, YANG e ZHANG, 2009, e BARANSKA et al., 2005). Na região anomérica pode-se ver a distinção entre as configurações α e β das moléculas de um polissacarídeo.

As vibrações na região de 800 – 400 cm^{-1} são, em geral, devido a deformações de C-C-O e C-C-C, e nesta região pode-se observar um acoplamento muito forte relacionado com deformações estruturais do anel glicosídico (GELDER et al., 2007).

A banda intensa 475 e 485 cm^{-1} tem sido utilizado como um marcador para identificar a presença de amido em diferentes amostras, bem como para caracterizar amilose, amilopectina e polissacarídeos que são constituintes ou derivados de amido (KIZIL, IRUDAYARAJ & SEETHARAMAN, 2002), como é o caso da maltodextrina.

Modificações nas intensidades relativas destas regiões dos espectros de leite em pó são indicativos de mudança no conteúdo de carboidratos, que pode ser associada com a presença de maltodextrina.

Através da comparação dos espectros Raman do leite em pó integral com a amostra contendo 10 % de maltodextrina, foi possível identificar alterações mínimas no perfil do espectro da amostra adulterada, especificamente nas intensidades das bandas relacionadas com a presença de maltodextrina, 940, 856 e 481 cm^{-1} . Além disso, os aumentos no conteúdo de maltodextrina levou a uma alteração dos espectros de leite em pó, como foi observado na amostra contendo 30 % adulterante. Nas amostras com teores de maltodextrina menores que 10 %, com 2,5 %, 5,0 % e 7,5 % as mudanças espectrais são foram percebidas, necessitando do auxílio de uma análise exploratória ou discriminante para classifica-las.

Como mostrado na Figura 6, a presença de, pelo menos, 10 % de maltodextrina no leite em pó provocou alterações no perfil espectral principalmente nas regiões que contêm os modos vibracionais que são característicos da maltodextrina. Observa-se, portanto, que é possível identificar rapidamente a presença de maltodextrina sem qualquer preparação da amostra, o que é muito útil para a análise de campo, porém as alterações espectrais só foram significativas a ponto de identificar um adulterante quando a concentração do mesmo estava acima de 10 %, o que torna necessário o uso de ferramentas quimiométricas para confirmar possíveis fraudes, principalmente em concentrações menores do adulterante.

5.1.2. Caracterização quanto a presença de lactose

O espectro Raman do leite em pó e do leite em pó com baixo teor de lactose, identificadas como amostras 1 e 25, são mostrados na Figura 7, e as principais bandas vibracionais estão listadas na Tabela 2 com as suas respectivas tentativas de atribuição com base em comparações com dados da literatura.

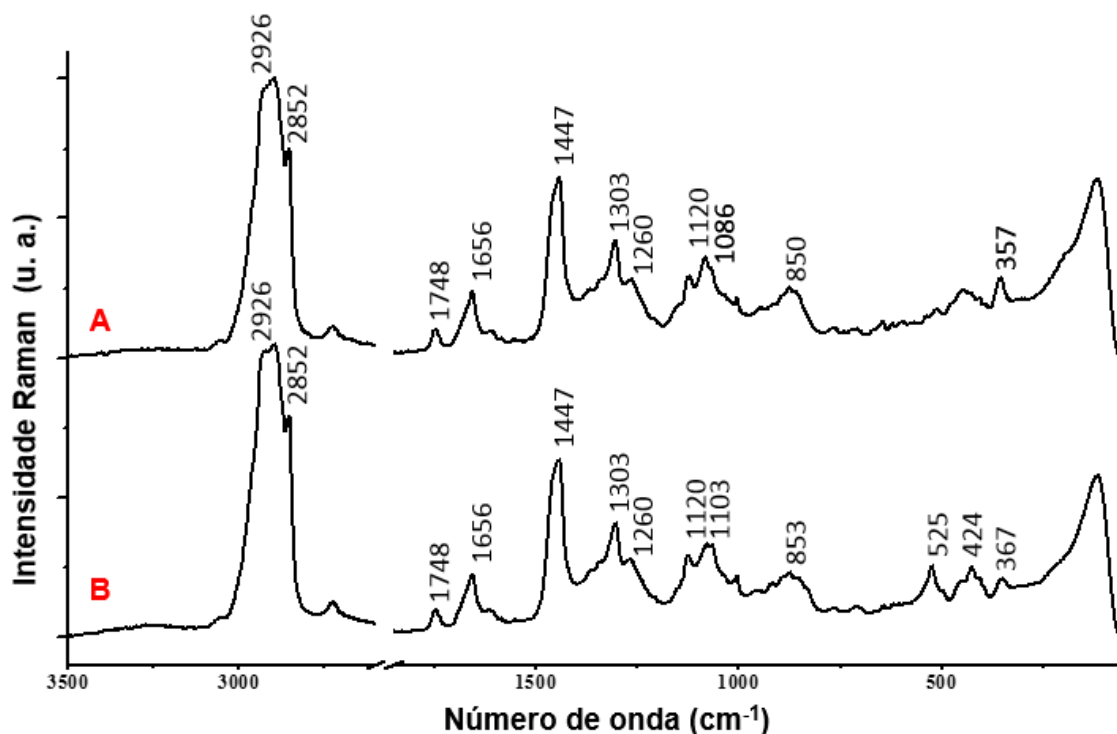


Figura 7 – Espectros FT-Raman de leite em pó (A) e leite em pó com baixo teor de lactose (B).

Tabela 2 – Principais números de onda e suas respectivas tentativas de atribuição (Almeida et al., 2011; Chien-Ju, Lupoi & Smith, 2011; McGoverin et al., 2010.)

Banda Raman (cm⁻¹)		Tentativa de atribuição	Banda Raman (cm⁻¹)		Tentativa de atribuição
357	w	Lactose	1082	m	v (C–O) + v (C–C) + δ (C–O–H)
424	w	Glucose	1121	m	v (C–O) + v (C–C) + δ (C–O–H)
445	w	δ (C–C–C) + τ (C–O)	1262	m	γ (CH ₂)
525	w	Glucose	1303	m	τ (CH ₂)
598	w	δ (C–C–C) + τ (C–O)	1340	m	δ (C–H); v (C–O)
645	w	δ (C–C–O)	1442	s	δ (CH ₂)
711	w	v (C–S)	1555	w	δ (N–H); v (C–N) Amide II
763	w	δ (C–C–O)	1654	m	v (C=O) Amide I; v (C=C)
877	m	δ (C–C–H) + δ (C–O–C)	1745	w	v (C=O) _{ester}
950	m	δ (C–O–C) + δ (C–O–H) + v (C–O)	2853	s	v _s (CH ₂)
1005	m	Ring-breathing (phenylalanine)	2900	vs	v _s (CH ₃)
1065	m	v (C–O) + v (C–C) + δ (C–O–H)	2927	vs	v _{ass} (CH ₂)

Vs – very strong; s – Strong; m – Medium; w – Weak.

Na região compreendida entre 3100 e 2800 cm⁻¹, a presença de bandas características de estiramento de C-H pode ser observada. Este tipo de módulo vibracional está relacionado com o teor de lipídios e carboidratos nas amostras (ALMEIDA et al., 2011).

A banda localizada em 1500 cm⁻¹ no espectro de leite em pó foi atribuída ao modo de amida II, tendo contribuições da deformação de N-H e do estiramento de C=N (MOROS, GARRIGUES & GUARDA, 2007). A presença da banda intensa a 1450 cm⁻¹ (relacionado com a deformação de CH₂) foi observada nos dois tipos de leite devido principalmente aos modos vibracionais de gordura e hidrocarbonetos presentes (ZHOU et al., 2006).

Os espectros dos dois tipos de leite apresentaram uma banda a 1260 cm⁻¹, o que foi atribuído à torção em CH₂ de carboidratos. A faixa espectral compreendida entre os 1200 e os 800 cm⁻¹ foi dominada pelos modos de vibração característicos de carboidratos. Os principais modos vibracionais presentes foram atribuídos ao estiramento C-O e deformações de C-C e C-O-H (1120 – 1064 cm⁻¹), bem como a deformação de C-O-C (950 – 870 cm⁻¹).

As bandas que foram mais úteis para identificar o leite em pó integral foram as de 2852, 1086 e 357 cm^{-1} , que são relacionadas a presença de lactose. Para amostras de baixo teor de lactose, além da diminuição da intensidade das bandas relacionadas com a presença de lactose, verifica-se a presença de bandas a 2866, 1103, 525, e 424 cm^{-1} , das quais principalmente as bandas 525 e 424 cm^{-1} estão relacionados para a presença de glicose (CHIEN-JU, LUPOI & SMITH, 2011).

5.2. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A fim de verificar se as amostras apresentaram espectros Raman com as mesmas características de acordo com a sua classificação, foi realizada uma análise exploratória empregando PCA, cujos escores estão representados na Figura 8.

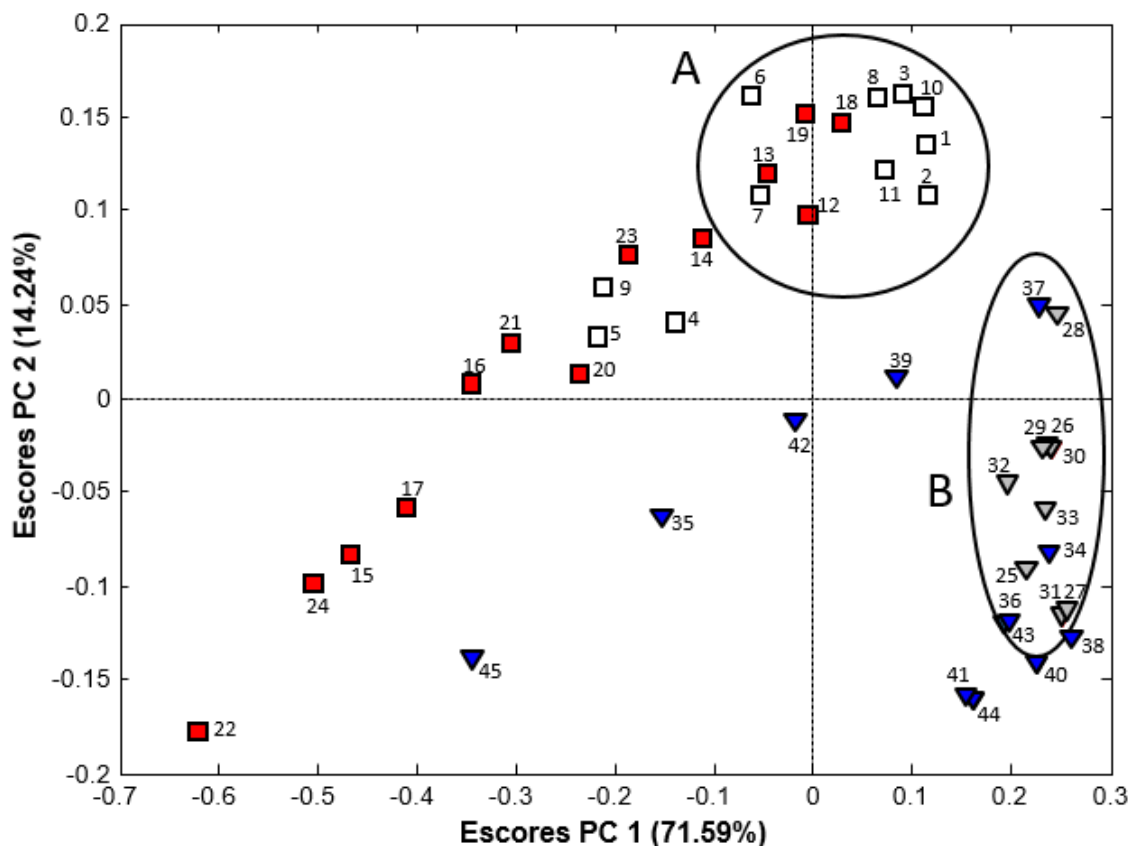


Figura 8 – Gráfico de escores de PC1 versus PC2 das amostras de leite em pó (□), leite em pó com maltodextrina (■), leite em pó com baixo teor de lactose (▼) e leite em pó com baixo teor de lactose adicionado de maltodextrina (▼).

A PCA está representada para os dois primeiros componentes principais, responsáveis por 85,83 % da informação original.

As principais variáveis que foram responsáveis pela diferenciação das amostras podem ser observadas no gráfico de loadings, ou simplesmente pesos para cada variável dentro de cada componente principal. Os pesos da PCA obtida se encontram na Figura 9.

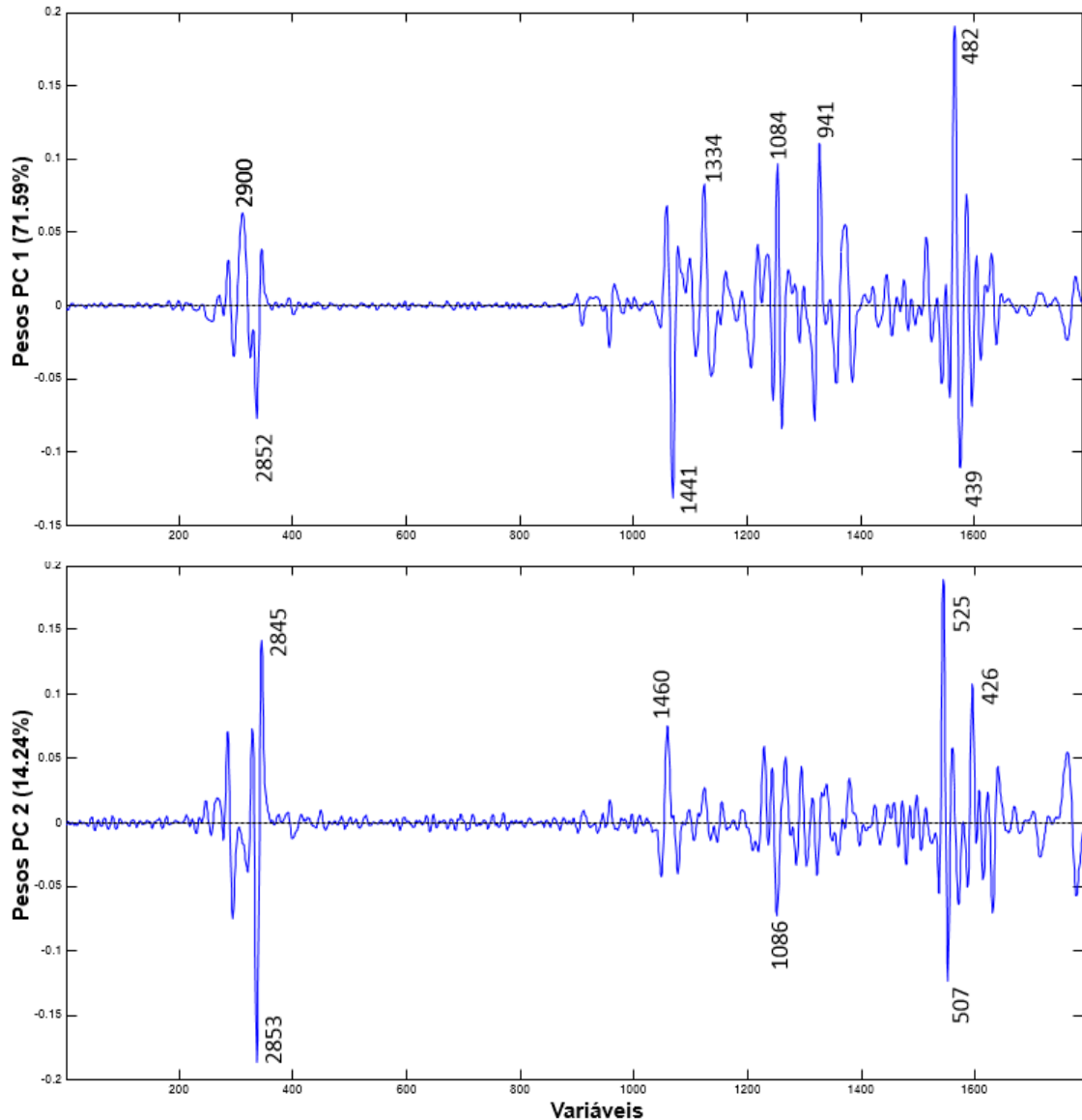


Figura 9 – Gráfico de Loadings / Pesos de PC1 e PC2 versus Número de onda para as amostras.

É possível verificar a separação de dois grupos, onde o grupo A contém a maioria das amostras de leite em pó integral não adulteradas, e o grupo B contém a maioria das amostras com baixa lactose não adulteradas.

É possível observar uma dispersão das amostras adulteradas em relação as amostras normais, onde as amostras com maiores concentrações de maltodextrina se distanciam em relação aos dois eixos principais.

É importante notar que as bandas em 940 e 482 cm^{-1} , atribuídas à presença de maltodextrina em amostras de leite em pó, tiveram as maiores pontuações no PC1 e foram as variáveis mais importantes para a discriminação dos grupos. De acordo com as pontuações do PC2, as bandas 1086 e 507 cm^{-1} , relacionados com a presença de lactose, eram mais responsáveis pela separação de amostras com lactose, enquanto que as bandas a 525 e 426 cm^{-1} relacionada com a presença de glucose, foram responsáveis por agrupar as amostras de baixa lactose.

Porém nota-se que os grupos formados não estão perfeitamente definidos. Principalmente em relação a detecção de fraude, percebe-se que as amostras com as menores concentrações de maltodextrina se confundem com amostras não adulteradas, o que demonstra a necessidade de um método de classificação supervisionada para melhor discriminação das amostras, visto que a PCA não foi suficiente para tomar uma decisão quanto a natureza de todas as amostras.

5.3. ANÁLISE DISCRIMINATÓRIA COM O MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

5.3.1. Classificação das amostras adulteradas

A fim de verificar a formação de padrões entre as amostras adulteradas e não adulteradas, foi realizada uma análise discriminante. Nesta abordagem quimiométrica, PCA e PLS-DA foram usadas porque, na concepção de um sistema para ser usado por operadores não especializados, é necessário fornecer um algoritmo de classificação para as amostras. Antes da análise, uma matriz de dados foi construída, constituída de 45 linhas (45 amostras) e 1790 colunas (1790 pontos de dados, entre 3500 e 50 cm^{-1}) e pré-tratadas tal como descrito na seção Material e métodos.

PLS-DA foi usado para obter uma melhor discriminação entre os espectros Raman das amostras de leite em pó sem a adição de maltodextrina

e das amostras adulteradas. As amostras utilizadas para a construção deste modelo PLS-DA foram as mesmas utilizadas no modelo de PCA. Para um total de 45 amostras (20 amostras não adulteradas e 25 amostras adulteradas, com conteúdo de maltodextrina variando de 2,5 a 50 %), foi utilizada a gama espectral completa (3500 – 50 cm^{-1}). O conjunto de dados resultante obtido pela validação cruzada utilizando seis variáveis latentes (LV) foi, então, dividido aleatoriamente em grupos; treinamento (14 amostras não adulteradas e 16 amostras adulteradas) e avaliação (6 amostras não adulteradas e 9 amostras adulteradas). Os resultados do modelo PLS-DA são mostrados na Figura 10.

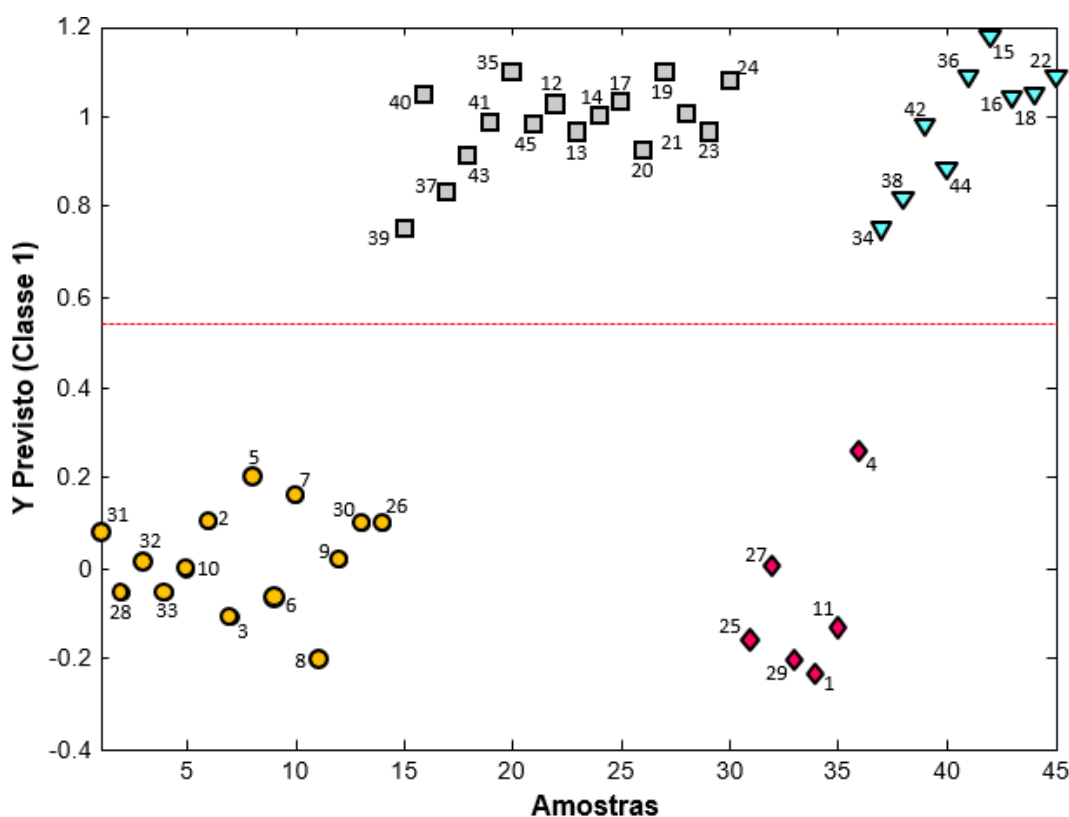


Figura 10 – Resultados do modelo PLS-DA para treinamento, mostrando as amostras sem fraude (●) e amostras adulteradas (■); Resultados para avaliação, mostrando as amostras sem fraude (◆) e amostras adulteradas (▼).

Os valores previstos do modelo PLS-DA foram 0 para amostras não adulteradas e 1 para as amostras adulteradas. Como pode ser visto na Figura 12, os valores experimentais foram em torno de 0 ou 1; assim um valor limite entre os valores previstos foi calculado. O valor limite utilizado na classificação foi de 0,555. Como resultado, as amostras acima deste nível pertenciam à classe modelada neste estudo. A separação de amostras de

leite em pó de acordo com o grau de adulteração foi, em seguida, mais óbvia, o que ocorreu devido ao algoritmo da PLS-DA maximizar a variância entre os grupos e não dentro do grupo.

O conjunto de avaliação produziu uma taxa de classificação correta de 100,0%. As amostras de leite em pó foram corretamente classificadas em 100 % dos casos, com uma especificidade de 100,0 % e sensibilidade de 88,62 %, de acordo com os dados da curva ROC (Figura 11).

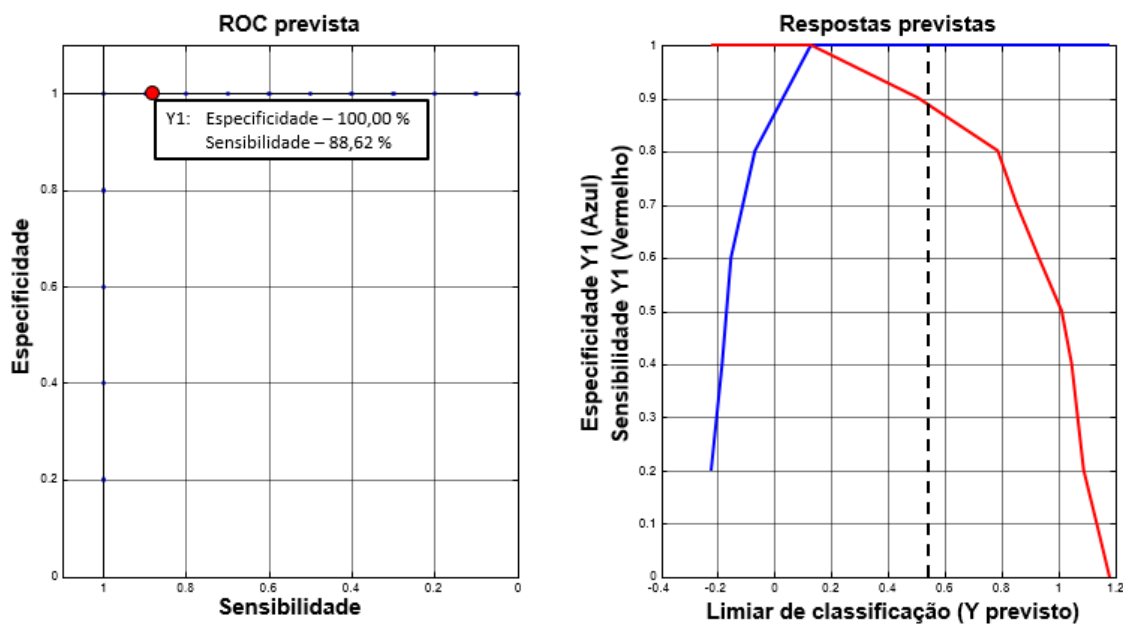


Figura 11 – Curva ROC, sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA obtido para classificação das amostras adulteradas.

Os resultados para o conjunto de avaliação foram satisfatórios, mostrando a confiabilidade e robustez do modelo desenvolvido. Deste modo, o modelo PLS-DA pode analisar novas amostras de leite em pó com os dados obtidos por espectroscopia Raman, classificar e prever a probabilidade de adulteração de novas amostras contendo maltodextrina.

5.3.2. Classificação das amostras com baixo teor de lactose

A fim de verificar a formação de padrões entre as amostras com baixo teor em lactose e amostras de teor de lactose normal, uma nova PLS-DA foi realizada.

As amostras utilizadas para a construção deste modelo PLS-DA foram as mesmas utilizadas nos modelos de PCA e PLS-DA realizado para verificar fraude. Para um total de 45 amostras (21 amostras de baixo teor de lactose e 24 amostras integrais), o modelo utilizou a gama espectral completa (3500 – 50 cm^{-1}). O conjunto de dados resultante obtido pela validação cruzada usando três LVs foi então dividido aleatoriamente, totalmente independente em relação à PLS-DA anteriormente empregada, em dois grupos; 30 amostras foram utilizadas em treinamento (14 amostras de baixo teor de lactose e 16 amostras integrais) e para avaliação, 15 amostras foram usadas (7 amostras com baixo teor de lactose e 8 amostras integrais). Os resultados do modelo PLS-DA são mostrados na Figura 12.

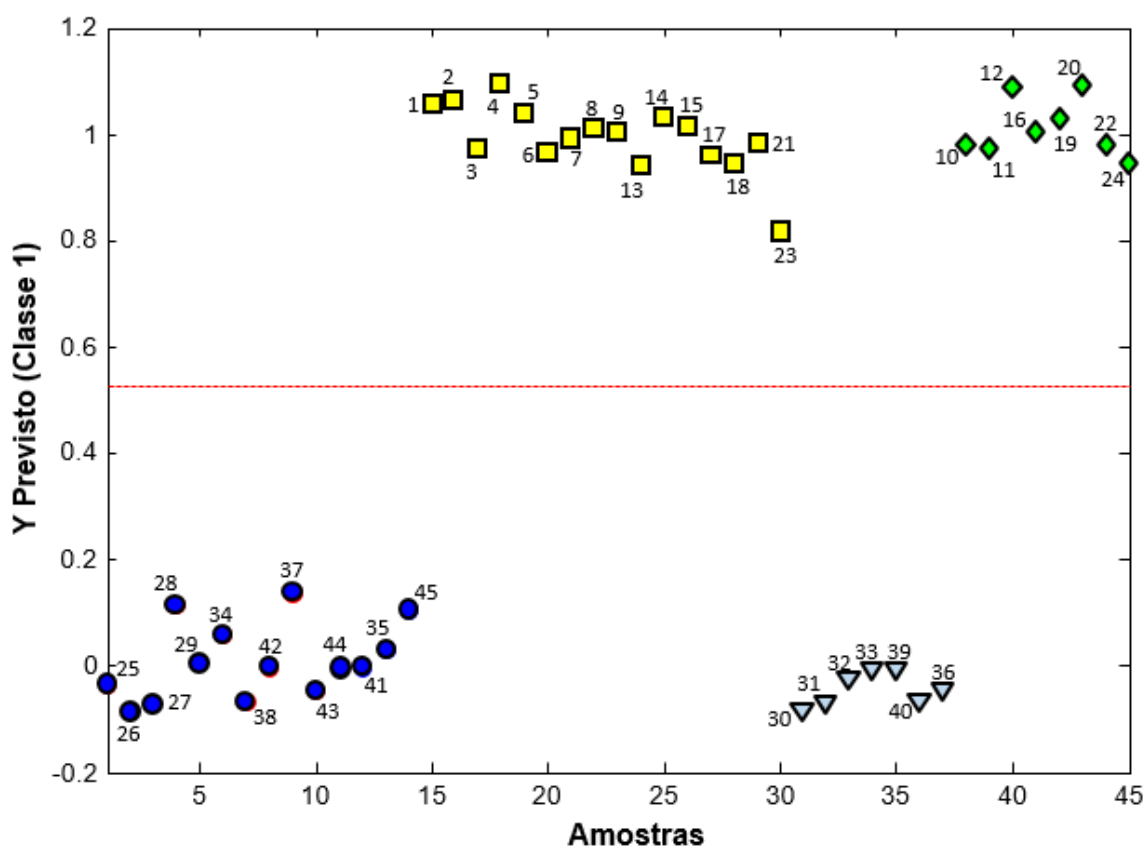


Figura 12 – Resultados do modelo PLS-DA para treinamento, mostrando as amostras de leite em pó integral (●) e amostras com baixo teor de lactose (■); Resultados para avaliação, mostrando as amostras de leite em pó integral (▼) e amostras com baixo teor de lactose (◆).

O valor limite utilizado na classificação foi de 0,533. As amostras de baixo teor de lactose e de leite em pó integral foram corretamente

classificadas em 100% dos casos, com uma especificidade de 100,0% e sensibilidade de 98,58%, de acordo com os dados da curva ROC (Figura 13).

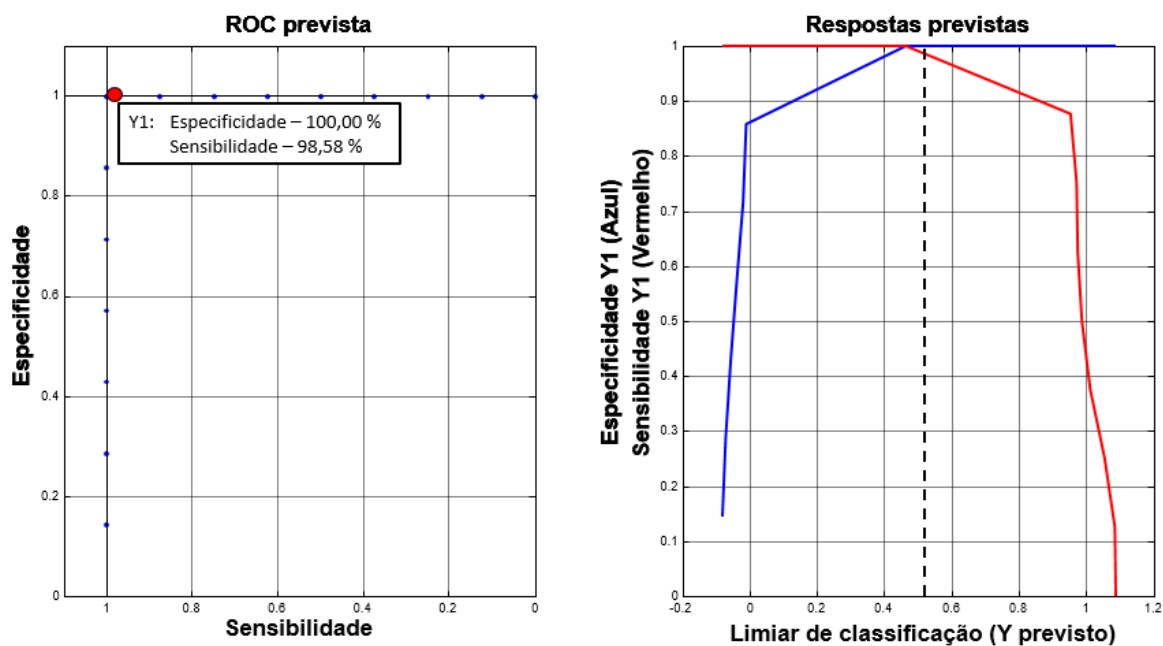


Figura 13 – Curva ROC, sensibilidade e especificidade do modelo PLS-DA obtido para classificação quanto a presença de lactose.

Os resultados para o conjunto de Avaliação foram bastante satisfatórios, o que mostra que ser possível a utilização de FT-Raman para determinar qualitativamente a presença de lactose no leite em pó.

6. CONCLUSÕES

A espectroscopia Raman é uma técnica com alto potencial de aplicação em alimentos devido as diversas vantagens analíticas em relação a demais técnicas, principalmente em relação ao tempo de análise e ao preparo das amostras, muitas vezes trabalhoso.

Este estudo demonstrou a utilidade da espectroscopia Raman para determinar atributos de qualidade em leite em pó, onde observou-se a simplicidade da aplicação da técnica, uma vez que nenhuma reação química está envolvida. Mesmo sendo uma técnica bastante sofisticada e com alto nível de exigência de conhecimento químico e físico para entendimento dos princípios e toda a base teórica, um operador pode realizar a análise e compreender a natureza dos espectros desde que tenha conhecimento sobre a composição química e estrutural das amostras.

O uso em conjunto com ferramentas quimiométricas possibilita explorar melhor os dados e concluir sobre o tipo de amostra analisada, pois em alguns casos não é possível verificar diferenças entre espectros somente por meio da análise visual. Além disso, a quimiometria pode fornecer exatamente quais bandas são responsáveis pela diferenciação e agrupamento das amostras, auxiliando na compreensão dos dados.

Os espectros Raman do leite em pó comum e do leite em pó adicionado de maltodextrina puderam ser diferenciados por interpretação visual: A presença de 10 % ou mais do adulterante causou mudanças visíveis no perfil espectral do leite em pó, principalmente nas regiões que continham modos vibracionais característicos de maltodextrina (940 e 856 cm^{-1} e bandas entre 610 e 400 cm^{-1}).

Quanto ao teor de lactose, foi observado nos espectros Raman o desaparecimento de bandas características da presença de lactose no leite em pó nas amostras previamente hidrolisadas (principalmente 1086 cm^{-1}), assim como o aparecimento de bandas indicativas da presença de glicose (525 e 424 cm^{-1}), evidenciando que a molécula de lactose foi realmente clivada.

Neste estudo, não foi possível observar uma separação nítida dos grupos de amostras com a PCA, sendo necessário a utilização da PLS-DA,

que forneceu resultados satisfatórios, permitindo classificar corretamente 100 % das amostras com especificidade de 100 % e sensibilidade maior 86 % nos dois modelos obtidos.

É importante frisar que o estudo foi qualitativo, aplicável apenas para diferenciar amostras quanto a presença ou ausência de uma substância ou de uma característica. Para identificar a quantidade exata de maltodextrina ou lactose no leite em pó seria necessário o desenvolvimento de outro modelo e utilização do método de referência para quantificação dos componentes.

O trabalho também demonstra a aplicação de diferentes tipos de análises para o mesmo conjunto de dados permitindo diferentes interpretações e conclusões sobre as amostras. Cada espectro foi utilizado em 2 modelos PLS-DA desenvolvidos e foi possível classificar corretamente cada um deles de acordo com cada condição avaliada. Os espectros poderão também ser utilizados em trabalhos futuros para determinar outros atributos, desde que utilizem os mesmos parâmetros, incluindo o alcance do espectro e resolução em cm^{-1} .

Os resultados obtidos neste estudo permitiram avaliar a espectroscopia Raman, em conjunto com a quimiometria, como uma técnica de detecção de fraude e discriminação de amostras de diferentes tipos de leite em pó, sendo capaz de produzir uma “impressão digital” química para amostras de leite em pó integral, leite em pó com baixo teor de lactose, leite em pó com adição de maltodextrina assim como a própria amostra de maltodextrina.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra o potencial de aplicação da técnica FT-Raman e ferramentas quimiométricas para aplicação e determinações qualitativas em leite em pó e obteve, além da presente dissertação, os seguintes resultados:

- Artigo do tipo “Short communication”, de título “FT-RAMAN AND CHEMOMETRIC TOOLS FOR RAPID DETERMINATION OF QUALITY PARAMETERS IN MILK POWDER: CLASSIFICATION OF SAMPLES FOR THE PRESENCE OF LACTOSE AND FRAUD DETECTION BY ADDITION OF MALTODEXTRIN”, submetido para a revista “Food Chemistry” em dez-2014 (Em processo de revisão).

Além dos resultados alcançados, o trabalho desenvolvido abre novas perspectivas e possibilidades em relação à utilização da técnica Raman em lácteos:

- Podem ser feitos estudos com outros derivados lácteos além do leite em pó para verificar se a técnica permite classificar as amostras adulteradas.
- Trabalhos podem ser desenvolvidos para avaliação de outros tipos de adulterantes.
- Novos experimentos podem utilizar outras ferramentas quimiométricas como a PLS para determinar a quantidade de maltodextrina e lactose nas amostras, comparando os resultados com os do método de referência.

Os estudos na área de lácteos envolvendo Raman permitem compreender melhor as aplicações da ferramenta, que apresenta como principal vantagem em relação aos métodos de referência a ausência de preparo das amostras e tempo curto de análise. Estes estudos podem atrair investimentos para o desenvolvimento da técnica como uma ferramenta analítica dentro da indústria, substituindo ou complementando as técnicas utilizadas, auxiliando na otimização de processos e contribuindo para a evolução da indústria de lácteos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSETH, N. K.; WOLD, J. P.; SEGTMAN, V. H. The potential spectroscopy for characterisation of the acid unsaturation of Salmon. *Analytica Chimica Acta*, v. 572, p. 85 – 92, 2006.

ALCÂNTARA, P. J. Espectroscopia molecular. Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, 2002.

ALMEIDA, M. R.; ALVES, R. S.; NASCIMBEM, L. B. L. R.; STEPHANI, R.; POPPI, R. J.; OLIVEIRA, L. F. C. Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 397, 2693–2701.

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

ALMEIDA, Mariana Ramos de. Avaliação da qualidade e variedade de leite em pó e leite condensado por espectroscopia Raman e análise multivariada. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010.

ALVAREZ-GUERRA, M.; BALLABIO, D.; AMIGO, J. M.; VIGURI, J. R.; BRO, R. A chemometric approach to the environmental problem of predicting toxicity in contaminated sediments *Journal of Chemometrics*. 2009, 24, 379–386.

ANGEL, S. M.; CARRABBA M.; COONEY T. F.; The utilization of diode lasers for Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Spectrosc*. 1995; (51): 1779-99.

BACELAR JÚNIOR, A. J.; KASHIWABARA, T. G. B.; NAKAOKA, V. Y. E. S. Intolerância a Lactose: Revisão de Literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*. Vol. 4, n. 4. p. 38 – 42. Set-Nov 2013.

BARANSKA, M.; SCHULZ, H.; BARANSKI, R.; NOTHNAGEL, T.; CHRISTENSEN, L. P. In Situ simultaneous analyses of polyacetylenes, carotenoids and polysaccharide in carrot roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 6565–6571.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*. 2003, 17, 166–173.

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

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento; Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade do leite em pó, Portaria nº 369. de 04 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa nº 14, 27 de Abril de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29/03/52. Brasília: Ministério da Agricultura, 1952.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 29. Regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais. *Diário Oficial da União*, Brasília, 13 jan. 1998.

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

CALL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 2, p. 575-586, 2010.

CARIC´, M.; AKKERMAN, J. C.; MILANOVIC´, S.; KENTISH, S. E.; TAMIME, A. Y. Technology of evaporators, membrane processing and dryers. In: TAMIME, A. Y. *Dairy powders and concentrated products*. 1 st ed. Chichester: Blackwell, 2009. cap. 3, p. 99-148.

CHENG, Y.; DONG, Y.; WU, J.; YANG, Y.; BAI, H.; ZHENG, H.; REN, D.; ZOU, Y.; LI, M. Screening melamine adulterant in milk powder with laser Raman spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010, 23, 199–202.

CHIEN-JU, S.; LUPOI, J. S.; SMITH, E. A. Raman spectroscopy measurements of glucose and xylose in hydrolysate: Role of corn stover pretreatment and enzyme composition. *Bioresouce Technology*. 2011, 102, 5169–5176.

CHRONAKIS, I.S. On the molecular characteristics, composition properties, and structural – functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Critical Reviews in Food Science*, v.38, n.7, p.599-637, 1998.

CUNHA, L. R.; SOARES, N. F. F. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, p. 23-26, 2007.

FACÃO, Margarida. *Interferômetro de Michelson: Princípios e Aplicações*. Universidade de Aveiro, Departamento de Física. Portugal, março de 1999.

FERRÃO, M. F.; MELLO, C.; BORIN, A.; MARETTO, D. A.; POPPI, R. J. LSSVM: A new chemometric tool for multivariate regression. Comparison of LS-SVM and PLS regression for determination of common adulterants in powdered milk by NIR spectroscopy. *Quimica Nova* 2007, 30, 852–859.

GELDER, J.; GUSSEM, K.; VANDENABEELE, P.; MOENS, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules; *Journal of Raman Spectroscopy*. 2007, 38, 1133–1147.

- KENNEDY, J.F.; KNILL, C.J.; TAYLOR, D.W. Maltodextrins. In: KEARSLEY, M.W.; DZIEDZIC, S.Z. Blackie Academic & Professional, 1995. p.65-82.
- KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN, K. Characterization of Irradiated Starches by Using FT-Raman and FTIR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50, 3912–3918.
- KNIPSCHILDT, M. E.; ANDERSEN, G. G. In: ROBINSON, R. K. *Modern dairy technology: Advances in milk processing*. London: Chapman & Hall, 1994. v. 1, p. 159-254.
- KOCIÁN, J. Lactose intolerance – minireview. *International Journal Biochemistry*, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.
- LONGO, G. Influência da adição de Lactase na produção de iogurtes. *Dissertação Mestrado*. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- LÓPEZ, M. I.; COLOMER, N.; RUISÁNCHEZ, I.; CALLAO, M. P. Validation of multivariate screening methodology. Case study: Detection of food fraud. *Analytica Chimica Acta*. 2014, 827, 28–33.
- LUZ, E. R. Predição de propriedades de gasolinas usando espectroscopia FTIR e regressão por mínimos quadrados parciais. *Dissertação Mestrado*. PUC-Rio. Rio de Janeiro, 2003.
- MCGOVERIN, C. M.; CLARCK, A. S. S.; HOLROYD, S. E.; GORDON, K. C. Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 673, 26–32.
- MOREIRA, K. M. M.; COELHO, L. H.; PERINI, C. C.; RAPACCI, M.; KARAM, L. B. Produção de Doce de leite com teor reduzido de lactose por β -Galactosidase. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambientais*. v. 7. n. 4. p. 375-382, out./dez. 2009.
- MORIOWAKI, C.; MATIOLI G. Influencia da β -galactosidase na tecnologia do leite e na má digestão da lactose. *Arquivos de ciência da saúde da UNIPAR*. Maringá- PR. 2000; 4(3):283-90.

- MOROS, J.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Evaluation of nutritional parameters in infant formulas and powdered milk by Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 593, 30–38.
- NIKONENKO, N. A.; BUSLOV, D. K.; SUSHKO, N. I.; ZHBANKOV, R. G. Spectroscopic manifestation of stretching vibrations of glycosidic linkage in polysaccharides. *Journal of Molecular Structure*. 2005, 752, 20–24.
- OLSEN, E. F.; RUKKE, E.O.; FLATTEN, A.; ISAKSSON, T. Quantitative Determination of Saturated-, Monounsaturated- and Polyunsaturated Fatty Acids in Pork Adipose Tissue with Non-Destructive Raman Spectroscopy. *Meat Science*, v. 76, p. 628-634, 2007.
- PROZYN. Prozyn Lactase. São Paulo, 2004. 4p. Informação técnica.
- RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new type of secondary radiation. *Nature*. 1928; 121:501-2.
- RIBEIRO, F. A. L. Análise de imagens nível de cinza utilizando métodos quimiométricas. 2007, 173p. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- RIBEIRO, J. S.; SALVA, T. J.; FERREIRA, M. M. C. Chemometric studies for quality control of processed Brazilian coffees using DRIFTS. *Journal of Food Quality*. v. 33, p. 212-227, 2010.
- ROBIN, J.P.; et al. A. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*, v. 51, p.389-, 1974.
- SALA O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho. 2.ed. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista; 2008. 224 p.
- SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 583-592, 2000.
- SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*. 1964, 36, 1627–1639.

SCHUCK, P. Spray drying of dairy products: state of the art. *Lait*, v. 82, p. 375 – 382, 2002.

SCHUCK, P. Understanding the factors affecting spray-dried dairy powder properties and behaviour. In: CORREDIG, M. Dairy-derived ingredients – Food and nutraceutical uses. Woodhead Publishing, 2009. p. 24-50.

SCHUCK, P.; JEANTET, R.; CARVALHO, A. F. Lactose crystallization and drying of whey. In: Notas de classe do curso em Ciência e Tecnologia de Laticínios ministrado na Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil, 2010.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 43, p. 13-25, 2007.

SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 556, 647, 2000.

SILVEIRA, F. L. Determinação da concentração de gorduras saturadas e insaturadas em alimentos comerciais por espectroscopia Raman dispersiva. Dissertação Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba. 2008.

SOCRATES G., 2004 “Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts - 3 edition” John Wiley & Sons.

VALSECHI, O. Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados. Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p.

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

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. Dairy science and technology. 2.ed. New York: Taylor and Francis Group, 2006. 782 p.

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

ZHANG, X.; CAO, Y.; YE, J. Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*. 2001, 72, 385-388.

ZHOU, Q.; SUN, S. Q.; YU, L.; XU, C. H.; NODA, I.; ZHAND, X. R. Sequential changes of main components in different kinds of milk powders using two-dimensional infrared correlation analysis. *Journal of Molecular Structure*. 2006, 799, 77–84.