

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Kamila de Sá Oliveira

Análise de Requeijão por Espectroscopia Raman e Ferramentas Quimiométricas

Juiz de Fora
2014

Kamila de Sá Oliveira

Análise de Requeijão por Espectroscopia Raman e Ferramentas Quimiométricas

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

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

Juiz de Fora
2014

AGRADECIMENTOS

- À minha família, em especial meus pais Wania e Oracy, por todo amor, esforço e apoio incondicional.
- Ao Eduardo, pelo amor, incentivo e compreensão durante todos esses anos.
- Ao prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira pela orientação, oportunidade de trabalho, confiança, paciência e amizade cultivada.
- À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Química, pela possibilidade de realização deste trabalho.
- À CAPES pela bolsa concedida.
- Ao Rodrigo Stephani pelas idéias e acompanhamento do trabalho.
- À Gemacom Tech pelo fornecimento das amostras.
- À amiga Mariana Ramos de Almeida pela enorme contribuição com relação à Quimiometria.
- Aos alunos de iniciação científica Carlos Eduardo e Layce pela ajuda na aquisição dos espectros Raman e pela amizade.
- Aos colegas do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM), obrigada pelo convívio e momentos agradáveis.
- A todos os professores do Departamento de Química que contribuíram para a minha formação profissional.
- A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Neste trabalho, a espectroscopia FT-Raman foi explorada como técnica rápida para avaliação de amostras de requeijão. A análise exploratória empregando os dados da espectroscopia Raman e a análise por componentes principais (PCA) permitiu a separação das amostras do laticínio em questão acordo com a sua classificação - tradicional ou *light*. A análise multivariada também foi empregada para classificar amostras de requeijão contendo amido. Para a construção dos modelos, foram utilizados dois tipos de amostras: comerciais (puras e adulteradas em laboratório) e manufaturadas em uma indústria da região, as quais, de forma geral, forneceram melhores resultados do que as primeiras. O modelo das componentes principais foi capaz de alocar em agrupamentos diferentes amostras com e sem redução de lipídios e também amostras com e sem amido. Na análise discriminante por mínimos quadrados parciais, todas as amostras foram classificadas corretamente quanto à presença ou ausência de amido, sendo necessário fazer seleção de variáveis em alguns dos modelos. A regressão multivariada foi feita através dos mínimos quadrados parciais e os resultados mostraram-se satisfatórios. Entretanto, os modelos construídos apresentaram altos erros de previsão para as amostras sem amido, o que pode indicar um resultado falso positivo de fraude. Por fim, é importante salientar que a espectroscopia Raman, em conjunto com quimiometria, pode ser usada como ferramenta para controle de qualidade em amostras da indústria de laticínios, e em particular para amostras de requeijão.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman. Quimiometria. Requeijão. Amido.

ABSTRACT

In this work, FT-Raman spectroscopy has been explored as a rapid technique to evaluate *requeijão* samples. Exploratory analysis using Raman data as well principal component analysis (PCA) has been able to separate the dairy samples according to their classifications: traditional or light food. Multivariate analysis has also been employed to classify *requeijão* samples which contain starch. To build the models two types of samples have been used: commercial (pure and adulterated in laboratory) and manufactured in local industries, which have given the best results when compared to the first samples. PCA model was able to allocate in groups different samples with and without lipid content reduction, as well samples with and without starch. In the partial least square discriminant analysis all samples were correctly classified in terms of starch content, being necessary the selection of other variables in some of the models. Multivariate regression has been done through partial least square method, and the results are satisfactory. However, the built models have shown high prevision errors for samples without starch, which can be indicative of a false positive result of fraud. At last, the results show clearly that Raman spectroscopy with chemometric models can be used as quality control tool for dairy products, in particular *requeijão*.

Keywords: Raman spectroscopy. Chemometrics. *Requeijão*. Starch.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Modelo esquemático de um glóbulo de gordura	19
FIGURA 2: Modelo esquemático de uma micela de caseína segundo WASLTRA <i>et al.</i> (2001), extraído de LEMOS, <i>et al.</i> (2010)	19
FIGURA 3: Estrutura química da lactose.....	20
FIGURA 4: Estados brasileiros (em vermelho) que apresentaram resultado positivo para soro em amostras de leite, segundo o MAPA. Os estados em branco ainda não tinham sido analisados (VARGAS, 2009).....	22
FIGURA 5: Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido (BELITZ <i>et al.</i> , 2009).	30
FIGURA 6: Estrutura dos monômeros de amilopectina e amilose (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010)	31
FIGURA 7: Mecanismo de hidrólise do amido em meio ácido formando glicose e dextrinas (BRIMHALL, 1944; CAREY, 2000; BRUICE, 2006).....	33
FIGURA 8: Esquema da reação de oxidação dos aldeídos presentes nas moléculas de açúcares através da redução do Cu^{2+} a Cu^{+} (CAREY, 2000).....	34
FIGURA 9: Representação esquemática da conformação espacial da amilose e do complexo de inclusão I_3^- - amido (SOUZA e NEVES, 2011).....	36
FIGURA 10: Ilustração esquemática dos espalhamentos Raman e Rayleigh.....	41
FIGURA 11: Organização dos dados multivariados em uma matriz a partir do espectro Raman.....	47
FIGURA 12: Representação gráfica do somatório dos produtos dos vetores escores e pesos	50
FIGURA 13: Representação de uma componente principal (PC) no caso de duas variáveis: (A) os pesos são os cossenos dos ângulos entre o vetor direção e a variável; (B) os escores são as projeções das amostras 1 a 6 na direção da PC. Os dados estão centrados na média	51
FIGURA 14: Decomposição das matrizes X e Y para o modelo PLS	52
FIGURA 15: Espectros FT-Raman do requeijão <i>light</i> (a) e tradicional (b) sem amido. 62	
FIGURA 16: Espectros Raman de amostras de requeijão comercial tradicional com amido (a), sem amido (b), requeijão comercial <i>light</i> com amido (c) e sem amido (d). . 64	

FIGURA 17: Destaque da região de 600 a 400 cm^{-1} dos espectros Raman de amostras de requeijão comercial tradicional com amido (a), sem amido (b), requeijão comercial <i>light</i> com amido (c) e sem amido (d).....	65
FIGURA 18: Gráfico de escores da PC1 <i>versus</i> PC2 dos dois tipos de requeijão sem amido: (▼) tradicional e (●) <i>light</i>	66
FIGURA 19: Gráfico de pesos da PC1 <i>versus</i> número de onda (cm^{-1}).	66
FIGURA 20: Espectros Raman de uma amostra de requeijão tradicional contida no agrupamento principal (a) e da amostra afastada das demais (b).	67
FIGURA 21: Gráfico de escores da PC1 <i>versus</i> PC2 dos quatro tipos de requeijão: (▼) tradicional sem amido, (●) tradicional com amido, (●) <i>light</i> sem amido e (◆) <i>light</i> com amido.	68
FIGURA 22: Gráfico de pesos da PC1 <i>versus</i> número de onda (cm^{-1}).	69
FIGURA 23: Gráfico de pesos da PC2 <i>versus</i> número de onda (cm^{-1}).	69
FIGURA 24: Espectro Raman do amido, usado neste estudo como adulterante.	70
FIGURA 25: Espectros Raman do requeijão comercial tradicional (a) e com adição de amido nas proporções de 5% (b), 10% (c) e 20% (d).	71
FIGURA 26: Espectros Raman do requeijão comercial <i>light</i> (a) e com adição de amido nas proporções de 5% (b), 10% (c) e 20% (d).	72
FIGURA 27: Espectros Raman do amido 2560 (a) e do amido 4051 (b).	73
FIGURA 28: Espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 2560 (b), com 6% de amido 2560 (c), com 10% de amido 2560 (d), e do próprio amido 2560 (e).	74
FIGURA 29: Destaque para a região de 600 a 400 cm^{-1} dos espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 2560 (b), com 6% de amido 2560 (c), com 10% de amido 2560 (d), e do próprio amido 2560 (e).	74
FIGURA 30: Espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 4051 (b), com 6% de amido 4051 (c), com 10% de amido 4051 (d), e do próprio amido 4051 (e).	75
FIGURA 31: Destaque para a região de 600 a 400 cm^{-1} dos espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 4051 (b), com 6% de amido 4051 (c), com 10% de amido 4051 (d), e do próprio amido 4051 (e).	75
FIGURA 32: Gráfico de escores da PC1 <i>versus</i> PC2 das amostras comerciais tradicionais sem amido (▼), com amido (★), das amostras comerciais <i>light</i> sem amido	

(■), com amido (★) e das amostras comerciais tradicionais (▼) e <i>light</i> (■) adulteradas em laboratório.....	77
FIGURA 33: Gráfico de pesos da PC1 <i>versus</i> número de onda (cm ⁻¹).....	78
FIGURA 34: Gráfico de pesos da PC2 <i>versus</i> número de onda (cm ⁻¹).....	78
FIGURA 35: Gráfico de escores da PC1 <i>versus</i> PC2 das amostras de requeijão comercial tradicional sem amido (▲), com amido (■) e adulteradas em laboratório (○).	79
FIGURA 36: Gráfico de pesos da PC1 <i>versus</i> número de onda (cm ⁻¹).....	79
FIGURA 37: Gráfico de escores da PC1 <i>versus</i> PC2 das amostras de requeijão comercial <i>light</i> sem amido (▲), com amido (■) e adulteradas em laboratório (○).....	80
FIGURA 38: Gráfico de pesos da PC1 <i>versus</i> número de onda (cm ⁻¹).....	80
FIGURA 39: Gráfico de scores da PC1 <i>versus</i> PC2 <i>versus</i> PC3 das amostras de requeijão padrão (▼), requeijão adulterado com amido 2560 (●), requeijão adulterado com amido 4051 (●), requeijão comercial tradicional sem (▲) e com amido (▲) e requeijão comercial <i>light</i> sem (★) e com amido (★).	81
FIGURA 40: Gráfico de pesos da primeira componente principal <i>versus</i> número de onda (cm ⁻¹).....	82
FIGURA 41: Gráfico de pesos da terceira componente principal <i>versus</i> número de onda (cm ⁻¹).	82
FIGURA 42: Valores previstos pelo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial tradicional sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ – calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).	84
FIGURA 43: Valores previstos pelo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial <i>light</i> sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ – calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).	85
FIGURA 44: Valores previstos pelo novo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial tradicional sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ – calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).....	86
FIGURA 45: Valores previstos pelo novo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial <i>light</i> sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ –	

calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).	87
FIGURA 46: Resultados previstos pelos modelos PLS-DA das amostras tradicionais (a) e <i>light</i> (b): amostras de requeijão padrão (▶ - calibração; ▷ - validação), requeijão adulterado com amido 2560 (● - calibração; ○ - validação), requeijão adulterado com amido 4051 (● - calibração; ○ - validação), requeijão comercial sem amido (◆ - calibração; ◇ - validação) e requeijão comercial com amido (■ - calibração; □ - validação).....	89
FIGURA 47: Valores previstos <i>versus</i> valores de referência para o modelo PLS das amostras tradicionais puras e adulteradas em laboratório; amostras de calibração (●) e amostras de validação (▼).	91
FIGURA 48: Valores previstos <i>versus</i> valores de referência para o modelo PLS das amostras <i>light</i> puras e adulteradas em laboratório; amostras de calibração (●) e amostras de validação (▼).	92
FIGURA 49: Gráfico dos pesos da LV 1 <i>versus</i> os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do amido das amostras tradicionais (a) e <i>light</i> (b).	93
FIGURA 50: Valores previstos <i>versus</i> valores de referência para os modelos PLS das amostras tradicionais (a) e <i>light</i> (b), construídos a partir das amostras de requeijão comerciais puras e das amostras manufaturadas na empresa Gemacom Tech; conjunto de calibração (●) e de validação (▼).	94
FIGURA 51: Gráfico dos pesos da LV 1 <i>versus</i> os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do amido das amostras tradicionais (a) e <i>light</i> (b).	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Planejamento para a adulteração com amido das amostras de requeijão comercial.	58
TABELA 2: Conjunto de amostras de requeijão preparadas na empresa Gemacom Tech.	59
TABELA 3: Distribuição das amostras para construção dos modelos PLS-DA e PLS.	61
TABELA 4: Principais números de onda (cm^{-1}) e suas respectivas atribuições tentativas baseadas na literatura.	63
TABELA 5: Números de onda (cm^{-1}) e tentativa de atribuição do espectro Raman do amido (ALMEIDA et al., 2010).	70
TABELA 6: Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras tradicionais adulteradas e não adulteradas.	84
TABELA 7: Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras <i>light</i> adulteradas e não adulteradas.	85
TABELA 8: Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras tradicionais adulteradas e não adulteradas.	87
TABELA 9: Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras <i>light</i> adulteradas e não adulteradas.	88
TABELA 10: Resultados obtidos dos modelos PLS-DA para as amostras tradicionais e <i>light</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HCA – Análise Hierárquica de Agrupamentos

HMF – Hidroximetilfurfural

IN – Instrução Normativa

FAO – Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

KNN – K-vizinhos mais próximos

LDA – Análise Discriminante Linear

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIR – Espectroscopia no Infravermelho Médio

NIR – Espectroscopia no Infravermelho Próximo

PC – Componente Principal

PCA – Análise de Componentes Principais

PLS – Mínimos Quadrados Parciais

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

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

RMSECV - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada

RMSEP - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão

SIMCA – Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes

UHT – Ultra Alta Temperatura

VL – Variável Latente

ν - estiramento

δ - deformação

τ - torção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A MATÉRIA-PRIMA: LEITE.....	17
1.2 QUEIJOS PROCESSADOS – HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS.....	22
1.3 REQUEIJÃO.....	24
1.3.1 Características gerais.....	24
1.3.2 Aspectos da legislação.....	25
1.3.3 Tecnologia de fabricação.....	25
1.3.3.1 Obtenção da massa.....	26
1.3.3.2 Adição de ingredientes.....	27
1.3.3.3 Processo de fusão.....	28
1.3.3.4 Embalagem, resfriamento e estocagem.....	29
1.4 USO DE AMIDO EM REQUEIJÕES.....	30
1.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	33
1.5.1 Método de Lane-Eynon.....	33
1.5.2 Identificação de amidos pelo teste do Lugol.....	35
2 OBJETIVOS	37
3 ESPECTROSCOPIA RAMAN	38
4 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	46
4.1 Pré-processamentos.....	47
4.2 Análise de Componentes Principais (PCA).....	48
4.3 Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	52
4.4 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	55
5 MATERIAIS E MÉTODOS	57
5.1 Amostras.....	57
5.1.1 Análise qualitativa dos tipos de requeijão.....	57
5.1.2 Análise qualitativa e quantitativa do requeijão com adição de amido.....	57
5.2 Aquisição dos Espectros Raman.....	59
5.3 Tratamento dos dados.....	60
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62

6.1 Caracterização das amostras de requeijão comercial através dos espectros Raman.....	62
6.2 Análise Exploratória das Amostras de Requeijão Comercial.....	65
6.3 Análise Espectroscópica das Amostras de Requeijão Adulteradas.....	69
6.4 Análise Exploratória das Amostras de Requeijão Comerciais e Adulteradas.....	76
6.5 Classificação das Amostras de Requeijão Comerciais e Adulteradas.....	83
6.6 Análise Quantitativa das Amostras de Requeijão Comerciais e Adulteradas.....	90
7 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXOS.....	110

1 INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade dos alimentos vem desde épocas imemoriais. Registros históricos relatam a existência do Código de Massu na China do século XIII a.C., o qual estabelecia sanções aos comerciantes que adulteravam seus produtos. Durante a Idade Média, na França, aquele que vendesse manteiga com pedra para aumentar o peso ou adicionasse água no leite era punido com castigos físicos (FILOMENO, 1991). No entanto, somente no século XIX foram estabelecidas as primeiras leis de caráter alimentar e estabelecidos os primeiros órgãos de fiscalização. A partir desse momento, a química dos alimentos começou a ganhar credibilidade e se iniciou o planejamento dos primeiros métodos de análise para avaliação das características dos alimentos (INMETRO, 2014).

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

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

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

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

O leite e seus derivados são alimentos consumidos por todas as camadas da sociedade. Devido à grande demanda e às variações de preços que ocorrem com as flutuações sazonais, esses produtos são alvos de adulterações econômicas, que são praticadas com a adição de ingredientes não permitidos para reduzir os custos do produto final. Como exemplo, tem-se a aplicação de amido em produtos à base de queijos processados. Muitos estudos têm sido feitos na área, uma vez que propriedades físicas, como as reológicas e a microestrutura, são influenciadas pelas interações entre o amido e as proteínas do leite; no entanto, o principal benefício da adição de amido aos produtos lácteos é a redução de custos (ZACARCHENCO, VAN DENDER E SPADOTI, 2012).

Atualmente, a Instrução Normativa 68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento regulamenta os métodos oficiais para análises físico-químicas de produtos lácteos. Esta norma contempla a análise qualitativa do amido pelo teste do Lugol, ao passo que a análise quantitativa é feita de acordo com o método de Lane-Eynon. Essa última técnica se baseia na clarificação e filtração da amostra para separação dos açúcares simples dos complexos; posteriormente, é feita a digestão ácida do resíduo sólido gerado, o qual sofre nova clarificação e filtração. O segundo filtrado é submetido então à titulação com reagente de Fehling (BRASIL, 2006).

Entretanto, o método quantitativo descrito na IN 68/2006 apresenta alguns problemas. Além de demandar o uso de muitos reagentes, requerer mão-de-obra qualificada e gerar resíduos, há indícios de perdas de amido durante a primeira filtração, conforme discutido por Valladão (2012). Dessa forma, a falta de exatidão e precisão do método prejudica o monitoramento por parte dos organismos fiscalizadores, impossibilitando a obtenção de resultados confiáveis em relação à utilização de ingredientes regulamentados, como o amido.

1.1 A MATÉRIA-PRIMA: LEITE

O consumo de leite de origem animal pelos humanos vem desde épocas remotas, e aconteceu com a domesticação do gado que ocorreu na Revolução Neolítica. O primeiro registro histórico é uma peça datada de 3100 a.C. encontrada no Oriente Médio, conhecida como Friso dos Ordenhadores, a qual retrata a ordenha do gado e a

filtragem do leite (SIMIONATO, 2008). No Brasil, a primeira alusão ao leite é feita em 1552 pelos Jesuítas, numa carta enviada a Portugal.

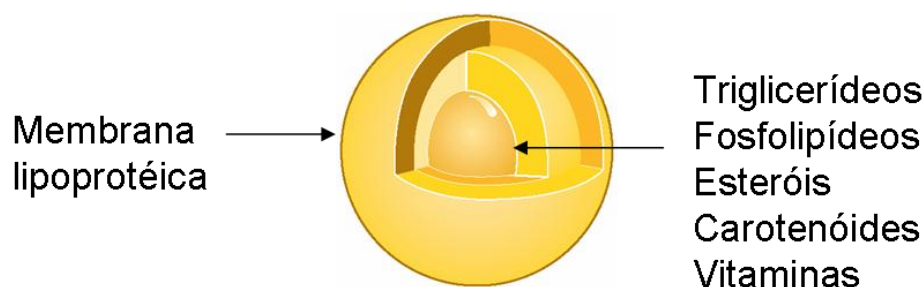
Segundo as Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), atualmente 10% da população mundial vive da atividade leiteira. Esses dados mostram a importância econômica e social do leite. O Brasil ocupa hoje a quinta posição entre os principais países produtores de leite, sendo Minas Gerais o estado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

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

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

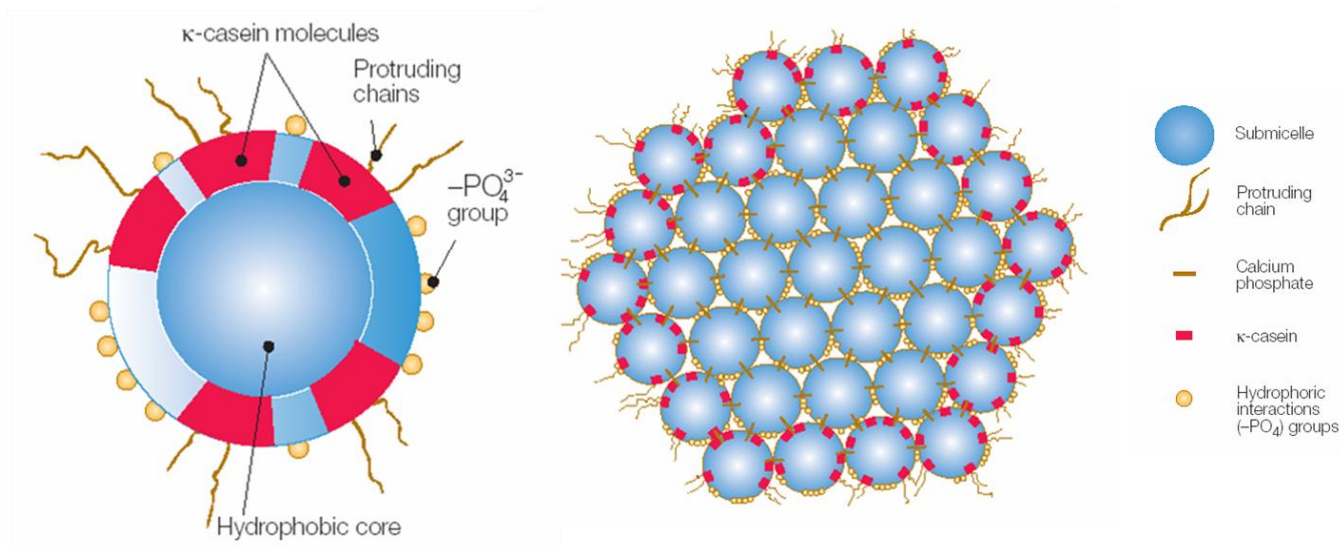
A gordura é a componente mais variável do leite, sintetizada a partir dos ácidos graxos voláteis que são originados na fermentação ruminal de forrageiras, é encontrada no leite na forma de glóbulos esféricos, como ilustrado na Figura 1, com diâmetro médio de 3-4 μm . A gordura é composta por uma mistura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

Figura 1 – Modelo esquemático de um glóbulo de gordura.



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

Figura 2 - Modelo esquemático de uma micela de caseína segundo.



Fonte: WASLTRA *et al.* (2001), extraído de LEMOS, *et al.* (2010).

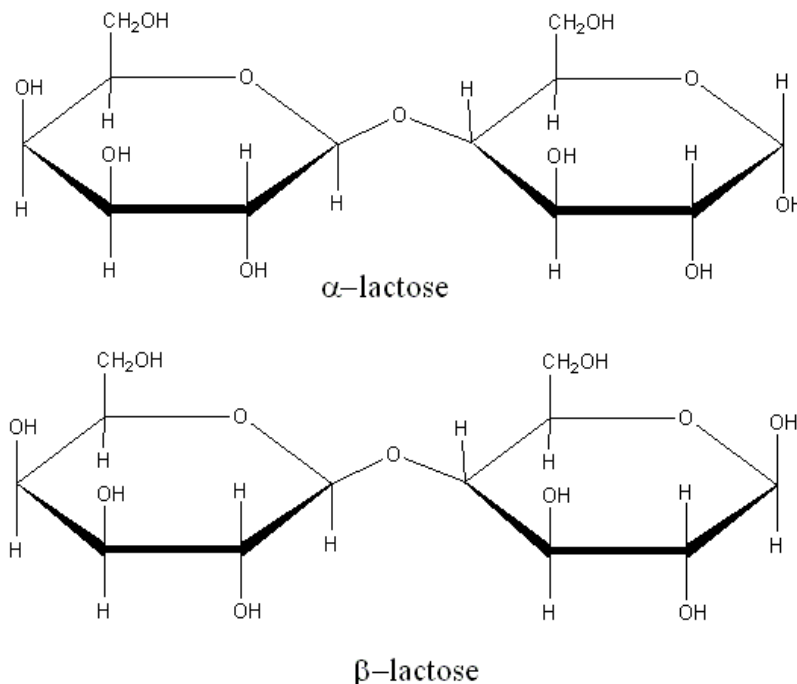
A κ -caseína, localizada na superfície das micelas, atua como estabilizadora da micela, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao Ca^{2+} . A κ -caseína é caracterizada como uma glicoproteína, por apresentar cerca de 6 a 10% de carboidrato em sua molécula - esses carboidratos são o ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico),

galactose e o N-acetilgalactosamina (SGARBIERI, 2005). A região de natureza apolar da κ -caseína orienta-se para o interior da micela, na qual interage com as caseínas α e β por meio de grupos hidrofóbicos. A região que contém o carboidrato, em virtude de sua polaridade, interage com a água, evitando a aglomeração da micela. A importância industrial da caseína está na fabricação de queijos.

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

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

Figura 3 - Estrutura química da lactose.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

O carbono anomérico da unidade de glicose está disponível para oxidação e, portanto, a lactose é um dissacarídeo redutor. Tratamentos térmicos ocasionam reações

de escurecimento a partir da lactose, especificamente a reação de Maillard, com diminuição do valor nutricional (SILVA, 1997). A lactose apresenta sabor pouco adocicado e baixa solubilidade em água, sua solubilidade média é de 20g/100g de água a 20°C, enquanto que, a solubilidade da glicose é de 107g/100g de água.

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

O leite e seus derivados são alvos de adulterações econômicas devido à grande demanda e as variações de preços que ocorrem com as flutuações sazonais; 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 ao leite. Um levantamento feito pelo MAPA, em 2003, mostrou que de 17 estados brasileiros analisados, 16 deram resultados positivos para soro em leite (VARGAS, 2009), como apresentado na Figura 4.

Constatou-se, porém, o inconveniente de uma separação da proteína e da gordura no produto.

Em 1991, Gerber e Stettler conseguiram solubilizar o paracaseinato de cálcio da matéria prima por meio de calor, usando citrato de sódio como agente fundente, obtendo assim o que foi chamado de queijo fundido ou processado. O sal sódico sob agitação constante e calor promove uma troca interna de íons, transformando o paracaseinato de cálcio, de hidratação instável, em paracaseinato de sódio, cuja solução é coloidal e estável (MAURER-ROTHMANN e SCHEURER, 2005; GARRUTI *et al.*, 2003).

O princípio de fabricação deste tipo de queijo consiste em fundir os dois elementos principais do queijo, isto é, a proteína e a gordura. A fusão só ocorre de maneira adequada quando a matéria-prima é submetida ao calor e à agitação mecânica em tachos especiais. Além disso, há necessidade do emprego de produtos emulsificantes conhecidos como sais fundentes para evitar a separação de gordura e de água da mistura, o que iria acontecer normalmente após o aquecimento, se esses aditivos não fossem acrescentados. O objetivo do uso de sais fundentes consiste, portanto, em promover a emulsificação da mistura (gordura, proteína e água), obtendo-se, dessa forma, um produto final homogêneo e estável (LEE e KLOSTERMEYER, 2001; VAN DENDER, 2006).

Do ponto de vista legal, os queijos processados ou fundidos devem cumprir os critérios estabelecidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Processado ou Fundido, Processado Pasteurizado e Processado ou Fundido UHT ou UAT (BRASIL, 1997b). De acordo com este regulamento, entende-se por queijo processado *o produto obtido por trituração, mistura, fusão e emulsão por meio de calor e agentes emulsificantes de uma ou mais variedades de queijos, com ou sem adição de outros produtos lácteos e/ou sólidos de origem láctea e/ou especiarias, condimentos ou outras substâncias alimentícias nas quais o queijo constitui o ingrediente lácteo utilizado como matéria prima preponderante na base láctea. O produto definido se denominará “Queijo Processado” ou “Queijo Fundido” ou “Queijo Processado Pasteurizado”*.

A apresentação dos queijos fundidos é bastante variada – podem ser comercializados em blocos para fatiar, em porções embaladas individualmente para lanche, fatiados, em copos ou em bisnagas. Por outro lado, há inúmeras possibilidades de variação do sabor dos queijos fundidos, seja através da combinação de diferentes

queijos para compor a mistura, ou ainda mediante utilização de condimentos ou outros ingredientes alimentares de sabor característico (VAN DENDER, 2006).

1.3 REQUEIJÃO

1.3.1 Características gerais

Segundo a classificação genérica de queijos, o requeijão pertence ao grupo de queijos denominados processados pasteurizados e é o produto que melhor representa essa classe no Brasil (OLIVEIRA, 1986).

O requeijão surgiu como subproduto feito a partir de leite desnatado, considerado descarte das regiões produtoras de creme para a fabricação de manteiga (MUNCK e CAMPOS, 1984). A produção se restringia ao uso local, mas com a evolução dos meios de transporte, de acondicionamento e de tecnologia, o requeijão tornou-se expressivo no mercado de queijos, ocupando a preferência de consumo de muitos brasileiros. Atualmente, são muitas as tecnologias empregadas na fabricação de requeijão, assim como no formato dos produtos, embalagens, consistência e coadjuvantes tecnológicos (RODRIGUES, 2006).

Pequenas fábricas semi-artesaniais que dispunham de uma desnatadeira separavam o creme e o leite desnatado resultante era deixado coagular espontaneamente para obter a massa que era então transformada em requeijão (MUNK e CAMPOS, 1984; OLIVEIRA, 1986).

Porém, com o nome de requeijão, existem no mercado queijos com diferentes teores de umidade e, conseqüentemente, com variações na consistência, havendo desde produtos com elevada cremosidade e espalhabilidade, como o requeijão cremoso, até produtos bastante firmes e até mesmo fatiáveis, como o requeijão do norte. O mesmo acontece em relação ao teor de gordura – pode-se chegar quase a um creme fermentado, até requeijões praticamente sem gordura (OLIVEIRA, 1986; CAVALCANTE, 1991).

O requeijão é normalmente consumido logo após a fabricação e deve apresentar sabor ligeiramente ácido, agradável ao paladar, aroma característico de produto fermentado por micro-organismos lácticos e massa homogênea, com uma cremosidade ou untuosidade típica. Um requeijão mais consistente, a exemplo do requeijão do norte, pode fugir ligeiramente desta última característica, apresentando-se com massa mais

desidratada, de alguma forma lembrando as características de um queijo de massa filada recém-fabricado (OLIVEIRA, 1986).

1.3.2 Aspectos da legislação

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requeisón (BRASIL, 1997c), o requeijão é definido como *produto obtido por fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionado de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butter oil. O produto poderá ser adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias. A denominação requeijão está reservada ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea.*

Até 2005, em nosso país, produtos com gordura vegetal e/ou amido não podiam ser chamados de requeijão e eram registrados como especialidade láctea, reques, compostos, alimento ou produto à base de requeijão. Tal fato ocorria porque, segundo a Portaria 359/1997, a denominação requeijão estava reservada ao produto no qual a base láctea não apresentasse gordura vegetal e/ou proteína de origem não láctea. No final de 2005, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal suspendeu a aprovação de especialidades lácteas e deu um prazo para que as indústrias fizessem as alterações de rotulagem e solicitação de novo número de registro de seus produtos. O produto que constava como especialidade láctea passou a ser denominado requeijão, complementado com o nome do condimento ou substância alimentícia, devendo seguir o regulamento técnico do requeijão. (Gordura vegetal e amido são considerados substâncias alimentícias.) O nome do produto fica, por exemplo, “REQUEIJÃO COM GORDURA VEGETAL E AMIDO”, devendo o nome vir completo e em destaque.

1.3.3 Tecnologia de fabricação

As principais etapas do processo de fabricação dos requeijões em geral consistem na coagulação do leite, retirada do soro, lavagem da massa, adição de cloreto de sódio e sais fundentes, adição da gordura, processo de fusão, envase da mistura

líquida a quente, resfriamento do produto embalado e, finalmente, estocagem em temperatura de refrigeração (RODRIGUES, 2006).

O leite é a matéria-prima principal, sendo utilizada na fabricação da massa de queijo. Tradicionalmente, o leite utilizado para a fabricação do requeijão é desnatado, prática esta proveniente da época em que a manteiga era o derivado mais valorizado do leite (OLIVEIRA, 1986). Atualmente, pode-se utilizar vários tipos de leite, incluindo o desnatado, o reconstituído, o integral ou até mesmo o integral homogeneizado, onde os glóbulos de gordura são fraturados, impedindo que os mesmos sejam perdidos na etapa de dessoragem da massa (VAN DENDER, 2006).

A qualidade do leite empregado exerce forte influência no processamento e nas características básicas desses produtos no que se refere aos atributos de aparência, consistência, textura, sabor, aroma, bem como sua vida útil, sendo praticamente impossível obter um produto de boa qualidade a partir de uma matéria-prima de baixa qualidade (VALLE, 1981).

1.3.3.1 Obtenção da massa

Existem várias formas de processamento para a produção de massa destinada à fabricação de requeijão cremoso; dentre elas encontram-se a coagulação enzimática, a adição de fermentos lácteos e a acidificação direta (com ácido láctico ou ácido acético) do leite aquecido (MORENO, VIALTA e VALLE, 2002; VAN DENDER, 2006).

A coagulação do leite por bactérias lácticas não tem sido empregada em função do longo período gasto pelo processo. Assim, para a fabricação de requeijão, tem-se preferido a obtenção da massa pelo processo de acidificação direta ou por meio de coagulação enzimática (SOBRAL, 2007).

Na obtenção da massa pelo processo de acidificação direta a quente do leite, o pH no momento da coagulação das proteínas é maior do que 4,6 (ponto isoelétrico da caseína), o que se deve à ação conjunta do calor e do ácido, aumentando a taxa de colisão entre as partículas e desidratando parcialmente as proteínas do leite. Deste modo, a redução de pH é suficiente para acelerar a precipitação, ao mesmo tempo que fornece um coágulo mais macio (ORDÓNEZ *et al.*, 2006).

O aumento do ponto isoelétrico das frações de caseína com o aquecimento do leite é presumivelmente devido à associação das frações de caseína com as proteínas do

soro. Com isso, a acidificação do leite aquecido resulta em um precipitado de caseína e proteínas desnaturadas do soro com a formação de flocos ou grãos, ao invés do gel homogêneo formado pela fermentação láctica ou pela ação da renina. Os requeijões produzidos por este processo possuem como característica uma massa elástica com grande formação de fios (SCOTT, ROBINSON e WILBEY, 2002).

A acidificação direta a quente, ao contrário do uso dos coalhos enzimáticos e fermento láctico, reduz o custo, o tempo de produção do queijo, elimina a manutenção de culturas lácticas, proporciona maior uniformidade na produção, bem como melhores características de conservação do produto. Possibilita ainda automatizar o processo de fabricação, convertendo-o em operação contínua, o que representa uma grande vantagem (FERNANDES e MARTINS, 1980; VAN DENDER, 2006).

No processo de fabricação em que a massa é obtida por meio da coagulação enzimática, emprega-se coalho rico em enzimas proteolíticas de origem animal (ECK, 1987). A coagulação das micelas devido à ação proteolítica do coalho é dividida em duas fases. Na primeira, a enzima renina (quimosina) age sobre a ligação peptídica Phe 105-Met 106 da fração κ -caseína. A segunda fase caracteriza-se por uma agregação do fragmento hidrofóbico, denominada paracaseína, a qual, na presença de cálcio solúvel dá origem a um coágulo brilhante, elástico e hidratado – o paracaseinato de cálcio (VAN DENDER, 2006).

O requeijão elaborado a partir deste tipo de massa não apresenta a elasticidade tradicionalmente presente nos requeijões elaborados a partir de massa exclusivamente láctica. Este fato é devido à presença de cálcio na massa enzimática, que influencia na formação de uma estrutura rígida e menos elástica quando comparado com massas lácticas (sem cálcio) (RODRIGUES, 2006).

1.3.3.2 Adição de ingredientes

Sais fundentes

Os sais fundentes ou emulsificantes são utilizados com o objetivo de remover o cálcio do sistema proteico, peptizar, hidratar, solubilizar e dispersar a proteína, estabilizar a emulsão, controlar o pH, contribuir para a formação de uma estrutura apropriada após o resfriamento e, em alguns casos, atuar como agente bacteriostático. A

principal característica de um sal fundente é a capacidade de solubilizar a caseína, com a conseqüente formação de um sol homogêneo (DIMITRELI e THOMAREIS, 2004; FERNANDES, *et al.*, 1985).

Segundo Van Dender (2006), três categorias de sais fundentes são empregadas na fabricação de requeijões: citratos, monofosfatos e polifosfatos. Cada grupo confere ao produto final características básicas de firmeza, espalhabilidade, maciez e poder tamponante.

O tipo e a quantidade de sal emulsificante que deve ser adicionado à massa é determinado em função de vários fatores, como o pH, grau de maturação e estrutura do queijo usado como matéria-prima, grau de cremificação e características de textura desejadas para o produto final (ZEHREN e NUSBAUM, 1992).

Gordura

Entre as fontes de gordura utilizadas no processo de fabricação dos requeijões estão o creme de leite, a manteiga ou o *butter-oil* (VAN DENDER, 2006). A quantidade de gordura a ser adicionada depende do teor de gordura que se deseja no extrato seco do produto final e das porcentagens de gordura e sólidos totais na massa inicial (FERNANDES, 1981). Além de realçar o sabor do produto, a gordura exerce um papel importante na sua consistência, tornando-o mais atraente para o consumo e melhorando suas características organolépticas (VALLE, 1981).

1.3.3.3 Processo de fusão

Durante o processo, a massa de queijo constituída principalmente de proteína e gordura é dispersa, homogeneizada e convertida em uma emulsão. O processo de fusão consiste no tratamento térmico ao qual a mistura aquecida é submetida, utilizando tanto vapor direto como indireto, sob agitação constante (VAN DENDER, 2006). A fusão propriamente dita é realizada através do aquecimento e agitação vigorosa da massa, utilizando uma temperatura mínima de 80°C durante 15 segundos, ou qualquer outra combinação tempo/temperatura equivalente (BRASIL, 1997c).

A temperatura de fusão é um fator muito importante, pois o calor influencia a peptização da caseína e a estrutura do produto final. A cremificação é consideravelmente maior quando a temperatura é aumentada de 70°C para até cerca de 90°C (FERNANDES, 1981). De acordo com Valle (1981), recomenda-se o uso de temperaturas superiores a 75°C, para assegurar a pasteurização do produto. O tempo necessário para a fusão depende do equipamento utilizado, do tipo de matéria-prima, das propriedades desejadas no produto final e do tipo e quantidade de sal emulsificante usado (ZEHREN e NUSBAUM, 1992). Segundo Fernandes (1981), a temperatura também influencia o tempo de fusão, uma vez que o tratamento térmico é definido pelo binômio tempo/temperatura.

O processo possui algumas fases principais. A primeira consiste na peptização, que é a troca de íons cálcio bivalentes da paracaseína por íons sódio monovalentes, promovida pelos sais fundentes. Nessa fase, ocorre uma dissolução das pontes de cálcio do agregado de caseína e a estrutura passará do estado gel para o estado sol. Na segunda fase, denominada de fase de hidratação, ocorre a cremificação, ou seja, uma mudança na consistência do produto pela absorção de água. A última fase, de reestruturação, ocorre durante o resfriamento e após a estocagem, havendo uma estabilização do produto por meio de reorientação das moléculas proteicas (VAN DENDER, 2006).

1.3.3.4 Embalagem, resfriamento e estocagem

Quando ainda quente, o requeijão é fluido e nessas condições é então envasado (OLIVEIRA, 1986). Dentre os materiais empregados no envase do produto destacam-se os copos de vidro, os termoformados de polipropileno e os tubos de polietileno (ALVES *et al.*, 2007).

O resfriamento do requeijão deve ser feito o mais rápido possível e, normalmente, é realizado abaixo de 10°C, embora a utilização destas temperaturas possa promover a formação de cristais (VAN DENDER, 2006).

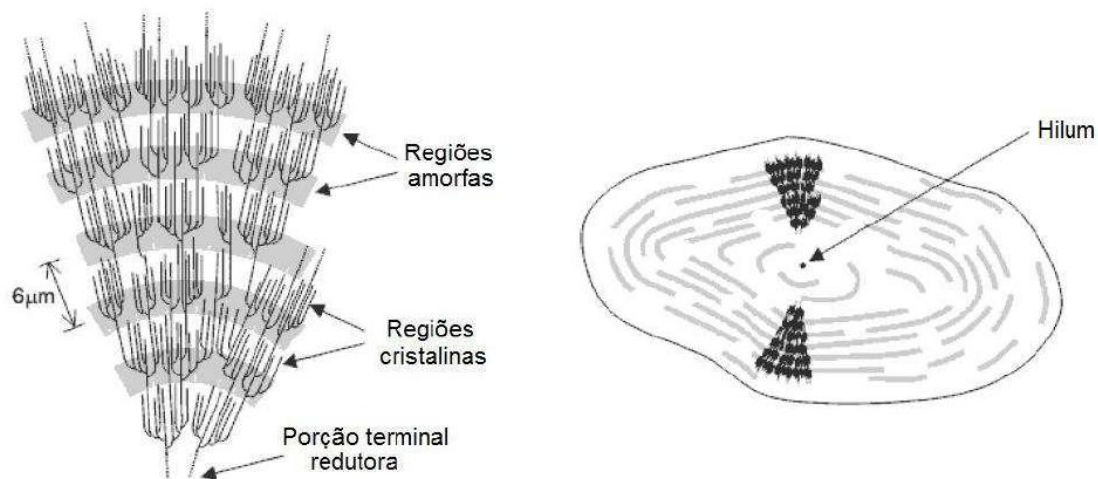
Com relação ao armazenamento do produto, este requer refrigeração da mesma forma que a maioria dos queijos processados. Entretanto, a sua conservação é bem maior quando mantido hermeticamente fechado. Depois de aberto, a sua conservação é limitada a cerca de uma semana, mesmo sob refrigeração adequada (RAPACCI, 1997).

1.4 USO DE AMIDO EM REQUEIJÕES

Diferentes amidos podem ser empregados por fabricantes de requeijão, através de um balanceamento na combinação de ingredientes, para melhorar o rendimento sem perder a característica do produto (MARCHIORI, 2005).

As características químicas, físicas e os aspectos nutricionais do amido destacam-no dos demais carboidratos. Ele é a reserva alimentar predominante das plantas, fornecendo 70 a 80% das calorias de consumo humano no mundo, sendo a matéria-prima alimentar mais abundante e barata disponível (BOBBIO e BOBBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010). É encontrado na natureza em partículas características, denominadas grânulos, os quais são constituídos de moléculas de amilose e amilopectina, dispostas de modo radial, apresentando regiões cristalinas e não cristalinas em camadas alternadas (Figura 5) (BOBBIO e BOBBIO, 2003; DENARDIN e SILVA, 2009; FENNEMA, 2010).

Figura 5 - Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido.



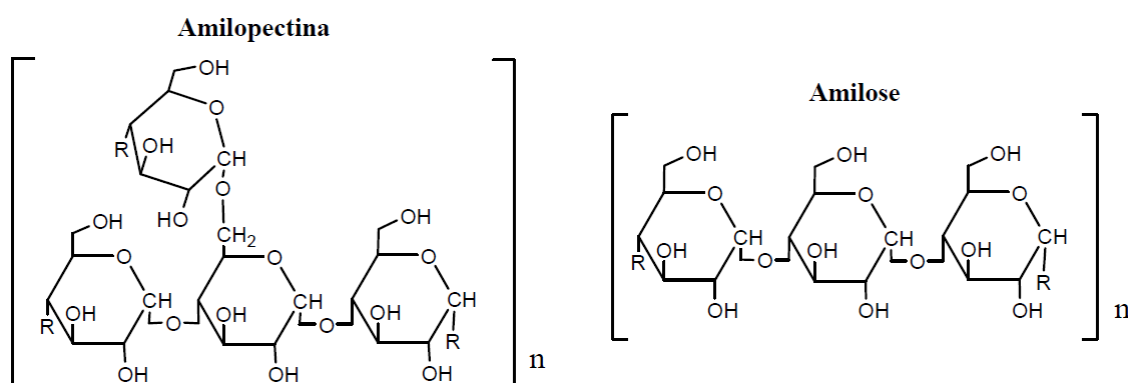
Fonte: BELITZ et al., 2009.

A amilose é essencialmente uma cadeia linear de α -D-glicoses unidas em ligações glicosídicas α -1,4, contendo de 350 a 1000 unidades, apresentando estrutura helicoidal, α -hélice, formada por ligações de hidrogênio entre os radicais hidroxila das moléculas de glicose (Figura 6). Por serem helicoidais e com o interior hidrofóbico, as cadeias de amilose são capazes de formar complexos de inclusão com porções

hidrofóbicas lineares de moléculas que se ajustam ao tubo, como os ácidos graxos e o íon triiodeto (I_3^-) (RIBEIRO e SERVALLI, 2004; DENARDIN e SILVA, 2009; FENNEMA, 2010).

A amilopectina apresenta uma estrutura ramificada, constituída por cadeias lineares de 20 a 25 unidades. Essas cadeias estão unidas entre si através de ligações glicosídicas α -1,6 (Figura 6). A amilopectina é constituída por 10 a 500 mil unidades de glicose e apresentam uma estrutura esférica (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

Figura 6 - Estrutura dos monômeros de amilopectina e amilose.



Fonte: RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010.

A proporção entre amilose/amilopectina varia com a espécie, grau de maturação e manipulação genética dos vegetais. Dependendo do teor de amilose, o amido pode ser classificado em amido comum, ceroso ou baixo teor de amilose (*waxy*) e com alto teor de amilose (*high-amylose*) e apresenta aplicações distintas na indústria. O amido de milho normal caracteriza-se pela formação de um gel consistente e é bastante utilizado em sopas desidratadas e molhos que requerem viscosidade a quente. Para produtos que necessitam de armazenamento sob refrigeração é indicado o amido ceroso, que apresenta maior estabilidade a baixas temperaturas devido ao fato de praticamente não possuir amilose. Os géis feitos com esses amidos são fracos e altamente viscosos, enquanto os amidos com alto teor de amilose gelificam e formam filmes com facilidade (BELITZ, et al., 2009; WEBER et al., 2009).

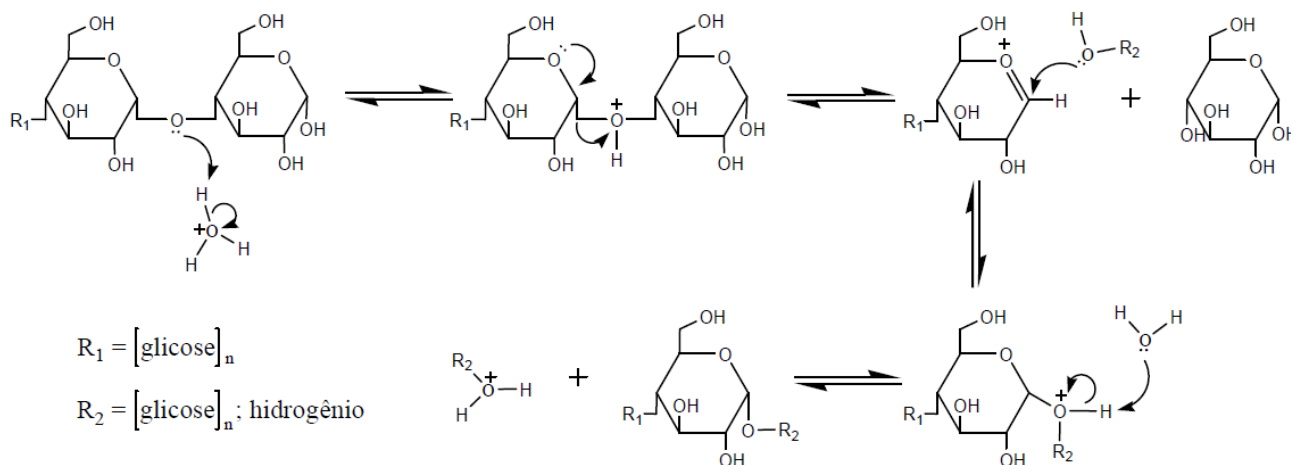
Os amidos comerciais são obtidos a partir de sementes de cereais, principalmente de milho, trigo, arroz, tubérculos e raízes, em especial batata e mandioca (WEBER et al., 2009; FENNEMA, 2010).

Os amidos modificados são produtos obtidos a partir do amido com a finalidade de atender às necessidades específicas da indústria de alimentos, como melhorar as características das massas e dos géis devido ao aumento de resistência ao calor, ao cisalhamento e à acidez (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; BELITZ et al., 2009).

As modificações podem ser de um só tipo, porém, com frequência, os amidos são preparados pela combinação de dois, três e, algumas vezes, quatro processos, que podem ser químicos ou físicos. As modificações químicas compreendem as reações de hidrólise ácida, com formação de dextrinas, oxidação, esterificação, eterificação e formação de ligações cruzadas. As formações físicas compreendem a alteração da estrutura cristalina pelo processo de pré-gelatinização, que causa ruptura da ordem molecular no interior dos grânulos, evidenciado pelo inchaço irreversível do grânulo, perda da birrefringência e da cristalinidade. Este processo produz uma goma viscosa, constituída de uma fase contínua de amilose solubilizada e/ou moléculas de amilopectina, e uma fase descontínua de grânulos remanescentes (EARLY, 2000; BOBBIO e BOBBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; BELITZ et al., 2009; FENNEMA, 2010).

As moléculas de amido, assim como todas as moléculas de polissacarídeos, despolimerizadas por ácido a quente, devido à presença de carbono anomérico. A hidrólise química dos polissacarídeos é influenciada por vários fatores, tais como pH, temperatura, configuração anomérica (α é mais susceptível que β), forma e tamanho do anel. De uma forma geral, a sensibilidade à hidrólise diminui com o aumento das associações intermoleculares. As ligações glicosídicas são mais facilmente quebradas em meios ácidos do que em meios alcalinos. A hidrólise das ligações glicosídicas ocorre de forma aleatória para produzir, inicialmente, fragmentos muito grandes e, no final do processo, moléculas menores, como as dextrinas e monômeros de glicose (Figura 7). Na formação de dextrinas, pode ocorrer o fenômeno de reversão, em que as cadeias de ligações glicosídicas lineares (α -1,4) são transformadas em cadeias menores e ramificadas, cuja ligação α -1,6 predomina. A extensão dessas modificações varia de acordo com o tipo de amido utilizado e o ambiente químico da reação (BRIMHALL, 1944; THOMPSON e WOLFROM, 1958; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

Figura 7 - Mecanismo de hidrólise do amido em meio ácido formando glicose e dextrinas.



Fonte: BRIMHALL, 1944; CAREY, 2000; BRUICE, 2006.

1.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

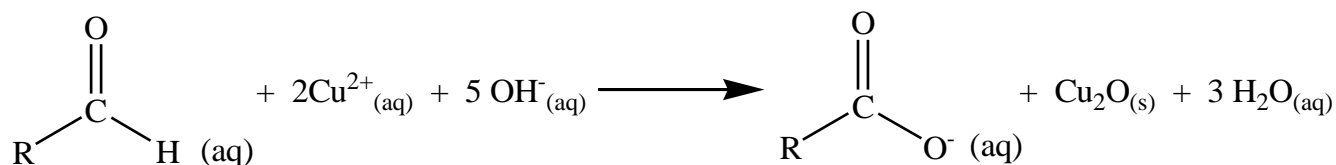
1.5.1 Método de Lane-Eynon

Aldoses são açúcares redutores, desde que possuam um aldeído funcional de cadeia aberta. Em soluções alcalinas, as cetoses se convertem em aldoses por meio de um intermediário enólico, fenômeno conhecido como tautomeria. De uma forma geral, qualquer carboidrato que contenha uma função hemiacetal livre é um açúcar redutor (CAREY, 2000; BOBBIO e BOBBIO, 2003).

Em soluções alcalinas, os açúcares redutores são capazes de reduzir sais de cobre, prata, bismuto e mercúrio a compostos de valência menores ou ao estado metálico (CECCHI, 2003; BELITZ et al., 2009).

A solução de sulfato de cobre II complexada com tartarato em meio básico (Reagente de Fehling) é capaz de oxidar aldeídos alifáticos ao seu ácido carboxílico correspondente. A formação de um precipitado vermelho tijolo de óxido de cobre II ($\text{Cu}_2\text{O}_{(s)}$) é indicativo de teste positivo para aldeídos (Figura 8). O químico alemão H. V. Fehling foi o primeiro pesquisador a indicar as proporções adequadas dos reagentes (CAREY, 2000; DEMIATE et al., 2002).

Figura 8 - Esquema da reação de oxidação dos aldeídos presentes nas moléculas de açúcares através da redução do Cu^{2+} a Cu^+ .



Fonte: CAREY, 2000.

Usualmente, as reações coloridas baseadas nas propriedades redutoras dos açúcares não são específicas e necessitam de remoção de substâncias interferentes para posterior identificação e quantificação. Essas substâncias podem ser pigmentos solúveis, substâncias opticamente ativas, constituintes fenólicos, lipídios e proteínas. Os interferentes podem ser separados por descoloração, tratamento com resina trocadora de íons ou clarificação por meio de agentes clarificantes, que possuem a função de precipitar as substâncias que podem interferir na medida física ou química dos açúcares. Para os lácteos, utilizam-se as soluções de ferrocianeto de potássio e sulfato de zinco, em que a presença de metais pesados precipitam substâncias coloidais, como, por exemplo, as proteínas, ou o precipitado formado na reação com metais pesados, como o ferricianeto de zinco, combina e co-precipita as proteínas (CAREY, 200; CECCHI, 2003).

O método de Lane-Eynon, descrito na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2006), baseia-se na adição a um erlenmeyer da solução de carboidratos a ser quantificada até próximo ao ponto de viragem teórico e 5 mL de cada uma das soluções de Fehling A (solução de cobre) e Fehling B (solução alcalina de tartarato). Submete-se o conjunto ao aquecimento até atingir o ponto de ebulição, adiciona-se a solução de azul de metileno a 2% e titula-se vagarosamente a solução de carboidratos até que se observe o ponto de viragem. O azul de metileno é um indicador de oxirredução que muda de azul para incolor; porém, como existe o precipitado de óxido de cobre, a cor observada na viragem é de azul para vermelho-tijolo. Existem dois fatores importantes a serem seguidos nesse método para maior exatidão dos resultados (DEMIATE et al., 2002; CECCHI, 2003; AOAC, 2006; BRASIL, 2006):

1. A solução deve ficar constantemente em ebulição durante a titulação, porque o Cu_2O formado pode ser novamente oxidado pelo O_2 do ar, mudando a cor da solução novamente para azul;

2. A titulação deve levar no máximo 3 minutos, porque pode haver caramelização dos açúcares com o aquecimento prolongado.

O aquecimento de soluções de carboidratos a temperaturas próximas ao ponto de ebulição da água, em particular da sacarose e de açúcares redutores, em ausência de compostos nitrogenados, promove um complexo grupo de reações envolvidas na caramelização. A reação é facilitada por pequenas quantidades de ácidos e alguns sais, Ainda que não envolva a reação entre carboidratos e proteínas, a caramelização é similar à reação de Maillard. O produto final, o caramelo, contém uma mistura complexa de compostos poliméricos formados a partir de compostos cíclicos insaturados e de alto peso molecular. O aquecimento causa desidratação da molécula de açúcar, por um mecanismo que envolve enolização e β -eliminação, com a introdução de ligações duplas ou a formação de anéis anidros. São formados então os intermediários furanos e hidroximetilfurfural (HMF). Os anéis insaturados podem condensar, formando polímeros de coloração marrom, as melanoidinas e os caramelos. As frações de baixo peso molecular presentes na mistura caramelizada contêm, além do açúcar que não reagiu, ácido pirúvico e aldeídos (BOBBIO e BOBBIO, 2003; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004; FENNEMA, 2010).

1.5.2 Identificação de amidos pelo teste do Lugol

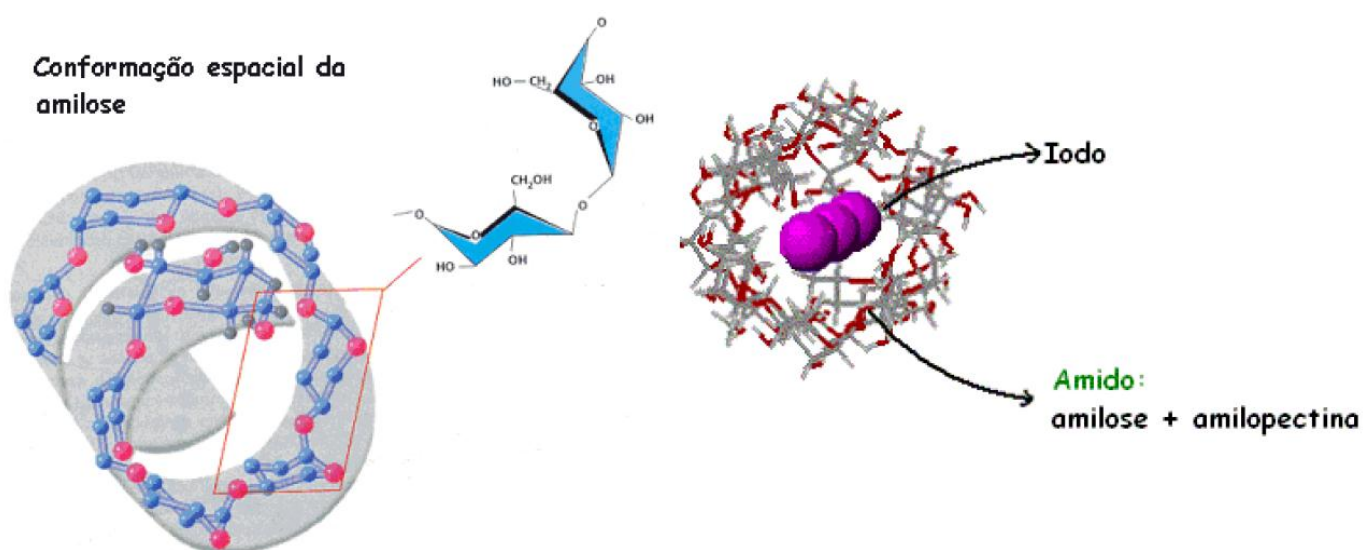
O teste do Lugol foi elaborado pela primeira vez em 1829, pelo pesquisador francês J. G. A. Lugol, e era composto por uma solução elementar de iodo e iodeto de potássio em água (NEUZIL, 2002).

Rigorosamente, a solução de Lugol é composta por 10 g de iodeto de potássio e 5 g de iodo, dissolvidos em 100 mL de água destilada. O iodeto de potássio é adicionado para aumentar a solubilidade do iodo, através da formação do ânion I_3^- (CAREY, 2000; MORITA e ASSUMPÇÃO, 2007).

Atualmente, a solução de Lugol é utilizada como antisséptico, desinfetante, reagente de rotina para detecção de amido, quantificação de amilose, em exames de colposcopia, coloração de GRAM, investigações de neoplasias bucais, entre outros (KNUTSON, 1999; NEUZIL, 2002, SIMÕES, 2009; GONDIM et al., 2011; WANG et al., 2011).

O complexo de inclusão azul formado pelo iodo com a amilose (Figura 9) é normalmente utilizado para mensurar o conteúdo de amilose nos amidos por espectrofotometria e/ou potenciometria. A diferenciação entre amido comum, ceroso e com alto teor de amilose é de grande importância na indústria alimentícia, devido às suas várias e específicas aplicações. Nos métodos espectrofotométricos, existem variações em termos de absorvidade e comprimento de onda em função do comprimento de onda máximo de absorção utilizado ($\lambda_{máx}$), dependendo do grau de polimerização e da estrutura das moléculas de amilose, que determina a composição do complexo da cadeia de iodo com as hélices da amilose (KNUTSON, 1999; LIU et al., 2009; WEBER et al., 2009).

Figura 9 - Representação esquemática da conformação espacial da amilose e do complexo de inclusão I_3^- - amido.



Fonte: SOUZA e NEVES, 2011.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a caracterização dos principais componentes do requeijão utilizando a espectroscopia Raman. Além disso, ele também tem o objetivo de utilizar a espectroscopia Raman juntamente com ferramentas quimiométricas para analisar qualitativamente e quantitativamente a presença de amido em amostras de requeijão de diferentes procedências, contribuindo com os órgãos de fiscalização para avaliação da autenticidade e da qualidade de amostras do referido laticínio encontradas no mercado nacional.

3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Várias técnicas permitem obter informações sobre estrutura molecular, níveis de energia e ligações químicas, como, por exemplo, a ressonância magnética nuclear, difração de elétrons, nêutrons e raios X, efeito Mössbauer, espectroscopia Raman e no infravermelho, etc. A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um de seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Os espectros fornecem as transições (diferença de energia entre os níveis) e, a partir dessas medidas, determinam-se as posições relativas dos níveis energéticos. No caso de moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende dos tipos de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Normalmente, as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibrações na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas (em moléculas com átomos leves, também no infravermelho distante). As diferentes regiões espectrais exigem espectrômetros com elementos dispersivos e detectores apropriados. Assim, cada tipo de espectroscopia tem uma tecnologia específica.

Desconsiderando a energia devida aos movimentos translacionais, a energia total de uma molécula será a soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional: $E_{total} = E_{ele} + E_{vib} + E_{rot}$, sendo que $E_{ele} > E_{vib} > E_{rot}$. Isto permite, numa primeira aproximação, que estes níveis possam ser considerados separadamente, isto é, cada tipo de espectro possa ser estudado independentemente das interações entre eles. Na realidade, como $E_{ele} > E_{vib} > E_{rot}$, as transições eletrônicas envolvem uma estrutura vibracional e rotacional que pode ou não estar resolvida. As transições vibracionais envolvem níveis vibracionais e rotacionais e somente os espectros rotacionais seriam puros, no sentido de que as transições são somente entre níveis rotacionais de um mesmo estado vibracional e eletrônico.

A separação entre os movimentos dos núcleos e dos elétrons, conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer, resulta da grande diferença entre as massas dos núcleos e dos elétrons. Dessa forma, sendo o movimento dos elétrons muito mais rápido do que dos núcleos, pode-se considerar que a posição dos núcleos é fixa durante a transição eletrônica. Do mesmo modo, durante o movimento dos núcleos, pode-se considerar uma distribuição média dos elétrons. A interação da radiação

eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos origina o espectro vibracional no infravermelho ou o espalhamento Raman.

A espectroscopia Raman, técnica empregada neste trabalho, baseia-se no espalhamento inelástico da radiação eletromagnética monocromática que interage com as moléculas. As frequências vibracionais são determinadas pelas diferenças entre as frequências das radiações espalhadas e da radiação incidente. Considerando os mesmos estados vibracionais, as frequências Raman seriam as mesmas do espectro no infravermelho.

Embora os mesmos valores de frequências vibracionais sejam obtidos através dos espectros Raman ou no infravermelho, diferentes mecanismos envolvem os dois fenômenos, o que pode dar origem a diferenças entre os respectivos espectros. Para um modo vibracional ser ativo no infravermelho, é necessário haver variação do momento dipolar durante essa vibração. A atividade no Raman difere no sentido de que o momento de dipolo considerado é o induzido pela radiação eletromagnética, isto é, deve haver variação da polarizabilidade da molécula durante a vibração. Uma vez que os fenômenos físicos envolvidos são diferentes e, conseqüentemente as regras de seleção também, a espectroscopia no infravermelho e a espectroscopia Raman são chamadas de técnicas complementares.

Se uma molécula é irradiada por uma luz monocromática de frequência ν (laser), então, por causa da polarização eletrônica induzida na molécula por este feixe, a luz de frequência ν (espalhamento Rayleigh), bem como a luz de frequência $\nu \pm \nu_i$ (espalhamento Raman) é espalhada quando ν_i representa uma frequência vibracional da molécula. Assim, espectros Raman são apresentados como deslocamentos da frequência incidente na região do ultravioleta, visível ou IV próximo.

A origem do espectro Raman pode ser explicada por uma teoria clássica elementar. Considerando uma onda de luz de frequência ν com um campo elétrico de intensidade E . Como E varia com a frequência ν , pode-se escrever:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (3.1)$$

onde E_0 é a amplitude e t é o tempo. O campo elétrico oscilante induz na molécula um momento de dipolo oscilante P (equação 3.2), cuja frequência será a mesma do campo elétrico externo:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (3.2)$$

Neste caso, α é a constante de proporcionalidade e é chamada de *polarizabilidade*, que pode ser entendida como uma medida da facilidade de deformação da nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico. Levando em conta a vibração molecular, os movimentos nucleares irão induzir flutuações na polarizabilidade com frequências que correspondem aos vários modos normais de vibração, ou seja, se a molécula vibra com frequência ν_i , o deslocamento do núcleo para uma molécula diatômica pode ser descrito de acordo com a equação 3.3:

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_i t \quad (3.3)$$

onde q_0 é a amplitude vibracional. A polarizabilidade pode ser considerada como uma função linear de q e expandida numa série:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q + \dots \quad (3.4)$$

Neste caso, α_0 é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0$ é a taxa de variação de α com relação a q , na posição de equilíbrio. Combinando-se as equações (3.2), (3.3) e (3.4), tem-se:

$$\begin{aligned} P &= \alpha E_0 \cos 2\pi\nu t = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu t + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \cos 2\pi\nu t \cos 2\pi\nu_i t \\ &= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu t \\ &\quad + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \{\cos[2\pi(\nu + \nu_i)t] + \cos[2\pi(\nu - \nu_i)t]\} \end{aligned} \quad (3.5)$$

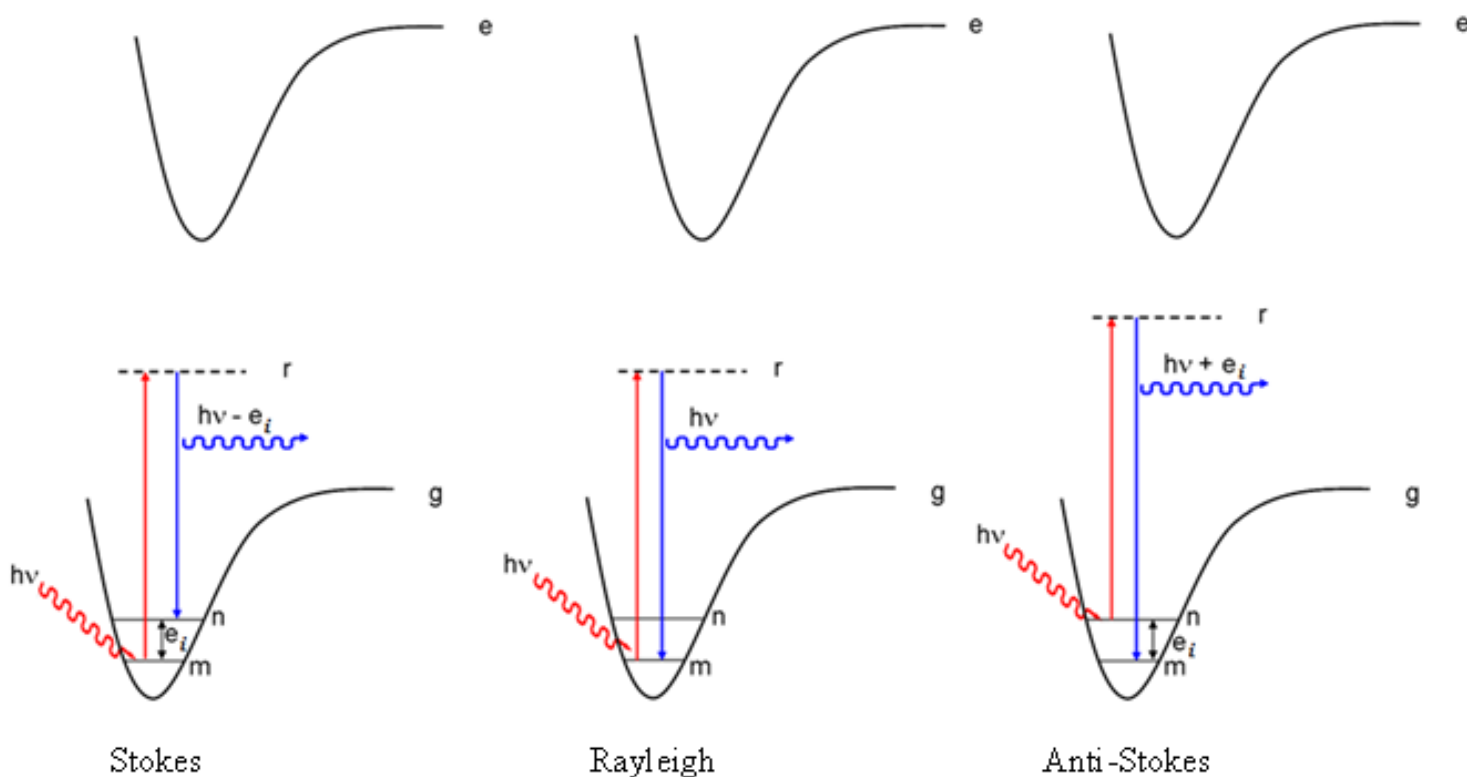
De acordo com a previsão clássica, o primeiro termo contém somente a frequência da radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico), após a interação do fóton com a molécula, esta volta ao mesmo nível de energia inicial e o fóton é espalhado sem modificação de frequência. Somente no segundo termo aparece o espalhamento Raman, com frequência $\nu + \nu_i$ (espalhamento anti-Stokes) ou $\nu - \nu_i$ (espalhamento Stokes). No primeiro caso, o fóton encontra a molécula já num estado excitado e, após a interação a molécula, decai para o estado fundamental - essa diferença de energia é cedida ao fóton que é espalhado com energia $h\nu + e_i$. No espalhamento Stokes de frequência $\nu - \nu_i$, a molécula no estado fundamental sofre colisão com o fóton de energia $h\nu$, passa para um estado intermediário (virtual), pois

não corresponde a nenhum estado estacionário da molécula, o estado virtual é um autoestado do sistema molécula-radiação. Em seguida a molécula decai para um estado vibracional excitado de energia e_i ; o fóton espalhado $h\nu - e_i$, tem energia menor que o incidente. Os espalhamentos elástico e inelástico (Stokes e anti-Stokes) podem ser representados esquematicamente de acordo com a Figura 10.

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

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left(\frac{\nu + \nu_i}{\nu - \nu_i} \right) \exp\left(-\frac{e_i}{kT}\right) \quad (3.6)$$

Figura 10 - Ilustração esquemática dos espalhamentos Raman e Rayleigh.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

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

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \quad (3.7)$$

Combinando a equação anterior com a equação 3.4, obtém-se:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_{mn} \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau \quad (3.8)$$

Para ser observado o efeito de espalhamento Raman, é necessário que pelo menos uma das integrais da equação 3.8 seja diferente de zero. O primeiro termo da equação é igual a zero, devido a ortogonalidade entre ψ_m e ψ_n . Para o segundo termo ser diferente de zero, é necessário atender a duas condições. A primeira é:

$$\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q} \right)_0 \neq 0 \quad (3.9)$$

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

A segunda condição é:

$$\int \psi_m q \psi_n d\tau \neq 0 \quad (3.10)$$

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

O espectro Raman mostra um conjunto de transições vibracionais permitidas de uma molécula. O número de bandas, as frequências e a intensidade relativa dessas bandas estão associados com o modo normal de vibração da ligação química. A

atribuição das frequências vibracionais observadas no espectro Raman pode ser feita com o uso da teoria de grupo juntamente com o cálculo de coordenadas normais, sendo possível obter informações das constantes de força das ligações químicas, previsão do número de modos vibracionais ativos e a correta atribuição das frequências vibracionais (OLIVEIRA, 2009).

A intensidade das bandas Raman depende da probabilidade de transição, ou seja, do quadrado do tensor de polarizabilidade e da quarta potência da frequência da radiação espalhada:

$$I_{m,n} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4}\right) I_0 v^4 \sum_i \sum_j |\alpha_{i,j}|^2 \quad (3.11)$$

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

$$\alpha_{m,n} = \frac{1}{h} \sum_r \left[\frac{\mu_{nr}\mu_{rm}}{\nu_{rm} - \nu_0} + \frac{\mu_{nr}\mu_{rm}}{\nu_{rn} + \nu_0} \right] \quad (3.12)$$

Na equação acima, h é a constante de Planck, r descreve um conjunto de estados que pertence à molécula não perturbada, ν_{rm} e ν_{rn} correspondem às frequências dos estados denotados por m e n , ν_0 é a frequência da radiação incidente e μ_{nr} e μ_{rm} são os momentos de transição. O numerador do primeiro termo entre colchetes corresponde à passagem do estado inicial m para um estado intermediário r , e deste para o estado final n .

Quando a energia do fóton de excitação é próximo da energia de uma transição permitida, o denominador do primeiro termo diminui e o termo aumenta, causando grande aumento de $\alpha_{m,n}$ e, como consequência, produz uma intensificação do sinal Raman – efeito conhecido como Raman ressonante. Para o entendimento dessas

mudanças, torna-se necessário a utilização do formalismo vibrônico para o efeito Raman introduzido por A. C. Albrecht.

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

$$\alpha_{m,n} = A + B + C + D \quad (3.13)$$

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

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

Para obtenção dos espectros Raman, foram utilizadas até 1950 lâmpadas de vapor de mercúrio (435 nm) para obtenção da radiação excitante. No entanto, essas lâmpadas emitiam uma série de linhas indesejadas, fazendo-se necessário o uso de filtros para isolar as linhas de interesse, entretanto, vários compostos absorviam essas linhas ou eram decompostos fotoquimicamente, impedindo a obtenção dos espectros Raman de alguns compostos. Os espectros eram registrados em chapas fotográficas (SALA, 2008).

Os avanços na instrumentação facilitaram a tarefa de obter um espectro Raman, como exemplo, tem-se as novas fontes de radiação monocromática - no início eram lâmpadas de mercúrio, mas hoje são empregados lasers. Esses apresentam atributos que fazem com que sejam excelentes fontes de excitação, entre os quais podemos destacar monocromaticidade, direcionalidade e coerência. Novos tipos de detectores, como os detectores multicanal (CCD), o uso de microscópio óptico acoplado ao espectrômetro, a utilização de fibra óptica para medidas remotas, o desenvolvimento da espectroscopia FT-Raman, as técnicas de imagem e a miniaturização da instrumentação tem tornado a espectroscopia Raman uma técnica cada vez mais popular para a caracterização rápida e

fácil de sólidos, líquidos e no controle de qualidade, ganhando assim novos campos de pesquisa e espaço no setor industrial.

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

4 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

Devido à crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química e à grande quantidade de dados gerados por elas, técnicas de tratamentos de dados mais complexas do ponto de vista matemático e estatístico tornaram-se necessárias (BRUNS e FAIGLE, 1985).

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras. Há muito tempo, a estatística univariada vem sendo aplicada a problemas químicos, mas a sua utilização tornou-se limitada. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade e dando origem a uma nova disciplina, chamada *Quimiometria* (SENA et al., 2000).

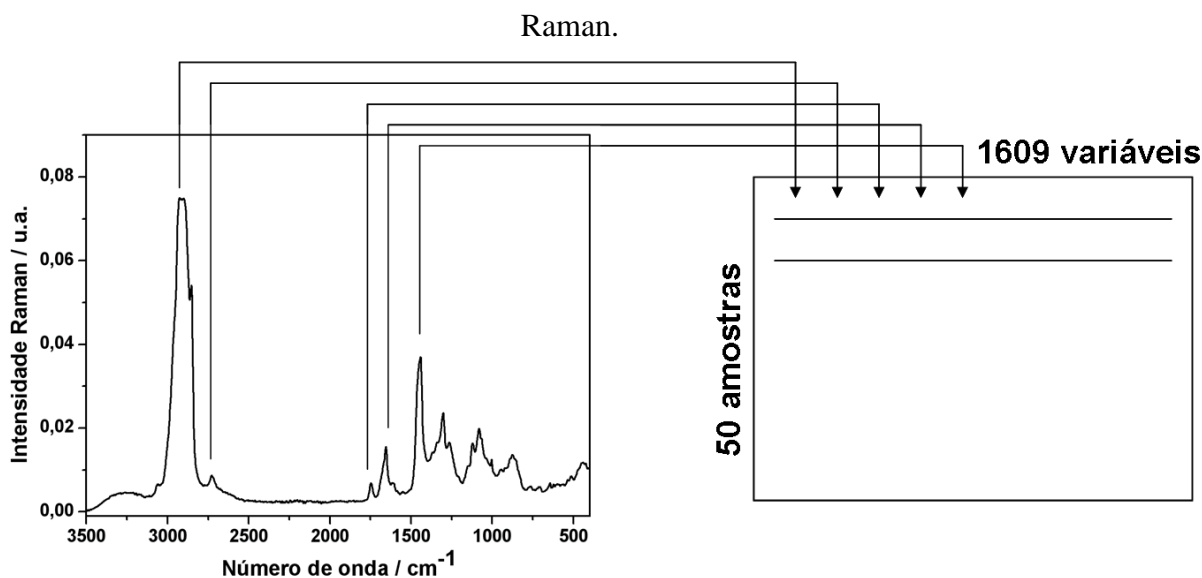
Para a análise de dados os métodos multivariados são os mais adequados, porque permitem um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas, nem a existência de alta correlação nos dados. Também é possível a identificação de problemas eventuais com linha base ou interferentes nas amostras (FERREIRA et al., 1999).

A Quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico. Dentre as diversas subáreas da Quimiometria pode-se destacar o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas. No reconhecimento de padrões, a partir de uma vasta gama de informações (medidas químicas ou espectrais, por exemplo) sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras (objetos) que são similares entre si e, assim, detectar tendências nos dados. Na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade (concentração, por exemplo) (SOUZA e POPPI, 2012).

As notações de álgebra linear também se aplicam à quimiometria. Um vetor é uma matriz que tem somente uma linha ou uma coluna, sendo chamado de vetor linha ou coluna, respectivamente. Os vetores são designados por letras minúsculas em negrito (**y**). As matrizes são designadas por letras maiúsculas em negrito (**X**). Os elementos das matrizes, dos vetores, ou ainda constantes como coeficientes de regressão são

representados por letras sem negrito (x) (KALIVAS, 2005). Dessa forma, os dados em calibração multivariada devem ser dispostos em forma de matriz, onde as linhas da matriz referem-se às amostras e as colunas referem-se às variáveis (intensidades Raman em diferentes números de onda) (BRERETON, 2000; MILLER, e MILLER, 2000). Durante uma análise química, uma grande quantidade de dados pode ser obtida; como exemplo, um espectro Raman coletado para 50 amostras na faixa de 3500 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} produz uma matriz de dados de dimensões $50 \times 1609 = 80450$ números, conforme ilustra a Figura 11. Desta forma, faz-se necessária uma maneira de extrair informações importantes de matrizes de dados com tais dimensões.

Figura 11 - Organização dos dados multivariados em uma matriz a partir do espectro



Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.1 Pré-processamentos (SOUZA e POPPI, 2012)

A etapa de pré-processamento dos dados é fundamental para o sucesso da análise multivariada. Os principais objetivos da aplicação das técnicas de pré-processamento são eliminar informações não relevantes do ponto de vista químico e tornar a matriz de dados melhor condicionada para a análise, possibilitando a subsequente análise do conjunto de dados com eficiência. Normalizar os espectros, centrar os dados na média e derivar e suavizar utilizando o algoritmo de Savitzky-Golay foram os métodos aplicados neste estudo.

A normalização é um tipo de pré-processamento que tem como objetivo reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados, garantindo que cada observação seja representada de forma adequada e consistente. Um método comum de normalização aplicado a dados espectroscópicos é o chamado normalização por área total, cujo principal objetivo é reduzir o efeito da intensidade total de perfis de resposta, devido a variações sistemáticas ou na concentração da amostra. A normalização para a área total do espectro é realizada pela divisão de cada variável pela soma dos valores absolutos de todas as variáveis para uma dada amostra, conforme a Equação 4.1.

$$X_{i,\text{norm}} = \frac{X_i}{\sum_{j=1}^n |X_{i,j}|} \quad (4.1)$$

Centrar os dados na média (Equação 4.2) consiste em calcular a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrair cada uma das intensidades do valor médio. Desta maneira, cada variável passará a ter média zero, ou seja, as coordenadas são movidas para o centro dos dados, permitindo que diferenças nas intensidades relativas das variáveis sejam mais fáceis de perceber.

$$X_{ij}(\text{centrado na média}) = X_{ij}(\text{original}) - \bar{X}_{ij}(\text{média}) \quad (4.2)$$

Deslocamentos e inclinações de linha de base podem ser corrigidos por derivação dos espectros. Os métodos de alisamento são utilizados para reduzir matematicamente o ruído, aumentando com isto a relação sinal-ruído. Nestes métodos, é selecionada uma janela, a qual contém certo número de variáveis. Os pontos na janela são, então, utilizados para determinar o valor no ponto central da janela e, assim, o tamanho da janela influencia diretamente o resultado do alisamento. No método de Savitzky-Golay (SAVITSKY e GOLAY, 1964), um polinômio de ordem baixa é ajustado aos pontos da janela e utilizado para recalculer o ponto central.

4.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é um dos métodos mais importantes utilizados na Quimiometria e é a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. Normalmente, a PCA é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados,

encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados (SOUZA e POPPI, 2012).

Conforme mencionado anteriormente, métodos de análise exploratória são utilizados para extrair informação e detectar tendências nos dados, baseados nas medidas multivariadas das amostras. De maneira geral, eles podem ser classificados como métodos supervisionados como, por exemplo, *Linear Discriminant Analysis* (LDA), *K-Nearest Neighbor* (KNN), *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA) e *Soft-Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA), ou não supervisionados como, por exemplo, *Principal Component Analysis* (PCA) e *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA) e permitem a interpretação multivariada de conjuntos de dados complexos por meio de gráficos bi- ou tridimensionais. Nos métodos supervisionados é necessário que exista alguma informação inicial sobre a identidade das amostras para a formação das classes e o objetivo é desenvolver um modelo baseado nas informações contidas nas amostras. Por outro lado, nos métodos não supervisionados, a separação de classes acontece sem a necessidade de informações iniciais sobre a natureza das amostras e o objetivo é identificar agrupamentos naturais entre as amostras (SOUZA e POPPI, 2012).

A PCA é um método que permite a redução da dimensionalidade através da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PC), permitindo a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões. No espaço original, as amostras são pontos localizados em um espaço n -dimensional, sendo n igual ao número de variáveis. Com a redução de dimensionalidade proporcionada pela PCA, as amostras passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidos pelas PCs, por exemplo, bi ou tridimensionais. Matematicamente, na PCA, a matriz \mathbf{X} é decomposta em um produto de duas matrizes, denominadas escores (\mathbf{T}) e pesos (\mathbf{P}), mais uma matriz de erros (\mathbf{E}), como mostrado na Equação 4.3:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (4.3)$$

ou graficamente, como na Figura 12:

Figura 12 - Representação gráfica do somatório dos produtos dos vetores escores e pesos.

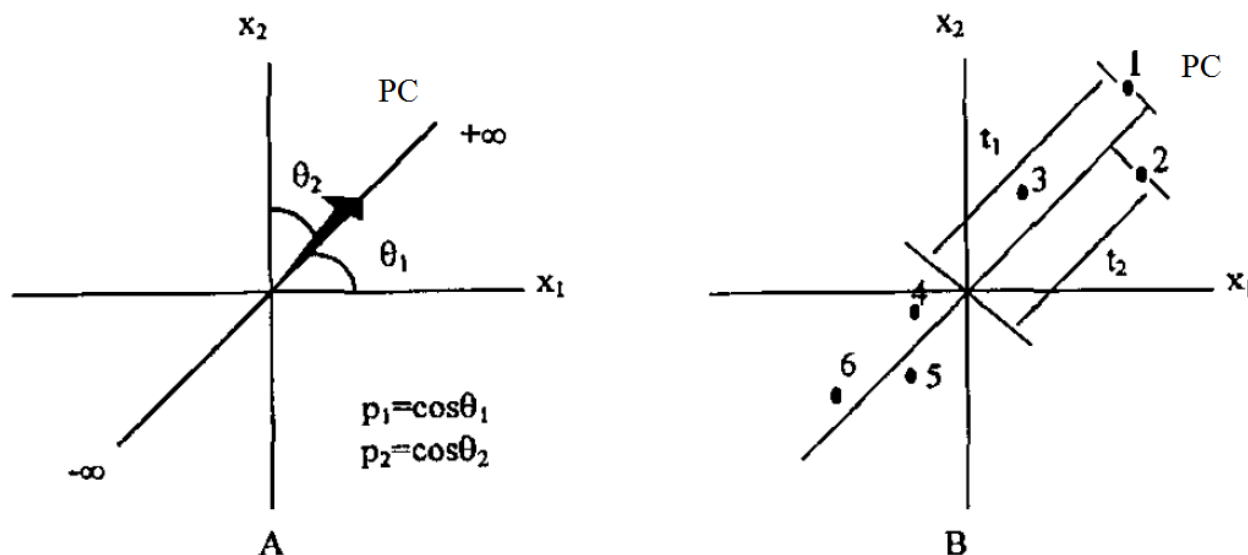
$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{X} \\ \hline \end{array}
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{T} \\ \hline \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{P}^T \\ \hline \end{array}
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline \mathbf{E} \\ \hline \end{array}
 \end{array}$$

m n m d d n m n

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os escores representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelas componentes principais. Cada componente principal é constituída pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são denominados pesos. Matematicamente, os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e as componentes principais (PC), representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. A primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido da maior variação no conjunto de dados; a segunda (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, com o intuito de descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante; enquanto os escores representam as relações de similaridade entre as amostras. A avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos escores. Através da análise conjunta do gráfico de escores e pesos, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras (SOUZA e POPPI, 2012). Como exemplificação, a Figura 13 ilustra no plano bidimensional duas variáveis x_1 e x_2 . A Figura 13A mostra um componente principal (PC), a reta que aponta na direção de maior variabilidade das amostras (pontos 1 a 6) da Figura 13B. Os escores t_h são as projeções das amostras na direção da PC (Figura 13B) e os pesos p_h são os cossenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável (Figura 13A) (SENA, et al., 2000).

Figura 13 - Representação de uma componente principal (PC) no caso de duas variáveis: (A) os pesos são os cossenos dos ângulos entre o vetor direção e a variável; (B) os escores são as projeções das amostras 1 a 6 na direção da PC. Os dados estão centrados na média.



Fonte: SENA, et al., 2000.

As novas variáveis, as PCs, são ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas. Normalmente, as primeiras PCs explicam a maior parte da variância total contida nos dados e podem ser usadas para representá-los (SENA, et al., 2000).

O número de componentes principais a ser utilizado no modelo PCA é determinado pela porcentagem de variância explicada. Assim, seleciona-se um número de componentes de tal maneira que a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais seja capturada (SOUZA e POPPI, 2012).

De forma resumida, é possível afirmar que a PCA é um método exploratório porque ajuda na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. Ela é capaz de separar a informação importante da redundante.

Para a análise exploratória, é de fundamental importância entender que os escores fornecem a composição das PCs em relação aos objetos (amostras), enquanto os pesos fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre os objetos através dos gráficos dos escores projetados nas primeiras PCs, e entre as variáveis através dos gráficos dos pesos. Esses gráficos apresentam informações úteis sobre tendências subjacentes e

características da estrutura dos dados, tais como agrupamentos de objetos ou variáveis e caracterização dos chamados “*outliers*” (amostras mal comportadas, que não se encaixam no modelo). O estudo conjunto de escores e pesos permite estimar a influência de cada variável em cada objeto (SENA, et al., 2000).

4.3 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

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

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

Figura 14 - Decomposição das matrizes X e Y para o modelo PLS.

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

Fonte: Elaborado pela própria autora.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (4.4)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \quad (4.5)$$

onde \mathbf{T} e \mathbf{U} são as matrizes escores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as matrizes pesos de \mathbf{X} e \mathbf{Y} ; \mathbf{E} e \mathbf{F} são os resíduos. Uma relação entre os dois blocos pode ser realizada correlacionando-se os escores para cada componente de cada vez, utilizando-se um modelo linear:

$$\mathbf{U}_h = b_h \mathbf{t}_h \quad (4.6)$$

Onde:

$$b_h = \frac{\mathbf{U}_h \mathbf{t}_h^T}{\mathbf{t}_h^T \mathbf{t}_h} \quad (4.7)$$

Para cada $h = 1, 2, \dots, A$ componentes principais.

Esse modelo, entretanto, não é o melhor possível. Isto porque a Análise de Componentes Principais é realizada em cada matriz separadamente, podendo resultar numa relação não muito satisfatória (não linear) entre os escores dos dois blocos. Deve-se buscar um modelo onde as matrizes de resíduos \mathbf{E} e \mathbf{F} sejam as menores possíveis e, ao mesmo tempo, conseguir uma relação linear entre \mathbf{t} e \mathbf{u} . No PLS, isto é realizado por uma leve mudança nos valores dos escores, de forma a produzir a melhor relação possível, ou seja, há uma leve rotação no eixo das componentes principais para obtenção de uma maior correlação com o vetor de dados \mathbf{y} . Então, essas novas componentes principais passam a se chamar variáveis latentes. Como pode ser notado, há um compromisso entre a habilidade dos componentes principais em descrever as amostras nos espaços individuais (modelagem dos blocos \mathbf{X} e \mathbf{Y}), e o aumento na correlação entre \mathbf{u} e \mathbf{t} .

O número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo é normalmente determinado pelo procedimento de validação cruzada com o método denominado *leave-one-out* (“um por vez”). Neste procedimento, uma amostra (espectro) pertencente ao conjunto de calibração é deixada de fora, o modelo é construído com as demais e é realizada a previsão da propriedade de interesse para esta amostra empregando um número crescente de variáveis latentes. Este procedimento é então repetido para todas as amostras e um erro médio (RMSECV, Equação 4.8) é calculado para cada número de variáveis latentes empregado. O número de variáveis latentes a partir do qual não existe variação apreciável no valor de RMSECV é utilizado para determinar o número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo. Caso exista dúvida se dois valores de RMSECV são estatisticamente diferentes, é possível a realização de um teste F entre os

dois valores, empregando um número de graus de liberdade igual número de amostras do conjunto de calibração.

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum (y_p - y_e)^2}{n}} \quad (4.8)$$

Na equação acima, y_p representa o valor previsto de concentração, y_e o valor esperado e n o número de amostras de calibração (SOUZA et al., 2013).

Na construção do modelo de calibração multivariada, as amostras são divididas em dois conjuntos de dados, um conjunto de calibração e outro conjunto chamado de validação. As amostras de calibração precisam ser escolhidas de forma que sejam representativas, ou seja, apresente maior variabilidade dos dados. Para isso, o algoritmo de Kennard-Stone (KENNARD e STONE, 1969) é frequentemente utilizado, o qual seleciona as amostras de calibração com base nas suas distâncias. Dois espectros são selecionados, o primeiro mais próximo do ponto central e o segundo é escolhido de forma que apresente maior distância euclidiana em relação ao primeiro. Essas duas amostras são então removidas do conjunto de calibração e alocadas em um subconjunto. Para cada espectro do conjunto de calibração, as distâncias euclidianas entre o espectro selecionado do subconjunto e os espectros restantes são computadas. O procedimento segue até a obtenção do número desejado de amostras para o conjunto de calibração.

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

$$h_i = t_{a,i}^T (T_a^T T_a)^{-1} t_{a,i} \quad (4.9)$$

onde T são os escores das amostras de calibração, t_i é o escore de uma determinada amostra i e a é o número de variáveis latentes. Os resíduos correspondem a desvios entre os dados de referência e os dados estimados pelo modelo. Uma amostra com *leverage* e resíduo altos deve ser excluída do modelo e este, reconstruído. Amostra com *leverage* baixo e resíduo alto indica previsão ruim da propriedade a ser determinada. A amostra que apresenta resíduo baixo e *leverage* alta revela ser diferente das demais, onde o modelo não consegue descreve-la.

A parte fundamental da regressão é a verificação de sua validade, ou seja, se o modelo construído é capaz de prever corretamente ou com pequena margem de erro os valores das concentrações de novas amostras. Existem algumas maneiras de determinar a habilidade de previsão do modelo: através da determinação dos valores previstos pelo modelo, dos seus respectivos erros relativos e da raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP – do inglês, *Root Mean Squares Error of Prediction*), por meio da equação 4.10:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum (y_r - y_p)^2}{n}} \quad (4.10)$$

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

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

4.4 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

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

associados, permitindo a visualização e entendimento de diferentes padrões e associações nos dados.

A PLS-DA segue o mesmo princípio do PLS, porém, neste método, a variável simulada (matriz \mathbf{Y}) descreve a classe da amostra empregando valores zero ou um. A classe de uma nova amostra é determinada através do valor previsto pelo PLS-DA. Apesar de os valores previstos pelo modelo serem zero ou um, observa-se que os valores se aproximam destes. Isso porque é calculado um valor limite entre os valores previstos, onde amostras acima deste valor indicam que estas pertencem à classe modelada. O modelo permite ainda o cálculo da probabilidade de uma amostra pertencer à classe que está sendo modelada; tal cálculo é feito com base no teorema de Bayes (RIBEIRO, 2007).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras

5.1.1 Análise qualitativa dos tipos de requeijão

Foram analisadas um total de 19 amostras de diferentes marcas de requeijão sem amido, adquiridas no comércio da cidade de Juiz de Fora, MG, dentre as quais 11 são do tipo Tradicional e 8 são do tipo *Light*. Além disso, foram analisadas 7 amostras de requeijão com amido, adquiridas também no comércio da cidade de Juiz de Fora, dentre as quais 3 são do tipo Tradicional e 4 são *Light*. Os espectros Raman dessas amostras foram coletados no dia da abertura da embalagem e elas não passaram por nenhum preparo prévio.

5.1.2 Análise qualitativa e quantitativa do requeijão com adição de amido

O amido utilizado como adulterante neste trabalho foi fornecido pela empresa de produtos alimentícios Gemacom Tech, sediada na cidade de Juiz de Fora, MG. Seu espectro Raman foi obtido sem nenhum preparo prévio.

Todas as 19 amostras de requeijão comerciais sem amido foram adulteradas com amido em diferentes proporções, que variaram de 2,5 a 20% (m/m), fornecendo um total de 152 amostras, divididas em oito níveis de concentração, conforme mostra a Tabela 1. Cada componente foi pesado utilizando uma balança analítica modelo Shimadzu Marte AY 220, as amostras resultantes foram homogeneizadas e os espectros Raman foram coletados imediatamente após o preparo das mesmas.

Todas as amostras adulteradas, juntamente com as comerciais, foram utilizadas para a construção dos modelos PCA, PLS-DA e PLS.

Tabela 1 - Planejamento para a adulteração com amido das amostras de requeijão comercial.

Mistura	Requeijão %(m/m)	Amido %(m/m)
1	97,5	2,5
2	95,0	5,0
3	92,5	7,5
4	90,0	10,0
5	87,5	12,5
6	85,0	15,0
7	82,5	17,5
8	80,0	20,0

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Além disso, para obter resultados mais condizentes com a realidade e construir modelos multivariados mais confiáveis, foram preparadas 11 amostras de requeijão sem redução de gorduras pela empresa Gemacom Tech. Dentre elas, uma é a amostra padrão, sem adição de amido, e as outras dez foram divididas em dois grupos segundo o tipo de amido adicionado: cinco amostras sofreram adição de amido contendo 12% de amilose e 88% de amilopectina, chamado neste texto de amido 2560, e cinco sofreram adição de amido contendo < 5% de amilose e o restante de amilopectina, chamado neste texto de amido 4051. Em ambos os grupos, as adulterações foram feitas em proporções que variaram de 2 a 10% (m/m), divididas em cinco níveis de concentração, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Conjunto de amostras de requeijão preparadas na empresa Gemacom Tech.

Amostra	% amido 2560 (m/m)	% amido 4051 (m/m)
1	0	0
2	2	0
3	4	0
4	6	0
5	8	0
6	10	0
7	0	2
8	0	4
9	0	6
10	0	8
11	0	10

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os ingredientes usados no preparo da amostra padrão foram: queijo muçarela (como a massa base), água, cloreto de sódio e polifosfato de sódio (como sal fundente). Para o preparo das amostras adulteradas, variou-se a proporção de água e de amido – quanto maior a quantidade de amido, menor a quantidade de água. Para cada caso, os ingredientes foram homogeneizados e submetidos a um aquecimento de até aproximadamente 80 °C; em seguida, as amostras foram colocadas em recipientes plásticos vedados e mantidos sob refrigeração até o dia seguinte, quando foram obtidos os espectros Raman.

5.2 Aquisição dos Espectros Raman

Os espectros Raman das amostras estudadas foram coletados em um espectrômetro RFS 100 FT-Raman Bruker equipado com um detector de Ge, refrigerado com nitrogênio líquido, linha de excitação em 1064 nm, empregando um laser Nd:YAG, e geometria de coleção da radiação espalhada de 180°. O software OPUS 6.0 (Bruker Optik, Ettlingen, Germany) foi utilizado para a aquisição dos dados Raman. As medidas foram feitas com resolução de 4 cm⁻¹, potência do laser de 150 mW, 256 acumulações e faixa espectral de 3500 a 400 cm⁻¹. Estes parâmetros foram

previamente ajustados para obter a melhor relação sinal-ruído possível ao mesmo tempo em que a integridade física e química das amostras fosse mantida. Em todos os espectros Raman obtidos nesse trabalho, as amostras não passaram por nenhum preparo prévio. Foram coletados espectros em triplicata apenas das amostras de requeijão preparadas pela empresa Gemacom Tech, ao passo que os espectros das amostras comerciais foram coletados uma única vez.

5.3 Tratamento dos dados

Para a análise multivariada, utilizou-se o software *Matlab 7.10.0 (R2010a)*. As informações fornecidas pelos espectros Raman foram dispostas em forma de matriz, na qual as linhas representam as amostras e as colunas as intensidades Raman das respectivas amostras para cada número de onda. No presente estudo, foi utilizada a faixa espectral de 3500 a 400 cm^{-1} .

Antes da realização de qualquer análise, os espectros foram tratados empregando a primeira derivada usando o algoritmo suavização de Savitzky-Golay [18], com polinômio de ordem 2 e janela de 15 pontos, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média, através da subtração de cada valor da variável pela média das variáveis. Esses pré-processamentos foram usados de forma variada para cada análise quimiométrica, de forma a obter um modelo que explicasse a maior variância possível dos dados com um menor número de componentes principais ou variáveis latentes.

A análise exploratória dos dados foi feita através da análise dos componentes principais (PCA) e a escolha do número de componentes principais foi feita através do gráfico de autovalores (importância de cada componente principal).

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi empregada para classificação das amostras de requeijão adulteradas ou não com amido. Para a construção do modelo de classificação, os dados fornecidos pelos espectros Raman formaram a matriz X, e a matriz Y indicou a classe ao qual a amostra pertencia, sendo 0 para as amostras sem amido e 1 para as amostras com amido.

A construção do modelo de calibração multivariada para determinação da quantidade adicionada de adulterante no requeijão foi feita empregando o método dos mínimos quadrados parciais (PLS); neste caso a matriz X foi formada pelos espectros

Raman e a matriz Y pelos valores das concentrações de amido adicionadas a cada amostra.

Para o desenvolvimento e avaliação dos modelos de classificação e regressão, foram utilizados dois conjuntos de dados: amostras de treinamento ou calibração (aproximadamente 67% do número total de amostras) e amostras de validação (aproximadamente 33% do número total de amostras). As amostras pertencentes a cada um desses conjuntos foram escolhidas de modo a fornecer a maior variabilidade ao conjunto de treinamento. A Tabela 3 mostra o número de cada tipo de amostra usado na construção dos conjuntos de calibração e validação.

Tabela 3 - Distribuição das amostras para construção dos modelos PLS-DA e PLS.

	Modelos construídos a partir das amostras comerciais puras e adulteradas em laboratório		Modelos construídos a partir das amostras comerciais puras e manufaturadas na empresa Gemacom Tech	
	Amostras Tradicionais	Amostras <i>Light</i>	Amostras Tradicionais	Amostras <i>Light</i>
Conjunto de Calibração	74	47	32	29
Conjunto de Validação	38	29	16	16
Total	112	76	48	45

Fonte: Elaborado pela própria autora.

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização das amostras de requeijão comercial através dos espectros Raman

Dois dos espectros FT-Raman obtidos para as amostras de requeijão comercial tradicional e *light* – ambos sem amido – são mostrados na Figura 15 e as principais bandas vibracionais estão listadas na Tabela 4, com suas respectivas atribuições tentativas baseadas em comparações com dados previamente publicados.

Figura 15 - Espectros FT-Raman do requeijão *light* (a) e tradicional (b) sem amido.

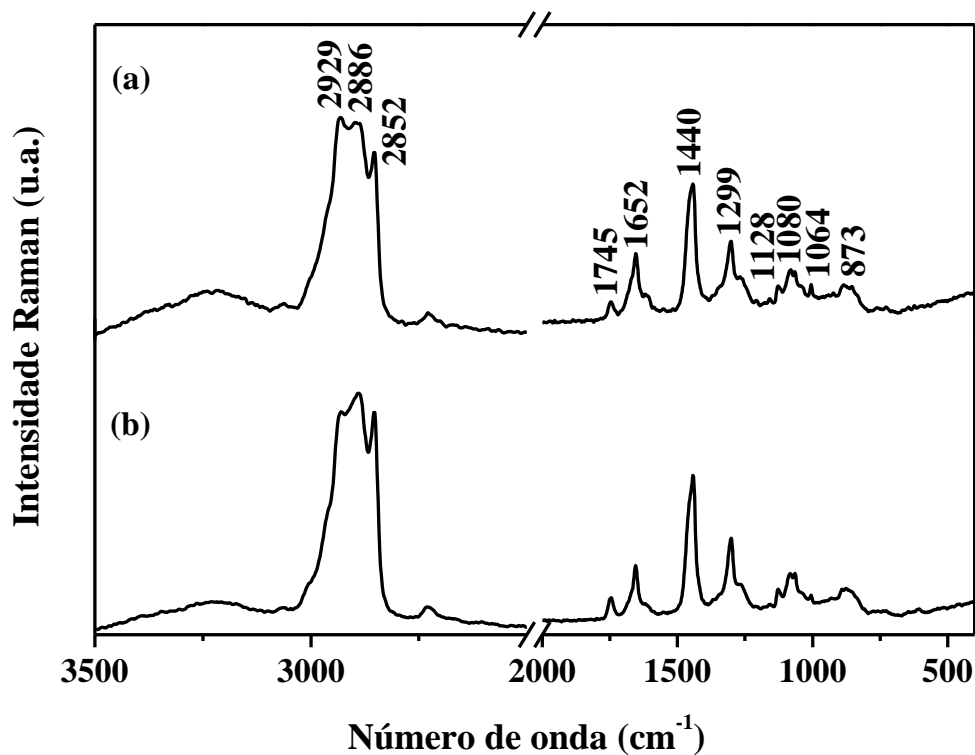


Tabela 4 - Principais números de onda (cm^{-1}) e suas respectivas atribuições tentativas baseadas na literatura.

Número de onda (cm^{-1})	Tentativa de atribuição
2929	$\nu_{\text{ass}}(\text{CH}_2)$
2886	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2852	$\nu_s(\text{CH}_2)$
1745	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{éster}}$
1652	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amida I; $\nu(\text{C}=\text{C})$
1440	$\delta(\text{CH}_2)$
1299	$\tau(\text{CH}_2)$
1128	$\nu(\text{C}-\text{O}) + \nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})$
1080	$\nu(\text{C}-\text{O}) + \nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})$
1064	$\nu(\text{C}-\text{O}) + \nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{O}-\text{H})$
873	$\delta(\text{C}-\text{C}-\text{H}) + \delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$

Fonte: HERRERO (2008); LI-CHAN (1996); MAHDAD-BENZERDJEB et al. (2007); MOROS et al. (2007); ZHOU et al. (2006).

Na região de vibração da ligação CH, observa-se uma banda na região de 2929 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída ao estiramento assimétrico CH_2 e está relacionada a modos vibracionais de proteínas e carboidratos. A principal diferença entre os tipos de requeijão é a presença total ou parcial de lipídios, nutriente que determina a classificação do mesmo. Essa diferença é expressa no espectro Raman por meio das bandas em 2886 e em 2852 cm^{-1} - modos vibracionais característicos de lipídios. No espectro do requeijão tradicional elas aparecem em maior intensidade com relação à banda em 2929 cm^{-1} , indicando uma maior presença do nutriente em questão em comparação com as amostras *light* (LI-CHAN, 1996).

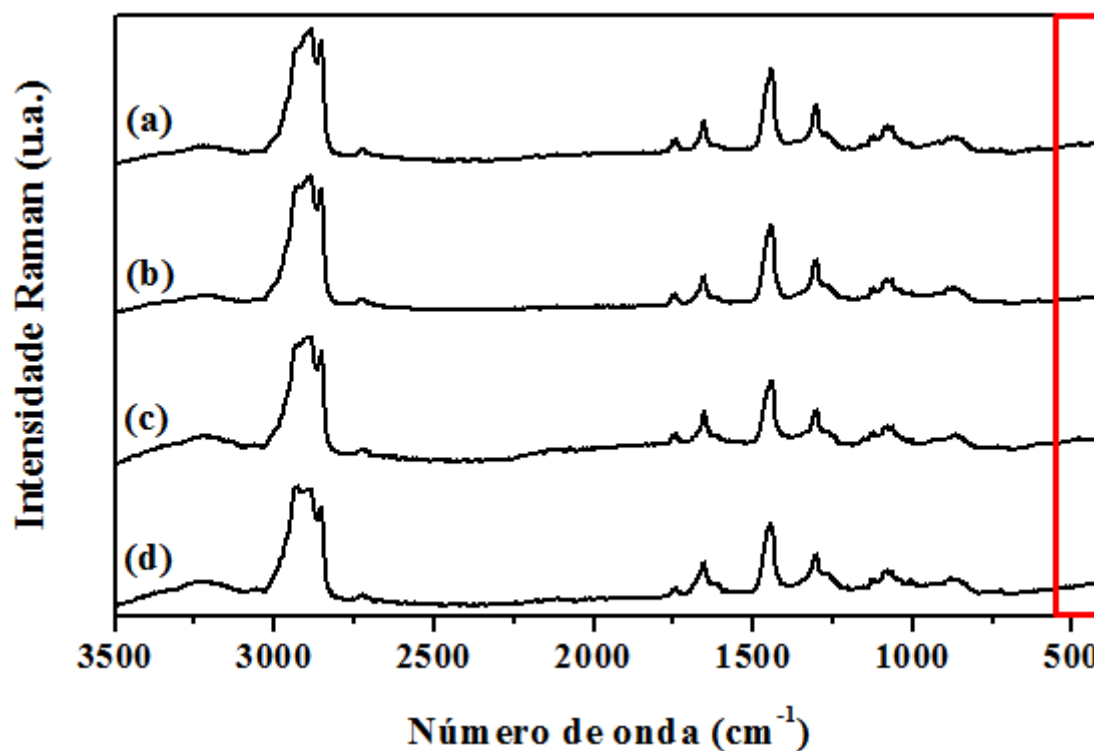
A região do espectro Raman de 1800 a 400 cm^{-1} apresenta grande quantidade de bandas e é rica em informação estrutural. A banda na região de 1745 cm^{-1} é atribuída ao modo vibracional de estiramento C=O de ácidos graxos (ZHOU et al., 2006) e, por ser procedente de um modo vibracional de lipídio, está presente em menor intensidade no espectro Raman do requeijão *light*. A região de 1652 cm^{-1} é caracterizada pelo modo amida I, referente ao estiramento C=O das moléculas de proteínas. Essa região

apresenta ainda contribuição do estiramento da ligação C=C dos ácidos graxos insaturados presentes no leite (MOROS et al., 2007; ZHOU et al., 2006). Na região de 1440 cm^{-1} é observada uma intensa banda; nela aparecem os modos de deformação da ligação CH_2 , tendo contribuição das moléculas de lipídios, carboidratos e dos aminoácidos alifáticos presentes nas proteínas do leite (LI-CHAN, 1996; ZHOU et al., 2006). Outra banda referente à presença de lipídio é a que aparece em 1299 cm^{-1} , referida na literatura como torção da ligação CH_2 (HERRERO, 2008).

A região de 1200 a 800 cm^{-1} é dominada por bandas características de modos vibracionais dos carboidratos. Os principais modos presentes são os estiramentos C-O e C-C e as deformações C-O-H e C-O-C, em 873 cm^{-1} , sendo esta última referente ao modo vibracional da ligação glicosídica β -1-4 da lactose (LI-CHAN, 1996; MAHDAD-BENZERDJEB et al., 2007).

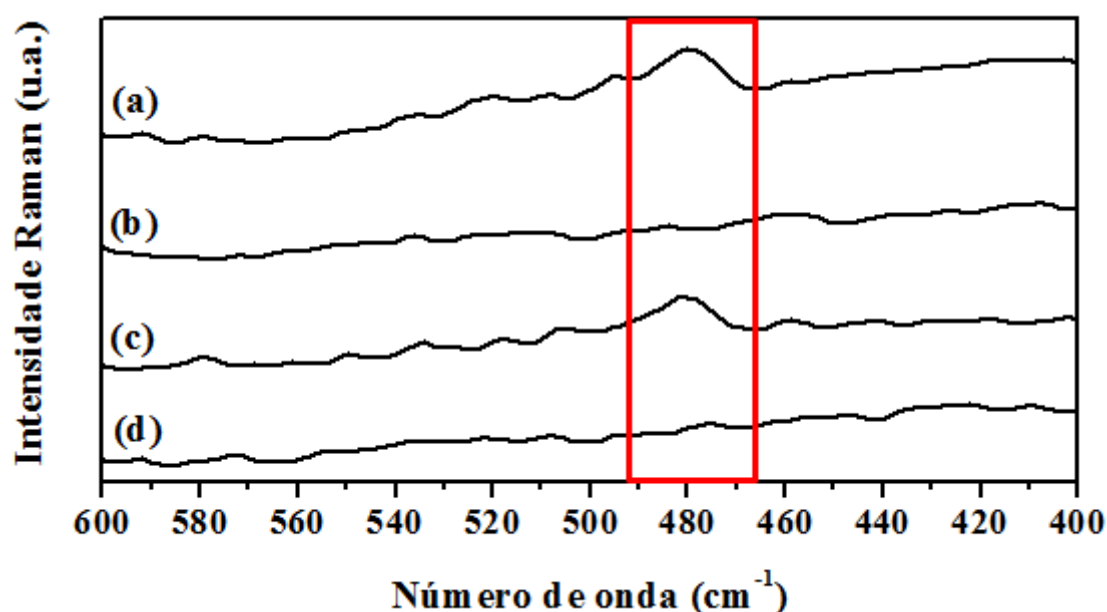
A Figura 16 mostra os espectros Raman de quatro amostras de requeijão comercial tradicional e *light*, com e sem amido.

Figura 16 - Espectros Raman de amostras de requeijão comercial tradicional com amido (a), sem amido (b), requeijão comercial *light* com amido (c) e sem amido (d).



Nela, observa-se que ocorre uma pequena modificação na região de 477 cm^{-1} [$\delta(\text{CCC}) + \tau(\text{CO})$] (ALMEIDA et al., 2010), utilizada na literatura como marcadora da presença do amido (BARANSKA et al., 2005; DE VEIJ et al., 2009). A Figura 17 possibilita uma melhor observação da banda em questão.

Figura 17 - Destaque da região de $600\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ dos espectros Raman de amostras de requeijão comercial tradicional com amido (a), sem amido (b), requeijão comercial *light* com amido (c) e sem amido (d).



6.2 Análise Exploratória das Amostras de Requeijão Comercial

Para verificar se todas as amostras de requeijão tradicional e *light* apresentavam espectros com mesmas características, de acordo com a classificação comercial, realizou-se análise exploratória empregando a PCA. O modelo foi construído utilizando a primeira derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média como pré-processamentos e 2 componentes principais; a Figura 18 mostra o gráfico de escores das duas primeiras componentes principais. Neste gráfico, é possível notar que a componente principal 1 promove a formação de dois agrupamentos – o das amostras tradicionais e o das amostras *light*. A Figura 19 mostra o gráfico de pesos da componente principal 1, o qual traz os números de onda que mais contribuem para a formação dos grupos. Observa-se que a região de $2930\text{ a }2850\text{ cm}^{-1}$, atribuída à presença

de lipídios, apresenta grande contribuição para a separação dos tipos de requeijão. Outras três bandas importantes para a separação das amostras estão localizadas em 1745, 1652 e 1440 cm^{-1} , as quais também apresentam contribuição de modos vibracionais de lipídios.

Figura 18 - Gráfico de escores da PC1 *versus* PC2 dos dois tipos de requeijão sem amido: (\blacktriangledown) tradicional e (\bullet) *light*.

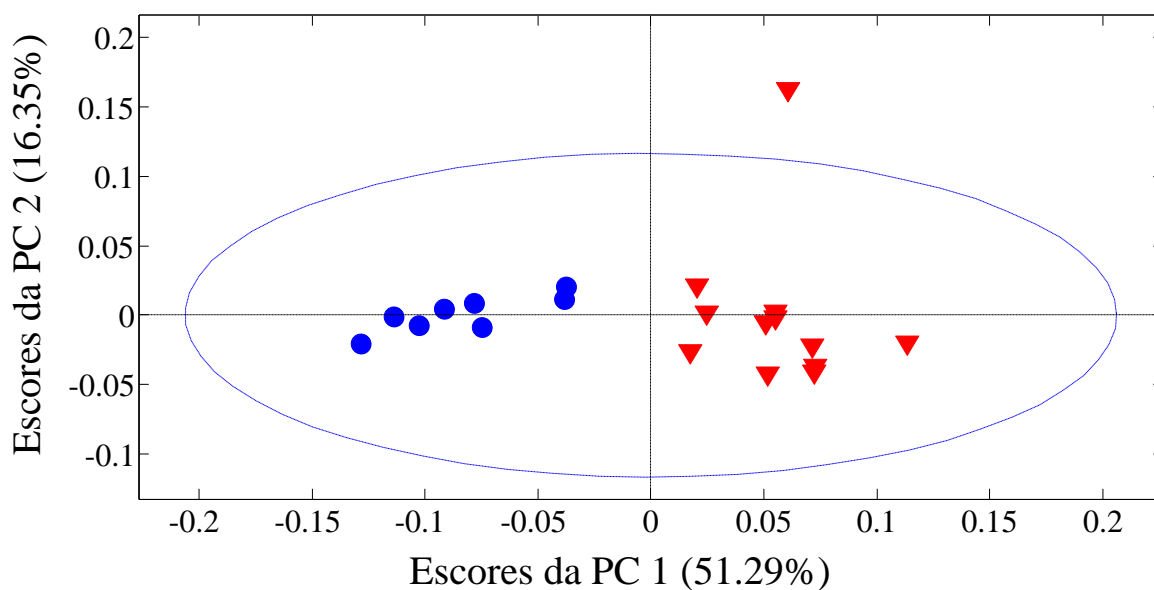
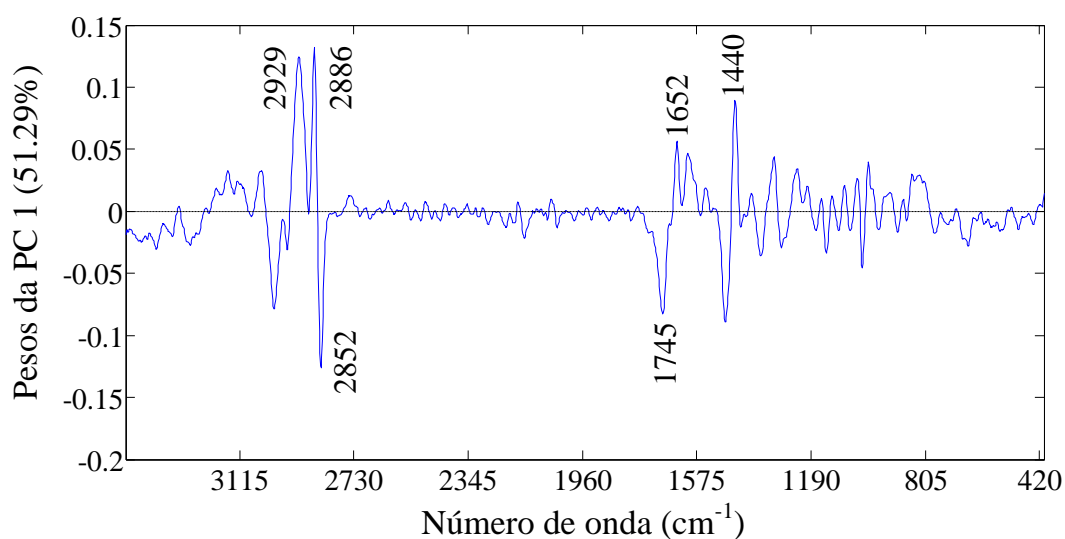
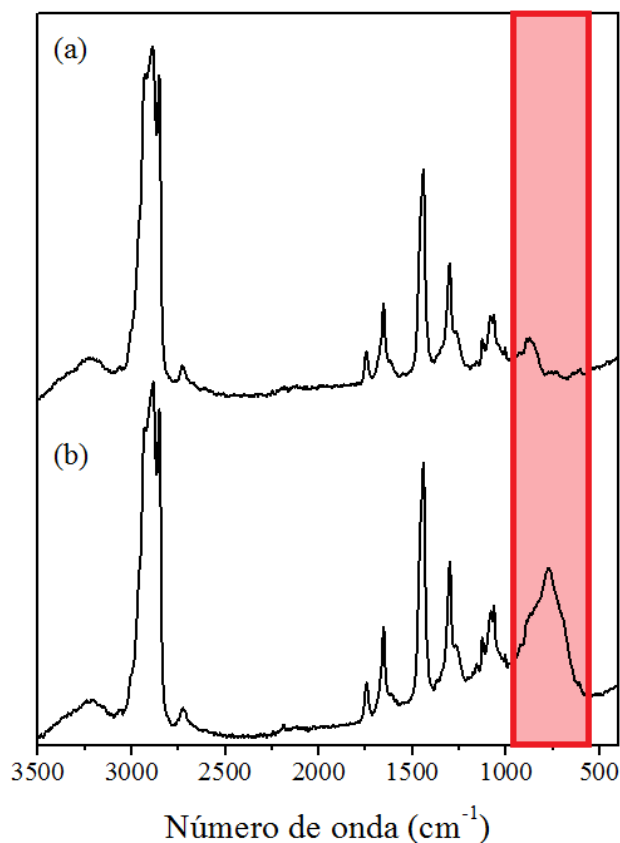


Figura 19 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* número de onda (cm^{-1}).



Para as amostras de requeijão tradicional observa-se o afastamento de uma amostra do grupo, isso porque seu espectro Raman apresentou um perfil diferente do espectro das demais. A Figura 20 compara o espectro Raman da amostra em questão com o espectro de uma amostra contida no agrupamento principal.

Figura 20 - Espectros Raman de uma amostra de requeijão tradicional contida no agrupamento principal (a) e da amostra afastada das demais (b).

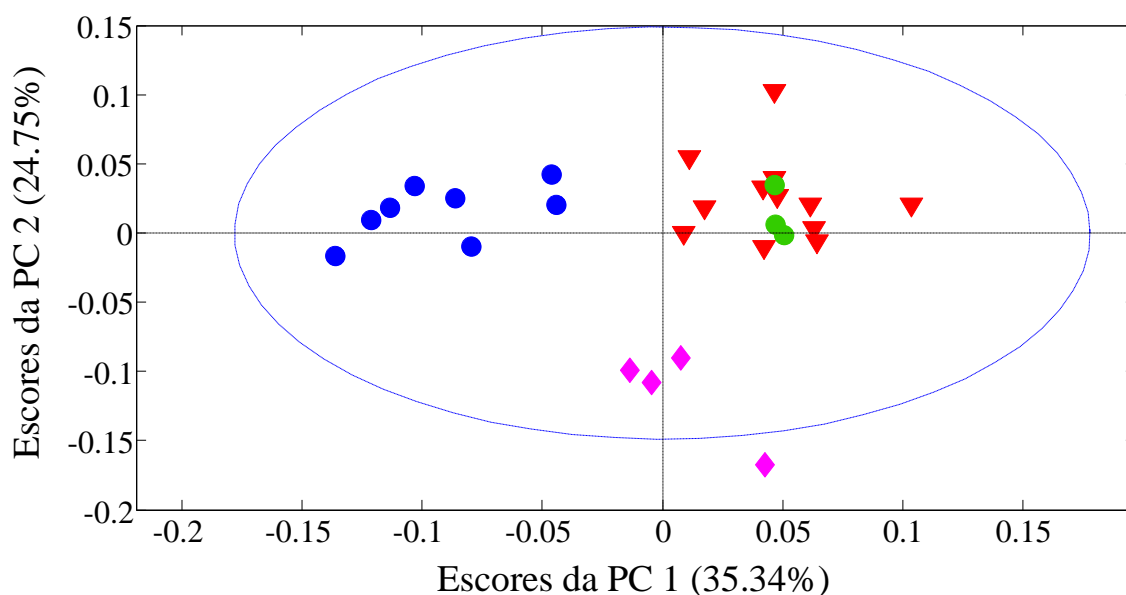


A principal diferença está na região de 800 a 750 cm⁻¹ e, segundo o fabricante, o produto é “rico em fósforo” (descrito exatamente desta forma no rótulo). De acordo com a literatura (SILVA, 2010), a banda em 690 cm⁻¹ é referente ao estiramento simétrico da ligação entre um átomo de fósforo e um átomo de oxigênio em ponte, o que sugere que o fabricante tenha usado um excesso de polifosfato na manufatura do produto.

Para avaliar o comportamento dos requeijões frente à presença de amido, um novo modelo PCA foi construído, utilizando todas as amostras comerciais – com e sem amido. A primeira derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média foram os pré-processamentos e utilizou-se também 2 componentes

principais; a Figura 21 mostra o gráfico de escores das duas componentes principais. Neste gráfico, é possível notar a formação de três agrupamentos, correspondentes, respectivamente, às amostras tradicionais (com e sem amido), às amostras *light* sem amido e às amostras *light* com amido. Assim como para o modelo construído anteriormente, o gráfico de pesos da componente principal 1 (Figura 22) mostra que as regiões espectrais que mais contribuem para a disposição das amostras no gráfico de escores são as relacionadas a modos vibracionais de lipídios. Além disso, o gráfico de pesos da componente principal 2 (Figura 23) mostra que a banda em 477 cm^{-1} também é determinante para a distribuição das amostras.

Figura 21 - Gráfico de escores da PC1 *versus* PC2 dos quatro tipos de requeijão: (▼) tradicional sem amido, (●) tradicional com amido, (●) *light* sem amido e (◆) *light* com amido.



Desta forma, observa-se claramente que a análise exploratória empregando a PCA permitiu a separação das amostras de requeijão quanto ao seu tipo, bem como a identificação de amostras diferentes dentro de um mesmo grupo. Quanto à presença de amido, a PCA foi capaz de discernir as amostras *light* contendo ou não o carboidrato em questão, embora não tenha tido a mesma capacidade quando aplicada às amostras tradicionais.

Figura 22 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* número de onda (cm^{-1}).

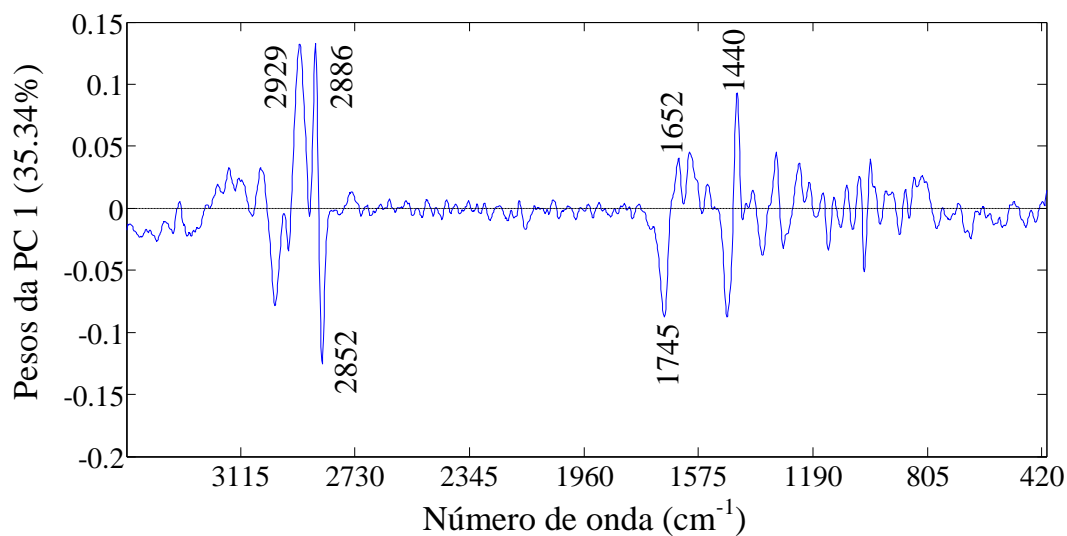
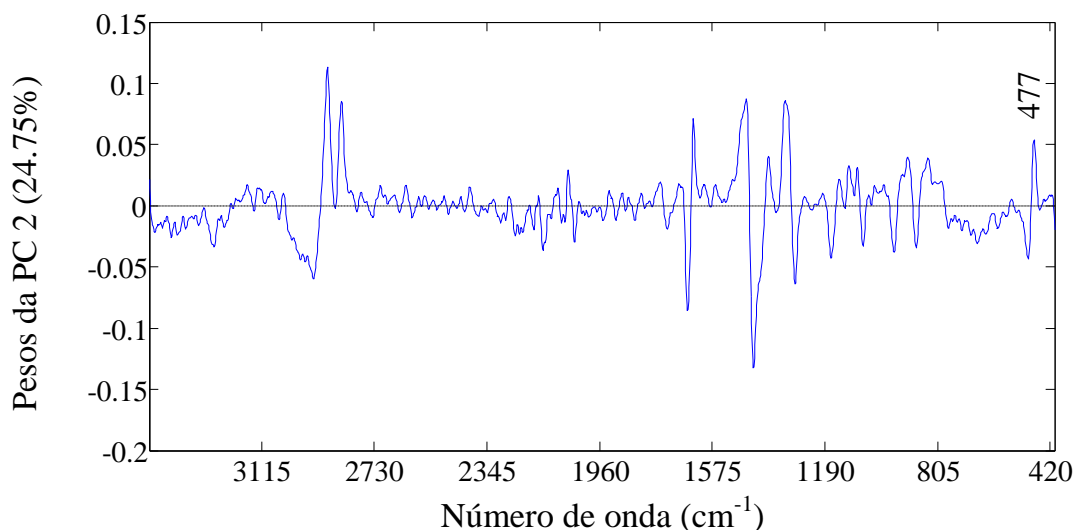


Figura 23 - Gráfico de pesos da PC2 *versus* número de onda (cm^{-1}).



6.3 Análise Espectroscópica das Amostras de Requeijão Adulteradas

Para avaliar a presença de amido em diferentes concentrações, as amostras de requeijão comercial (apenas as que não continham amido em sua composição original) foram adulteradas em laboratório com tal carboidrato e, em seguida, foram obtidos seus respectivos espectros Raman. A Figura 24 mostra o espectro Raman do amido usado como adulterante e a Tabela 5 apresenta as atribuições dos seus principais modos vibracionais.

Figura 24 - Espectro Raman do amido, usado neste estudo como adulterante.

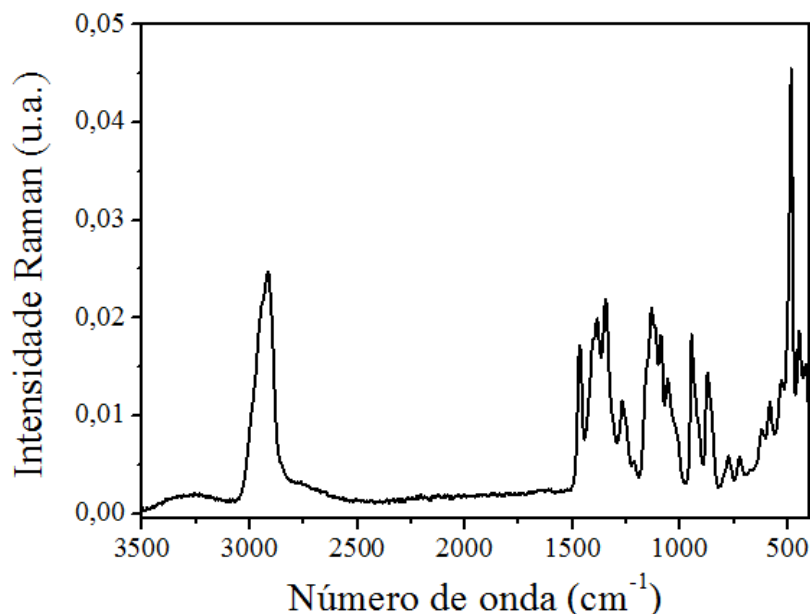


Tabela 5 - Números de onda (cm^{-1}) e tentativa de atribuição do espectro Raman do amido.

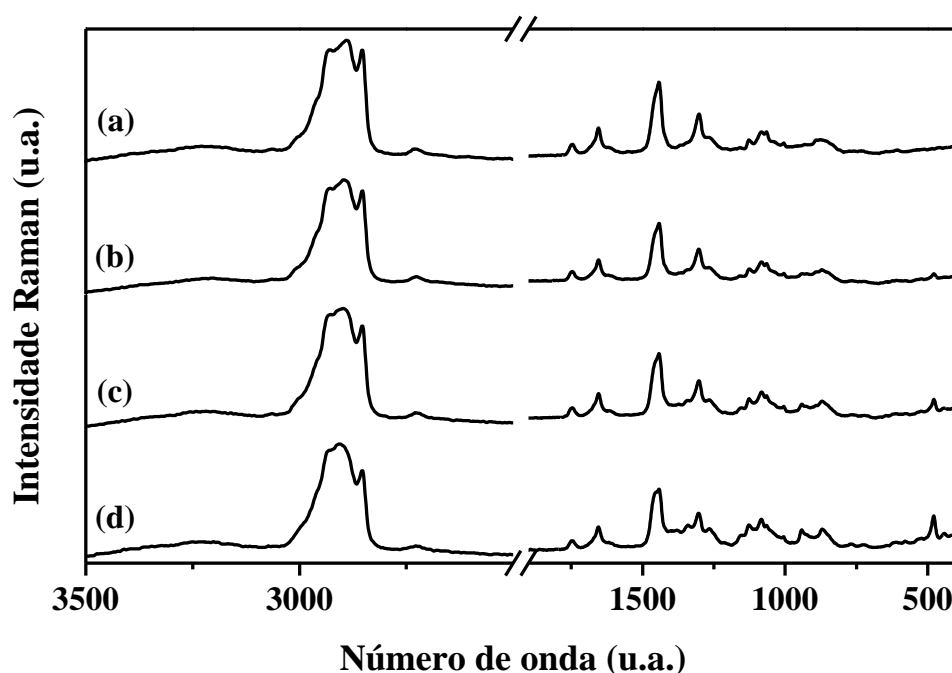
Número de onda (cm^{-1})	Atribuição tentativa
2913	$\nu(\text{CH})$
1460	$\delta(\text{CH}) + \delta(\text{CH}_2)$
1384	$\delta(\text{COH})$
1343	$\nu(\text{CO}) + \delta(\text{COH})$
1266	$\delta(\text{CCH}) + \delta(\text{OCH}) + \delta(\text{COH})$
1129 – 1050	$\nu(\text{CO}) + \nu(\text{CC}) + \delta(\text{COH})$
950 – 830	$\delta(\text{COC}) + \delta(\text{COH}) + \nu(\text{CO})$
477	$\delta(\text{CCC}) + \tau(\text{CO})$

Fonte: ALMEIDA et al., 2010.

Conforme discutido anteriormente, a presença do amido pode ser facilmente identificada, pois seu espectro Raman apresenta bandas que o distingue dos demais componentes presentes na matriz láctea e que podem ser utilizadas para a identificação desse adulterante nas amostras de requeijão. A literatura mostra a banda em 477 cm^{-1} como marcadora na identificação de amido em vários produtos, como cenouras (BARANSKA et al., 2005) e substâncias farmacêuticas (DE VEIJ et al., 2009). Fortes

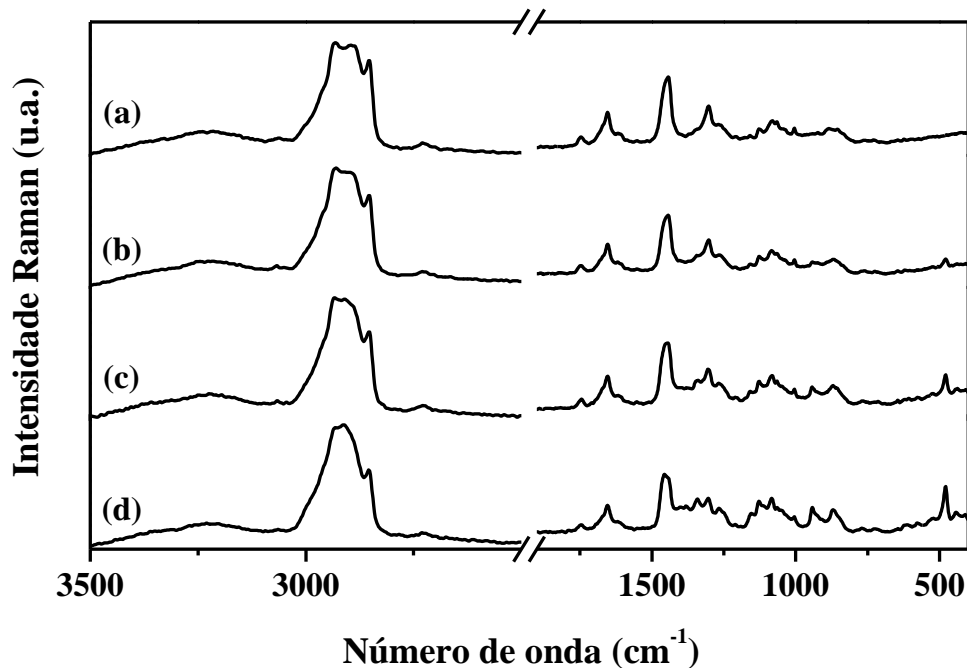
acoplamentos entre modos vibracionais são encontrados nessa região e tais modos estão relacionados principalmente com a deformação do esqueleto do anel glicosídico [$\delta(\text{C-C-O} + \text{C-C-C})$]. A Figura 25 mostra o espectro do requeijão tradicional comercial com amostras de requeijão tradicional contendo 5, 10 e 20% (m/m) de amido adicionado. Na amostra com 5% de amido observam-se pequenas modificações no espectro Raman em relação ao da amostra comercial; estas modificações ocorrem na região entre de 950 e 830 cm^{-1} [$\delta(\text{COC}) + \delta(\text{COH}) + \nu(\text{CO})$], e em 477 cm^{-1} [$\delta(\text{CCC}) + \tau(\text{CO})$], esta última utilizada como marcadora da presença do carboidrato. Com o aumento do teor de adulterante, as mudanças tornam-se mais perceptíveis, como observado nos espectros das amostras com 10 e 20% de amido. Além das mudanças ocorridas nas regiões citadas anteriormente, observa-se alterações também nas regiões de 1384 e de 1080 cm^{-1} , que envolvem, respectivamente, o modo $\delta(\text{COH})$ e o modo acoplado $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{C-O-H})$.

Figura 25 - Espectros Raman do requeijão comercial tradicional (a) e com adição de amido nas proporções de 5% (b), 10% (c) e 20% (d).



A adição de amido ao requeijão light também provoca mudanças nas regiões mencionadas anteriormente, como apresentado na Figura 26.

Figura 26 - Espectros Raman do requeijão comercial *light* (a) e com adição de amido nas proporções de 5% (b), 10% (c) e 20% (d).



Conforme apontam os espectros, a presença de determinada quantidade de amido provoca modificações no perfil do espectro Raman do requeijão, principalmente nas regiões que possuem modos característicos desse componente.

Para verificar se o aquecimento ao qual é submetido o requeijão durante o seu preparo exerce influência sobre o amido, foram fabricados três diferentes tipos de amostras na indústria Gemacom Tech. Essas amostras contam com um requeijão padrão sem amido e com dois outros requeijões, que sofreram adição de amidos com diferentes proporções de amilose e amilopectina – descritos como amido 2560 e 4051 –, cujos maiores detalhes encontram-se na seção de Materiais e Métodos.

A Figura 27 apresenta os espectros Raman dos dois tipos de amido usados no preparo das amostras adulteradas. Embora contenham teores de amilose e amilopectina diferentes, seus espectros apresentam o mesmo perfil.

As Figuras 28 a 31 trazem os espectros Raman das amostras que sofreram adição de amido durante seu preparo. Diferentemente do que ocorre com a adulteração em laboratório, nos espectros Raman dessas amostras a banda em 477 cm⁻¹ apresenta-se mais larga e com intensidade muito menor. Tal fato pode ser atribuído à gelatinização do amido, que compreende a difusão de água para o interior do grão, transformando a estrutura cristalina dos grãos em partículas de gel. Ela acontece através do aquecimento

de uma suspensão de amido em água até 60 – 90 °C, dependendo do tipo de amido; nessa faixa de temperatura, são rompidas as ligações de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina, as quais passam a fazer ligações de hidrogênio com a água (SCHUSTER et al., 2000). Uma vez que a gelatinização é uma transição ordem-desordem, o alargamento da banda em questão reflete uma maior distribuição das frequências de vibração, ou seja, existe um aumento das possíveis conformações moleculares que as cadeias de amilose e amilopectina podem assumir, uma vez que a estrutura ordenada dos grânulos é desfeita (CELEDÓN e AGUILERA, 2002).

Figura 27 - Espectros Raman do amido 2560 (a) e do amido 4051 (b).

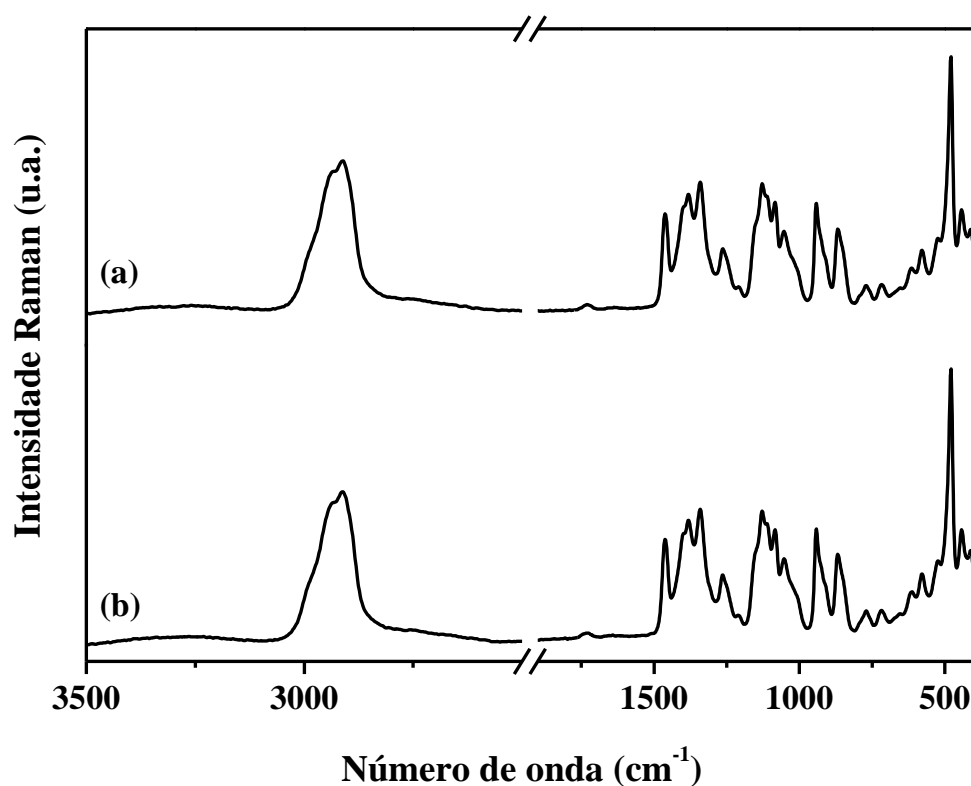


Figura 28 - Espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 2560 (b), com 6% de amido 2560 (c), com 10% de amido 2560 (d), e do próprio amido 2560 (e).

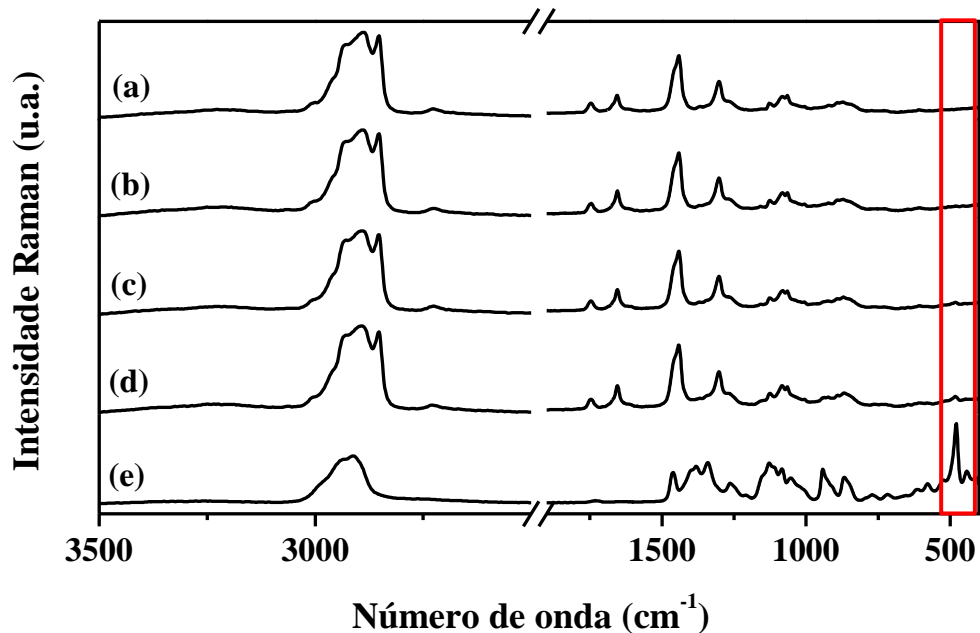


Figura 29 - Destaque para a região de 600 a 400 cm⁻¹ dos espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 2560 (b), com 6% de amido 2560 (c), com 10% de amido 2560 (d), e do próprio amido 2560 (e).

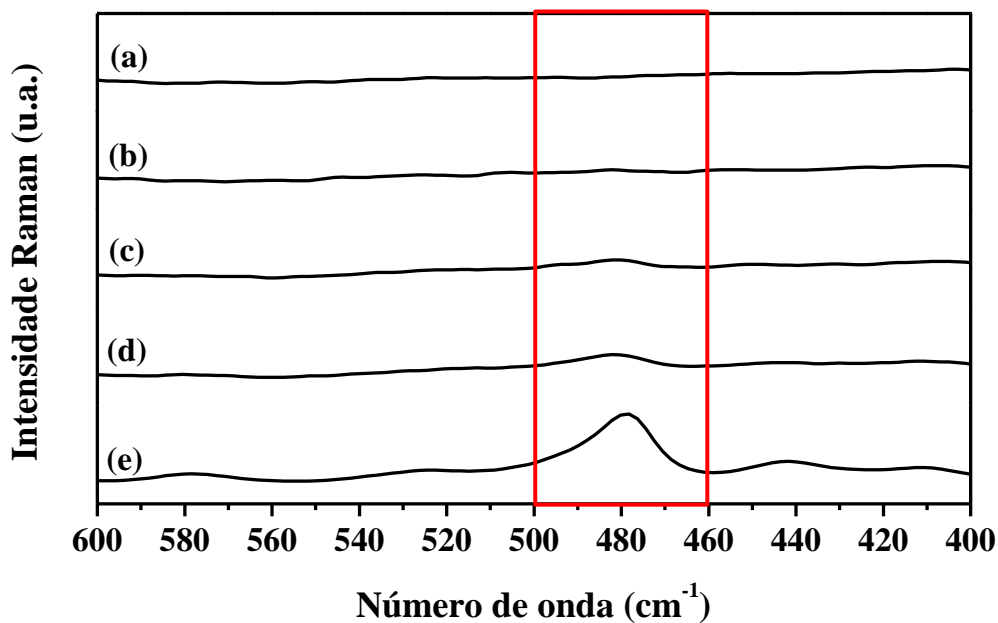


Figura 30 - Espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 4051 (b), com 6% de amido 4051 (c), com 10% de amido 4051 (d), e do próprio amido 4051 (e).

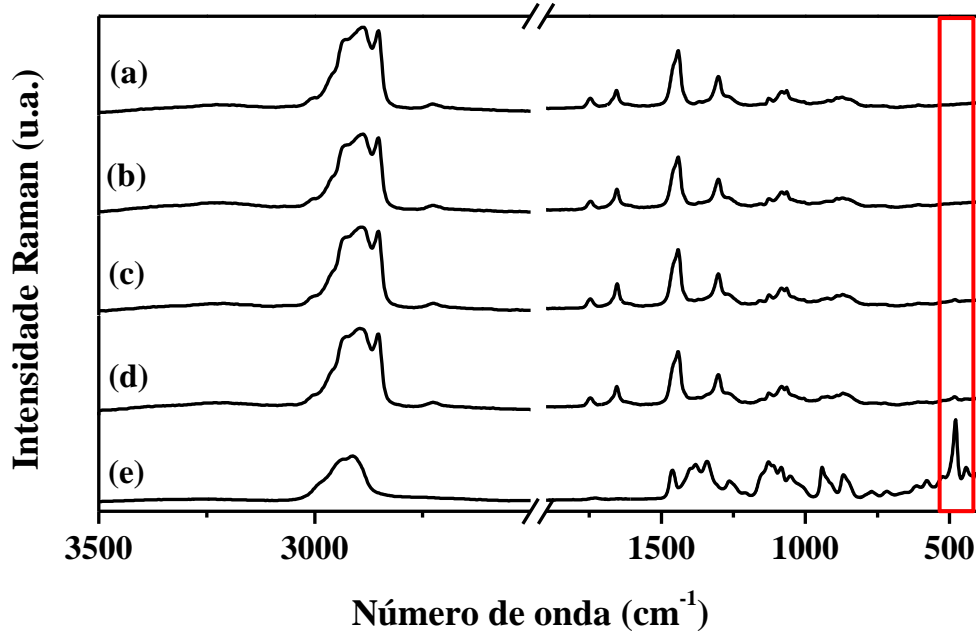
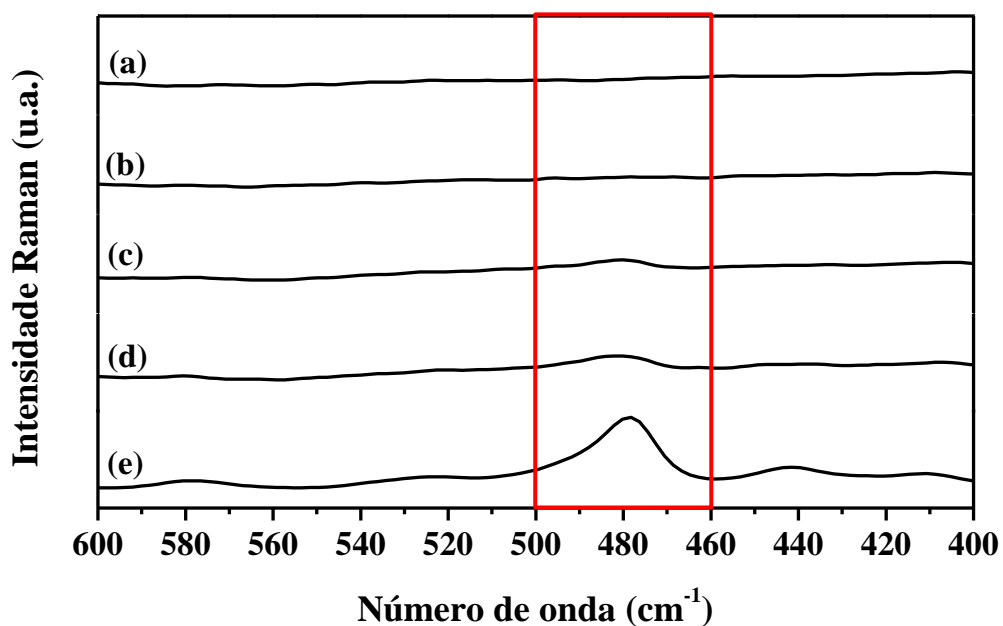


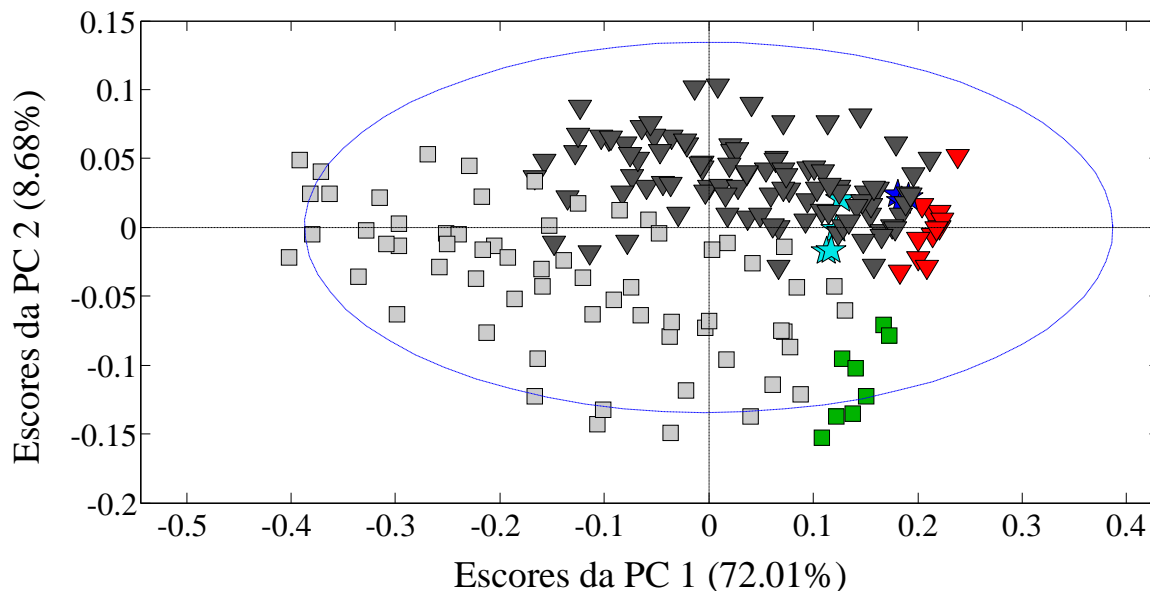
Figura 31 - Destaque para a região de 600 a 400 cm⁻¹ dos espectros Raman da amostra de requeijão padrão (a), com adição de 2% de amido 4051 (b), com 6% de amido 4051 (c), com 10% de amido 4051 (d), e do próprio amido 4051 (e).



6.4 Análise Exploratória das Amostras de Requeijão Comerciais e Adulteradas

No intuito de identificar a formação de agrupamentos entre as amostras de requeijão comerciais e entre as amostras adulteradas em laboratório (2,5 a 20% (m/m) de amido), realizou-se a análise de componentes principais. Para a construção do modelo utilizou-se a primeira derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média como pré-processamentos e 2 componentes principais. A Figura 32 mostra o gráfico dos escores das duas primeiras componentes principais (80,69% da variância dos dados) para as amostras comerciais de requeijão tradicional e *light* – com e sem amido - e também para as amostras adulteradas em laboratório. Pelo gráfico, percebe-se que a primeira componente principal promove uma distribuição lógica das amostras: as amostras comerciais sem amido ficaram concentradas do lado direito, enquanto que as adulteradas ficaram distribuídas por todo o gráfico de acordo com o teor de amido – as amostras que continham baixo teor de adulterante ficaram próximas às amostras comerciais e à medida que esse teor aumentava, a distância com relação às amostras comerciais também aumentava. Tal fato também ocorreu com as amostras comerciais com amido, as quais ficaram localizadas um pouco mais afastadas daquelas sem o carboidrato. O gráfico de pesos da componente principal 1 (Figura 33) confirma tal distribuição, uma vez que a região do espectro que mais tem importância na separação das amostras é a compreendida em 477 cm^{-1} , que, conforme discutido anteriormente, é a banda marcadora do amido.

Figura 32 - Gráfico de escores da PC1 *versus* PC2 das amostras comerciais tradicionais sem amido (▼), com amido (□), das amostras comerciais *light* sem amido (■), com amido (◻) e das amostras comerciais tradicionais (▼) e *light* (■) adulteradas em laboratório.



Através do gráfico de escores, também é possível perceber que a segunda componente principal promove uma ligeira separação entre as amostras tradicionais e *light* – as amostras tradicionais ficam concentradas na porção superior do gráfico e as amostras *light* ficam concentradas na porção inferior do mesmo. O que corrobora para tal análise é o gráfico de pesos dessa componente principal (Figura 34), pois, segundo ele, as regiões do espectro mais relevantes para essa distribuição são as relacionadas a modos vibracionais de lipídeos, como em 2929, 2886, 2852, 1652 e 1440 cm^{-1} .

Figura 33 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* número de onda (cm^{-1}).

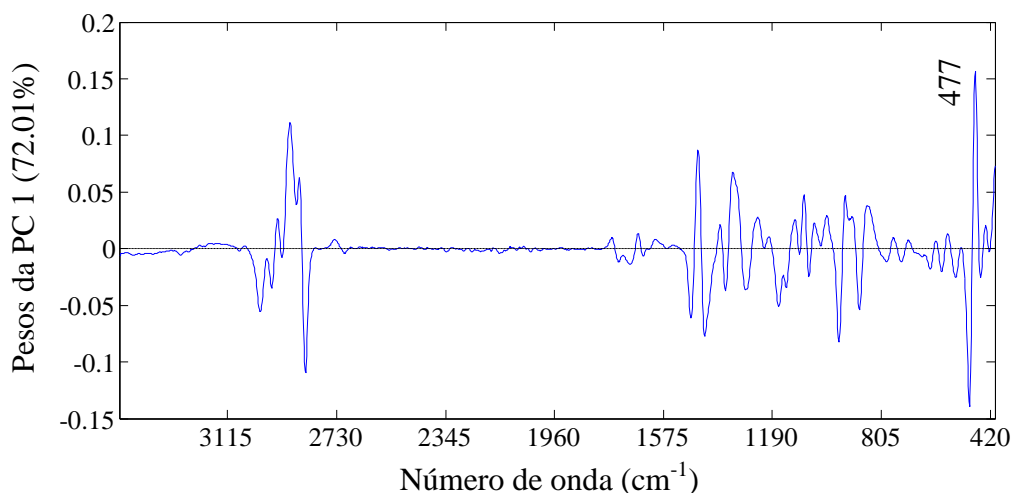
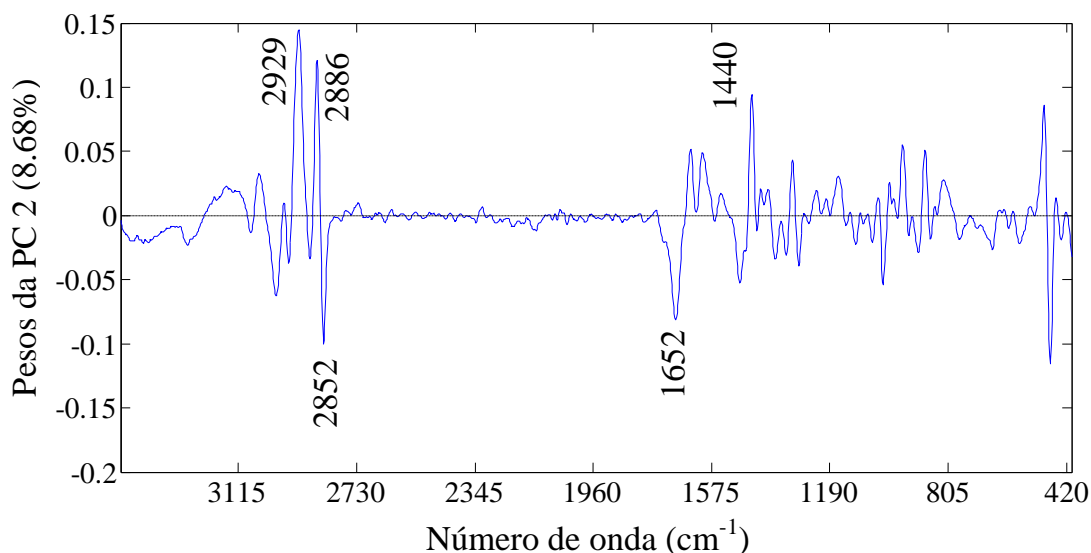


Figura 34 - Gráfico de pesos da PC2 *versus* número de onda (cm^{-1}).



Com base nestes resultados, as amostras foram divididas em amostras de requeijão tradicional e requeijão *light* e novamente foi realizada a análise de componentes principais para cada tipo de requeijão separadamente. Em ambos os casos, utilizou-se como pré-processamento dos dados a primeira derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média e os modelos foram construídos com 2 componentes principais. As Figuras 35 e 37 mostram o gráfico de escores das duas primeiras componentes principais para as amostras de requeijão tradicional e *light* comerciais e adulteradas, respectivamente. Assim como no caso em que as amostras de requeijão foram analisadas em conjunto, esses gráficos também levam à conclusão de

que a primeira componente principal promove a distribuição das amostras com base no teor de amido presente nas mesmas. E isso pode ser confirmado por meio dos gráficos de pesos dos respectivos casos estudados (Figuras 36 e 38), uma vez que eles mostram que a região espectral mais relevante para essa distribuição é a compreendida em 477 cm^{-1} .

Figura 35 - Gráfico de escores da PC1 *versus* PC2 das amostras de requeijão comercial tradicional sem amido (\blacktriangle), com amido (\blacksquare) e adulteradas em laboratório (\circ).

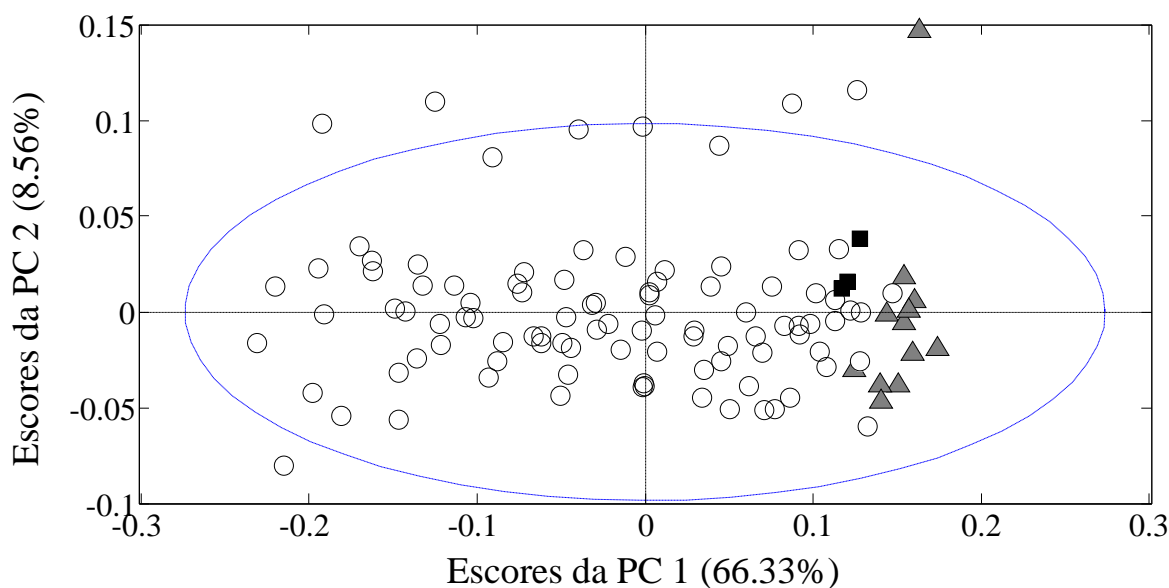


Figura 36 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* número de onda (cm^{-1}).

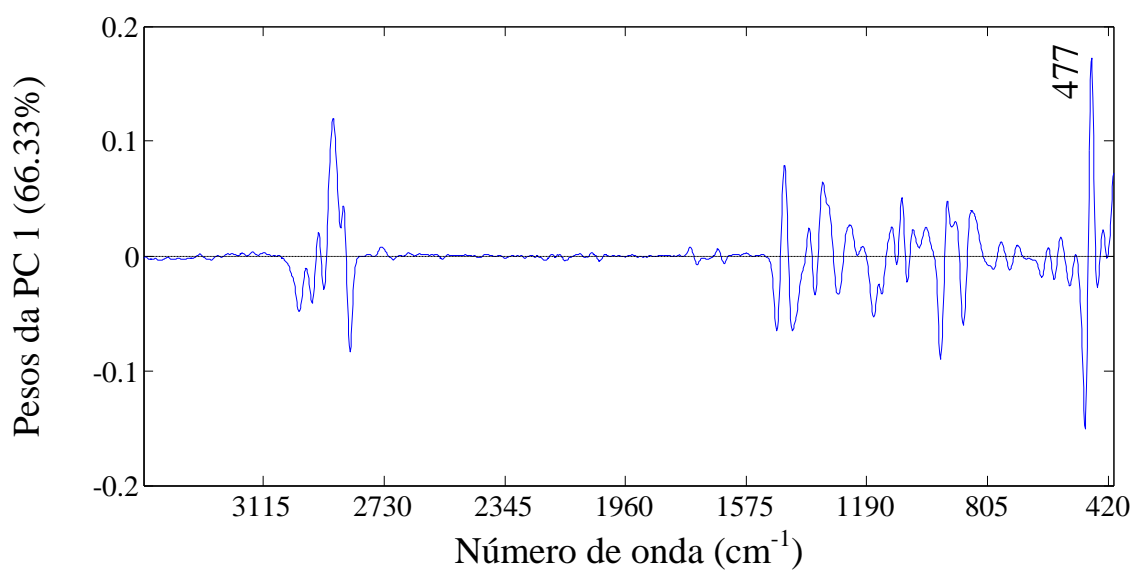


Figura 37 - Gráfico de escores da PC1 *versus* PC2 das amostras de requeijão comercial *light* sem amido (\blacktriangle), com amido (\blacksquare) e adulteradas em laboratório (\circ).

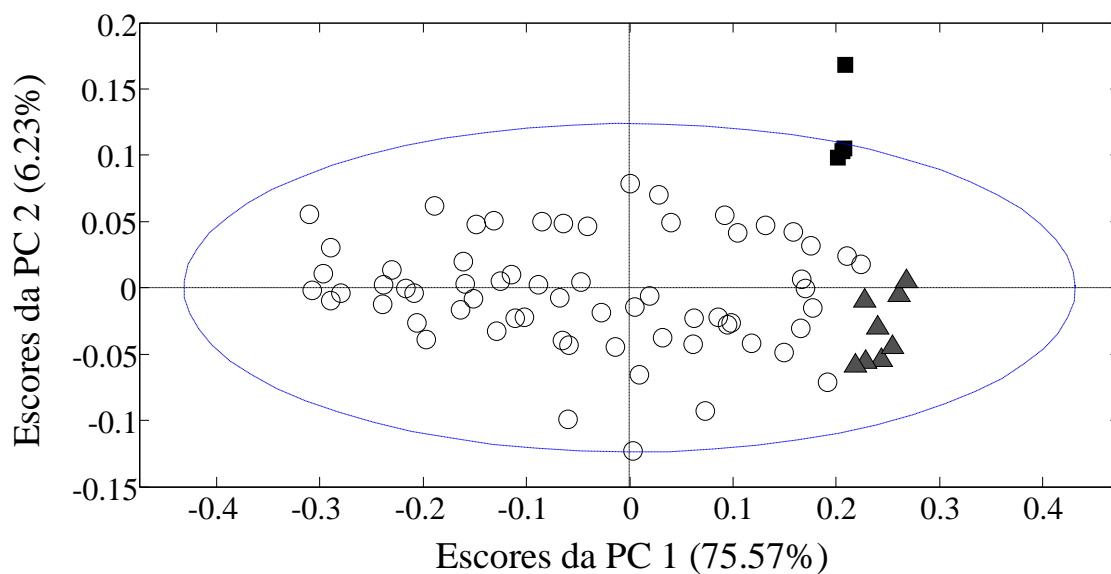
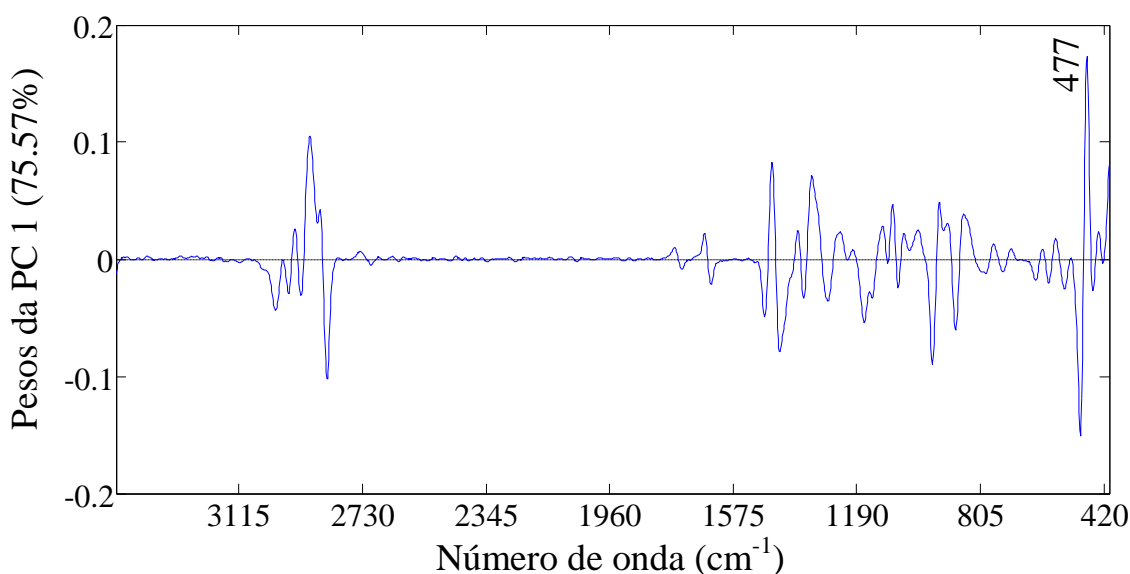


Figura 38 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* número de onda (cm^{-1}).



Com o objetivo de avaliar o comportamento das amostras de requeijão comercial juntamente com as amostras adulteradas preparadas pela empresa Gemacom Tech, empregou-se também a análise exploratória por meio da PCA para esse caso. A Figura 39 mostra o gráfico de escores das três primeiras componentes principais, que representam 71.58% da informação original. Nele, é possível perceber uma divisão das amostras de requeijão *light* das demais, seja com ou sem amido. Tal divisão é

promovida pela primeira componente principal e pode ser confirmada pela análise do seu gráfico de pesos (Figura 40). Nesse gráfico, nota-se que as regiões do espectro mais relevantes para a divisão são as relacionadas a modos vibracionais de lipídeos, como em 2886, 2852, 1652 e 1440 cm^{-1} . Além disso, também é visível a distribuição das amostras segundo o teor de amido nelas presente, promovida pela terceira componente principal. O seu gráfico de pesos (Figura 41) mostra que uma das regiões espectrais mais relevantes para a distribuição está compreendida em 477 cm^{-1} , utilizada neste estudo como banda marcadora do amido. Ainda com base na análise exploratória, é possível concluir que, apesar de ter-se utilizado dois tipos diferentes de amido na manufatura dos requeijões, não existem diferenças espectrais entre as amostras que contém um ou outro. Isso porque todas as amostras adulteradas preparadas em laboratório ficaram alocadas em um mesmo agrupamento.

Figura 39 - Gráfico de scores da PC1 *versus* PC2 *versus* PC3 das amostras de requeijão padrão (▼), requeijão adulterado com amido 2560 (●), requeijão adulterado com amido 4051 (●), requeijão comercial tradicional sem (▲) e com amido (▲) e requeijão comercial *light* sem (★) e com amido (★).

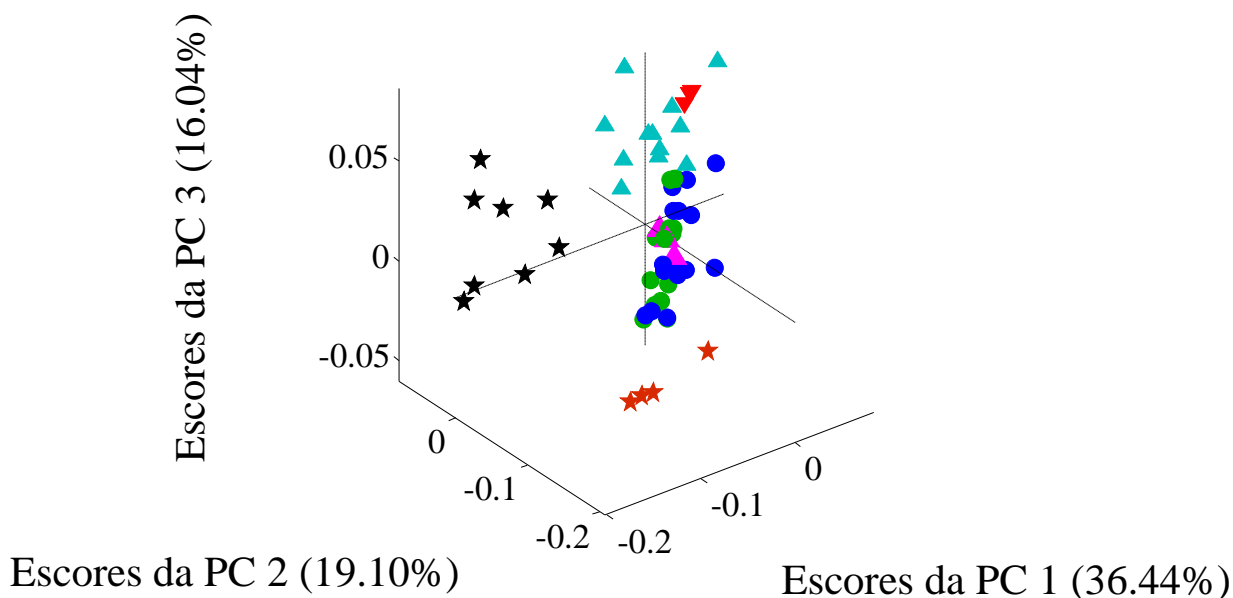


Figura 40 - Gráfico de pesos da primeira componente principal *versus* número de onda (cm^{-1}).

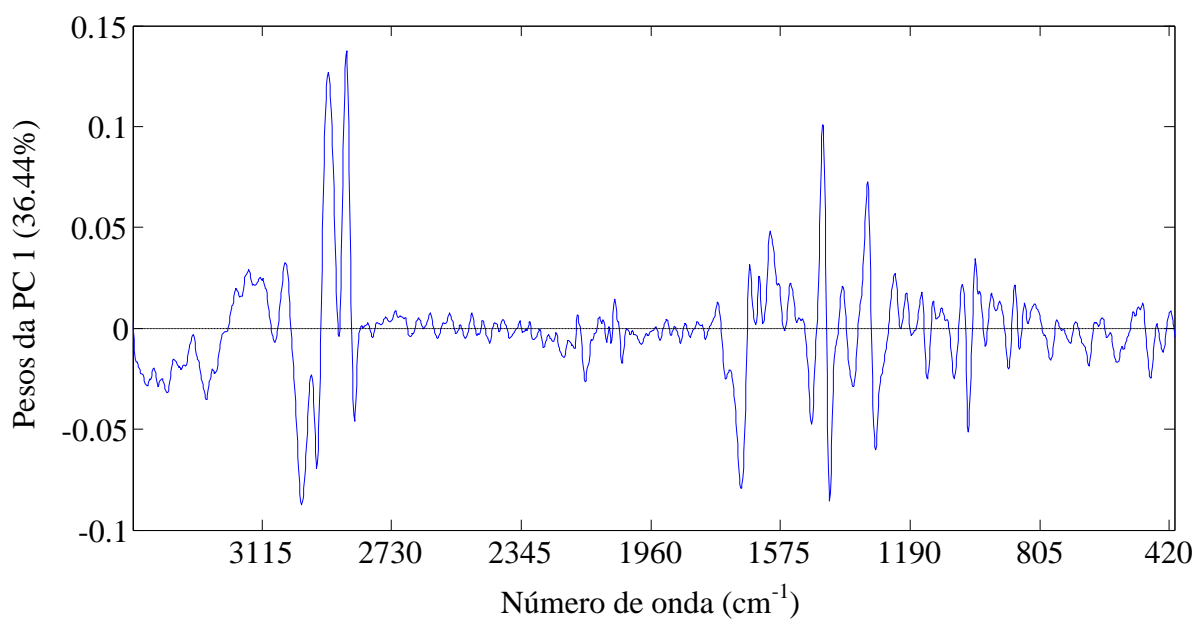
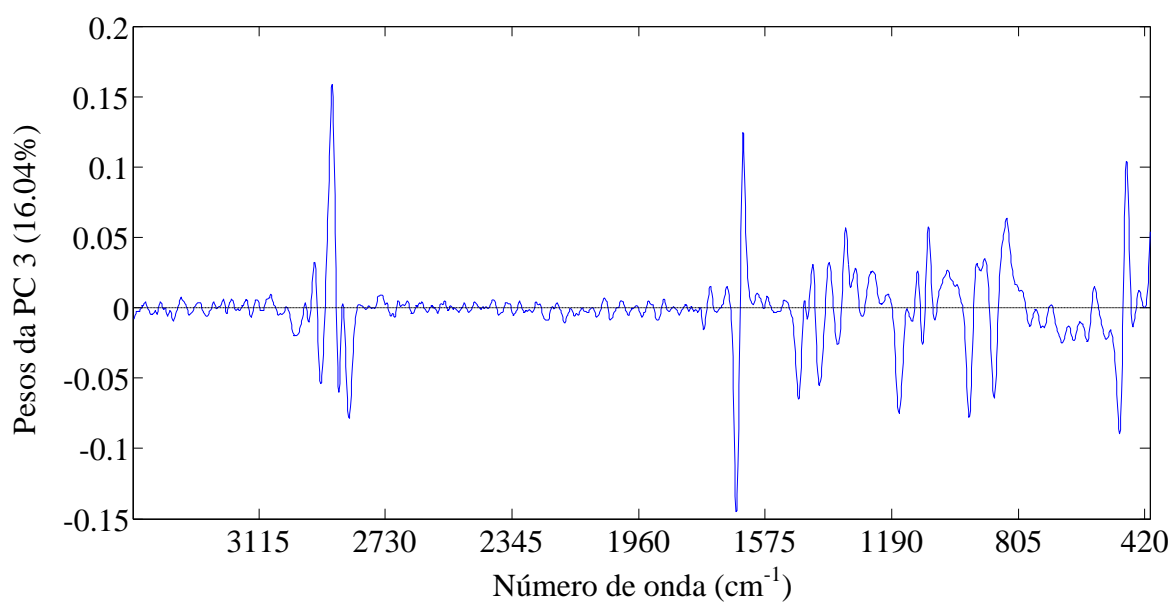


Figura 41 - Gráfico de pesos da terceira componente principal *versus* número de onda (cm^{-1}).



6.5 Classificação das Amostras de Requeijão Comerciais e Adulteradas

Embora os modelos construídos empregando o método não supervisionado (PCA) tenham conseguido separar as amostras adulteradas das não adulteradas, essa separação não foi feita de forma satisfatória, uma vez que as amostras com baixo teor de amido ficaram muito próximas das amostras comerciais. Por esta razão, foi empregado o método de classificação supervisionado PLS-DA, sendo este uma possibilidade de melhor distinguir as amostras de requeijão que contêm ou não amido. Foi construído um modelo de previsão por meio do uso de amostras alocadas em classes previamente conhecidas e, uma vez validado o modelo, este pode ser utilizado para prever se uma amostra contém ou não o carboidrato em questão.

Os valores previstos pelo modelo PLS-DA são zero (amostras sem amido) e um (amostras com amido). É calculado então um valor limite entre os valores previstos, onde as amostras acima deste valor indicam que estas pertencem à classe modelada, ou seja, à classe das amostras com amido.

O desempenho do modelo foi avaliado com base na classificação correta da amostra, na sensibilidade, que é a capacidade do modelo de reconhecer uma amostra adulterada como adulterada, e na especificidade, que é a capacidade de reconhecer amostras não adulteradas como não adulteradas.

Para as amostras de requeijão tradicional empregou-se o PLS-DA com 4 variáveis latentes e, como pré-processamentos, a segunda derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média. Os resultados do modelo construído são mostrados na Figura 42 e as performances do modelo para as amostras de treinamento e validação são apresentadas na Tabela 6.

Figura 42 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial tradicional sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ – calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).

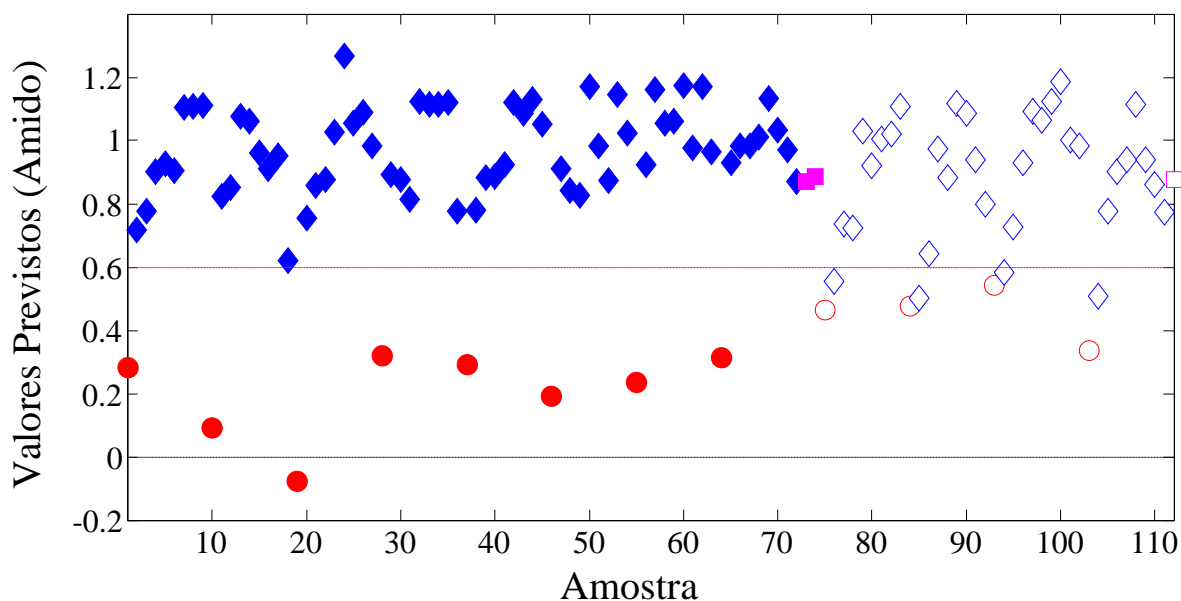


Tabela 6 - Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras tradicionais adulteradas e não adulteradas.

	Calibração (%)	Previsão (%)
% Correta	100,0	94,1
Sensibilidade	100,0	88,2
Especificidade	100,0	100,0

Na etapa de calibração, o modelo foi capaz de reconhecer corretamente todas as amostras comerciais e adulteradas, sendo sua sensibilidade igual a 100,0% e a sua especificidade também igual a 100,0%. Na etapa de previsão, o modelo classificou incorretamente quatro amostras adulteradas, sendo sua sensibilidade igual a 88,2% e sua especificidade igual a 100,0%. As amostras adulteradas classificadas incorretamente foram identificadas como contendo 2,5% de amido, o que indica que ainda sim os resultados encontrados para o modelo são satisfatórios, uma vez que ele foi capaz de identificar e classificar amostras com um teor igual a 5% ou mais de adulterante. É interessante notar que as amostras comerciais que contêm amido em sua composição

original foram classificadas corretamente pelo modelo, tanto na etapa de calibração quanto na de previsão.

Para as amostras de requeijão *light* empregou-se o PLS-DA com 5 variáveis latentes e, como pré-processamentos, segunda derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média. Os resultados do modelo construído são mostrados na Figura 43 e as performances do modelo para as amostras de treinamento e validação são apresentadas na Tabela 7.

Figura 43 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial *light* sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ – calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).

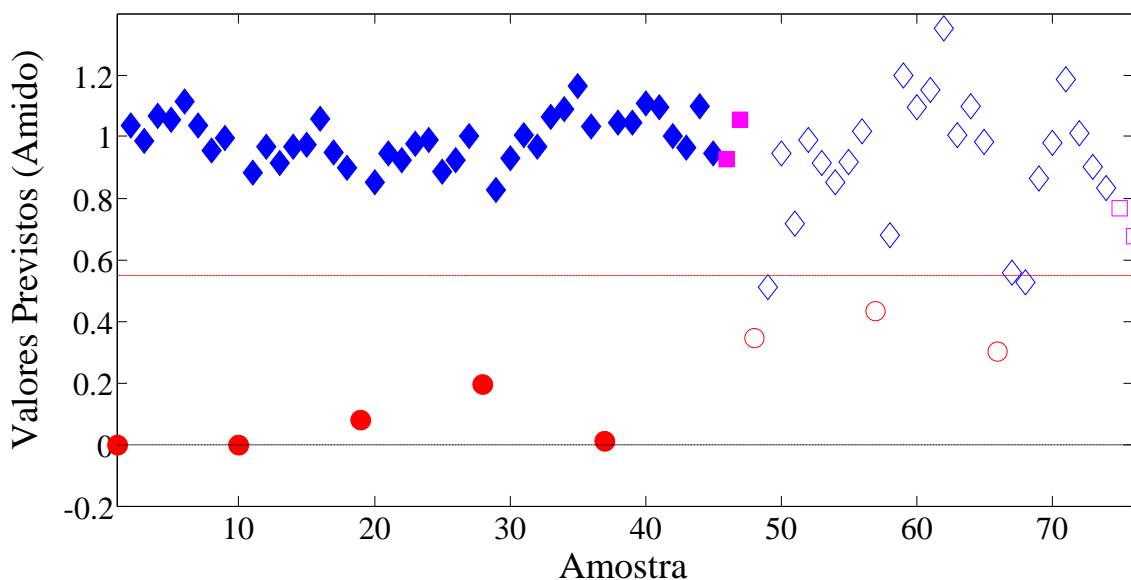


Tabela 7 - Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras *light* adulteradas e não adulteradas.

	Calibração (%)	Previsão (%)
% Correta	100,0	96,2
Sensibilidade	100,0	92,3
Especificidade	100,0	100,0

Na etapa de calibração, o modelo foi capaz de reconhecer corretamente todas as amostras comerciais e adulteradas, sendo sua sensibilidade igual a 100,0% e a sua

especificidade também igual a 100,0%. Na etapa de previsão, o modelo classificou incorretamente três amostras adulteradas, sendo sua sensibilidade igual a 92,3% e sua especificidade igual a 100%, pois classificou corretamente todas as amostras comerciais. Duas das amostras adulteradas classificadas incorretamente foram identificadas como contendo 2,5% de amido e uma contendo 5%. Assim como para o modelo das amostras tradicionais, é importante notar que as amostras comerciais *light* que contêm amido em sua composição original foram classificadas corretamente pelo modelo, tanto na etapa de calibração quanto na de previsão.

No intuito de melhorar os modelos de classificação, realizou-se a restrição da faixa espectral de 3500 a 400 cm^{-1} para 600 a 400 cm^{-1} , uma vez que a banda de interesse, utilizada como marcadora da presença de amido, encontra-se em 477 cm^{-1} . Dessa forma, é possível minimizar as possíveis interferências causadas pelas demais informações espectrais.

Para as amostras de requeijão tradicional, o novo modelo de classificação foi construído com 3 variáveis latentes e, como pré-processamentos, utilizou-se a primeira derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 44 e as performances do modelo para as amostras de treinamento e validação são apresentadas na Tabela 8.

Figura 44 - Valores previstos pelo novo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial tradicional sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ – calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).

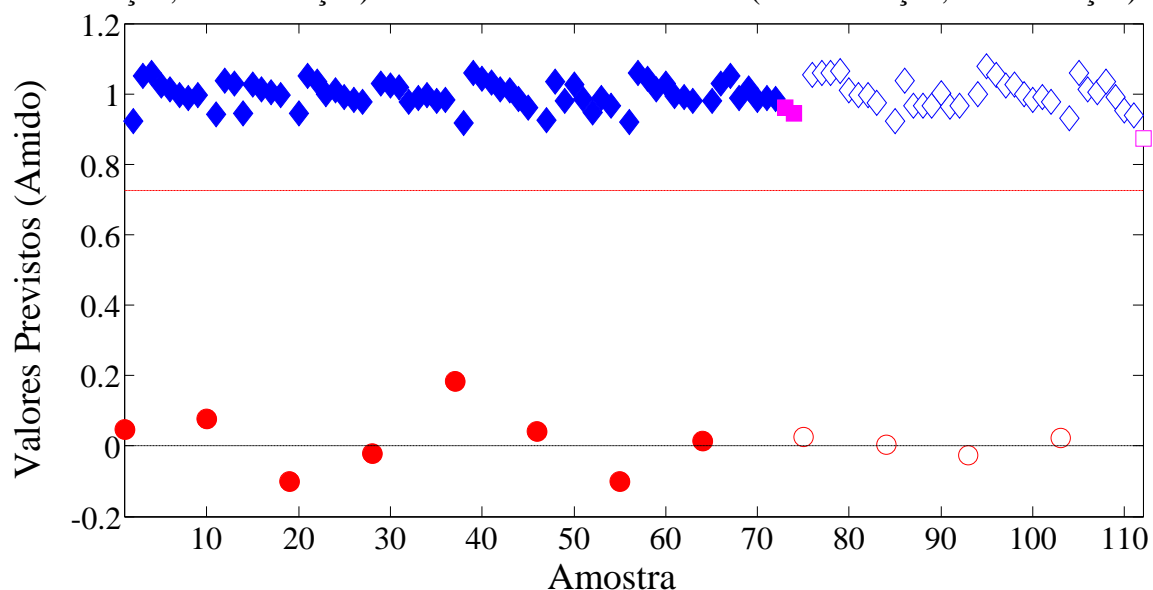


Tabela 8 - Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras tradicionais adulteradas e não adulteradas.

	Calibração (%)	Previsão (%)
% Correta	100,0	100,0
Sensibilidade	100,0	100,0
Especificidade	100,0	100,0

O modelo obtido foi capaz de classificar corretamente todas as amostras, tanto na etapa de calibração, quanto na de previsão, resultando em uma sensibilidade igual a 100,0% e uma especificidade também igual a 100,0% para ambas as etapas.

O novo modelo de classificação das amostras *light* foi construído com os mesmos parâmetros do modelo das amostras tradicionais e os resultados obtidos são mostrados na Figura 45 e as performances do modelo para as amostras de treinamento e validação são apresentadas na Tabela 9.

Figura 45 - Valores previstos pelo novo modelo PLS-DA para as amostras de requeijão comercial *light* sem amido (● – calibração; ○ – validação), com amido (■ – calibração; □ – validação) e adulteradas em laboratório (◆ – calibração; ◇ – validação).

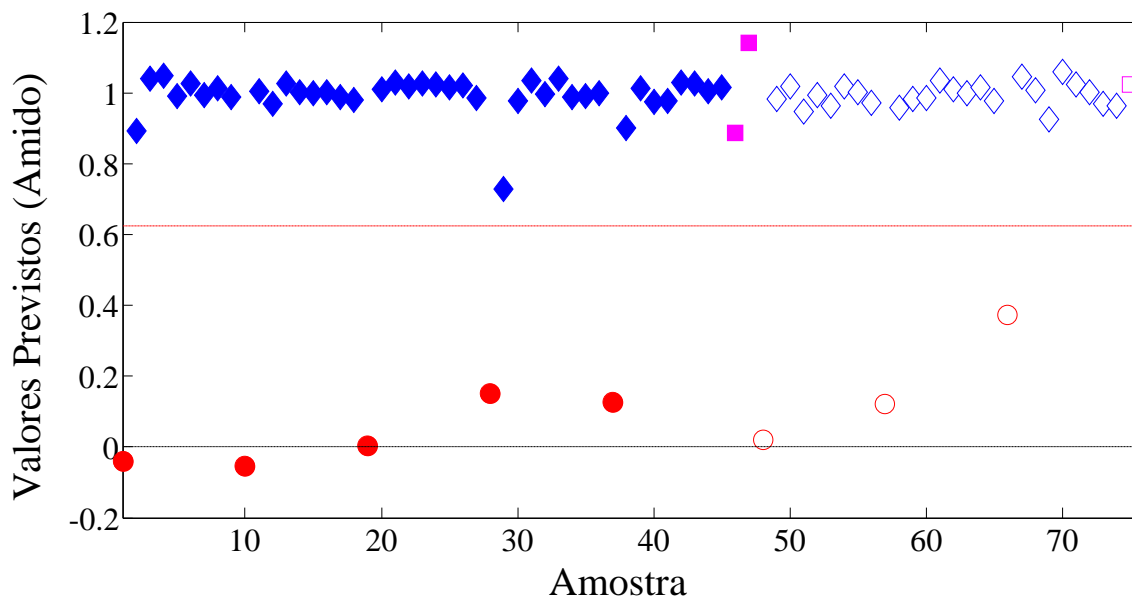


Tabela 9 - Porcentagem das amostras classificadas corretamente (% Correta), sensibilidade e especificidade alcançadas para o conjunto de amostras *light* adulteradas e não adulteradas.

	Calibração (%)	Previsão (%)
% Correta	100,0	100,0
Sensibilidade	100,0	100,0
Especificidade	100,0	100,0

Neste caso, o modelo também classificou corretamente todas as amostras de calibração e previsão, resultando em 100,0% para os parâmetros sensibilidade e especificidade nas duas etapas.

Além dos modelos construídos com as amostras adulteradas em laboratório, também foram obtidos modelos de classificação a partir das amostras contendo amido preparadas industrialmente. Tanto para o modelo das amostras tradicionais, quanto para o modelo das amostras *light*, foram utilizadas três variáveis latentes e, como pré-processamentos, utilizou-se a primeira derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média. Os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 46a e 46b e na Tabela 10.

Figura 46 - Resultados previstos pelos modelos PLS-DA das amostras tradicionais (a) e *light* (b): amostras de requeijão padrão (▶ - calibração; ▷ - validação), requeijão adulterado com amido 2560 (● - calibração; ○ - validação), requeijão adulterado com amido 4051 (● - calibração; ○ - validação), requeijão comercial sem amido (◆ - calibração; ◇ - validação) e requeijão comercial com amido (■ - calibração; □ - validação).

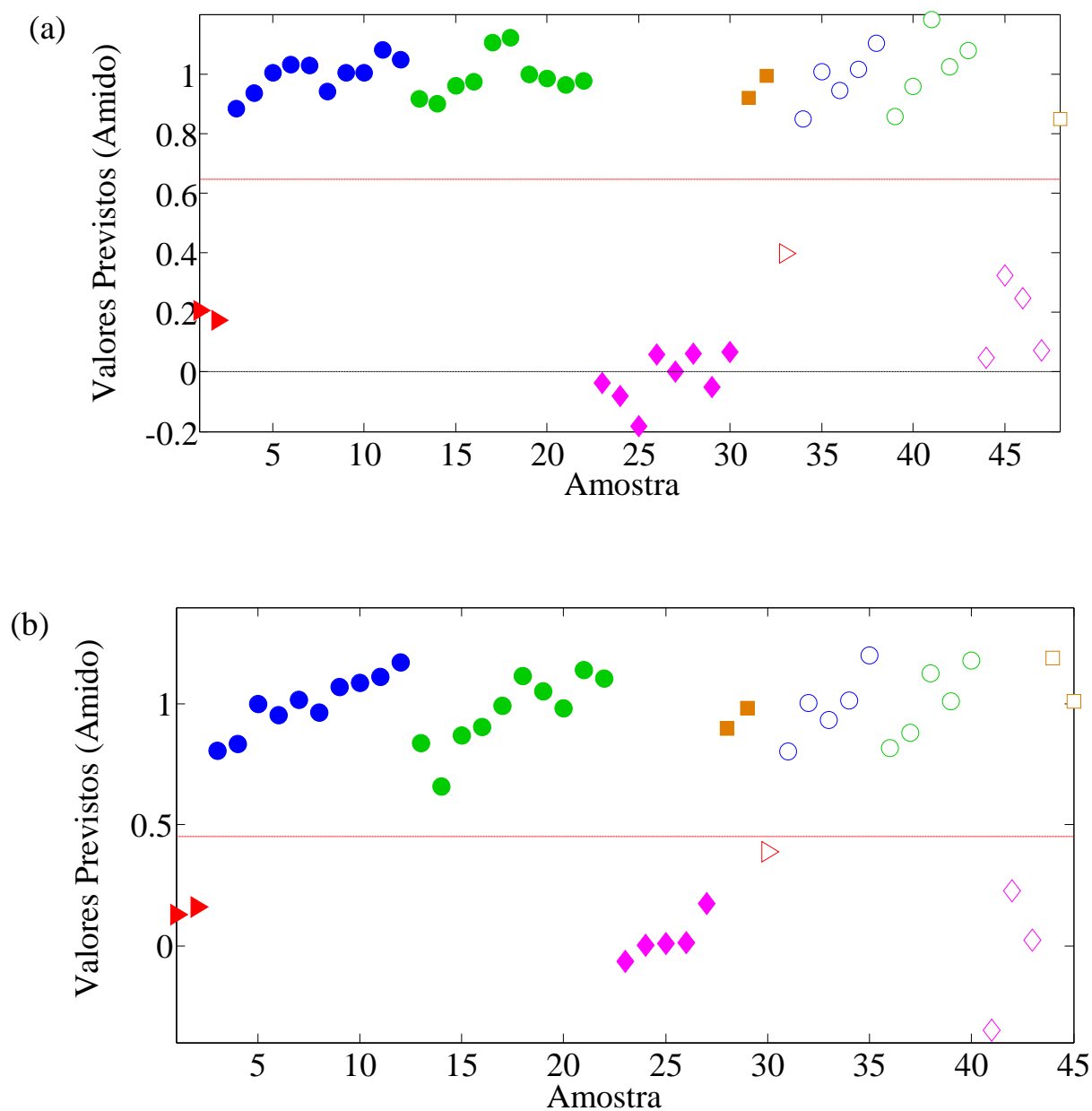


Tabela 10 - Resultados obtidos dos modelos PLS-DA para as amostras tradicionais e *light*.

	Amostras Tradicionais		Amostras <i>Light</i>	
	Calibração (%)	Previsão (%)	Calibração (%)	Previsão (%)
% Correta	100,0	100,0	100,0	100,0
Sensibilidade	100,0	100,0	100,0	100,0
Especificidade	100,0	100,0	100,0	100,0

Nos dois modelos obtidos, todas as amostras – adulteradas ou não - foram classificadas corretamente, resultando em 100% de sensibilidade e 100% de especificidade para ambos os casos. Diante do excelente desempenho dos dois últimos modelos, não foi necessário restringir a faixa espectral, como foi feito para as amostras adulteradas em laboratório.

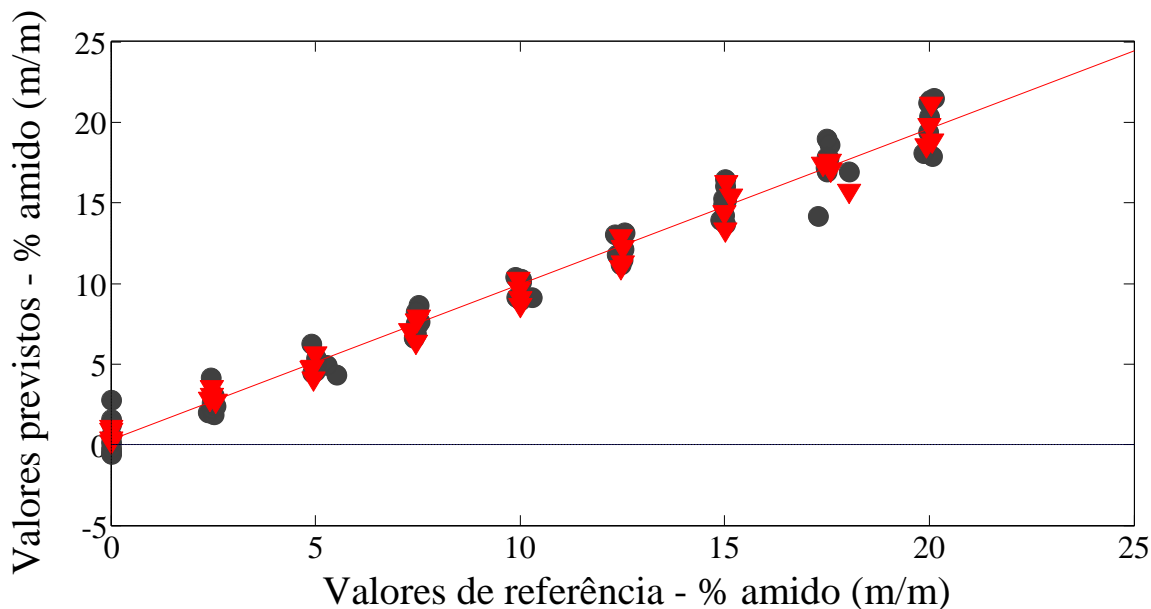
Assim, os modelos construídos empregando a PLS-DA apresentaram resultados melhores para a classificação das amostras de requeijão como adulteradas ou não do que a PCA, principalmente para baixas concentrações. As informações fornecidas pelos espectros Raman das amostras juntamente com esta ferramenta podem auxiliar na identificação de requeijões contendo amido e podem ser empregadas como teste de *screening*, onde permitem a classificação em categorias como negativo, positivo ou suspeito para adição do referido adulterante. Além disso, esse tipo de análise apresenta o mesmo desempenho para diferentes tipos de amido, independentemente da sua constituição em termos de amilose e amilopectina, o que se constitui em uma vantagem sobre a metodologia oficial. Isso porque, segundo já descrito na seção 1.5.2, a reação utilizada para identificar qualitativamente a presença de amido em amostras lácteas ocorre somente com a amilose; dessa forma, a utilização de um amido com baixo teor de amilose implicaria em um resultado falso negativo para a amostra submetida ao teste.

6.6 Análise Quantitativa das Amostras de Requeijão Comerciais e Adulteradas

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

Primeiramente, os modelos foram construídos com as amostras comerciais puras e adulteradas em laboratório, com 2,5 a 20% (m/m) de amido. Para as amostras tradicionais, empregou-se como pré-processamentos dos dados a segunda derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média. A escolha do número de variáveis latentes foi feita com base no menor valor do RMSECV; com base neste parâmetro, o número escolhido para este modelo foi de 3 variáveis latentes, com RMSECV de 1,22%. A Figura 47 mostra a correlação entre os valores de referência (quantidades de amido adicionadas no laboratório) com os valores previstos utilizando as informações fornecidas pelos espectros Raman das amostras. A avaliação do desempenho do modelo foi realizada através da determinação dos valores previstos pelo modelo, seus respectivos erros relativos e do valor de RMSEP, que expressa o grau de concordância entre o valor estimado pelo modelo e o valor de referência. O RMSEP obtido para o modelo foi de 0,89% (m/m) e o coeficiente de regressão da curva foi de 0,988. Na avaliação dos erros relativos, observou-se que estes foram maiores para as amostras com altos teores de amido, enquanto que, para as amostras com 7,5, 10 e 12,5% (m/m) de amido, estes foram bastante baixos.

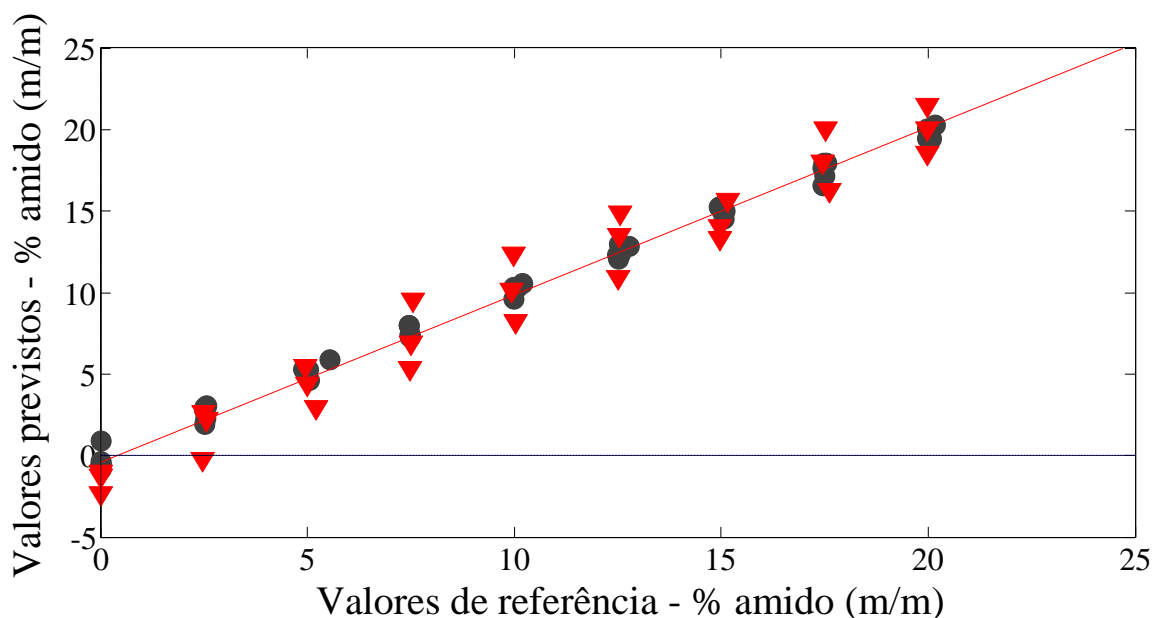
Figura 47 - Valores previstos *versus* valores de referência para o modelo PLS das amostras tradicionais puras e adulteradas em laboratório; amostras de calibração (●) e amostras de validação (▼).



Assim como para as amostras tradicionais, para as amostras *light* também empregou-se como pré-processamentos dos dados a segunda derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média. O número de variáveis latentes escolhido para o modelo foi igual a 3, com RMSECV de 0,98%. A Figura 48 mostra a correlação entre os valores de referência (quantidades de amido adicionadas no laboratório) com os valores previstos utilizando as informações fornecidas pelos espectros Raman das amostras *light*. O RMSEP obtido para o modelo foi de 1,55% (m/m) e o coeficiente de regressão da curva foi de 0,992. Ao contrário das amostras tradicionais, a avaliação dos erros relativos das amostras *light* revela que estes foram maiores para as amostras com 7,5, 10 e 12,5% (m/m) de amido.

Uma observação importante é que, nos modelos de regressão PLS das amostras tradicionais e *light*, os valores de previsão para algumas amostras sem adição de amido aparecem com valores diferentes de zero, o que pode indicar um resultado falso positivo de fraude.

Figura 48 - Valores previstos *versus* valores de referência para o modelo PLS das amostras *light* puras e adulteradas em laboratório; amostras de calibração (●) e amostras de validação (▼).

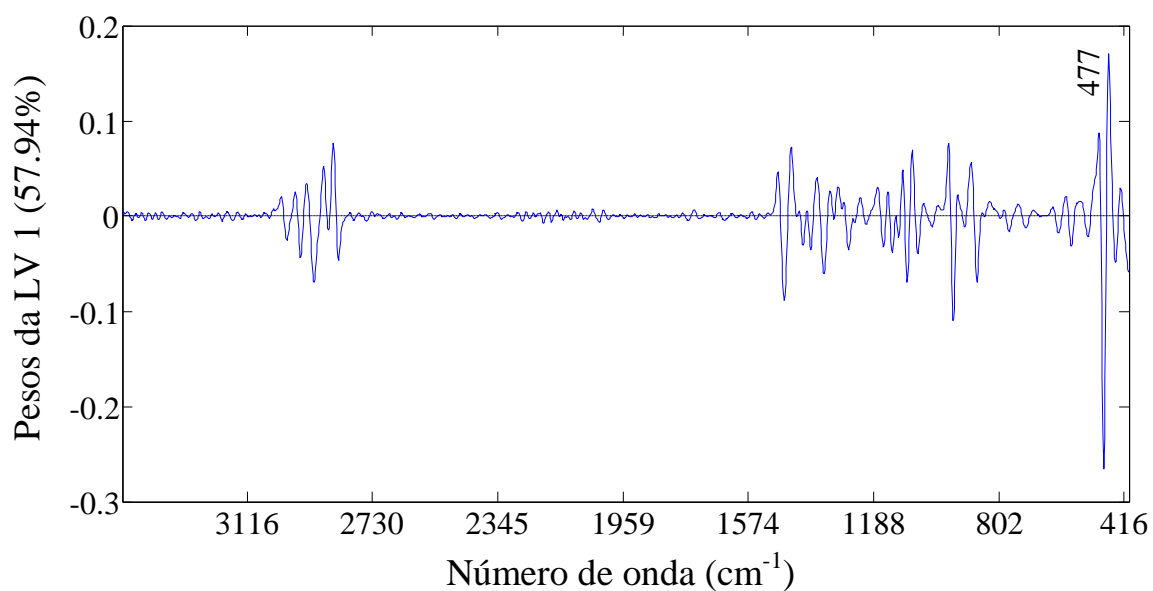


Os gráficos de pesos, mostrados nas Figuras 49a e 49b, indicam que a região do espectro Raman que mais contribui para os modelos de regressão, tanto para as amostras

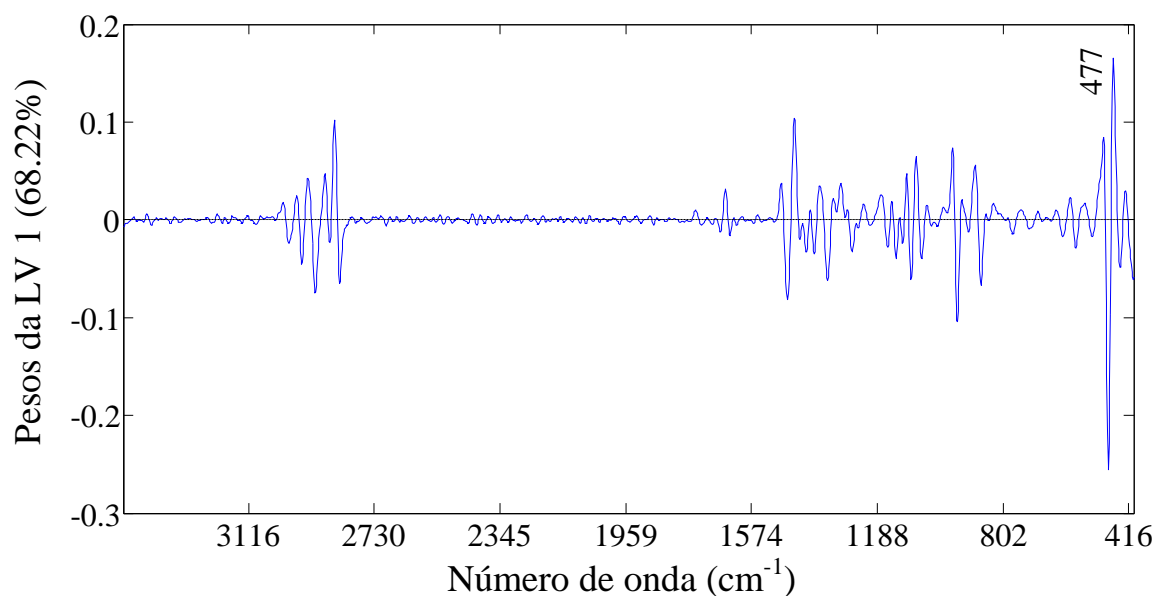
tradicionais, quanto para as *light*, é a situada em 477 cm^{-1} , indicadora da presença de amido.

Figura 49 - Gráfico dos pesos da LV 1 *versus* os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do amido das amostras tradicionais (a) e *light* (b).

(a)



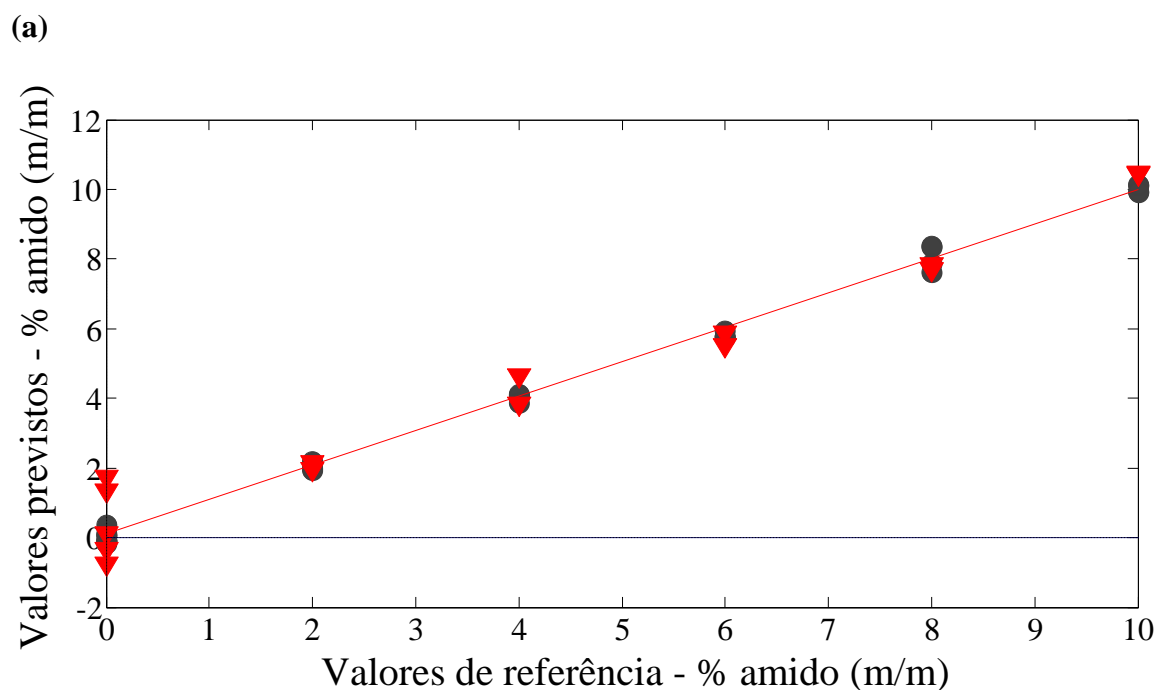
(b)



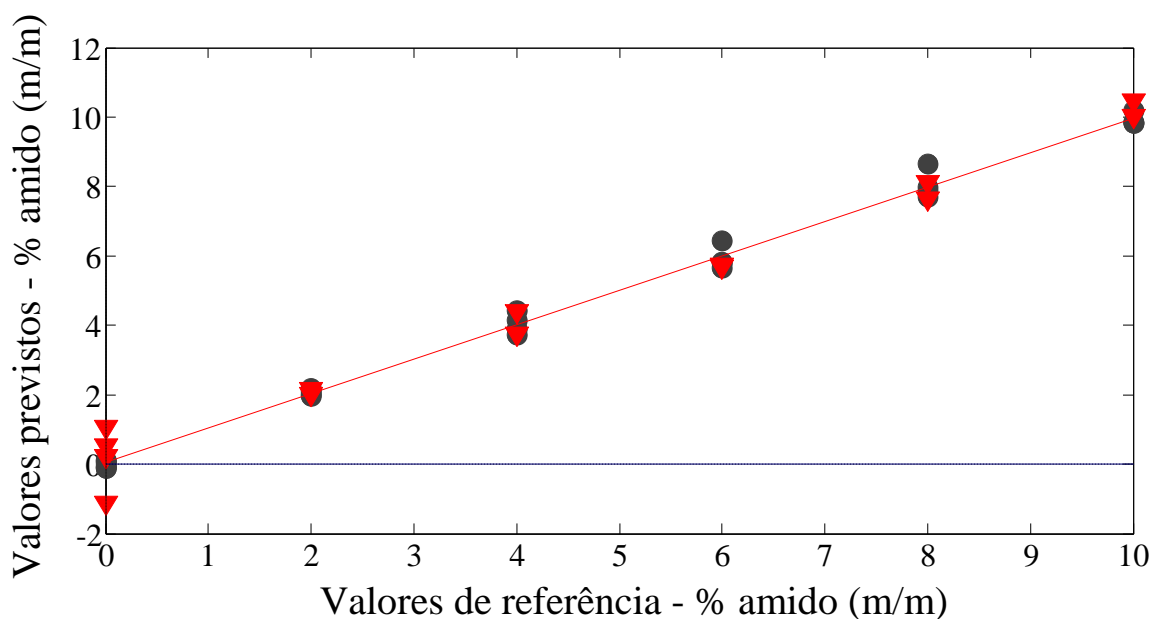
Também foram construídos modelos de regressão usando as amostras comerciais puras e as manufaturadas na empresa Gemacom Tech, com amido nas proporções de 2 a

10% (m/m), além da amostra padrão – sem amido. Tanto para o modelo das amostras tradicionais quanto para as amostras *light*, empregou-se como pré-processamentos dos dados a primeira derivada, a normalização por comprimento e a centralização dos dados na média. A escolha do número de variáveis latentes foi feita com base no menor valor do RMSECV; com base neste parâmetro, o número escolhido para ambos os modelos foi de 4 variáveis latentes, com RMSECV de 0,36% para as amostras tradicionais e 0,80% para as amostras *light*. A Figura 50a mostra a correlação entre os valores de referência (quantidades de amido adicionadas durante a fabricação das amostras) com os valores previstos utilizando as informações fornecidas pelos espectros Raman das amostras tradicionais, ao passo que a Figura 50b mostra o gráfico para as amostras *light*.

Figura 50 - Valores previstos *versus* valores de referência para os modelos PLS das amostras tradicionais (a) e *light* (b), construídos a partir das amostras de requeijão comerciais puras e das amostras manufaturadas na empresa Gemacom Tech; conjunto de calibração (●) e de validação (▼).



(b)



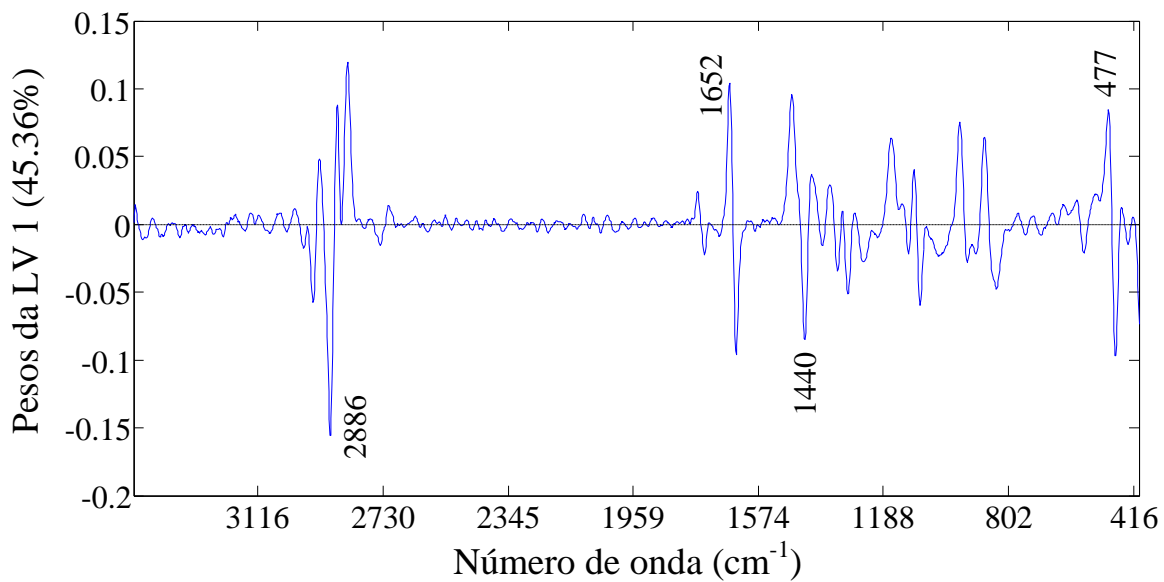
A avaliação do desempenho dos modelos foi realizada através da determinação dos valores previstos pelo modelo, seus respectivos erros relativos e do valor de RMSEP, que expressa o grau de concordância entre o valor estimado pelo modelo e o valor de referência. O RMSEP obtido para o modelo das amostras tradicionais foi de 0,67% (m/m) e o coeficiente de regressão da curva foi de 0,987; para as amostras *light*, o valor de RMSEP foi de 0,50% (m/m) e o coeficiente de regressão da curva foi igual a 0,991, o que mostra uma boa relação entre os valores de referência e os valores previstos pela regressão PLS nos dois modelos.

Assim como para os modelos construídos com as amostras adulteradas em laboratório, é importante observar que os valores de previsão para algumas amostras sem adição de amido aparecem com valores diferentes de zero, o que pode indicar um resultado falso positivo de fraude.

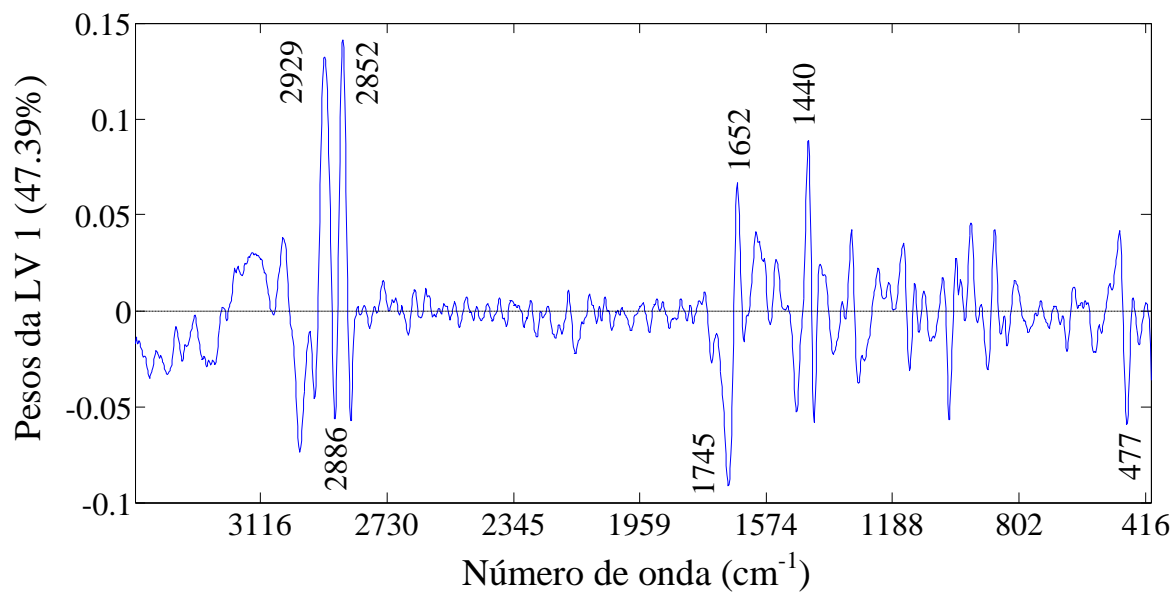
Os gráficos de pesos, mostrados nas Figuras 51a e 51b, indicam que as regiões do espectro Raman que mais contribuem para os modelos de regressão situam-se em 2886, 1652 e 1440 cm^{-1} , relacionadas a modos vibracionais de lipídios, conforme já discutido na Seção 6.1. Tal fato pode estar relacionado à diluição da quantidade total do referido nutriente à medida que o teor de adulterante aumenta. Além dessas regiões, a banda em 477 cm^{-1} , indicadora da presença de amido, também contribui significativamente para os modelos.

Figura 51 - Gráfico dos pesos da LV 1 *versus* os números de onda (variáveis) para o modelo de regressão do amido das amostras tradicionais (a) e *light* (b).

(a)



(b)



7 CONCLUSÕES

A espectroscopia Raman permitiu a identificação qualitativa da composição das amostras de requeijão estudadas e forneceu perfis ligeiramente diferentes para as amostras tradicionais e *light*. Além disso, foi possível identificar visualmente a presença ou ausência de amido através da banda marcadora. Neste sentido, a espectroscopia Raman também contribuiu para a comparação das amostras de requeijão adulteradas em laboratório com as amostras manufaturadas na empresa Gemacom Tech, uma vez que foi possível observar no espectro quais foram as mudanças ocorridas na estrutura do amido após o tratamento térmico presente na fabricação do laticínio em questão.

A análise de componentes principais mostrou-se eficiente na separação das amostras comerciais de requeijão tradicional e *light*, porém esta separação não foi eficiente para diferenciar as amostras modificadas em laboratório, com adição de amido, das amostras comerciais. Entretanto, o modelo construído com as amostras comerciais puras e com as amostras adulteradas manufaturadas mostrou-se mais eficiente, tendo formado agrupamentos diferentes para as amostras com e sem redução de gordura e para as amostras com e sem amido.

O método de classificação aplicado (PLS-DA) apresentou melhores resultados que a PCA. No modelo construído a partir das amostras comerciais puras e das amostras adulteradas manufaturadas, todas elas foram classificadas corretamente, quando se utilizou toda a faixa espectral. Por outro lado, para obter o mesmo resultado com o modelo construído a partir das amostras comerciais puras e adulteradas em laboratório, foi necessário fazer seleção de variáveis, restringindo a faixa espectral à região correspondente à banda marcadora do amido. Ademais, o método usado apresenta uma vantagem com relação ao teste do Lugol, uma vez que os resultados são obtidos com o mesmo desempenho, independentemente do tipo de amido usado no produto.

Os modelos de regressão obtidos através do PLS mostram-se satisfatórios. Entretanto, tanto para os modelos construídos a partir das amostras comerciais puras e adulteradas em laboratório quanto para aqueles construídos com as amostras adulteradas manufaturadas, os valores de previsão para algumas amostras sem adição de amido aparecem com valores diferentes de zero, o que pode indicar um resultado falso positivo de fraude.

Finalmente, o uso da espectroscopia Raman aliado a ferramentas quimiométricas apresenta grande potencial na avaliação da qualidade de requeijão, bem como no

controle de qualidade durante a produção do mesmo. Tal abordagem de análise é isenta da necessidade de métodos de separação e de outras etapas de preparo de amostras, a análise pode ser feita de forma rápida e sem geração de resíduos e apresenta bons resultados, como os mostrados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALESI, M. C. M. **Avaliação da hidrólise alcalina da gordura sobre a biodegradação anaeróbia de soro de queijo**. 2005, 83p. Dissertação (Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.
- ALMEIDA, M. R. et al. Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 7, p. 2693 – 2701, 2010.
- ALVES, R. M. V. et al. Effect of light and packages on stability of spreadable processed cheese. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 365 – 373, 2007.
- AOAC (Association Official Methods of Analysis AOAC International), **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18^a Edição, 4^a Revisão, 2011.
- BARANSKA, M. et al. In Situ Simultaneous Analysis of Polyacetylenes, Carotenoids and Polysaccharides in Carrot Roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6565 – 6571, 2005.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p. 166 – 173, 2003.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4 ed. Berlin: Springer, 2009. 1070 p.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, F. A. **Introdução à química de alimentos**. 3 ed. Campinas: Varela, 2003. 238 p.
- 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.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004 – 1011, 2004.

BRASIL, decreto n° 2244 de 4 de junho de 1997. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção I, 05 de junho de 1997a, p. 11555.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos**. Portaria n° 356. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de queijo processado ou fundido, processado pasteurizado ou fundido UHT (UAT). Brasília, 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos**. Portaria n° 359 de 04 de novembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão Cremoso ou Requesón. Brasília, 1997c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Número 68, 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 14 de dezembro de 2006, seção 1, página 8.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, p. 2125 – 2154, 2000.

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

BRIMHALL, B. Structure of pyrodextrins. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 72 – 75, 1944.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4 ed., v. 1. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. 590 p.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, v. 8, p. 84 – 99, 1985.

CAREY, F. A. **Inorganic Chemistry**. 4 ed. – International Edition. Boston: MC Graw Hill, 2000. 1270 p.

CAVALCANTE, A. B. D. **Desenvolvimento e padronização de formulação para o processamento de requeijão tradicional**. 1991, 112p. Dissertação (Engenharia dos Alimentos), Faculdade de Engenharia dos Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1991.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2 ed. Campinas: Unicamp, 2003. 207 p.

CELEDÓN, A.; AGUILERA, J. M. Applications of Microprobe Raman Spectroscopy in Food Science. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 101-108, 2002.

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

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. **UEPG - Exact and Soil Sciences, Agrarian S. and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65 – 78, 2002.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945 – 954, 2009.

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

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 265 – 271, 2004.

EARLY, R. **Tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 2000. 459 p.

ECK, A. **O Queijo**. Título original: Le Fromage. Coleção Euroagro, Publicações Europa-America, 1º volume, 1987. 337 p.

EMBRAPA GADO DE LEITE, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Informações Técnicas, Estatística do leite, disponível em <http://www.cnpql.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>. Acessado em 12/08/14.

FABER, N. M. Efficient computation of net analyte signal vector in inverse multivariate calibration models. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 5108 – 5110, 1998.

FENNEMA. O. R. **Food Chemistry**. 3 ed. University of Wisconsin, 1996. 1069 p.

FERNANDES, A. G.; MARTINS, J. F. P. Fabricação de requeijão cremoso a partir de massa obtida por precipitação ácida à quente do leite de búfala e de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 212, p. 7 – 13, 1980.

FERNANDES, A. G. Parâmetros fundamentais para o processamento de queijo fundido. In: MARTINS, J. F. P.; FERNANDES, A.G. (Ed.) Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.1-11, 1981.

FERNANDES, A. G. et al. Formulação de sais emulsificantes para a elaboração de requeijão cremoso e outros tipos de queijos fundidos. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 40, n. 237. p. 27 – 43, 1985.

FERRÉ, J.; BROWN, S. D.; RIUS, F. X. Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, v. 15, p. 537 – 553, 2001.

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

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

GARRUTI, D. S. et al. Sensory profile and acceptance of "requeijão cremoso" cheese. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, n. 3, p. 434-440, 2003.

GONDIM, C. S.; COELHO, O. A. M.; ALVARENGA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Validação de método qualitativo para pesquisa de adição de amido em leite. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 9, 2011, Campinas. **Resumos do Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 9, Campinas: SLACA, 2011.

HERRERO, A. M. Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1642-1651, 2008.

INMETRO, disponível em http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comites/codex_historico.asp. Acessado em 12/08/14.

KALIVAS, J. H. Multivariate calibration, an overview. **Analytical Letters**, v. 38, p. 2259-2279, 2005.

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

KNUTSON, C. A. Evaluation of variations in amylose-iodine absorbance spectra. **Carbohydrate Polymers**, v. 42. p. 65-74, 2000.

LEE, S. K.; KLOSTERMEYER, H. The Effect of pH on the Rheological Properties of Reduced-fat Model Processed Cheese Spreads. **LWT - Food Science and Technology**, v. 34, p. 288–292, 2001.

LEMOS, A. M.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R. Introdução à tecnologia de produtos lácteos concentrados e desidratados. In: **XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT.

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

LIU, J.; FEI, L.; MALADEN, M.; JAMAKER, B. R.; ZHANG, G. Iodine binding property of a ternary complex consisting of starch, protein, and free fatty acids. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 351-355, 2009.

LORBER, A. Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations. **Analytical Chemistry**, v. 58, p. 1167-1172, 1986.

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

MARCHIORI, E. Salvem o requeijão. *Revista Indústria de Laticínios*, v. 10, n. 58, p. 56-63, 2005.

MAURER-ROTHMANN, A.; SCHEURER, G. **Stabilization of milk protein systems. A Joha Guide**. BK Guillini Gmbh, Ludwigshafen, Germany, p. 50, 2005.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, 4^a ed., Prentice Hall, United Kingdom, 2001.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E do. **Efeitos das várias etapas do processamento de requeijão e queijos fundidos na microbiota do leite**. 2006. Artigo

em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/requeijao/index.htm>. Acesso em: 4/9/2014

MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança, descarte de produtos químicos**. 2 ed. São Paulo: Blücher, 2007.

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

MUNCK, A. V.; CAMPOS, W. A. Requeijão: um produto brasileiro. **Informe Agropecuário**, v.42, n. 115, p. 35-38, 1984.

NEUZIL, E. Jean Guillaume Auguste Lugol (1788-1851): his life and his works: a brief encounter, 150 years after his death. **History Science Medical**, v. 36, n. 4, p. 451-464, 2002.

OLIVEIRA, G. M. **Simetria de Moléculas e Cristais - Fundamentos da Espectroscopia Vibracional**. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: Fundamentos Tecnológicos**. Campinas: Ícone, 1986.

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

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos, v. 2 - Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RAPACCI, M. Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta, 1997. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 1997.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, Editora Blucher, 2004. 184 p.

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

RODRIGUES, F. **Requeijão, Fondue, Especialidade, Queijo Processado**. Juiz de Fora: Do Autor, 2006.

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

SAUER-LEAL, E.; OKADA, F. M.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1621-1625, 2008.

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

SCHUSTER, K. C.; EHMOSE, H.; GAPES, J. R.; LENDL, B. On-line FT-Raman spectroscopic monitoring of starch gelatinisation and enzyme catalysed starch hydrolysis. **Vibrational Spectroscopy**, v. 22, p. 181–190, 2000.

SCOTT, R.; ROBBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de queso**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2002.

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. 547 – 556, 2000.

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

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

SILVA, M. A. P. et al. Spectroscopic studies on glassy Ni(II) and Co(II) polyphosphate coacervates. **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, p. 547–551, 2010.

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

SIMÕES, C. A. **Uso da solução de Lugol para a detecção de segundos tumores primários de boca e orofaringe em portadores de carcinoma epidermóide na cabeça e pescoço: correlação dos achados na histopatologia com a imunoposição do p53 e metalotioneína**. 2009, 168p. Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOBRAL, D. **Otimização do processo de fabricação de análogos de requeijão culinário**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2007.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R., POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.

SOUZA, K. A. F; NEVES, V. A. Pesquisa de polissacarídeos: reação com o iodo. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.htm> Acesso em: 20 jun. 2011.

THOMPSON, A.; WOLFROM, M. L. The composition of pyrodextrins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 24, p. 6618-6620, 1958.

TORRES, E. A. F. S. et al. Composição Centesimal e Valor Calórico de Alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 145-150, 2000.

VALLADÃO, S. A. **Avaliação do Método Oficial IN 68/2006 para Análise de Amido em Iogurte**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2012.

VALLE, J. L. E. Qualidade físico-química da matéria-prima e produto acadabao. *In*: MARTINS, J. F. P; FERNANDES, A. G. (Ed) Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos, Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981.

VAN DENDER, A.G.F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo, SP: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2006. 392 p.

VARGAS, R. E. S. **Programa de Controle e Melhoria da Qualidade do Leite e Produtos Lácteos Produzidos no Brasil**, disponível em <http://www.camara.gov.br/internet/comissao/index/perm/capr/Fraudema%C3%A7ao2.pdf>, acessado em 12/08/14.

WALSTRA, P. et al. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. 1 ed., Zaragoza: Editorial Acribia, 2001. 730p.

WANG, J. P.; YUA, B.; XU, X.; YANG, N.; JIN, Z.; KIM, J. M. Orthogonal-function spectrophotometry for the measurement of amylose and amylopectin contents. **Food Chemistry**, v. 127, p. 102-108, 2011.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M. Requeijão Culinário - Aspectos históricos, de mercado e tecnológicos. **Revista Indústria de Laticínios**, n. 96, p. 70-74, 2012.

ZEHREN, V. L.; NUSBAUM, D. D. **Process cheese**. Schreiber Foods, Green Bay, Wis, 1992. 364p.

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

ANEXO A - Súmula Curricular

Formação Acadêmica:

Bacharela em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora (2012).

Comunicações Científicas:

Oliveira, K. S.; Almeida, C. E. R.; Stephani, R.; de Oliveira, L. F. C. “Avaliação de amostras de WPC armazenadas em diferentes condições por espectroscopia Raman”. Trabalho apresentado na forma de pôster no Simpósio 30 anos - Tecnologia de Leites Concentrados e Desidratados, Juiz de Fora, MG, maio de 2014.

Oliveira, K. S.; Campos, N. S.; Almeida, M. R.; Stephani, R.; de Oliveira, L. F. C. “Análise de Salsichas através de Espectroscopia Raman e Ferramentas Quimiométricas”. Trabalho apresentado na forma de pôster no III EnBraER (3º Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman), Fortaleza, CE, outubro de 2013.

Oliveira, K. S.; Campos, N. S.; Stephani, R.; de Oliveira, L. F. C. “Análise de amostras de queijo Parmesão empregando espectroscopia Raman e Análise de Componentes Principais”. Trabalho apresentado na forma de pôster no II EnBraER (2º Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman), Belo Horizonte, MG, dezembro de 2011.

Oliveira, K. S.; Almeida, M. R.; Stephani, R.; de Oliveira, L. F. C. “Classificação das amostras de leite em pó empregando espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas”. Trabalho apresentado na forma de comunicação oral e de pôster na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, SC, maio de 2011.

Oliveira, K. S.; Almeida, M. R.; de Oliveira, L. F. C.; Stephani, R. “Uma metodologia para *Screening Analysis* de leite em pó utilizando espectroscopia Raman e análise multivariada”. Trabalho apresentado na forma de pôster no 24º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Viçosa, MG, outubro de 2010.

ANEXO B - Artigos

Artigo científico proveniente desse projeto (em fase final de redação):

Oliveira, K. S.; Callegaro, L. S.; Stephani, R.; de Oliveira, L. F. C., “Analysis of *Requeijão* by Raman Spectroscopy and Chemometric Tools”.

Artigos científicos publicados provenientes de projetos paralelos:

Rodrigues Júnior, P. H.; Oliveira, K. S.; Almeida, C. E. R.; de Oliveira, L. F. C.; Stephani, R.; Pinto, M. S.; Carvalho, A. F; Perrone, I. T. “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 publicação.)

Stephani, R.; Oliveira, K. S.; Almeida, C. E. R.; Perrone, I. T.; Carvalho, A. F. “Raman spectroscopy as a tool for characterizing the lactose state in whey protein concentrate”. (Submetido para publicação.)

Campos, N. S.; Oliveira, K. S.; Almeida, M. R.; Stephani, R.; de Oliveira, L. F. C. “Classification of Frankfurters by FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Methods”. *Molecules* (Basel. Online), 2014, 19, 18980-18992.

Almeida, M. R.; Oliveira, K. S.; Stephani, R.; de Oliveira, L. F. C. “Application of FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Analysis for Determination of Adulteration in Milk Powder”. *Analytical Letters*, 2012, 45, 2589-2602.

Almeida, M. R.; Oliveira, K. S.; Stephani, R.; de 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.