

ANÁLISE DE GORDURAS E PROTEÍNAS EM LEITE BOVINO PELA ESPECTROSCOPIA RAMAN NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.

Jamil Saade¹, Landulfo Silveira Junior, Daniela Franco Lopes¹, Dírian Teixeira¹, Marcos Tadeu Tavares Pacheco¹

¹Universidade do Vale do Paraíba / Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/ Av. Shishima Hifumi 3911, saade@univap.br

Resumo – Neste estudo, relatamos a importância do controle de qualidade do leite bovino industrializado em caixinha no quesito identificação dos rótulos das embalagens quanto a porcentagem de gordura e níveis de proteínas para os tipos integral, semi-desnatado e desnatado pela Espectroscopia Raman no Infravermelho Próximo. Os espectros revelaram que o nível relativo de gorduras está de acordo com o rótulo das embalagens, mas o mesmo não ocorre com as proteínas. As bandas relativas às proteínas também decrescem do integral para o desnatado e semi-desnatado. Pode-se concluir que os processos pelos quais o leite é industrializado podem reduzir os níveis de algumas proteínas. Diversas técnicas espectroscópicas como a Técnica Raman têm sido utilizadas para a quantificação e análise de substâncias químicas, uma vez que dispensam qualquer tipo de tratamento prévio das amostras analisadas e se constituem numa ferramenta potencialmente importante para análises químicas, com as vantagens de serem não destrutivas e tornando desnecessária a separação prévia da amostra em seus componentes para posterior análise. Como resultado tem-se um menor tempo de análise e redução dos custos.

Palavras-chave: leite bovino, controle de qualidade, Espectroscopia Raman.

Área do Conhecimento: Engenharias.

INTRODUÇÃO

Na preparação do leite para a comercialização e fabricação de vários produtos de origem láctea, como a manteiga e o iogurte, são necessários alguns procedimentos, dentre os quais o desnatamento se destaca. Desta forma, é produzido o creme, que é a matéria-prima da manteiga e outros derivados do leite, além da produção do leite com diferentes teores de gordura, visando a comercialização. A grande maioria dos laticínios é fabricada à partir do leite bovino, mas os procedimentos de desnatamento são basicamente os mesmos para qualquer tipo de leite.

O processo de desnatamento é feito por centrifugação. O leite desnatado ainda permanece com 0,05% a 0,10% de gordura. A quantidade de gordura, no entanto, pode ser regulada na proporção de 20% a 50% com o ajuste da desnatadeira.

O processamento geral do leite e o tempo de estocagem podem alterar suas características. Há muita valorização da qualidade do leite principalmente pelas questões de excesso de ingestão de calorias ou falta de nutrientes no caso de leites especiais. Sabe-se que os leites tipo uht não destroem enzimas lipolíticas e proteolíticas, que com o tempo coagulam, além de estufarem as embalagens.

Técnicas espectroscópicas têm sido cada vez mais utilizadas para análise da presença e concentração de substâncias químicas em alimentos. Diferentes técnicas como a Espectroscopia de Absorção Eletrônica, Espectroscopia de Fluorescência, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho, Espectroscopia Raman, Reflexão difusa, Reflexão total atenuada e variáveis destas mesmas técnicas têm sido cada vez mais utilizadas juntamente com análises estatísticas multivariadas (STARK, 1986; SALA, 1996; WILSON, 1999; WILLIAMS, 1987; WEBSTER, 2000; VAN DE VOORT, 1992 e 1991; SIVAKESAVA, 2001; OSBORNE, 1986; MORGANO, 2005; FERRÃO, 2004 e 2001; COSTA FILHO, 2002; RUÍZ, 2001).

As técnicas de espectroscopia no infravermelho têm ganhado avanços e terreno nas aplicações industriais em virtude de sua praticidade e sensibilidade (KALASINSKY, 1990; CHALMERS, 1988). Este notável crescimento da utilização da espectroscopia no infravermelho médio (FERRÃO, 2004) nos últimos anos, e o contínuo desenvolvimento de métodos no infravermelho próximo (MORGANO, 2005) deve-se à procura de métodos analíticos rápidos e limpos, neste caso, evitando-se o emprego de reagentes agressivos ou a geração de resíduos danosos ao ambiente (HELFER, 2006).

Entre estas técnicas destaca-se a espectroscopia Raman no infravermelho próximo, que vem sendo utilizada em amostras biológicas

para a quantificação e caracterização de substâncias e monitoração de processos bioquímicos [ENEJDER, 2005; QI, 2005; LAMBERT, 2005; NOEL, 2005; SILVEIRA Jr. *et al*, 2002;].

No espalhamento Raman o fóton espalhado tem uma diferença em energia do fóton da radiação incidente. Essa diferença está diretamente relacionada com os modos vibracionais particulares da molécula espalhadora. Desta forma, a espectroscopia Raman pode ser usada para revelar a estrutura bioquímica da amostra em estudo e então revelar diferenças espectrais classificando o material biológico (DURIG, 1990; COATES, 1998; TUMA, 2005).

Este trabalho tem por objetivo a quantificação relativa entre as bandas de gorduras dos espectros Raman de leite bovino comercializado em caixinha para a comparação com o rótulo nutricional da embalagem do produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras de leite foram analisadas em cubetas de quartzo de 1x1x6cm. No total foram analisadas 10 amostras de cada tipo de leite de uma mesma marca. Os dados foram obtidos em sala de temperatura controlada de aproximadamente 18°C.

Aquisição e tratamento dos Espectros

O Sistema utilizado no experimento é composto por um laser de argônio, emitindo entre 488 e 514nm, com potência de saída de aproximadamente 5W, bombeando um laser Ti:Safira sintonizado em 785nm. A potência da radiação infravermelha registrada no porta-amostra foi de aproximadamente 70mW. A detecção do sinal é feita por uma câmera CCD refrigerada a nitrogênio líquido. Os dados foram obtidos mantendo-se um mesmo tempo de exposição ao detector para todas as amostras.

A aquisição dos espectros foi realizada através do software Winview V1.6.2® que armazena o número de aquisições por amostra e controla o tempo de exposição do detector. Os espectros obtidos foram exportados para o software Microcal Origin 6.0® onde foram calibrados em frequência e submetidos a uma série de procedimentos para o tratamento digital que incluem a retirada do fundo de fluorescência, reescalamento e estabelecimento da linha de base.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 é apresentada uma média dos 10 espectros obtidos a partir de cada tipo de leite: integral, desnatado e semidesnatado. Os espectros médios de cada tipo de leite não passaram por nenhum tipo de normalização e foram sobrepostos para melhor serem confrontados. O espectro em preto com linha contínua mostra as bandas de gorduras e proteínas que podem ser vistos pelo espalhamento Raman do leite integral. A intensidade dessas estruturas decai nitidamente do integral para o semi desnatado (linha laranja e mais fina) e um pouco mais para o desnatado (linha em preto tracejada). As bandas localizadas aproximadamente em 1451,1 cm⁻¹ e 1075,4 cm⁻¹ associadas a gorduras (STUART, 1997), caem mais rapidamente do integral para o desnatado e semi-desnatado do que outras bandas, associadas a proteínas e outros. Do semi-desnatado para o desnatado observa-se essa queda menos abruptamente.

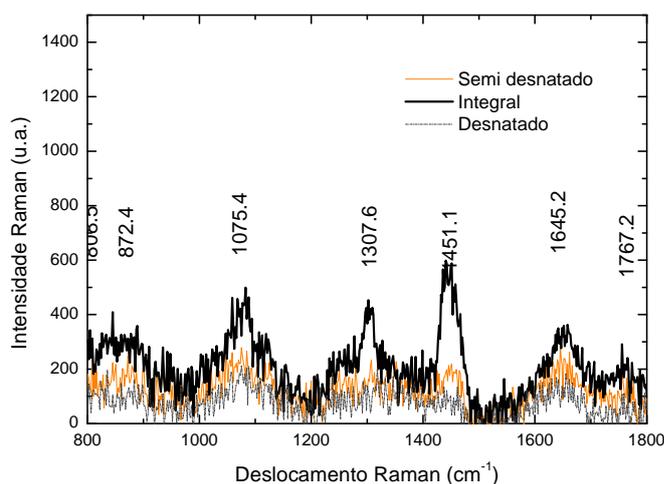


Figura 1: Espectro Raman de leite bovino Integral, desnatado e semi-desnatado.

Bandas (cm ⁻¹)	Integral/ Semi	Integral/ Desnatado
1451,1 (lipídio)	2,9	5,8
1645,2 (proteína, grupo amida I)	1,5	2,3
1307,6 (proteína, grupo amida III)	2,5	3,2
1075,4 (lipídio)	1,9	2,1

Tabela 1: Razão entre a intensidade dos picos raman das amostras de leite integral, semi-desnatado e desnatado.

Na tabela 1 é apresentada a razão entre o valor da intensidade arbitrária de cada pico no espectro. Como pode ser visto, o teor de proteínas também decresce consideravelmente do integral para o desnatado e do integral para o semi-

desnatado, pois a razão entre os picos é maior que 1. Em 1450 e 1075 cm^{-1} encontram-se bandas relativas à gorduras do leite. Por volta de 1645 cm^{-1} encontram-se vibrações da amida I em proteínas presentes no leite e em 1307 da amida III (STUART, 1997; DEKKER, 2001). Na tabela 2 é apresentado o rótulo do produto com as concentrações de proteínas e gorduras totais em cada porção de 200ml. As concentrações de gorduras nos três tipos de leite estão razoavelmente em acordo com os espectros (tabelas 1 e 2). Porém, as bandas relativas às proteínas mostram um decréscimo que não se encontra especificado no rótulo da embalagem do produto. Outra informação conflitante entre o rótulo e os dados espectrais é que a concentração de gordura no leite desnatado não é absolutamente zero como aparece especificado no rótulo do produto.

Componente	Integral	Semi-desnatado	Desnatado
Proteínas	6,2 gr	6,6 gr	6,2 gr
Gorduras totais	6,0 gr	2,0 gr	0 gr

Tabela 2: Rótulo da embalagem mostrando a concentração de gorduras totais e proteínas em cada porção de 200ml de leite

CONCLUSÃO

Os espectros revelaram que a redução das gorduras está razoavelmente de acordo com o rótulo das embalagens, mas o mesmo não ocorre com as proteínas. As bandas relativas às proteínas também decrescem do integral para o desnatado e semi-desnatado. Pode-se concluir que os processos pelos quais o leite é industrializado podem reduzir os níveis de algumas proteínas. Estas informações não se encontram especificadas no rótulo das embalagens. A técnica Raman no infravermelho próximo se mostrou eficaz para a análise da concentração relativa de gorduras e outras bandas. Uma vez que dispensa tratamento prévio das amostras, possui a enorme vantagem de ser não destrutiva e torna desnecessária a separação da amostra em seus componentes para a análise, essa técnica juntamente com um tratamento estatístico adequado (BRERETON, 2000; FERREIRA, 1999) pode ser utilizada como uma nova metodologia para análise do leite bovino. Como resultado tem se um menor tempo de análise e redução dos custos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, London, v. 125, p. 2125-2154, 2000.
- CHALMERS, J. M.; MACKENZIE, M. W. Solid sampling techniques. In: MACKENZIE, M. W. (Ed.) *Advances in applied Fourier transform infrared spectroscopy*. Chichester: John Wiley & Sons. 1988. p. 105-188.
- COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Application of genetic algorithms in the variable selection in mid infrared spectroscopy: simultaneous determination of glucose, maltose and fructose. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 46-52, 2002.
- COATES, J. *Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for infrared and Raman spectroscopy*. *Appl. Spectrosc. Rev.*, New York, v. 33, p. 267-425, 1998.
- DEKKER, M. *Infrared and raman spectroscopy of biological materials*. New York: c2001, 581 p. (Practical spectroscopy ;v. 24) ISBN 0824704096
- DURIG, J. R.; SULLIVAN, J. F. *Vibrational spectroscopy, Fourier transforms and analytical chemistry*. *Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 104-106, 1990.
- ENEJDER, A.M.K. et al. Raman Spectroscopy for noninvasive glucose measurements. *Journal of Biomedical Optics vol.10 n.3, p. 031114 2005*.
- FERREIRA, M.M.C.; MORGANO M. A.; QUEIROZ, S. C. N. et al. Relationships of the minerals and fatty acid contents in processed turkey meat products. *Food Chem.*, London, v. 69, p. 259-265, 2000.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. *Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial*. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- FERRÃO, M. F.; DAVANZO, C. U. Horizontal attenuated total reflection applied to simultaneous determination of ash and protein contents in commercial wheat flour. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 540, p. 411-415, 2005.
- FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MULLER, E. I.; DAVANZO, C. U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIRR-PLS e DRIFT-PLS. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, p. 333-340, 2004.

- FERRÃO, M. F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-lóg.*, Santa Cruz do Sul, v. 5, n. 1, p. 63-85, 2001.
- HELFER, G.A; FERRÃO, M.F; FERREIRA, C.V; HERMES, N. Pulcação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Vol.26. no. 4, 2006.
- KALASINSKY, K.S. Industrial applications of vibrational spectroscopy. *Trend. Anal. Chem.*, Amsterdam, v.9, n.3, p.83-89, 1990.
- LAMBERT, J.L and Christine C. Pelletier. Glucose determinatio in human aqueous humor with Raman spectroscopy. . *Journal of Biomedical Optics vol.10 n.3, p. 031114 2005.*
- MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F. et al. Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.25, n.1, p. 25-31, 2005.
- NOEL, J.C. Bauer. Remote temperature monitoring in ocular tissue using confocal Raman spectroscopy. . *Journal of Biomedical Optics vol.10 n.3, p. 031109, 2005.*
- OSBORNE, B.G.; FEARN, T. NIR Spectroscopy in Food Analysis. New York: John Wiley and Sons, 1986.
- QI, Dahu et al. Quantitative concentration measurements of creatinine dissolved in water and urine using Raman spectroscopy and a liquid core optical fiber. . *Journal of Biomedical Optics vol.10 n.3, p. 031110, 2005.*
- RUÍZ, A.; CAÑADA, M.J.A.; LENDL, B. A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. *Analyst*, London, v. 126, p. 242-246, 2001.
- REEVES III, J.B.; ZAPF, C.M. Mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy for discriminant analysis of food ingredients. *J. Agric. Food Chem.*, Easton, v.46, p.3614-3622, 1998.
- SALA, O. "Fundamentos da Espectroscopia Raman no Infravermelho". São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p.224.
- SIAMWIZA, M.N; R.C. Lord, M.C. Chen, T. Takamatsu, I. Harada, H. Matsuura, T. Shimanouchi, *Biochemistry* 14 (1975) 4870.
- SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by RTIR spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 81, p. 683-690, 2001.
- STARK, E.; LUCHTER, K.; MARGOSHES, M. Near-infrared analysis (NIRA): A technology for quantitative and qualitative analysis. *Appl. Spect. Rev.*, New York, v. 22, n.4, p.335-399, 1986.
- STUART, Barbara; ANDO, D. J. Biological applications of infrared spectroscopy. Chichester; New York: Published on behalf of ACOL (University of Greenwich) by John Wiley, c1997 191 p. (Analytical Chemistry by Open Learning (Series)) ISBN 0471974145
- Tu, A.T, in: R.J.H. Clark, R.E. Hester (Eds), *Spectroscopy of Biological System*, John Willy and Sons, New York, 1986, p.47
- TUMA, R; J. Raman Spectroscopy, 36 (2005) 307.
- VAN DE VOORT, F.R. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res. Int.*, Barking, v.25,p.397-403, 1992.
- VAN DE VOORT, F.R.; ISMAIL, A. A. Proximate analysis of foods by mid-FTIR spectroscopy. *Trends Food Sci. Technol.*, Cambridge, v.2, p. 13-17, 1991.
- YU, N.T; B.H.Jo, S.A.. Liu, J. *Amer. Chem. Soc.* 94 (1972) 5127.
- WILSON, R.H.; TAPP, H.S. Mid-infrared spectroscopy for food analysis: Recent new applications and relevant developments in sample presentation methods. *Trends Anl. Chem.*, Amsterdam, v. 18, n.2, p. 85-93, 1999.
- WILSON, R.H. Fourier transform mid-infrared spectroscopy for food analysis. *Trends Anl. Chem.* Amsterdam, v.9,n.4,p.127-131, 1990.
- WILLIAMS, P.C. Commercial Near-Infrared Reflectance Analysers. In: WILLIAMS, P.C.; NORRIS, K.H. Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Saint Paul: american Association of Cereal Chemistis, 1987. p.107-142.
- WEBSTER, L.; SIMPSON, P.; SHANKS, A.M.; MOFFAT, C.F. The authentication of olive oil on the basis of hydrocarbon concentration and composition. *Analyst*, London, v. 125, p.97-104, 2000.