

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E ENGE-
NHARIA AGRÍCOLA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTER O GRAU DE
MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - AGOSTO 1976.

ANÁLISE DO LEITE POR ESPETROSCÓPIA INFRAVERMELHA

Autor: Alan Frederick Wolfschoon Pombo

Orientador: Prof. Dr. Frederick C. Strong III

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais,
Arturo e Emília

À minha esposa,
Vânia

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Frederick C. Strong III, professor e amigo, que orientou a realização deste trabalho;

à Vânia, que revisou a redação em língua portuguesa;

à Organização dos Estados Americanos (OEA), que, fornecendo-me uma bolsa de estudos, possibilitou-me a realização desta pesquisa;

à Universidad Nacional de Panamá, que me indicou à OEA como candidato àquela bolsa;

a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	10
I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1. O leite.....	12
1.1.1. Generalidades.....	12
1.1.2. Gordura.....	13
1.1.3. Proteína.....	14
1.1.4. Lactose.....	14
1.1.5. Água.....	15
1.2. Métodos para a determinação dos componentes do leite.....	15
1.2.1. Determinação da gordura.....	16
1.2.2. Determinação da proteína.....	17
1.2.3. Determinação da lactose.....	19
1.3. O Infravermelho.....	20
1.3.1. Generalidades.....	20
1.3.2. O Analisador Infravermelho do leite (IRNA).....	23
1.3.3. Interferências dos componentes do leite.....	26
1.3.4. Espectroscopia infravermelha em soluções aquosas.....	30
II - MATERIAL E MÉTODO.....	36
2.1. Equipamento.....	36
2.1.1. Espectrofotômetro.....	36
2.1.2. Celas.....	36
2.2. Condições de operação do equipamento.....	37
2.3. Material e métodos.....	37
2.3.1. Material.....	37
2.3.2. Métodos.....	38
2.3.3. Escolha dos números de onda para a análise.....	41

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Discussão das condições de operação do equipamento.....	44
3.2. Discussão dos espectros de absorção infravermelha.....	45
3.2.1. Absorção do leite homogeneizado numa espessura de 23 μm	45
3.2.2. Absorção da cela da amostra.....	47
3.2.3. Absorção da água, leite e cloreto de sódio a quoso versus ar.....	49
3.2.4. Espectro de compensação do solvente.....	53
3.2.5. Absorção do leite homogeneizado numa espessura de 51,5 μm	55
3.2.6. Absorção da lactose, proteína e gordura.....	57
3.2.7. Absorção do clorofórmio.....	61
3.2.8. Absorção do leite sintético.....	63
3.3. Discussão dos quadros e gráficos.....	65
3.3.1. Quadros de reprodutibilidade e quadros de concentração versus absorvância.....	65
3.3.2. Gráficos de aplicabilidade da lei de Beer.....	72
3.3.3. Quadro de número de onda versus absortividade...	76
3.3.4. Gráfico de concentração versus espessura da cela.....	78
3.3.5. Comparação dos resultados das análises do leite.	80
IV - CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº 1.	Espetro de absorção do leite homogeneizado numa espessura de 23 μm	46
Nº 2.	Espetro de absorção da cela da amostra.....	48
Nº 3.	Espetro de absorção da água versus ar.....	50
Nº 4.	Espetro de absorção do leite versus ar.....	51
Nº 5.	Espetro de absorção do cloreto de sódio aquoso a 5% versus ar.....	52
Nº 6.	Espetro de absorção da água, utilizando-se para compensação NaCl aquoso a 5%.....	54
Nº 7.	Espetro de absorção do leite homogeneizado numa espessura de 51,5 μm	56
Nº 8.	Espetro de absorção da lactose.....	58
Nº 9.	Espetro de absorção da caseína.....	59
Nº 10.	Espetro de absorção da gordura.....	60
Nº 11.	Espetro de absorção do clorofórmio.....	62
Nº 12.	Espetro de absorção do leite sintético.....	64

ÍNDICE DOS GRÁFICOS

Nº 1.	Aplicabilidade da lei de Beer a 1735 cm^{-1}	73
Nº 2.	Aplicabilidade da lei de Beer a 1535 cm^{-1}	74
Nº 3.	Aplicabilidade da lei de Beer a 1065 cm^{-1}	75
Nº 4.	Relação entre espessura da cela de referência e concentração de gordura, proteína e lactose.....	79

ÍNDICE DOS QUADROS

Nº	1. Reprodutibilidade das leituras de transmitância versus concentração de gordura pelo aparelho infravermelho.....	66
Nº	2. Reprodutibilidade das leituras de transmitância versus concentração de proteína pelo aparelho infravermelho....	67
Nº	3. Reprodutibilidade das leituras de transmitância versus concentração de lactose pelo aparelho infravermelho.....	68
Nº	4. Absorvância versus concentração de gordura.....	69
Nº	5. Absorvância versus concentração de proteína.....	70
Nº	6. Absorvância versus concentração de lactose.....	71
Nº	7. Relação entre número de onda, absortividade, absortividade verdadeira, erro padrão e coeficiente de correlação.....	77
Nº	8. Resultados das análises do leite por infravermelho.....	80
Nº	9. Resultados das análises do leite por métodos químicos...	81
Nº	10. Comparação dos métodos analíticos de Gerber, Micro - Kjeldahl, Lane-Eynon e Infravermelho, para a determinação de gordura, proteína e lactose no leite.....	82

RESUMO

Há vários métodos para a determinação de gordura, proteína e lactose no leite, sendo que os espectrofotométricos vêm sendo aplicados cada dia mais. A espectroscopia infravermelha tem sido utilizada para a análise quantitativa de sistemas de multi-componentes, mas oferece problemas quanto à absorção da água, no caso de sistemas aquosos.

Como o leite contém uma grande porcentagem de água, a qual apresenta absorção forte a moderada na região de 3700—1000 cm^{-1} , do espectro eletromagnético, não é possível apreciar os picos de absorção dos componentes individuais, pois estes se encontram mascarados pela absorção da água.

Mediante o uso de uma cela de espessura variável, contendo solução de cloreto de sódio aquoso a 5%, no feixe de referência de um espectrofotômetro de duplo feix, foi possível compensar a absorção da água contida no leite e discernir os picos característicos da gordura, proteína e lactose, aos números de onda de 1735, 1535 e 1065 cm^{-1} , respectivamente. Baseado na lei de Beer-Bouguer-Lambert, e utilizando-se equações simultâneas, foi possível a determinação quantitativa dos componentes individuais a partir das medidas das absorvâncias aos números de onda específicos.

A comparação dos resultados obtidos das análises efetuadas pelo método infravermelho e pelos métodos químicos fornece evidência da utilidade e eficiência do método infravermelho para a determinação de gordura, proteína e lactose no leite.

SUMMARY

Among the various methods for the determination of fat, protein, and lactose in milk, spectrophotometric methods are being applied more and more every day. Infrared spectroscopy has been used for the quantitative analysis of multicomponent systems but presents problems such as absorption by water in the case of aqueous solutions.

Since milk contains a large percentage of water, which absorbs strongly to moderately in the region $3700-1000\text{ cm}^{-1}$ of the electromagnetic spectrum, it is very difficult to observe the absorption peaks of individual components in the spectrum.

However, by means of a variable thickness cell containing a 5% aqueous solution of sodium chloride, it was possible to compensate for the absorbance of water and discern characteristics peaks of fat, protein, and lactose at wavenumbers of 1735, 1535, and 1065 cm^{-1} , respectively. Quantitative determinations of these individual components, based on the Beer-Bouguer-Lambert law and simultaneous equations, were able to be made, starting with the absorption measurements at the given wavenumbers.

Comparison of the analytical results by the infrared method with those by chemical methods furnish evidence of the utility and efficiency of the infrared method for determining fat, protein, and lactose in milk.

INTRODUÇÃO

O leite é um produto nutritivo universalmente difundido, que se consome tanto naturalmente como nas suas mais variadas formas industrializadas. É um fluido biológico de composição complexa, razão por que há necessidade de métodos adequados para sua análise.

Dispõe-se, atualmente, de inumeráveis métodos de determinação dos componentes do leite, sendo eles, na sua maioria, métodos químicos que requerem muito tempo para sua execução. Com o avanço da química analítica nos últimos anos, os métodos fotométricos têm-se desenvolvido bastante e hoje são amplamente utilizados devido à sua simplicidade e confiança.

O objetivo desse trabalho é apresentar um método de determinação dos componentes do leite através da espectroscopia infravermelha.

A espectroscopia infravermelha, como método de análise, é aplicável não somente a líquidos, sólidos ou gases, mas também a sistemas biológicos, nos quais o leite se enquadra. Assim, por meio da absorção da radiação infravermelha por parte dos componentes do leite, pretende-se estabelecer um método rápido, acurado e de fácil manipulação, para a determinação de gordura, proteína e lactose no leite.

A lei de Beer-Bouguer-Lambert (3, 24) fornece o fundamento para a análise quantitativa por meio de espectroscopia de

absorção. Essa lei estabelece que a absorvância de luz por uma substância, numa espessura determinada e a número de onda específico, é diretamente proporcional à sua concentração:

$$A = abc$$

onde A = absorvância; a = absortividade; b = espessura; c = concentração.

O leite contém grande porcentagem de água, o que torna difícil sua análise por espectroscopia infravermelha, devido à forte absorção que a água apresenta, principalmente na região de 1640 cm^{-1} . A técnica de compensação do solvente, utilizando espectrofotômetros de duplo feixe, faz-se necessária em sistemas aquosos e emulsões, como é o caso do leite.

O emprego de uma cela de espessura variável, contendo cloreto de sódio no feixe de referência de um espectrofotômetro de duplo feixe, permite compensar fácil e satisfatoriamente a absorção da água do leite e discernir os picos de absorção dos triglicerídios, os picos das ligações peptídicas e os picos dos grupos hidroxilas, correspondentes à gordura, proteína e lactose, aos números de onda de 1735 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} e 1065 cm^{-1} , respectivamente.

É possível, então, aplicar a lei de Beer para a determinação dos componentes do leite, desde que se conheçam as absortividades individuais, obtidas das curvas de calibração, previamente preparadas para cada componente puro, bem como a espessura da cela utilizada.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O Leite

1.1.1. Generalidades

O leite é definido como a "secreção láctea, livre praticamente de colostro, obtida pela ordenha completa de uma ou mais vacas saudáveis, que contém no mínimo 8,25% de sólidos não gordurosos e não menos que 3,25% de gordura" (29).

O leite contém uma grande porcentagem de água, que serve como meio para os demais componentes, os quais encontram-se dissolvidos ou suspensos. A gordura é o mais variável de todos os componentes; contém um número grande de ácidos graxos e encontra-se em forma de emulsão. O carboidrato, a lactose, conhecido como açúcar do leite, constitui a maior parte dos sólidos totais do leite e se encontra em forma de solução verdadeira. A proteína, constituída por oito componentes principais, está em estado coloidal e é formada principalmente por caseína. As cinzas, que são o material não combustível, atingem 0,7%, que permanecem praticamente constantes. Os principais elementos são K, Ca, Cl, P, Na, Mg e S; muitos outros encontram-se em quantidades ínfimas.

Os outros componentes do leite, que são importantes mas que só serão mencionados nesse estudo, são: enzimas, vitaminas, fosfolipídios, esteróis e pigmentos.

1.1.2. Gordura

A gordura no leite está em forma de pequenos glóbulos com um diâmetro médio de 3µm. Cada glóbulo está coberto por uma membrana de fosfolipídios e proteínas o que lhe dá sua individualidade.

A gordura contém no mínimo 60 ácidos graxos, que representam perto de 85,5% por peso. Deles, 60-70% são saturados, 25% a 35% insaturados, e perto de 4% poli-insaturados (29). Estes ácidos graxos combinam-se mediante ligações de éster ao glicerol, formando os mono-, di- e triglicerídios, sendo estes últimos responsáveis pelo 97-98% da gordura do leite.

Outros componentes da gordura são os cerebrosídeos e fosfolipídios, sendo a lecitina o principal fosfolipídio encontrado no leite(62). O colesterol também é encontrado no leite. As vitaminas lipo-solúveis (A, D, E, K) se encontram na emulsão da gordura.

A densidade da gordura varia com a composição dos ácidos graxos dos triglicerídios e com a temperatura. O índice de refração é influenciado tanto pelo peso molecular como pelo grau de insaturação dos ácidos graxos.

A média de gordura no leite é de 3,8% , sendo que este valor depende da raça, do tempo de lactação, de variações da estação, da idade e do indivíduo.

1.1.3. Proteína

O leite contém em média 3,5% de proteínas, distribuídas em proteínas do soro (0,5-0,7%) e caseína (2,8-3,0%). A caseína é a fração que precipita ao acidificar o leite até pH= 4,6-4,7, sendo que as proteínas do soro são as que permanecem após a precipitação.

A caseína é constituída por uma mistura de proteínas, conhecidas como alfa, beta e gamma caseínas, que estão presentes no leite como suspensão coloidal formando os micélios. A fração alfa-caseína é composta de duas subfrações sendo uma delas, a fração kappa-caseína, a que estabiliza o micélio.

Das proteínas do soro, a lactoalbumina e a gamma lactoglobulina representam 0,30% e 0,13%, respectivamente, do total. A primeira é uma mistura de lactoglobulinas (alfa lactoalbumina e beta lactoglobulina) com as chamadas albuminas do soro sanguíneo. A gamma lactoglobulina é formada pela euglobulina e pela pseudoglobulina.

Do nitrogênio não protéico (0,19%) presente no leite fazem parte: amônia, uréia, creatina, creatinina, ácido úrico e a fração de peptonas, responsáveis pelo 2-6% do total da proteína do leite. O conteúdo em aminoácidos é apresentado por diferentes autores (29, 62).

1.1.4. Lactose

A lactose é um dissacarídeo, isto é, pode ser hidrolizada

em dois outros açúcares: d-glicose e d-galactose. É um açúcar reductor e apresenta o fenômeno da muto-rotação, uma vez que existe em duas formas, alfa e beta, obtidas por cristelização de uma dissolução acima ou abaixo de $93,5^{\circ}\text{C}$. Ela se encontra no leite em qualquer das duas formas cristalinas: alfa lactose ou beta lactose. Quando qualquer das duas formas é dissolvida em água, há uma conversão gradual de uma forma à outra, até que o equilíbrio se estabeleça. As densidades dos cristais são ligeiramente diferentes e não são funções lineares retas da concentração.

As reações químicas da lactose são as caraterísticas dos carboidratos, de um modo geral: reações que envolvem a união glicosídica entre os dois monozacarídeos; o grupo redutor da glicose; as hidroxilas livres; as ligações carbônio-carbônio (62).

A lactose é o sólido predominante no leite, encontrando-se em média de 5,0% .

1.1.5. Água

A água é o componente que se encontra em maior quantidade no leite, atingindo em média 87,0% . Nela encontram-se dissolvidos ou suspensos os demais componentes do leite. Pequenas quantidades estão como água de hidratação na lactose, assim também como água ligada nas proteínas.

1.2. Métodos para a determinação dos componentes do leite

O leite tem uma composição muito complexa, mas dispõe-

se de vários métodos para a determinação de gordura, proteína e lactose.

1.2.1. Determinação da gordura.

Para a dosagem da matéria gorda no leite utilizam-se vários métodos, entre os quais podem ser citados:

- o método Gerber (33) que mede o volume de gordura extraída mediante o uso de ácido;

- o método de Mojonnier (33) que é baseado na extração da gordura por meio de éter;

- o método de Babcock (33) que envolve a digestão do material não gorduroso e liberação da gordura;

- a medida turbidimétrica de uma emulsão de matéria gorda usando o Milko Tester -MT- (48);

- a medida do número de ligações éster dos triglicerídios mediante o analisador infravermelho do leite (IRMA) a número de onda de 1747 cm^{-1} (4) sendo este método adotado pela A.O.A.C. (39)

Grappin e Jeunet (22) indicam que a precisão dos métodos Gerber, MT e IRMA está relacionada com propriedades físicas da gordura: o Gerber depende da massa, o MT do índice de refração e o IRMA da absortividade. Estudando a influência de fatores biológicos sobre a exatidão desses métodos para a dosagem de gordura no leite, encontraram que a estação, a região, a raça e o indivíduo afetam a exatidão do MT e IRMA, sendo que o método Gerber não é grandemente afetado por nenhum destes fatores.

Esses autores (22) mostram que um aumento na proporção dos ácidos graxos insaturados acarreta um aumento no índice de refração, o que leva a uma super-estimação dos resultados do Milk Tester; por outro lado, há uma diminuição nos ácidos graxos de cadeia mediana e curta, que conduz a uma diminuição no número de ligações éster por unidade de peso, o que repercute na estimação dos resultados do IRMA.

Biggs (5) aponta que o método Babcock não separa os glóbulos de gordura muito pequenos nem os fosfolipídios, razão por que estes não são determinados. Confrontando-se o desvio padrão obtido pela comparação dos métodos de Babcock versus IRMA ($\pm 0,072$) com aquele obtido pela comparação dos métodos Mojonnier versus IRMA ($\pm 0,049$), encontra-se um desvio padrão menor quando se compara o Mojonnier com o IRMA, o que mostra uma melhor precisão para o método Mojonnier em relação ao método de Babcock.

1.2.2. Determinação da proteína.

Existem vários métodos para a determinação da quantidade de proteína nos produtos naturais. A escolha do método particular está relacionada com os materiais a serem analisados e o tipo de informação procurada. Para a dosagem de proteína no leite temos, entre outros:

-o método de Kjeldahl (25) que faz determinações do nitrogênio em proteínas mediante titulação do íon amônio resultante da digestão da amostra com ácido;

-o método de Biureto (14), que é um método espectrofotométrico, baseado na medida da coloração violeta característica do complexo de Cu^{+2} e substâncias contendo ligações peptídicas, em meio alcalino;

-o método de Lowry (30) que é uma modificação do método de Folin-Ciocalteu (12) baseado na presença de tirosina e triptofano em proteínas;

-o método de Warburg e Christian (61), que é baseado na absorção da luz ultravioleta a 280 nm e 260nm, devido à presença de tirosina e triptofano, assim também como aos ácidos nucleicos;

-métodos espectrofotométricos para a determinação de proteína (36) e gordura simultaneamente (37) no leite, que operem a comprimentos de onda de 280 nm e 400 nm;

-o método de corante (2), que consiste na medida da absorvência da solução de corante que não se combinou com a proteína, ao adicionar-se um excesso de corante ao leite;

-o Pro-Milk, que também é baseado no princípio de corante, dá resultados ligeiramente superiores aos obtidos pelo método de Kjeldahl na determinação de proteína no leite;

-o aparelho IRMA, que faz as determinações de proteína pela medida da absorção das ligações peptídicas entre os aminoácidos das moléculas de proteína, a número de onda de 1547cm^{-1} (39).

Biggs (5) indica que, devido à diferença na relação proteínas do soro:caseína, há uma variação na capacidade de combinação de corante, sendo esta variação dependente da estação e

do estado de lactação; por este motivo, o método de corante não deve ser usado como método de pesquisa.

Uma comparação da precisão do método Kjeldahl e o IRMA feita por Biggs (6) mostra um desvio padrão entre duplicados, favorável ao método infravermelho ($\pm 0,022$) em relação ao Kjeldahl ($\pm 0,037$).

1.2.3. Determinação da lactose.

Dos métodos existentes para a dosagem da lactose, tem-se usado:

- o método gravimétrico, que consiste em determinar os açúcares redutores mediante pesagem do óxido cúprico (Cu_2O) produzido pela redução da solução de Fehling, sob condições determinadas (26);

- determinação direta de lactose no leite, que é feita mediante adição de fenol e ácido sulfúrico e posterior leitura da absorvância a 490 nm (32);

- o método polarimétrico, que é baseado na medida da rotação da luz polarizada, investigado por Biggs e Szijarto (7) que encontraram um desvio padrão de $\pm 0,024$ para duplicados de amostras;

- o método infravermelho (recomendado pela A.O.A.C.) que utiliza o IRMA, se fundamenta na medida da absorção que apresentam os grupos hidroxilas das moléculas de lactose a número de onda de 1041 cm^{-1} (39);

-o método volumétrico de Lane-Eynon (39), que é baseado na titulação do açúcar redutor com solução de Soxhlet (modificação da solução de Fehling) e que possivelmente tem a exatidão do método gravimétrico.

Convém dizer que as análises efetuadas pelo analisador infravermelho do leite, IRMA, dependem, em grande parte, da precisão e exatidão do método usado para a calibração do IRMA, assim também como da habilidade do operador.

1.3. O Infravermelho

1.3.1. Generalidades

A região conhecida como infravermelha é aquela compreendida entre 0,78 e 300 μm no espectro eletromagnético. Esta faixa (55) está subdividida em infravermelho próximo (0,78-3 μm), região média ou infravermelho normal ($3333-333\text{ cm}^{-1}$) e infravermelho afastado ($333-33\text{ cm}^{-1}$).

Os termos aqui empregados são traduções daqueles recomendados pela revista Applied Spectroscopy (50,56). A luz, quando se propaga no espaço ou interage com a matéria (trocando energia), comporta-se como onda e como partícula; podemos, então, definir o Comprimento de Onda λ (lambda grego) como a distância medida ao longo da linha de propagação entre dois pontos que estejam em fase sobre ondas adjacentes (50); Frequência ν (nu grego), como número de ciclos por unidade de tempo (50); Número de Onda σ , (sigma grego), como o número de onda por unidade de comprimento,

usualmente como centímetros recíprocos (50); Velocidade de Propagação da Luz no ar q, igual a $2,997051 \times 10^8$ m/seg (55). Temos que o número de onda é diretamente proporcional à energia absorvida pela molécula ($\sigma = E/hc$ onde h é a constante de Planck). Observe-se que a quantidade de energia absorvida é quantizada, ou seja, $E = h\nu$; conseqüentemente, a molécula absorve radiação de frequência específica. Desse modo, as moléculas absorvem energia de acordo com suas vibrações e rotações, originando os picos de absorção.

Os átomos que formam uma molécula estão unidos por ligações químicas que se comportam como molas ao vibrar um átomo em relação a outro; assim, temos dois modos fundamentais de vibração das moléculas: o estiramento, em que os átomos permanecem no mesmo eixo ao aumentar ou diminuir a distância interatômica; a deformação, em que os átomos mudam de posição com respeito ao eixo da ligação.

Cada molécula tem suas frequências características de vibração, as quais têm a mesma ordem que as frequências da radiação eletromagnética correspondentes ao infravermelho; por isto, ao incidir luz infravermelha com frequência igual à da molécula, ocorre uma absorção dessa energia, conseqüentemente aumentando a amplitude da vibração. Estas trocas em vibração são dependentes tanto das massas atômicas como do tipo de ligação; ainda mais, a proximidade e geometria espacial dos átomos podem influenciar as vibrações.

No princípio de equipartição de energia sabe-se que

uma molécula de N átomos possui $3N-6$ graus de liberdade de vibração que podem absorver luz infravermelha, mas isto só é possível se a vibração causa uma mudança no momento dipolar da molécula. A absorção ocorre quando o campo elétrico do fóton é paralelo ao dipolo e quando o fóton tem a energia necessária para a transição eletrônica (55).

Se as moléculas se comportam como um oscilador harmônico, podemos considerar que a frequência de vibração é igual a $(1/2\pi)\sqrt{k/m}$, onde k é a constante de força e m a massa; a mecânica quântica atribui níveis de energia de vibração $E_v = (n+1/2)h\nu$ onde n é o nível de energia. Então, no estado fundamental, $E_v = (1/2)h\nu$ porque $n=0$. Ao absorver uma quanta, a molécula muda sua energia de vibração já que $n \neq 0$, estabelecendo-se um $\Delta E_v = nh\nu$. Ao voltar ao estado fundamental, a energia absorvida é liberada em forma de calor.

As vibrações que causam uma absorção com o menor número de onda são as de deformação porque sua k é menor. Para estimar o número de onda de uma vibração de estiramento temos que considerar a massa reduzida m e a frequência do fóton absorvido:

$$\sigma = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{k \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)}$$

Como a quantidade de energia absorvida é função do número de moléculas presentes, o infravermelho fornece informação tanto quantitativa como qualitativa, razão da sua importância na caracterização de compostos orgânicos.

1.3.2. O Analisador Infravermelho do Leite (I.R.M.A.)

Uma revisão da instrumentação disponível para a análise da composição do leite foi feita por Richardson em 1972 (46); porém, com o avanço atual das pesquisas, é quase impossível estabelecer o status real dessa instrumentação.

Goulden (15) iniciou o método infravermelho para a análise do leite quando demonstrou que a diferença entre o espectro da água e o do leite homogeneizado a 1745 cm^{-1} , 1648 cm^{-1} , 1266 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} poderia ser utilizada para a estimação das porcentagens de gordura, proteína, sólidos não gordurosos e lactose respectivamente, no leite.

Os erros mais significativos do método foram devidos à variação na quantidade de água contida nos diferentes tipos de leite; esses erros podem ser reduzidos, fazendo-se a calibração para gordura e lactose, para evitar os erros esperados devido à água, e fazendo-se a correção de cada análise de proteína depois que tenha sido determinada a variação no conteúdo da água, devido a mudanças na porcentagem de gordura (8).

Um aparelho infravermelho para a análise do leite, o Mark I IRMA foi desenvolvido em 1964 pela Grubb Parsons (49) e testado em Guelph, Canadá (9); os erros devidos à variação na quantidade de água foram medidos e estes resultaram concordantes com aqueles apresentados por Goulden. Fizeram-se modificações e apareceu o Mark II IRMA, que foi testado também na Alemanha (44) e na França (1) além dos estudos realizados em Guelph.

O IRMA mede as absorções de energia infravermelha pelos grupamentos carbonilas nas ligações éster das moléculas de gordura a número de onda de 1745cm^{-1} ; pelas ligações peptídicas entre os aminoácidos nas moléculas de proteínas a 1548cm^{-1} ; e pelos grupos hidroxilas nas moléculas de lactose a 1041cm^{-1} (39).

Como o método usado para a calibração do IRMA é exato, podemos dizer que o IRMA dá resultados exatos, já que a calibração é obtida ajustando-o primeiro aos resultados fornecidos pela análise química. Biggs tem amplamente discutido e comparado a precisão e exatidão do IRMA (5, 6) frente a outros métodos para a análise da composição do leite; ele aponta que, uma vez demonstrada a constância na precisão e exatidão do método utilizado para a calibração, o grau de precisão e exatidão obtido com o IRMA depende, além disso, da habilidade do operador para manter os baixos níveis de ruído requeridos para trabalhos precisos e, também, da sua habilidade para atingir e manter uma curva de calibração exata.

Mede-se a gordura, a proteína e a lactose automaticamente num volume pequeno de amostra, e os resultados são diretamente apresentados em forma de porcentagens. Produtos químicos não são utilizados em nenhuma parte da análise. O único pré-tratamento da amostra consiste em um aquecimento suave para derreter a matéria gorda e liberar gases residuais que possam estar presentes.

O IRMA é, essencialmente, um espectrofotômetro convencional de duplo feixe modificado para proporcionar rápidas mudanças

no comprimento de onda e fazer sinais lineares, de acordo com a concentração. O método, que é afetado pela eficiência da homogeneização, é baseado nas absorções da energia infravermelha aos números de onda específicos para cada componente.

Vendo o desenho abaixo, temos que a energia da fonte infravermelha é dividida opticamente em dois feixes: um atravessa a cela que contém a amostra (leite), e o outro, a cela de referência que contém água destilada. Mediante uso de espelhos, os dois

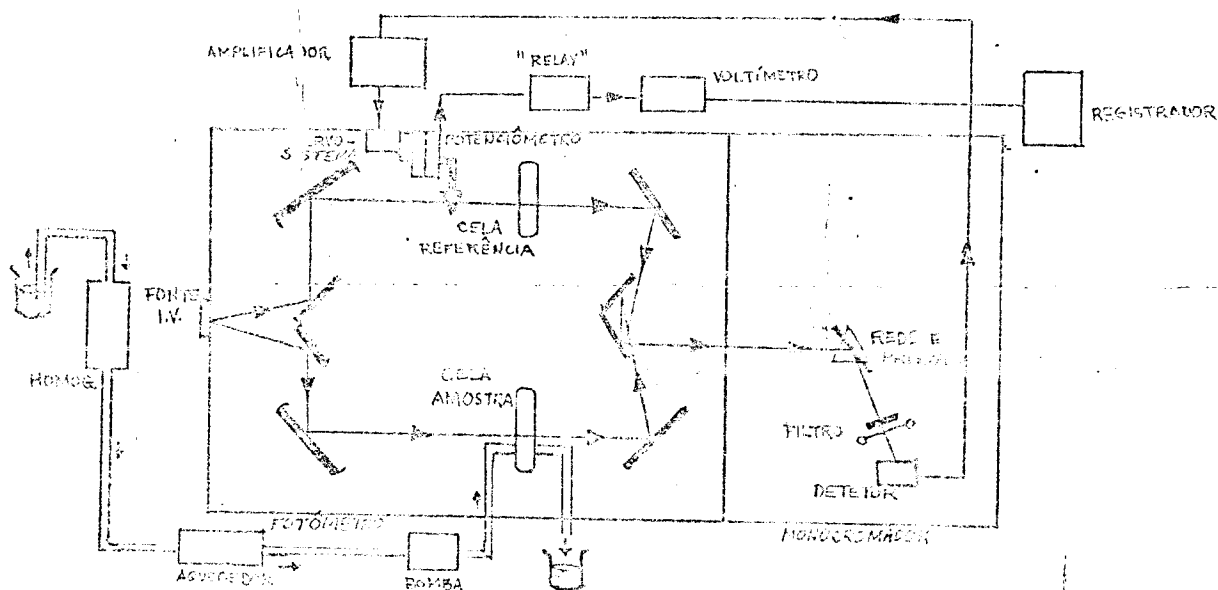


Diagrama de funcionamento do Mark II IRMA

Fonte: Journal of Dairy Science, 50,799 (1967)

Deutsche Molkerei-Zeitung, 92,2079 (1971)

feixes são dirigidos à seção do monocromador; esta inclui uma rede de difração e prisma de KBr; o número de onda é selecionado e a radiação é focalizada no par termoeletrônico que serve como detector. Devido à diferença na absorção de energia pela amostra e pela água, existe um nível de energia alternante que atinge o de-

tetor. O sinal alternante é amplificado e depois de retificado a ciona um servossistema atenuador (compensador que move um pente atenuador dentro ou fora do feixe de referência), mantendo assim uma igualdade entre os dois feixes. O grau de ajustamento do pente, requerido para compensar ou igualar os dois feixes, é proporcional à concentração de cada componente do leite na cela de amostra. O potenciômetro adaptado ao compensador gera uma voltagem que é registrada pelo voltímetro digital; o sinal é apresentado diretamente em forma de porcentagem.

1.3.3. Interferências dos componentes do leite .

Ao se fazer a análise do leite por espectroscopia infravermelha, apresentam-se sérias interferências devido aos seguintes componentes: gordura, proteína, carboidrato e, principalmente, água.

As variações nas porcentagens de cada um deles interfere, até certo ponto, nas medidas dos outros componentes. Uma mudança na porcentagem de um componente sólido do leite é equivalente a um deslocamento da água, enquanto as porcentagens dos outros componentes sólidos permanecem as mesmas. Uma vez que a absortividade da água é grande na região infravermelha, este fato, geralmente, acarreta um decréscimo do sinal e, portanto, as absortividades dos componentes interferentes são negativas na maioria das vezes (4).

Grappin e Collin (23) estudaram a influência do conteúdo

de matéria gorda na exatidão da determinação de lactose no leite, utilizando o IRMA; encontraram que a 1041 cm^{-1} as medidas efetuadas pelo aparelho poderiam ser expressadas em função da concentração da lactose ou em função das concentrações dos teores de matéria gorda e proteína. A variação da concentração de gordura e proteína implica numa variação equivalente (em volume) do teor de água, o que se traduz por uma absorção da energia infravermelha, sendo esta inversamente proporcional ao teor de matéria gorda e proteína. Assim eles explicam o signo negativo da absortividade da gordura, sendo o valor positivo da absortividade da proteína, a 1041 cm^{-1} , uma indicação de que sua absorção é mais importante que a da água. Os valores encontrados por eles concordam com aqueles apresentados por Goulden e por Biggs. Grappin e Collin(23) indicam que a precisão na determinação de lactose é influenciada principalmente pelo teor de gordura no leite.

Kliman e Pallansch (28) mencionam Goulden (15) como quem mostrou, provavelmente pela primeira vez, os problemas que apresenta a forte absorção da energia infravermelha pela água nos produtos lácteos, assim também como o espalhamento da luz pelas fases dispersas nos sistemas coloidais. Kliman e Pallansch utilizaram a técnica de atenuação total da reflexão (ATR) para a análise de produtos lácteos e encontraram uma correlação linear entre os sólidos totais e o grau de atenuação a 1035 cm^{-1} . Porém, o pico de absorção não pode ser atribuído a um só componente mas, provavelmente, à contribuição de todos os componentes na absorção ou

espalhamento. Também encontraram que o grau de atenuação a 1735 cm^{-1} não é relacionado somente com o conteúdo de matéria gorda, o que nos leva novamente à conclusão de que há influência de cada componente na absorção individual da energia infravermelha.

No leite, a absorção da energia infravermelha pela água é grande, enquanto que esta absorção é feita de forma seletiva pelos outros componentes. A maior interferência da água ocorre perto da região de 1640 cm^{-1} (11) devido à vibração de deformação da molécula de água. Note-se que a absorção dos grupos carboníla (vibração de estiramento) nas ligações éster, nas moléculas de gordura, e na ligação peptídica, nas moléculas de proteína, ocorrem perto dessa região; por este motivo pode-se esperar uma superposição dos espectros nessa faixa do infravermelho.

Goulden demonstrou (16) que a proteína, juntamente com os glóbulos de gordura, contribui, em pequena porcentagem, para o espalhamento total da luz. Descobriu que, em soluções diluídas do leite nas quais os diâmetros dos glóbulos de gordura estão na ordem de micrometros (μm), espera-se que eles produzam espalhamento máximo na região de $0,35\text{ }\mu\text{m}$ a $1,3\text{ }\mu\text{m}$ (visível-infravermelho próximo) do espectro, e que na medida em que o tamanho dos glóbulos de gordura diminuem, os máximos tornam-se mais intensos, movendo-se para menores comprimentos de onda.

Stockey e colaboradores (53) adaptaram o Auto-Analisador da Technicon, para a determinação da matéria gorda no leite; fazendo-se uma solução ácida da amostra, os glóbulos de gordura

são suspensos novamente pela adição de água; a absorvância desta solução é medida a 600 nm e, como ela é função da concentração da matéria gorda na amostra, obtém-se uma resposta linear para 1,5% a 7,0% do teor de gordura, sem nenhuma interferência da lactose ou da proteína. Convém dizer que 600 nm está compreendida na faixa visível do espectro eletromagnético, razão por que as medidas das absorvâncias não são produtos das vibrações moleculares, mas sim de reações turbidimétricas. Stockey refere-se a Walstra (60), que confirmou que, sob certas condições, soluções turvas obedecem a lei de Beer, tal como fazem as soluções coloridas.

Wilson e colaboradores (63) fizeram uma determinação quantitativa da gordura a 1740 cm^{-1} , da proteína a 1520 cm^{-1} e do carboidrato a 1040 cm^{-1} , em produtos de soja, utilizando a técnica de ATR; encontraram que o carboidrato, que absorve fortemente a 1040 cm^{-1} , é coberto completamente pelas absorções da gordura e proteína ao se superpor os espectros individuais desses componentes.

Em resumo, comparando os trabalhos feitos por vários pesquisadores na determinação de componentes em sistemas de multicomponentes mediante espectrofotometria infravermelha, nota-se uma interrelação dos componentes (gordura, água, proteína e carboidrato) nas regiões de 1740 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} , no espectro de absorção.

1.3.4. Espectroscopia Infravermelha em Soluções Aquosas.

O uso da água como solvente para espectroscopia infravermelha, assim como o material empregado na construção das células, tem sido discutido desde há várias décadas. Gore e colaboradores (13) mostraram a possibilidade de usar água e D_2O com células de $AgCl$ para determinar espectros infravermelhos. Nachod e Martini (35) estudaram os materiais disponíveis para as células, bem como as regiões onde os solventes (incluindo metanol e hidróxido de sódio) poderiam ser utilizados. Sternglanz (51) discutiu o uso da água no infravermelho e apresentou os espectros dos diferentes tipos de célula; indicou também que 0,05 mm é a espessura maior que pode ser utilizada na região de 1430 cm^{-1} a 910 cm^{-1} , sem grande perda na sensibilidade do instrumento.

Cross e Jones (10) apontaram que células de 0,01 mm ou menos são necessárias e que o uso de D_2O como solvente é recomendável em muitos casos. Goulden (17) mostrou que células até 75 μm podem ser convenientemente utilizadas com soluções aquosas; porém, o limite da espessura imposto pela absorção do solvente restringe a técnica de soluções aquosas para compostos que tenham solubilidades de aproximadamente 1% em água. Goulden e Manning (18) indicaram que BaF_2 é mais transparente que CaF_2 a números de onda menores, porém é mais frágil e menos resistente a ataques de pH alcalino. Manning (31) mencionou que a interrupção (número de onda onde a transmitância de uma célula de 5 mm é reduzida a 50%) para CaF_2 é a 1040 cm^{-1} e de 900 cm^{-1} para BaF_2 .

Manning (31) indicou também que celas de 50 μ m ou menos são empregadas devido à forte absorção da água; com tais celas, concentrações baixas são suficientes para produzir espectros satisfatórios.

Thompson (58) descreveu técnicas para preparar filmes de espessuras conhecidas que podem ser utilizadas para registrar espectros de líquidos e soluções que possuem picos de forte absorção.

Celas de espessuras variáveis foram especialmente projetadas para facilitar a compensação do solvente e para evitar a dificuldade de se fazer uma cela de uma espessura pré-determinada (43).

Thompson (59) menciona três fatores importantes a serem considerados quando se compensam os picos de absorção do solvente:

- a transmitância do solvente utilizado como referência deve ser maior que 20% no pico de máxima absorção;

- o perfil do solvente utilizado como referência deve assemelhar-se a seu correlato na solução da amostra;

- o índice de refração dos dois líquidos deve ser o mais perto possível.

Os métodos utilizados para compensar a absorção da água são (31):

- uso de filtro de transmitância ou atenuador de referência;

- uso de uma cela contendo água no feixe de referência sen

do as espessuras de ambas as celas aproximadamente iguais.

A desvantagem do primeiro é o fato de que o espectro obtido tem base curva. Isso não ocorre com o segundo método, porque o uso de celas de espessuras similares garantem um espectro com base plana (18).

Potts e Wright (42) utilizaram um filtro de transmissão para obter a compensação do solvente na região de 1540 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} e possibilitar a análise de espectros de sais metálicos de ácidos orgânicos e glicóis. Possivelmente, as primeiras aplicações da espectroscopia infravermelha para a análise de fluidos biológicos tenha sido feita por eles quando varreram espectros de aminoácidos e de plasma do sangue.

Parker (40) utilizou também um filtro de transmissão e celas de $0,053\text{ mm}$ de espessura, para registrar espectros de algumas substâncias bioquímicas na região de 1640 cm^{-1} a 685 cm^{-1} .

Rozelle e colaboradores (47) usaram a técnica infravermelha de soluções aquosas com celas de $50\text{ }\mu\text{m}$ para a análise de urina em pacientes diabéticos e normais, identificando os picos de absorção máxima.

Goulden (17) discutiu os espectros infravermelhos em soluções aquosas de ânions inorgânicos, moléculas orgânicas simples, sais de ácidos orgânicos, aminoácidos e material biológico, obtidos utilizando celas de 70 e $63\text{ }\mu\text{m}$ na faixa de 1540 cm^{-1} a 950 cm^{-1} . Aplicou espessuras fixas de $37,5\text{ }\mu\text{m}$ com celas de CaF_2 para a análise quantitativa do leite (19), utilizando os máximos de absorção

a 1745 cm^{-1} , 1548 cm^{-1} e 1042 cm^{-1} , para a determinação de gordura, proteína e lactose respectivamente. Junto com Manning (18, 20) aplicou a espectroscopia infravermelha para o estudo qualitativo de materiais inorgânicos e, também, para a análise quantitativa de fertilizantes hidrossolúveis, utilizando celas de CaF_2 de $32\text{ }\mu\text{m}$.

Em soluções eletrolíticas, interações íon-dipolo modificam o perfil dos picos de absorção da água; uma compensação acurada é, então, possível, utilizando-se uma solução de haleto de álcali metálico em vez de água pura, no feixe de referência. Este efeito depende da natureza do ânion presente e torna-se significativo ao se fazer medidas perto dos picos de absorção da água e resulta, usualmente, no fato de que a solução se torna mais transparente do que o solvente puro (31). O efeito do cloreto de sódio nos picos de absorção da água foi demonstrado por Thompson (59); observam-se mudanças no contorno das regiões de absorção produzidas pelas vibrações de estiramento e tesoura das moléculas da água. Um aparente incremento na transparência da solução é também encontrado em emulsões e soluções concentradas, o que resulta do deslocamento das moléculas fortemente absorventes da água (31).

A absorção da água é dependente da temperatura; se a temperatura da amostra não é mantida a $\pm 1^\circ\text{C}$, podem resultar erros nas absorvâncias, ao redor do pico de absorção de 1640 cm^{-1} . O uso de água no feixe de referência reduz este efeito, eliminando a necessidade de um controle de temperatura acurado (31).

Quando se utiliza um espectrofotômetro de duplo feixe para o estudo de soluções aquosas e se realiza a compensação do solvente, somente uma pequena fração da luz incidente alcança o detector. Para restituir a resposta do instrumento, a largura espectral deve ser aumentada por um fator de $T^{-1/2}$ (31) onde T é a transmitância da cela contendo água. Isto foi indicado por Potts e Wright (42) que determinaram como $\sqrt{1/T}$ o fator necessário para recuperar a energia perdida pela absorção da água e do filtro de transmitância.

Uma perda em resolução pode causar desvios da lei de Beer-Bouguer-Lambert ; Jones e Cross (40) apontaram que, com instrumentos equipados com rede de difração (que são melhores que os de prisma), a radiação resultante da fenda de saída ainda cobre um intervalo pequeno de frequência, o que pode produzir desvios na lei de Beer.

Com instrumentos de alta resolução (equipados com rede de difração) é impossível alargar suficientemente as fendas, de modo que a imagem torna-se maior que a superfície do detector; por isto, espectros satisfatórios podem ser registrados reduzindo a velocidade de varredura e incrementando a ganância do instrumento (31).

Em resumo, a espectroscopia infravermelha em soluções aquosas é utilizada para a análise quantitativa de sistemas de multicomponentes. Porém, todos os trabalhos apresentados falam do uso de celas de espessuras fixas para realizar a

compensação do solvente, o que nos sugeriu a possibilidade de utilizar uma cela de espessura variável no feixe de referência, para a análise quantitativa do leite.

MATERIAL E MÉTODO

2.1. Equipamento

2.1.1. Espectrofotômetro

Na realização deste trabalho, utilizou-se um espectrofotômetro infravermelho de duplo feixe, Perkin Elmer modelo 267, equipado com rede de difração e filtro óptico para reduzir a luz extraviada (stray light) a menos de 1/2% em toda a faixa de 4000 a 600 cm^{-1} . O instrumento foi calibrado contra um filme de poliestireno, segundo o manual da Perkin Elmer (24), tendo-se trabalhado à temperatura ambiente de 23°C aproximadamente.

2.1.2. Celas

2.1.2.1. Cella da amostra

Utilizou-se um cristal de CaF_2 na parte anterior e outro de BaF_2 na parte posterior, separados por uma lâmina fina de chumbo, formando uma espessura de 51,7 μm . A transmissão de luz através desta combinação de cristais era acima de 85%, e números de onda inferiores a 1250 cm^{-1} (8 μm), e de 65% a 40% na região de 1111 a 1000 cm^{-1} (9-10 μm). Esta cela da Perkin Elmer é do tipo desmontável.

2.1.2.2. Cella de referência

A cela no feixe de referência, composta de cristais de BaF_2 , era de espessura variável para efetuar facilmente a compensação do solvente. Foi adquirida da Wilks Corporation.

2.2. Condições de operação do equipamento

A determinação da espessura da cela de amostra foi feita pelo método de interferência, segundo o manual da Perkin Elmer (24) sobre técnicas infravermelhas.

Ao se realizar este trabalho, encontrou-se que, para celas de aproximadamente 50 μ m de espessura, se faz necessário:

- um programa de fendas (slit width) de 7, de maneira a aumentar a energia que alcança o detetor;
- diminuir a velocidade de varredura para a posição de lento (slow scan mode) para obter espectros adequados;
- aumentar a ganância (gain) para melhorar a resposta da cência;
- utilizar uma constância de tempo (time constant) de 1, para manter uma boa relação sinal/ruído (signal to noise ratio).

Com estas condições obtivemos espectros adequados para efetuar análises quantitativas.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Material

- clorato de sódio (da Ecibra - Equipamentos Científicos do Brasil S.A.);
- clorofórmio (da Research Becto Chemical);
- hidróxido de sódio (da Ecibra);
- manteiga comercial (São Carlos);
- caseína (da Fisher Scientific Co.);

- lactose (mono-hidrato cristalino da Sigma Chemical Co.);
- leite homogeneizado (da Cia. Laco de Produtos Alimentícios);
- leite sintético.

2.3.2. Métodos

2.3.2.1. Método Infravermelho

Este método foi utilizado, primeiramente, para determinar as absorptividades individuais da gordura, proteína e lactose, tal como descrito abaixo:

Fizeram-se soluções de concentração conhecida para cada componente e gráficos das absorvâncias (A), obtidas versus concentração (c). Desde que a espessura da cela (b) da amostra é constante, o valor de inclinação desta reta é a absorptividade (a). Este método de preparação de curvas analíticas é o recomendado pela ASTM (45). As absorptividades assim obtidas foram multiplicadas por um fator de 1000, por conveniência.

Durante as primeiras experiências, quando se efetuavam os estudos sobre a compensação do solvente, ambas as celas continham água destilada. Porém, no decorrer do trabalho, encontrou-se que o uso de uma solução aquosa a 5% de NaCl gerava um incremento na transmitância, o que produzia melhor compensação. Por isso, a água foi substituída por esta solução, no feixe de referência. Posteriormente, confirmou-se o acerto desta escolha, na literatura (59). Nestas condições, o 100% T (transmitância) foi ajustado a 1980 cm^{-1} , utilizando-se o controle fornecido pelo

instrumento. Registrou-se, desse modo, o espectro de compensação da água. Ao se introduzir as diferentes soluções de gordura, proteína e lactose na cela de amostra, o 100% T foi ajustado simplesmente variando-se a espessura da cela no feixe de referência. Desta forma, registraram-se todos os espectros nesta pesquisa.

As soluções de gordura de 2, 4, 6 e 8% foram feitas da seguinte maneira (9): a manteiga comercial foi aquecida até $\pm 60^{\circ}\text{C}$ e filtrada no forno ($\pm 60^{\circ}\text{C}$), usando-se um funil previamente aquecido à mesma temperatura; a gordura separada foi pesada para fazer soluções (p/v) em clorofórmio, nas porcentagens indicadas. A água na cela de amostra foi substituída pelas soluções clorofórmicas de gordura; no feixe de referência colocou-se a cela de espessura variável contendo clorofórmio, e os espectros foram registrados segundo se explicou anteriormente.

As emulsões de proteína foram feitas dissolvendo-se as quantidades desejadas de caseína em soluções salinas a 5%, sob aquecimento leve (30°C) e adicionando-se 10ml de NaOH a uma concentração de 0,5N; logo após, foram colocadas num agitador (New Brunswick Scientific Co.) durante 15 minutos, a 200 RPM e 30°C . Neste caso, a cela de referência (de espessura variável) continha NaCl a 5% em água; na cela de amostra colocaram-se, sucessivamente, as diferentes concentrações de caseína (2, 4, 6 e 8%) e registraram-se os espectros, variando-se a espessura da cela de referência, segundo se explicou anteriormente.

As soluções de alfa lactose foram feitas simplesmente

por dissolução das quantidades necessárias de lactose em água, para se obter soluções contendo 2, 4, 6 e 8 g/100ml; os espectros foram varridos da forma usual.

Uma vez determinadas as absorptividades individuais de cada componente, passou-se à análise de amostras de leite homogeneizado. O uso deste tipo de leite faz-se necessário, porque o tamanho dos glóbulos de gordura no leite homogeneizado não afeta, de forma considerável, a intensidade do pico de absorção da gordura (15).

Analizou-se, também, uma amostra de leite sintético, que foi preparada utilizando-se quantidade suficiente dos principais componentes do leite. Tais componentes e suas concentrações são especificados a seguir:

Gordura	3,80%
Proteína	1,00%
Lactose	4,20%

Após prévia solubilização da proteína com NaOH 0,1N e 0,7 gramas de cloreto de sódio, a lactose e a gordura foram adicionadas, completando-se a 100ml com água. A mistura foi, então, colocada num liquidificador por 5 minutos, ao término dos quais sua aparência era comparável com a do leite homogeneizado. Correu-se, em seguida, um espectro do leite assim preparado, tendo-se em vista dois objetivos: verificar se o seu espectro se assemelhava com o do leite homogeneizado, e testar a sensibilidade do método em relação à determinação da proteína, desde que esta é o componente que

não é estimado diretamente da sua absorvância.

2.3.2.2. Métodos químicos

Todas as amostras do leite homogeneizado foram analisadas, também, pelos métodos químicos especificados a seguir:

-as determinações de gordura foram feitas pelo método de Gerber (33), na Cia. Leco de Produtos Alimentícios;

-as determinações de proteína foram feitas pelo método Micro-Kjeldahl (52), utilizando-se um fator de 6,38 (A.O.A.C. - 16.043), para a conversão do nitrogênio total em proteína;

-as determinações de lactose foram feitas pelo método volumétrico (39) Lane-Eynon (31.062 - A.O.A.C.).

As determinações, tanto químicas como infravermelhas, foram efetuadas em quatro amostras feitas em duplicata e recolhidas de quatro caixas diferentes de um mesmo lote.

2.3.3. Escolha dos Números de Onda para a Análise

A lei de Beer, quando aplicada a um sistema de n componentes, pode ser expressada assim (45):

$$A_{\sigma} = a_1 b c_1 + a_2 b c_2 + \dots + a_n b c_n \dots \quad (1)$$

onde A_{σ} =Absorvância (total) da amostra ao número de onda; a_j =absortividade do componente j ao número de onda σ ($j=1, 2, 3\dots n$); c_j =concentração do componente j ; b =espessura da cela da amostra. Arranjando-se a equação (1) para n números de onda, obtém-se uma equação da seguinte forma:

$$\begin{aligned}
A_1 &= a_{11}bc_1 + a_{12}bc_2 + \dots + a_{1n}bc_n \\
A_2 &= a_{21}bc_1 + a_{22}bc_2 + \dots + a_{2n}bc_n \\
&\dots\dots\dots \\
A_n &= a_{n1}bc_1 + a_{n2}bc_2 + \dots + a_{nn}bc_n
\end{aligned}
\tag{2}$$

Ao se utilizar uma espessura b fixa, tanto para a calibração como para as análises, esta pode ser considerada como constante, e o produto de axb pode ser substituído, na equação (2), pelo termo k. Os valores de k são determinados pelas medidas das absorvências dos componentes puros e substituem k em (2).

A resolução para cada componente na mistura de multicomponentes é feita, então, utilizando-se o método de aproximações sucessivas. Para o leite, que é um sistema de três componentes, as equações de Beer podem ser expressadas assim:

$$A_1 = k_{11}c_1 + k_{12}c_2 + k_{13}c_3$$

$$A_2 = k_{21}c_1 + k_{22}c_2 + k_{23}c_3$$

$$A_3 = k_{31}c_1 + k_{32}c_2 + k_{33}c_3$$

onde todos os números nestas equações são conhecidos, excetuando-se os valores de c_1 , c_2 e c_3 . Para a primeira aproximação temos que:

$$c_1 = \frac{A_1}{k_{11}} ; \quad c_2 = \frac{A_2}{k_{22}} ; \quad c_3 = \frac{A_3}{k_{33}}$$

Das primeiras experiências, em que se testaram diferentes espessuras na cela de amostra, obtivemos um espectro do leite representado na figura 1; aparecem claramente os picos principais de gordura, proteína e lactose, aos números de onda de 1735 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} e 1065 cm^{-1} , respectivamente, escolhidos para a determinação desses componentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Discussão das condições de operação do equipamento

Como foi estabelecido anteriormente no capítulo referente a Material e Método, o espectrofotômetro tem vários controles ajustáveis que permitem selecionar as variáveis de operação. Das quatro velocidades que o instrumento permite, nós escolhemos a velocidade lenta de varredura (slow scan mode), desde que a velocidade muito lenta (very slow scan mode) não produz nenhuma melhora apreciável. Além disso, esta velocidade (lenta) é a recomendada para medidas quantitativas. Esta seleção assegurava uma velocidade de registro de $100 \text{ cm}^{-1}/\text{min}$ de $4000\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$ e de $50 \text{ cm}^{-1}/\text{min}$ para números de onda inferiores a 2000 cm^{-1} , o que permitiu obter espectros satisfatórios.

Desde que a resolução do instrumento depende principalmente da largura das fendas, um programa de fendas (slit width program) de 7 garante uma energia (sinal) constante adequada para restituir a energia infravermelha perdida, devido à absorção da água.

A ganância (gain) do amplificador governa o movimento da caneta e ativa o servossistema atenuador. Se esta é muito pequena, a caneta move-se lentamente e é incapaz de seguir as variações de absorção da amostra; por outro lado, se é excessiva, incrementa o nível de ruído, o que pode ocasionar erros nas medidas quantitativas. Esta ganância está intimamente relacionada à cons-

tância de tempo (time constant), que afeta o tempo de resposta da caneta e, conseqüentemente, a relação sinal/ruído . A constância de 1 garante um tempo de resposta da caneta de 0,8 aproximadamente, obtendo-se uma relação sinal/ruído (signal to noise ratio) satisfatória (41).

Todos os espectros foram registrados nestas condições e por isso são omitidas nas referências de cada um.

3.2. Discussão dos espectros de absorção infravermelha

3.2.1. Absorção do leite homogeneizado numa espessura de 23 μm .

A figura Nº1 apresenta o espectro de absorção infravermelha do leite homogeneizado, contido numa cela de BaF_2 de espessura igual a 23 μm . Utilizou-se água destilada no feixe de referência, para efetuar a compensação do solvente, numa cela de espessura igual a 5,5 μm . As duas celas são formadas por cristais de BaF_2 . Este espectro foi o resultado de uma série de experiências,

nas quais se testaram diferentes espessuras na cela de amostra. O espectro é descontínuo, desde que nessas regiões a água ainda absorve e a informação obtida dela é nula (57), já que não há alteração aparente na resposta da caneta, se se introduz a mão entre a fonte de energia infravermelha e a cela contendo a amostra.

O pico de absorção a 1735 cm^{-1} , devido à vibração de estiramento (27) do grupamento carbonila da ligação éster dos triglicerídios, pode ser utilizado para a determinação da gordura , desde que a proteína e a lactose não apresentem absorção neste nú

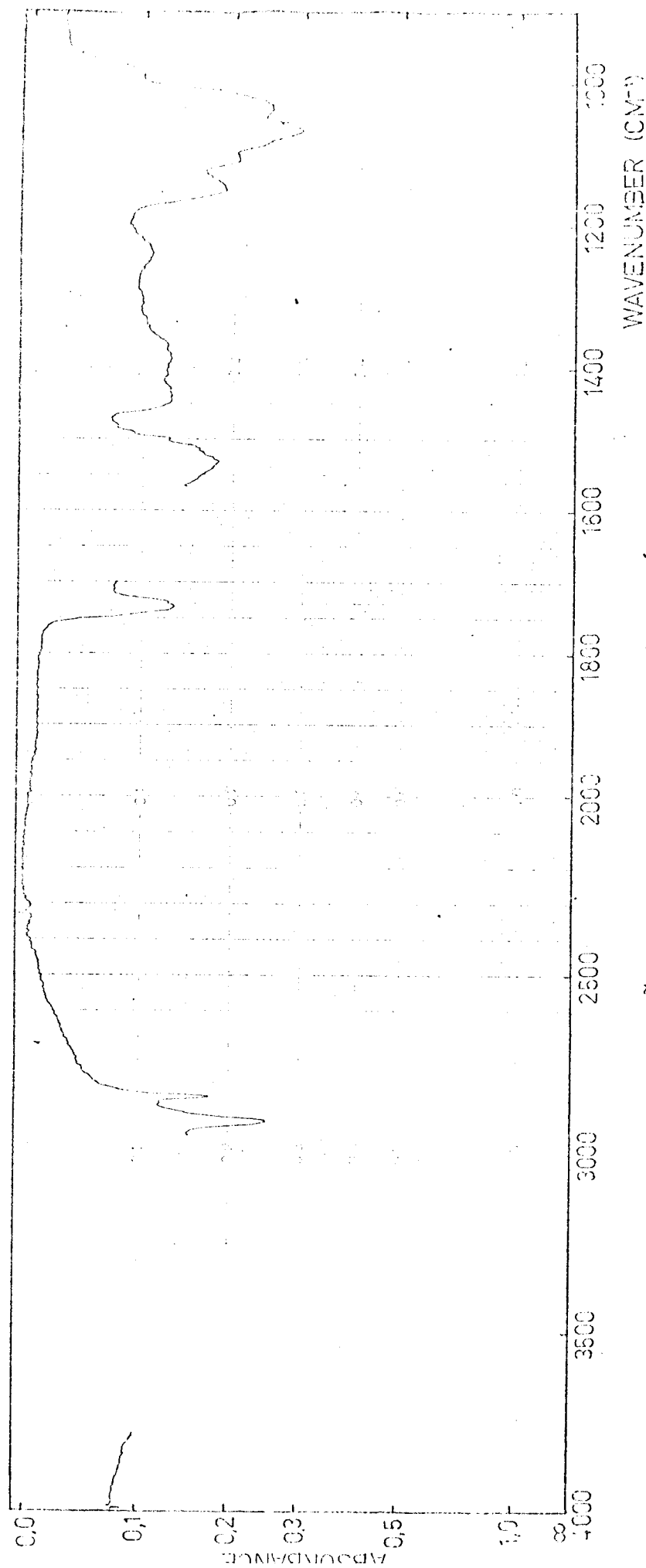


Figura Nº 1. Espectro de absorção do leite homogeneizado vs água. Espessuras de 23 μ m na cela da amostra e de 3,5 μ m na cela de referência. Antes as celas formadas por cristais de BaF₂.

mero de onda; isto será discutido posteriormente. A 1535 cm^{-1} , encontramos o pico de absorção do amido II, produto da vibração de deformação (27) do N-H das moléculas de proteína (R-LO-NHR); a 1065 cm^{-1} , o pico de absorção devido à vibração de estiramento (27) C-OH das moléculas de álcool da lactose.

Uma vez que os cristais ficavam opacos ao se utilizar espessuras na faixa de 15 a 30 μm , não foi possível adotar 23 μm como a espessura da cela da amostra; além disso, o espectro apresentado na figura Nº1 foi varrido na posição de velocidade máxima ($1000\text{ cm}^{-1}/\text{min}$ de $4000-2000\text{ cm}^{-1}$ e de $500\text{ cm}^{-1}/\text{min}$ de $2000-900\text{ cm}^{-1}$) porque a opacidade era tão grande a velocidades menores, que impedia medidas quantitativas acuradas. Esta perda em transmitância pela amostra possivelmente deve-se à denaturação da proteína do leite, resultante da pequena espessura utilizada.

3.2.2. Absorção da cela da amostra

A fig. Nº2 mostra a transmissão de luz da cela de CaF_2 - BaF_2 na região de $4000-900\text{ cm}^{-1}$. Desde que o pico de absorção da lactose ocorre a número de onda superior a 1000 cm^{-1} , onde esta cela tem uma redução da transmitância a $\pm 50\%$, podemos dizer que a combinação de cristais não é fator limitante para a determinação dos componentes do leite, ainda mais que a proteína e a gordura têm seus máximos de absorção a 1535 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} .

As setas 1 e 2, na figura Nº2, indicam os números de onda σ_1 e σ_2 selecionados para a estimação da espessura da cela;

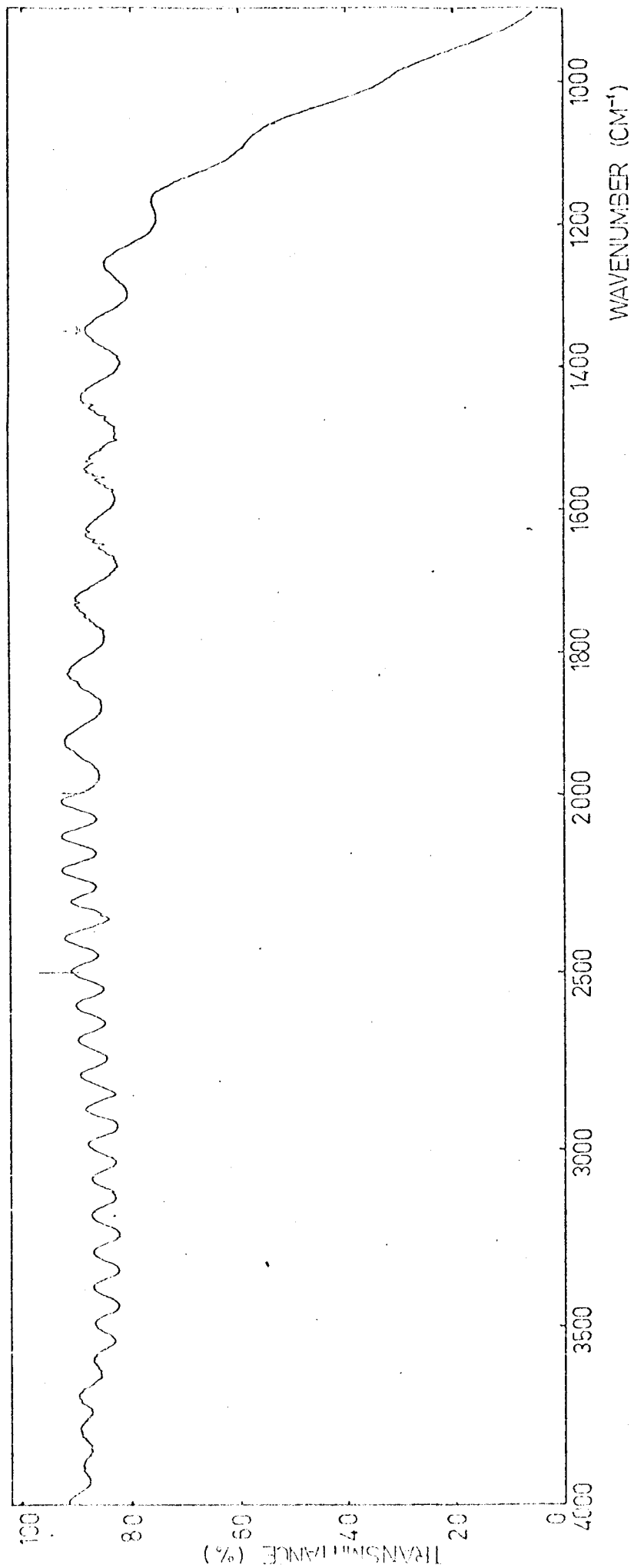


Figura Nº 2. Espectro infravermelho da cela da amostra, composta por cristais de CaF_2 na parte anterior e BaF_2 na posterior, separados por lâmina de chumbo de 51,5 μm .

esta é calculada facilmente pela seguinte fórmula (24):

$$d = \frac{\Delta m}{2(\sigma_1 - \sigma_2)}$$

onde d=espessura em cm; Δm =número de cristas ou vales entre σ_1 e σ_2 . Na figura Nº2, $\sigma_1 = 3390$, $\sigma_2 = 1350$ e $\Delta m = 21$, sendo d igual a 0,00515 cm (51,5 μm). Este valor difere do utilizado nas análises e preparação das curvas de calibração (51,7 μm), já que, ao concluir-se a pesquisa, a cela foi desmontada para polir os cristais e, ao montá-la novamente, para registrar os espectros apresentados neste trabalho, sua espessura foi levemente alterada.

3.2.3. Absorção da água, leite e cloreto de sódio versus ar

As figuras Nºs 3 e 4 apresentam os espectros infravermelhos de absorção da água e do leite homogeneizado contra ar, na região de 4000-900 cm^{-1} . A molécula de água tem três modos de vibração fundamental (3N-6): ocorrem vibrações de estiramento, simétrica e anti-simétrica, a 3652 cm^{-1} e 3756 cm^{-1} , respectivamente, (34) e uma vibração de deformação tipo tesoura a 1595 cm^{-1} (34), sendo o pico de absorção a 2100 cm^{-1} devido à combinação das vibrações fundamentais. A absorção da água é tão forte que mascara as absorções dos componentes do leite. Observam-se algumas diferenças entre as duas figuras nas regiões de 2900-2800 cm^{-1} , 1750-1700 cm^{-1} , 1450-1400 cm^{-1} e 1150-1000 cm^{-1} .

Na figura Nº5 apresenta-se o espectro infravermelho de cloreto de sódio aquoso a 5% contra ar. Tendo-se certa experiência

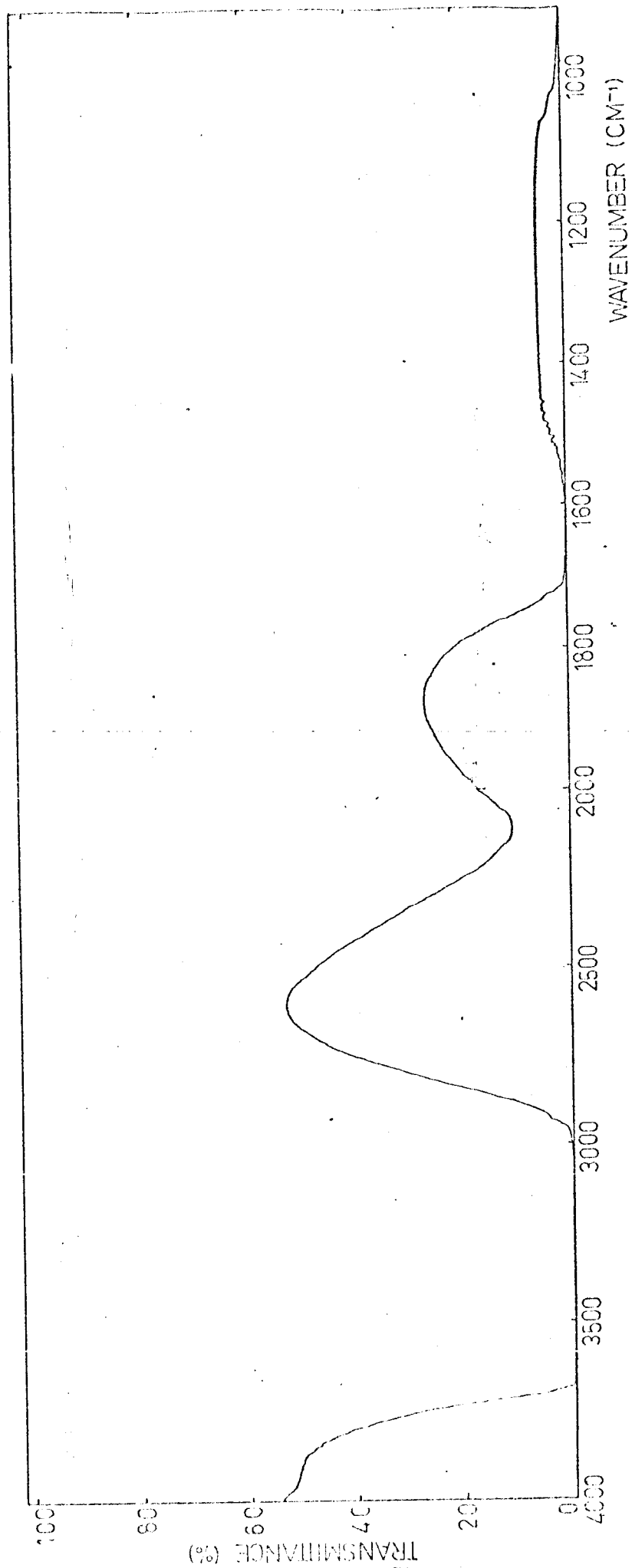


Figura Nº 3. Espectro de absorção da água versus ar. Espessura de 51,5 um • PART NO 412 593

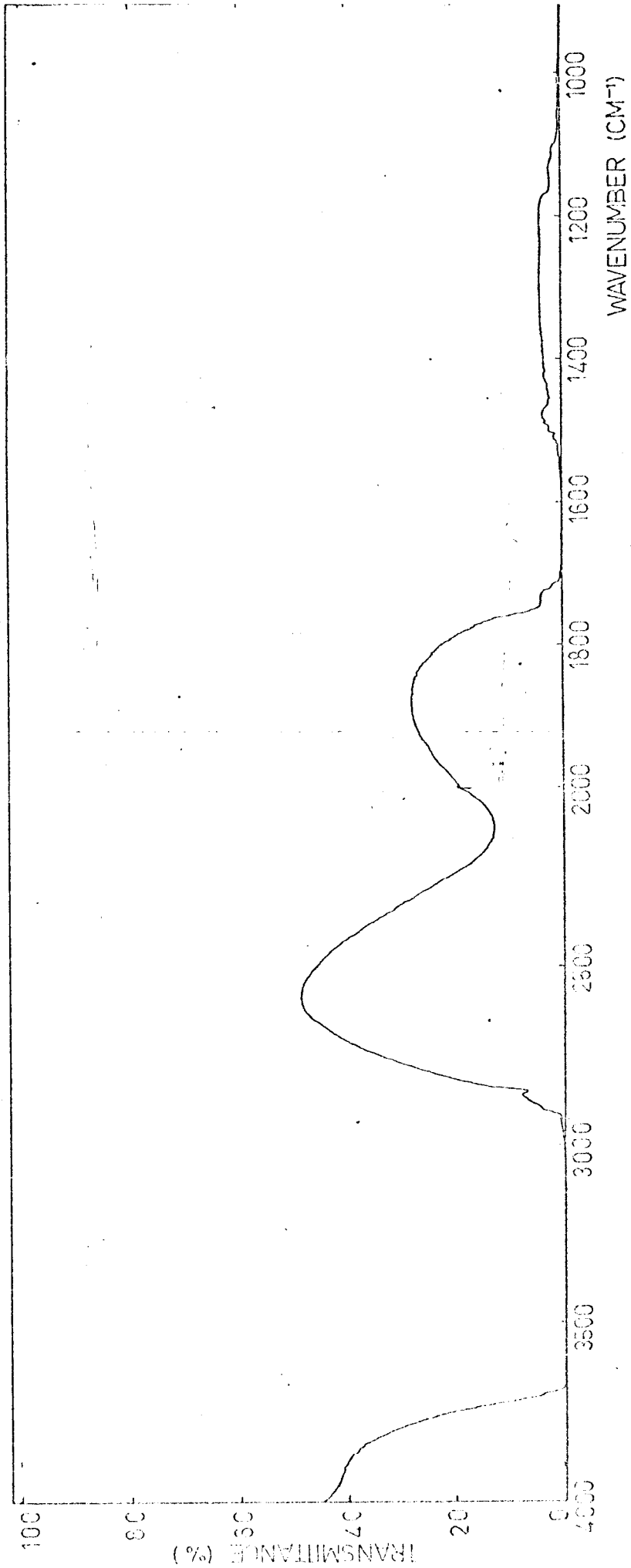


Figura Nº 4. Espectro de absorção do leite homogeneizado versus ar. Espessura de 51,5 μ m

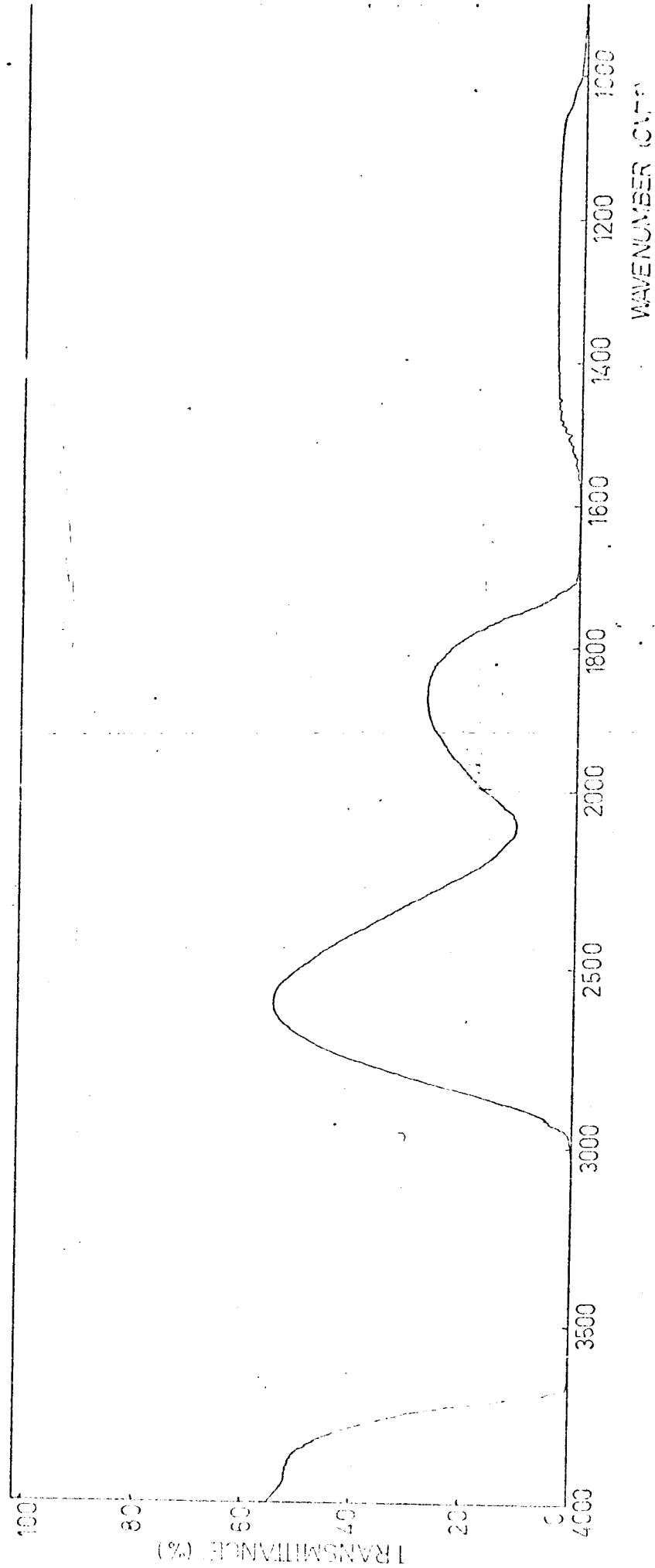


Figura Nº 5. Espectro de absorção de cloreto de sódio aquoso versus ar. Espessura de 51,5 um

em espectroscopia, é possível notar umas ligeiras diferenças no contorno dos picos de absorção da água, principalmente naquele da região da vibração de tesoura ($\pm 1600 \text{ cm}^{-1}$), o que concorda com as experiências de Thompson (59). Comparando-se os espectros da água, do leite homogeneizado e do cloreto de sódio aquoso, das figuras N^{os} 3, 4 e 5, respectivamente, observa-se que essas diferenças tornam os espectros do leite e do cloreto de sódio aquoso mais semelhantes entre si do que os espectros da água e do leite. Isto se deve ao fato de que a transmitância da solução de cloreto de sódio é ligeiramente superior à da água, sendo esta observação concordante com a da literatura (31, 59).

3.2.4. Espectro de compensação do solvente

A figura N^o 6 apresenta o espectro de compensação do solvente, ao se utilizar cloreto de sódio aquoso a 5% no feixe de referência. Utilizou-se a cela de $\text{CaF}_2\text{-BaF}_2$ ($51,5 \mu\text{m}$) no feixe da amostra e ajustou-se a cela de espessura variável à mesma medida, no feixe de referência. Pode-se notar que a água contida em celas de aproximadamente $50 \mu\text{m}$ transmite no mínimo 20% da radiação incidente nas regiões de $1500\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$, sendo esta transmitância de $\pm 50\%$ nas faixas de $3000\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$ e de $1500\text{-}1050 \text{ cm}^{-1}$. Note-se também a ausência total do pico de combinação a 2100 cm^{-1} , que aparece nas figuras N^{os} 3, 4 e 5. Conseqüentemente, se se coloca uma cela contendo cloreto de sódio aquoso no feixe de referência, a compensação pode ser realizada.

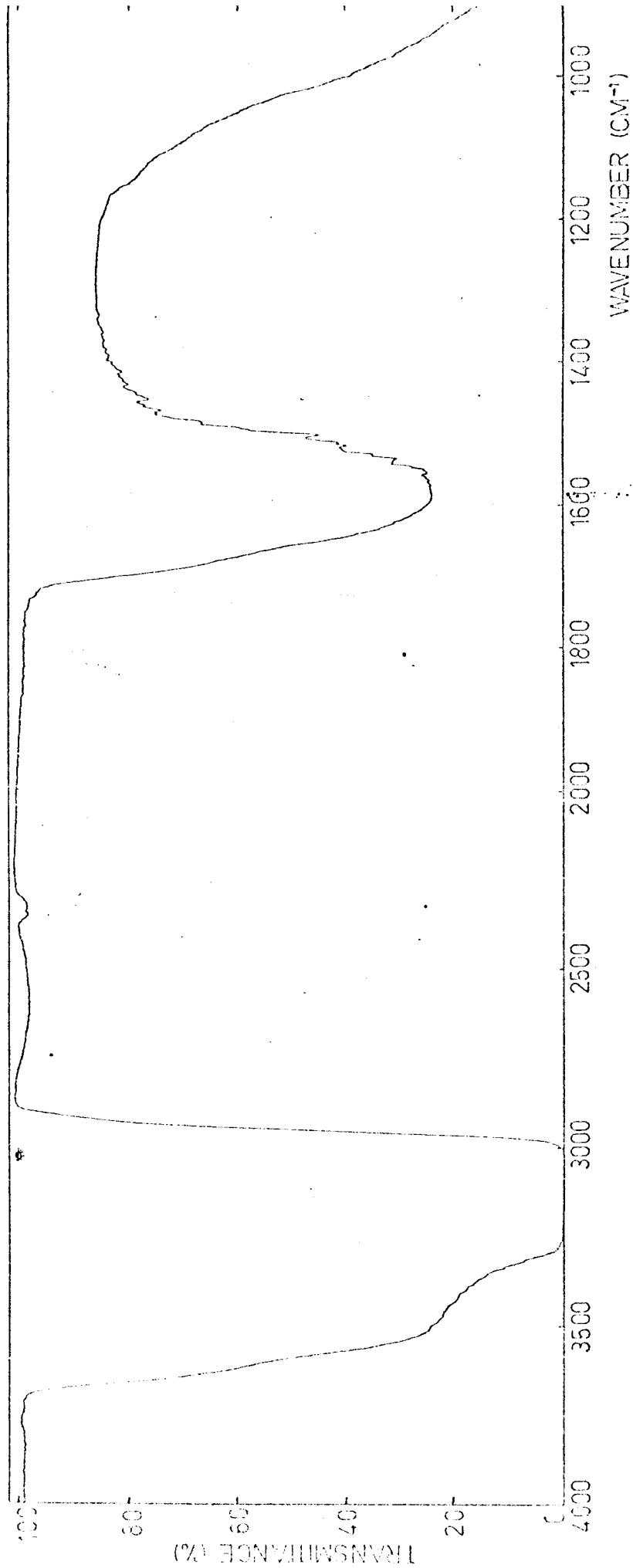


Figura Nº 6. Espectro de absorção da água, utilizando-se, para compensação cloreto de sódio aquoso a 2% no feixe de referência. Espessuras de 51,5 um na cela da amostra e de 51,5 um na cela de referência.

3.2.5. Absorção do leite homogeneizado numa espessura de 51,5 μm

A figura N°7 ilustra o espectro do leite homogeneizado, ao se utilizar a cela de espessura variável contendo cloreto de sódio aquoso a 5% no feixe de referência, para realizar a compensação do solvente. Observe-se os picos de absorção a 1735 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} e 1065 cm^{-1} , correspondentes à gordura, proteína e lactose, como se indicou anteriormente.

As diferenças deste espectro com o apresentado na figura N°1 podem ser explicadas pelos seguintes fatos:

- a espessura da cela da amostra foi de 23,0 μm para o espectro da figura N°1, enquanto que foi de 51,5 μm para o da figura N°7;

- a espessura da cela de referência foi de 5,5 μm , para o espectro da figura N°1, enquanto que foi de 54,0 μm para o da figura N°7;

- os cristais utilizados na cela da amostra foram cristais de BaF_2 , para o espectro da figura N°1, enquanto que foi utilizada uma combinação de CaF_2 - BaF_2 para o da figura N°7;

- a compensação foi realizada utilizando-se água destilada para o espectro da figura N°1, enquanto que utilizou-se cloreto de sódio aquoso a 5% para o da figura N°7.

No entanto, os dois espectros se assemelham num ponto fundamental: tanto no espectro da figura N°1 como no da figura N°7, os picos de absorção dos três componentes são encontrados exatamente no mesmo número de onda.

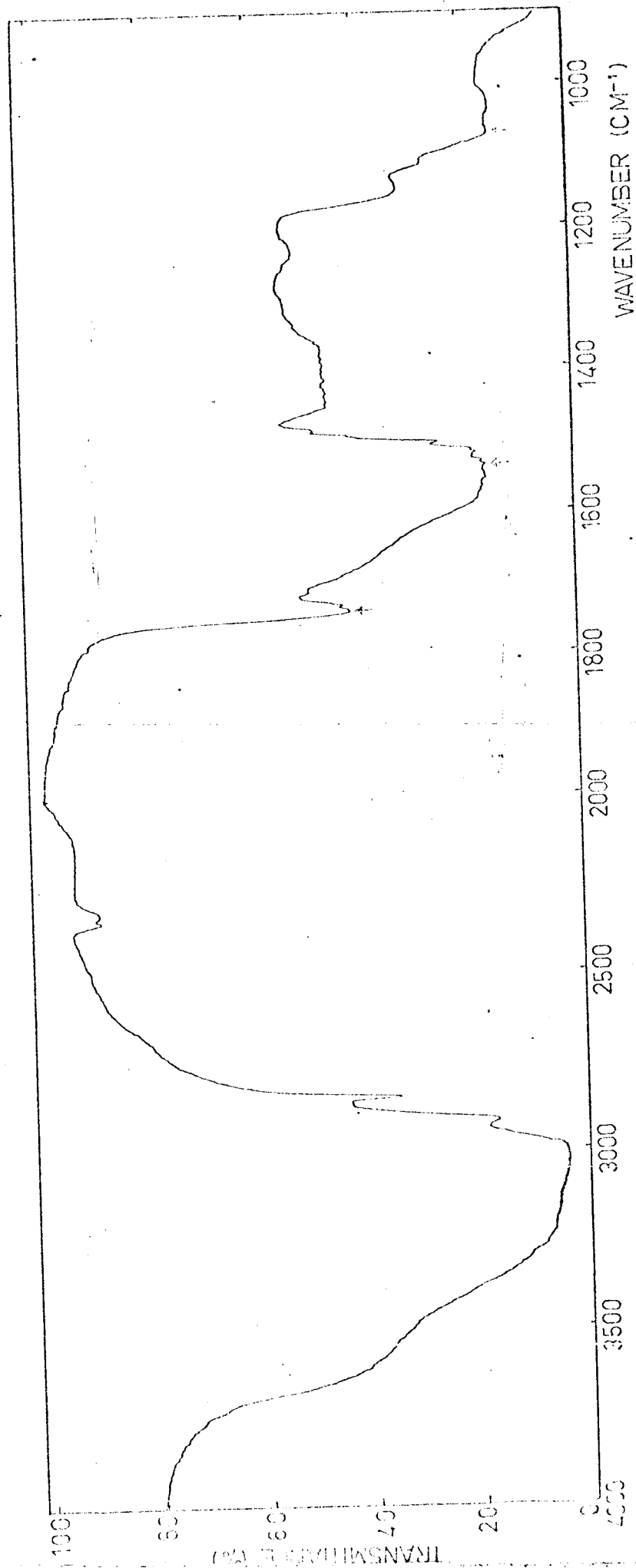


Figura 7. Espectro de absorção do leite homogeneizado versus cloreto de sódio aquoso a 5% •
Espessuras de 51,5 um na cela da amostra e 54,0 um na cela de referência.

3.2.6. Absorção da lactose, proteína e gordura

As figuras Nºs 8, 9 e 10 apresentam os espectros infravermelhos dos principais componentes do leite. A figura Nº 8 apresenta o espectro de absorção da lactose. A seta, neste espectro, indica o pico de absorção escolhido para a determinação da lactose, que coincide com os apresentados nas figuras Nºs 1 e 7 (a número de onda de 1065 cm^{-1}). Na figura Nº 8, observa-se que a absorção da lactose a 1735 cm^{-1} é desprezível, sendo a absorção a 1535 cm^{-1} devido principalmente à água presente. Por este motivo podemos desprezar sua contribuição na absorção dos outros componentes. A figura Nº9 apresenta o espectro de absorção da caseína. Do mesmo modo, a seta aponta o pico de absorção ao número de onda escolhido para a determinação da proteína (1535 cm^{-1}), que corresponde com os das figuras Nºs 1 e 7. Observa-se a ausência de picos de absorção a 1065 cm^{-1} e a 1735 cm^{-1} ; por isso, sua contribuição em absorção é insignificante nos números de onda onde se faz a determinação de gordura e lactose. A figura Nº 10 apresenta o espectro infravermelho da gordura; aparece um pico bem definido a 1735 cm^{-1} , concordante com aquele nas figuras Nºs 1 e 7, devido à vibração de estiramento do C=O como se estabeleceu anteriormente. Segundo O'Connor e colaboradores (38), a ausência de picos entre 1100 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} pode ser utilizada como evidência de triglicerídios. A pequena inflexão em $\pm 1015\text{ cm}^{-1}$ se deve ao solvente (CHCl_3), como se poderá apreciar na figura Nº11. Deve-se que não existem picos (no espectro da gordura) na região onde

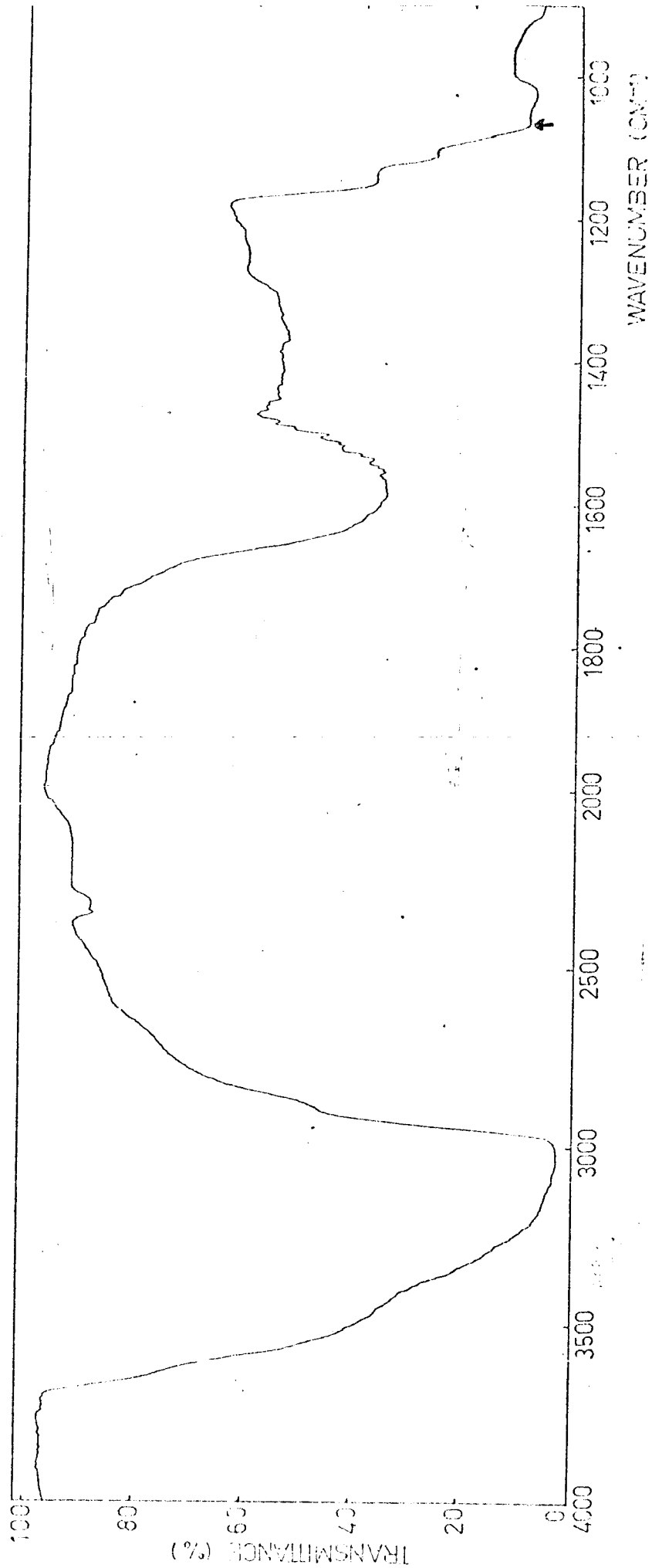


Figura Nº 8. Espetro de absorção da lactose (aquosa) versus cloreto de sódio aquoso a 5%. Espessuras de 51,5 um na cela da amostra e 58,5 um na cela da referência.

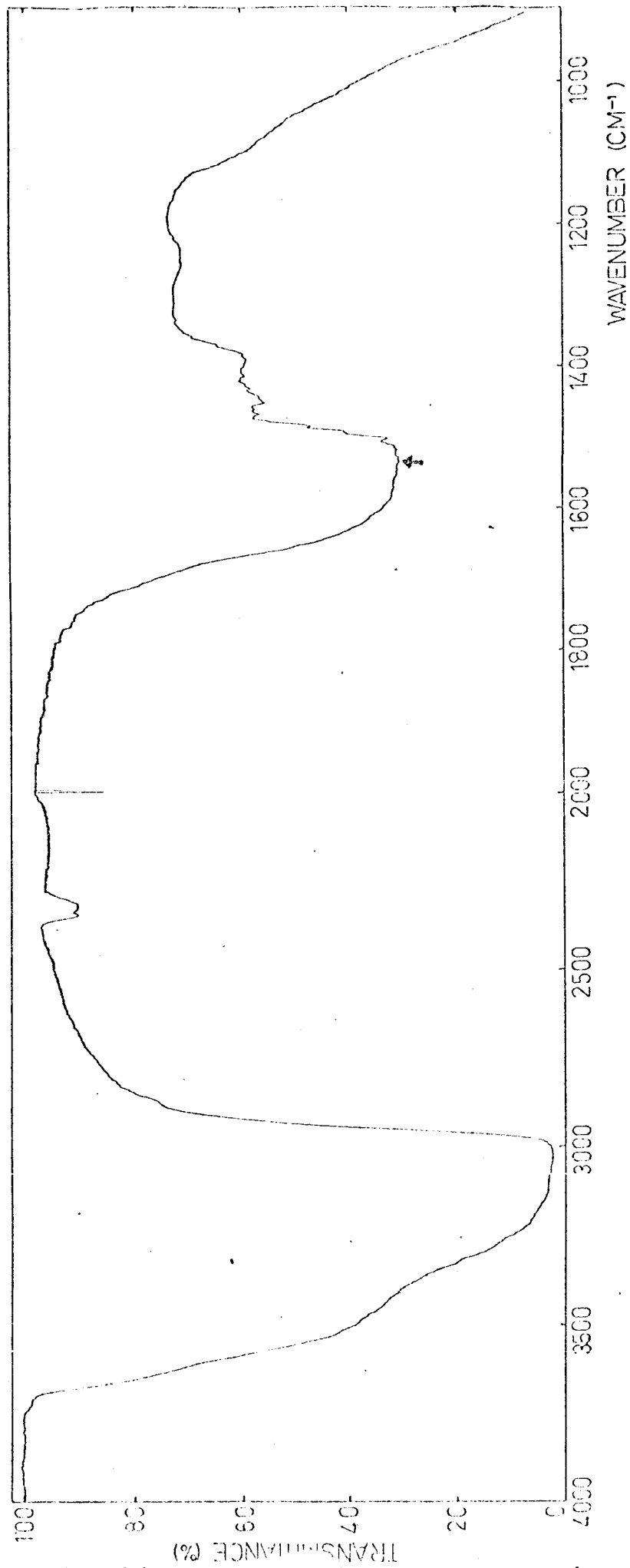


Figura Nº 9. Espetro de absorção da caseína (solução alcalina) versus cloreto de sódio aquoso

a 5%. Espessuras de 51,5 um na cela da anótera e de 57,5 um na cela de referência.

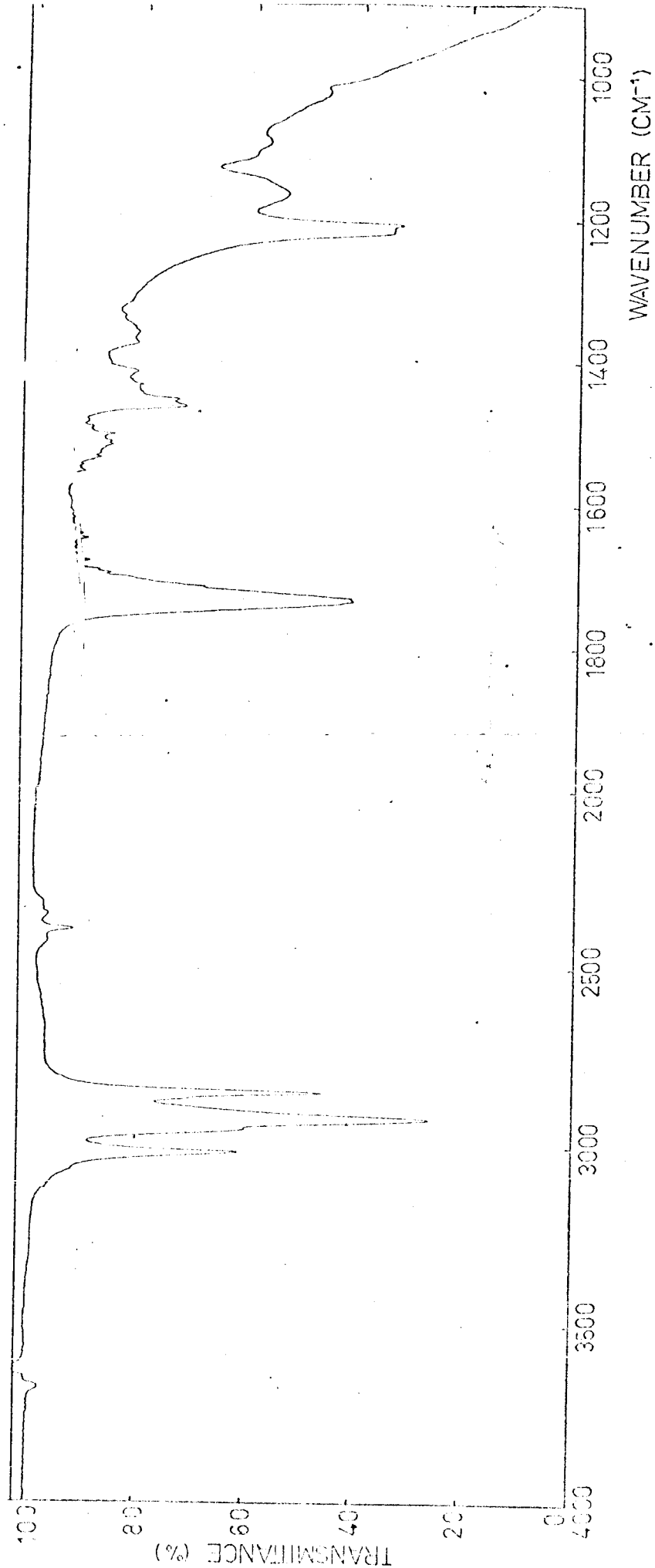


Figura Nº 10. Espectro de absorção da gordura (solução clorofórmica) versus clorofórmio. Espessuras de 51,5 um na cela da amostra e 51,5 um na cela de referência.

se faz a determinação da lactose (1065 cm^{-1}), a contribuição da gordura na absorção da lactose é desprezível; porém Greppin e Collin (23) acham que um termo de correção devido à gordura deve ser incluído. Goulden (19) estabeleceu que a gordura contribui de forma negativa para a absorção da proteína; por isso a determinação desta última é feita corrigindo-se cada leitura de proteína com a relação das absortividades relativas (gordura/proteína) a 1535 cm^{-1} e o conteúdo de gordura previamente determinado, ou seja:

$$\% \text{Proteína} = \frac{A(\text{proteína})}{a(\text{proteína})} - \left(\frac{1,05}{77,1} \right) \times c(\text{gordura})$$

3.2.7. Absorção do clorofórmio

A figura Nº 11 apresenta o espectro infravermelho do clorofórmio. O clorofórmio (CHCl_3) encontra-se entre os poucos solventes de boa transparência infravermelha, além de ser bom dissolvente para a gordura. O espectro não apresenta picos de absorção na região de 1700 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} e não interfere, portanto, com a determinação da gordura.

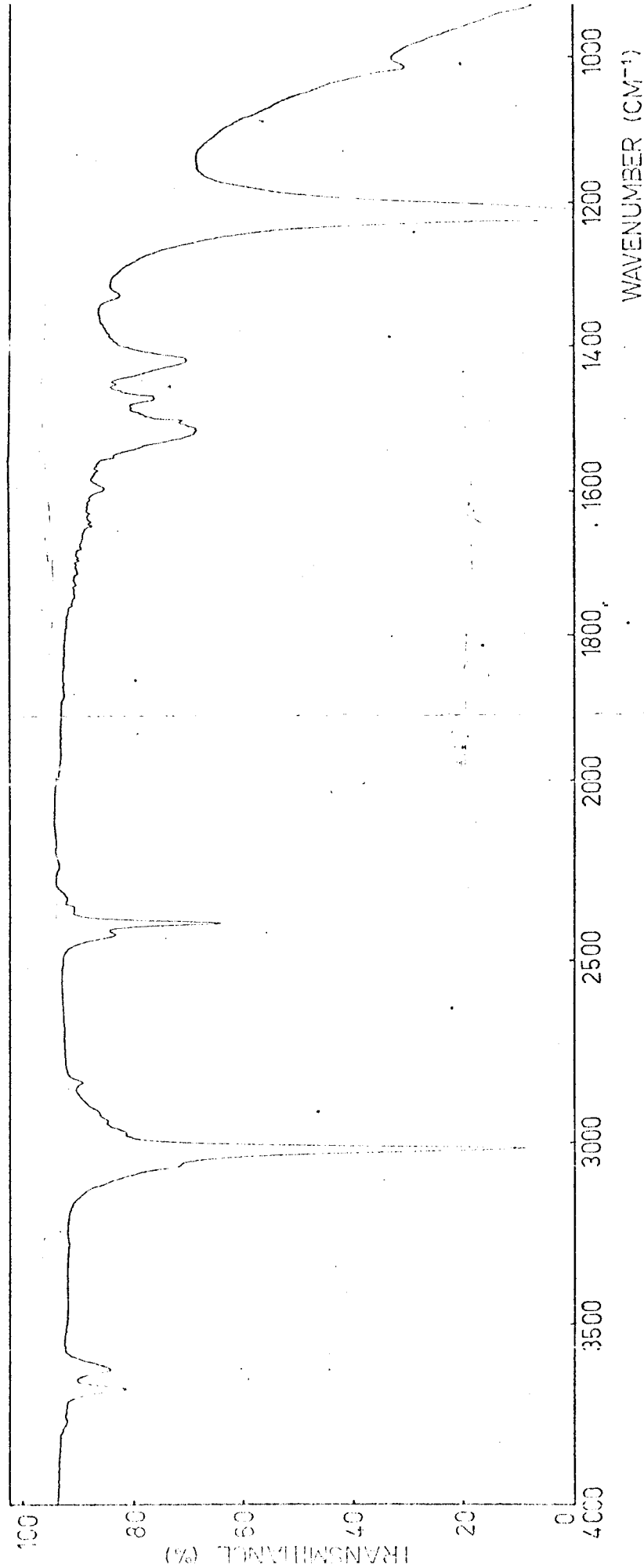


Figura 11. Espectro de absorção do clorofórmio versus ar. Espessura de 51,5 μ m

3.2.8. Absorção do leite sintético

A figura Nº12 ilustra o espectro infravermelho do leite sintético, preparado com a mistura de quantidades conhecidas de gordura, proteína e lactose (também NaCl). A inclusão desse espectro teve duas finalidades principais:

-primeira, estabelecer a correlação com os picos de absorção do leite homogeneizado, apresentados na figura Nº7. As diferenças nas intensidades dos picos de absorção nas duas figuras para os diferentes componentes se deve ao fato de que a composição do leite sintético não foi exatamente a mesma que a do leite homogeneizado. Além disso, observa-se que a intensidade do pico de absorção a 1735cm^{-1} é menor para o leite sintético, o que pode ser atribuído ao tamanho e ao grau de homogeneização dos glóbulos de gordura. Isto, por sinal, serve para demonstrar que a homogeneização afeta a sensibilidade do método.

-segunda, testar a sensibilidade do instrumento; a figura Nº12 mostra uma transmitância de 23,5% para o pico da proteína a 1535cm^{-1} e outra de 51,2% para o da gordura a 1735cm^{-1} ; ao se utilizar os dados dos quadros Nº4, 5 e 7, encontra-se que a porcentagem de gordura no leite sintético foi de 3,32 e a da proteína foi de 0,99, depois de se fazer a correção, como já se explicou.

O espectro ilustrado na figura Nº12 correlaciona-se bem com o do leite homogeneizado; é importante notar que esta correlação assegura que os números de onda selecionados foram os indicados.

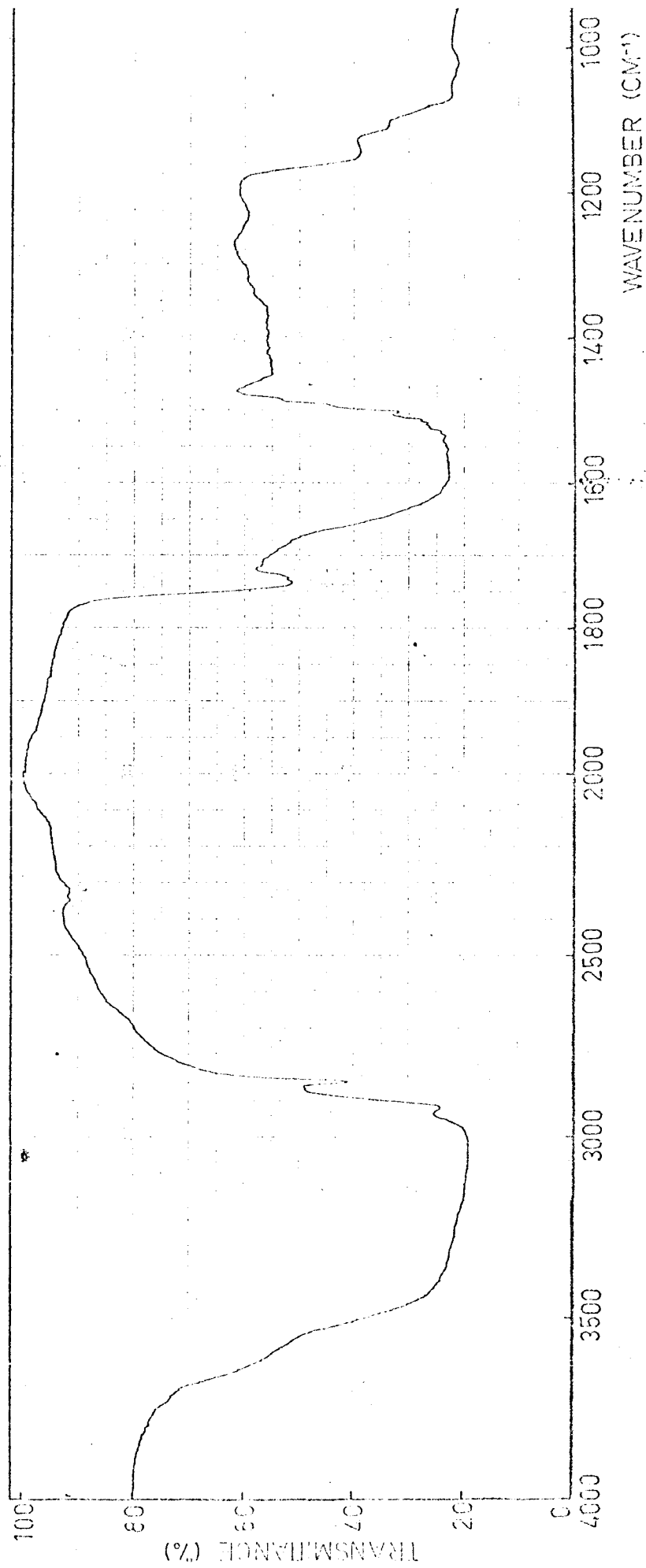


Figura Nº 12. Espectro de absorção do leite sintético versus cloroto de sódio aquoso a 5%. Espessuras de 51,5 um na cela da amostra e de 51,0 na cela de referência.

3.3. Discussão dos quadros e gráficos

3.3.1. Quadros de reprodutibilidade e quadros de concentração versus absorvância

Os quadros N^{os} 1, 2 e 3 demonstram a reprodutibilidade do método em relação a mudanças na concentração de gordura, proteína e lactose, respectivamente. Os dados apresentados neles foram obtidos pelas leituras diretas das transmitâncias de soluções de gordura, proteína e lactose, aos números de onda indicados. A precisão do instrumento encaixa-se bem com as especificações fornecidas pela Perkin Elmer (41) ($\pm 1\%$ na ordenada ou transmitância). Estes quadros apresentam também a variação da espessura da cela de referência, em relação a mudanças na concentração destes componentes; isto será discutido posteriormente.

Os dados da transmitância ($\bar{T}$) obtidos nesses quadros foram necessários para a elaboração dos quadros N^{os} 4, 5 e 6; nestes últimos, $\bar{T}/\bar{T}_0$ é a transmitância relativa àquela do solvente utilizado e a partir dela calculou-se a absorvância, A . Mediante aproximação linear, seguindo o método dos mínimos quadrados (regressão linear), obtiveram-se as absorvâncias A^1 que foram utilizadas na elaboração das curvas de calibração (gráficos N^{os} 1, 2 e 3).

As equações calculadas mediante regressão linear, com base nos dados de concentração e absorvância, apresentados nos quadros N^{os} 4, 5 e 6, têm a seguinte forma:

$$y = bx + a$$

onde $y = A^1$ (absorvância); b = inclinação da reta; x = concentração; a = intercepção. Para os componentes do leite as equações correspondentes são:

	1735 cm^{-1}	1535 cm^{-1}	1065 cm^{-1}
Gordura	$0,0849\% + 0,015$	$0,0011\% + 0,004$	$0,0081\% + 0,011 A^1$
Proteína	$0,0035\% - 0,004$	$0,0771\% - 0,073$	$0,0072\% + 0,006 A^1$
Lactose	$0,0008\% + 0,004$	$0,0039\% + 0,022$	$0,1136\% - 0,010 A^1$

QUADRO Nº 1. Reprodutibilidade das leituras de Transmitância versus Concentração de gordura pelo aparelho infravermelho.

	Concentração (g/100ml)					Número de Onda (cm^{-1})
	0	2	4	6	8	
T	97,50	63,30	43,50	29,20	19,20	1735
	98,50	64,50	43,50	29,50	20,30	
$\bar{T}$	98,00	63,90	43,50	29,35	19,80	
$\bar{T}$	95,00	93,80	93,20	93,20	92,50	1535
	95,00	93,50	93,00	92,50	92,00	
$\bar{T}$	95,00	93,65	93,10	92,85	92,25	
T	63,50	60,50	58,00	56,30	54,50	1065
	64,00	59,50	57,20	55,00	52,70	
$\bar{T}$	63,75	60,00	57,60	55,65	53,60	

T Transmitância

$\bar{T}$ Média das leituras das transmitâncias

A espessura da cela de referência foi de 51,7 μm

QUADRO Nº 2. Reprodutibilidade das leituras de Transmitância versus Concentração de proteína pelo aparelho infravermelho.

	Concentração(g/100ml)					Número de Onda(cm^{-1})
	0	2	4	6	8	
T	95,50	94,50	93,50	89,30	89,00	1735
	97,00	96,50	95,50	94,00	94,00	
$\bar{T}$	96,25	95,50	94,50	91,65	91,50	
T	29,50	22,20	17,00	13,80	6,50	1535
	27,00	22,50	17,00	11,00	8,70	
	28,25	22,35	17,00	12,40	7,60	
T	66,00	64,00	60,50	58,50	56,00	1065
	64,00	61,00	59,00	58,00	56,00	
	65,00	62,50	59,75	58,25	56,00	
b^1	50,50	51,50	52,00	49,00	48,00	
	50,50	52,00	52,50	49,00	47,50	
$\bar{b}$	50,50	51,75	52,25	49,00	47,75	

T Transmitância

$\bar{T}$ Média das leituras das transmitâncias

b^1 Espessura da cela de referência em μm

$\bar{b}$ Média das espessuras

QUADRO Nº 3. Reprodutibilidade das leituras de Transmitância versus Concentração de lactose pelo aparelho infravermelho.

		Concentração(g/100ml)					Número de Onda(cm^{-1})
		0	2	4	6	8	
T		95,50	93,90	93,50	93,50	92,80	
		96,00	95,00	95,00	94,50	94,00	1735
$\bar{T}$		95,75	94,45	94,25	94,00	93,45	
T		31,00	29,50	27,00	29,50	28,80	
		27,00	25,50	25,00	22,70	23,00	1535
$\bar{T}$		29,00	27,50	26,00	26,00	25,90	
T		66,00	39,50	23,50	14,10	8,50	
		64,00	38,50	24,50	13,00	8,00	1065
$\bar{T}$		65,00	38,00	24,00	13,55	8,25	
b^1		50,50	51,50	50,50	49,50	49,50	
		51,00	52,00	50,50	50,00	49,50	
$\bar{b}$		50,75	51,75	50,50	49,75	49,50	

T Transmitância

$\bar{T}$ Média das leituras das transmitâncias

b^1 Espessura da cela de referência em μm

$\bar{b}$ Média das espessuras

QUADRO Nº 4. Absorvância versus concentração de gordura.

Número de Onda (cm^{-1})	Transmitância		Absorvância		Concentração (g/100ml)
	$\bar{T}\%$	$\bar{T}/\bar{T}_0\%$	A	A^1	
1735	98,00	100,00	0,0000	0,0148	0
	63,90	65,20	0,1850	0,1846	2
	43,50	44,39	0,3527	0,3544	4
	29,35	29,95	0,5236	0,5242	6
	19,80	20,20	0,6946	0,6940	8
1535	95,00	100,00	0,0000	0,0042	0
	93,65	98,58	0,0062	0,0063	2
	93,10	98,00	0,0088	0,0084	4
	92,85	97,74	0,0099	0,0105	6
	92,25	97,11	0,0128	0,0126	8
1065	63,75	100,00	0,0000	0,0107	0
	60,00	94,12	0,0263	0,0269	2
	57,60	90,35	0,0441	0,0431	4
	55,65	87,29	0,0590	0,0593	6
	53,60	84,08	0,0753	0,0755	8

QUADRO Nº 5. Absorvância versus concentração de proteína.

Número de Onda (cm^{-1})	Transmitância		Absorvância		Concentração (g/100ml)
	$\bar{T}\%$	$\bar{T}/\bar{T}_0\%$	A	A^1	
1735	96,25	100,00	0,0000	0,0036(-)	0
	95,50	99,22	0,0034	0,0033	2
	94,50	98,18	0,0080	0,0102	4
	91,65	95,22	0,0213	0,0172	6
	91,50	95,06	0,0220	0,0241	8
1535	28,25	100,00	0,0000	0,0731(-)	0
	22,35	79,12	0,1017	0,0812	2
	17,00	60,18	0,2206	0,2354	4
	12,40	43,89	0,3576	0,3896	6
	7,60	26,90	0,5702	0,5438	8
1065	65,00	100,00	0,0000	0,0060	0
	62,50	95,38	0,0205	0,0203	2
	59,75	91,92	0,0366	0,0347	4
	58,25	89,62	0,0476	0,0491	6
	56,00	86,15	0,0647	0,0634	8

QUADRO Nº 6. Absorvância versus concentração de lactose.

Número de Onda (cm^{-1})	Transmitância		Absorvância		Concentração (g/100ml)
	$\bar{T}$	$\bar{T}/\bar{T}_0\%$	A	A^1	
1735	95,75	100,00	0,0000	0,0040	0
	94,45	98,64	0,0059	0,0055	2
	94,25	98,43	0,0069	0,0070	4
	94,00	98,17	0,0080	0,0086	6
	93,45	97,60	0,0106	0,0101	8
1535	29,00	100,00	0,0000	0,0222	0
	27,50	94,83	0,0231	0,0300	2
	26,00	89,66	0,0474	0,0378	4
	26,00	89,66	0,0474	0,0456	6
	25,90	89,31	0,0491	0,0534	8
1065	65,00	100,00	0,0000	0,0100(-)	0
	39,00	60,00	0,2218	0,2172	2
	24,00	36,92	0,4327	0,4445	4
	13,55	20,85	0,6810	0,6717	6
	8,25	12,69	0,8965	0,8990	8

3.3.2. Aplicabilidade da lei de Beer

A linearidade da lei de Beer é confirmada nos gráficos N^{os} 1, 2 e 3. Estes gráficos foram feitos especialmente para determinar as absorptividades individuais da gordura, proteína e lactose, aos números de onda selecionados.

As absorptividades relativas dos componentes a cada número de onda foram calculadas das inclinações das retas nestes gráficos. Dividindo-se as diferenças das absorvâncias pelas diferenças em concentração, obtém-se as absorptividades, já que b é constante; este método de cálculo foi utilizado por Goulden (21) no seu trabalho relativo à análise do leite por absorção infravermelha.

A interceptação negativa da proteína no gráfico N^o 2 se deve a um possível deslocamento da água pelas partículas da caseína, que parecem mais fortemente absorventes. Isto, possivelmente, não acontece com a gordura e a lactose, desde que elas formam soluções verdadeiras em clorofórmio e água, respectivamente. A explicação sugerida para a interceptação negativa da caseína é concordante com o fato de que, com emulsões e soluções concentradas, há um deslocamento das moléculas fortemente absorventes da água (31).

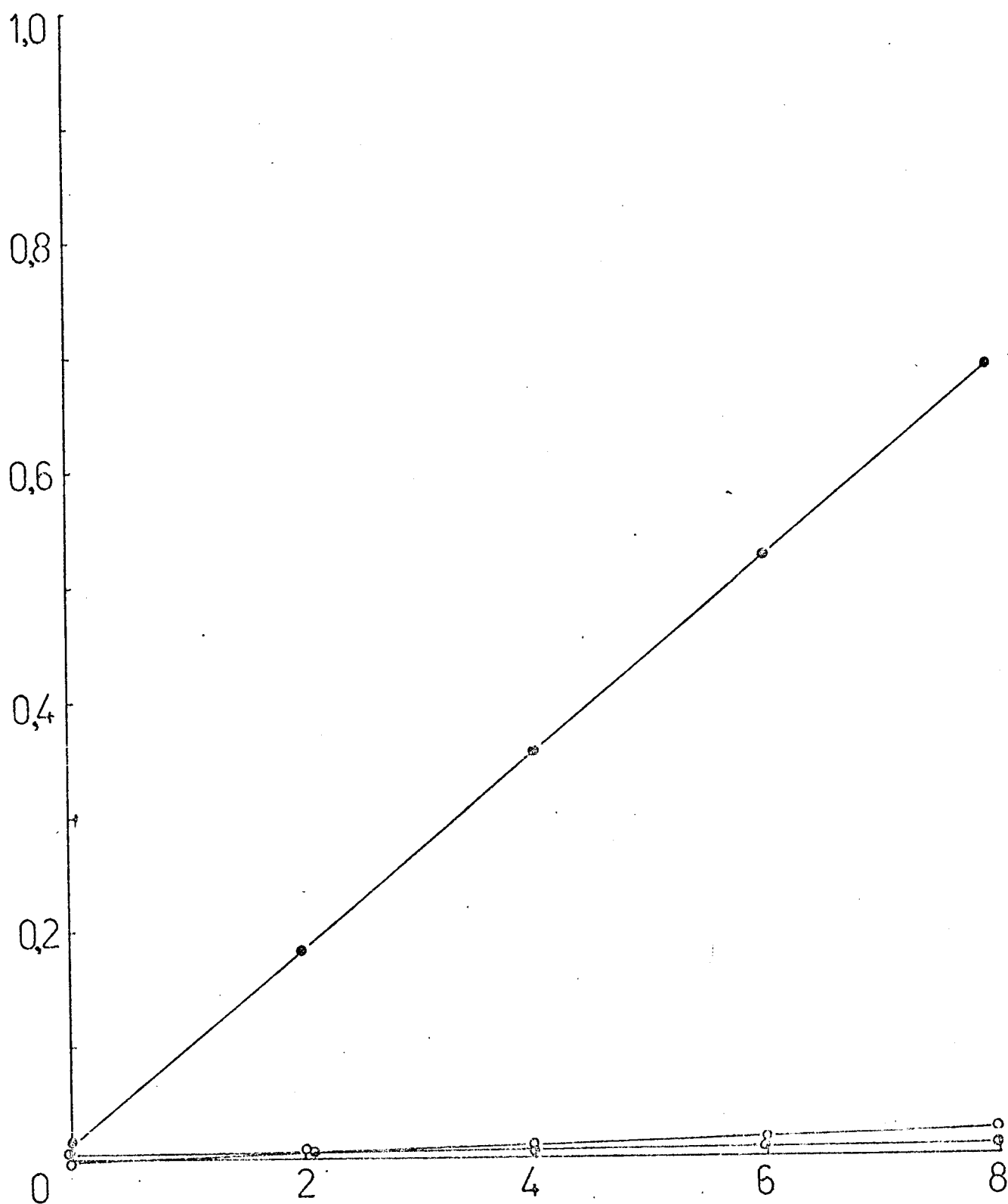


GRÁFICO Nº 1. Aplicabilidade da lei de Beer. Absorvância versus concentração de gordura (●), proteína (○) e lactose (◻) a 1735cm^{-1}

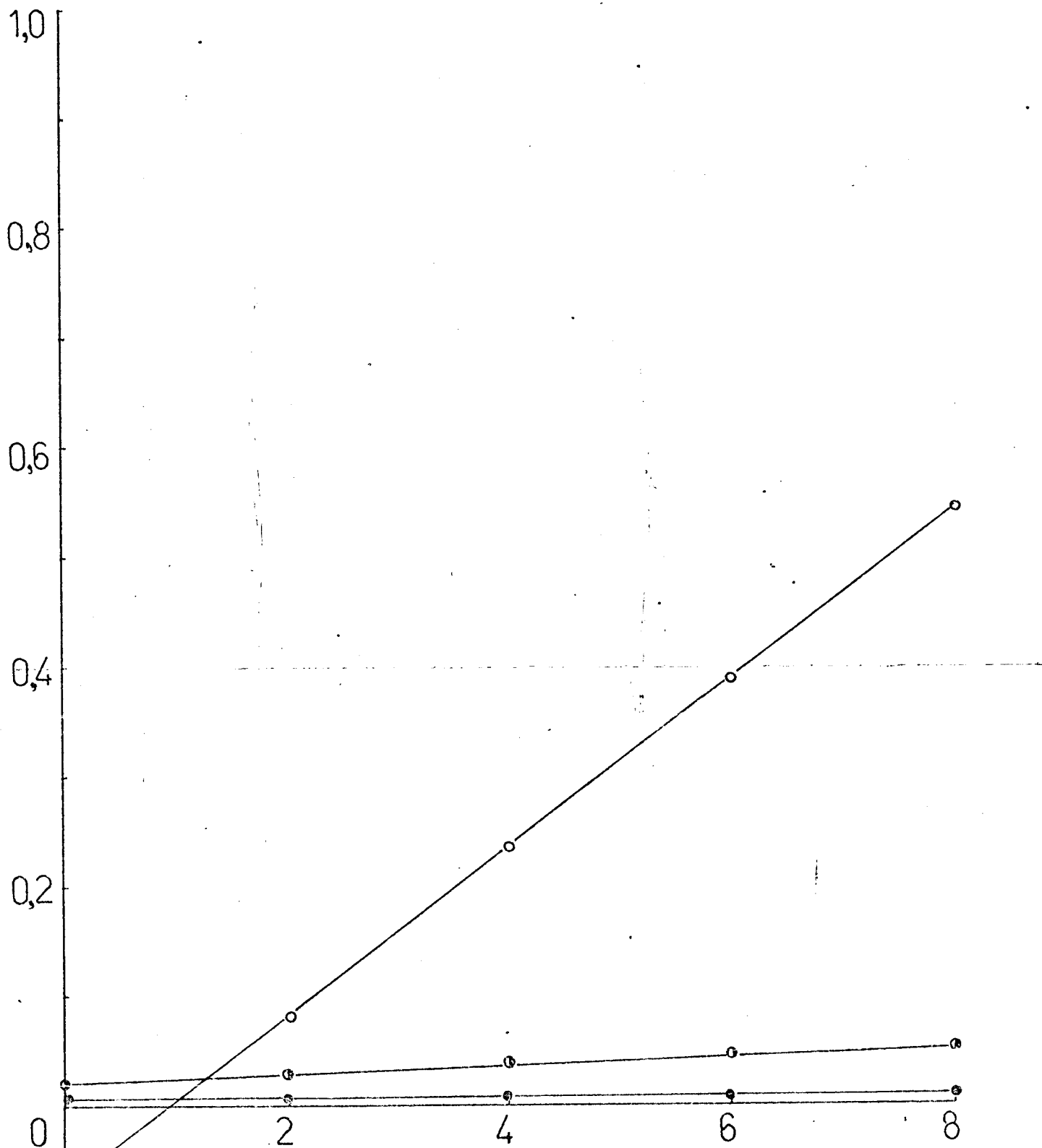


GRÁFICO Nº 2. Aplicabilidade da lei de Beer. Absorvância versus concentração de gordura (●), proteína (○) e lactose (◐) a 1535cm^{-1}

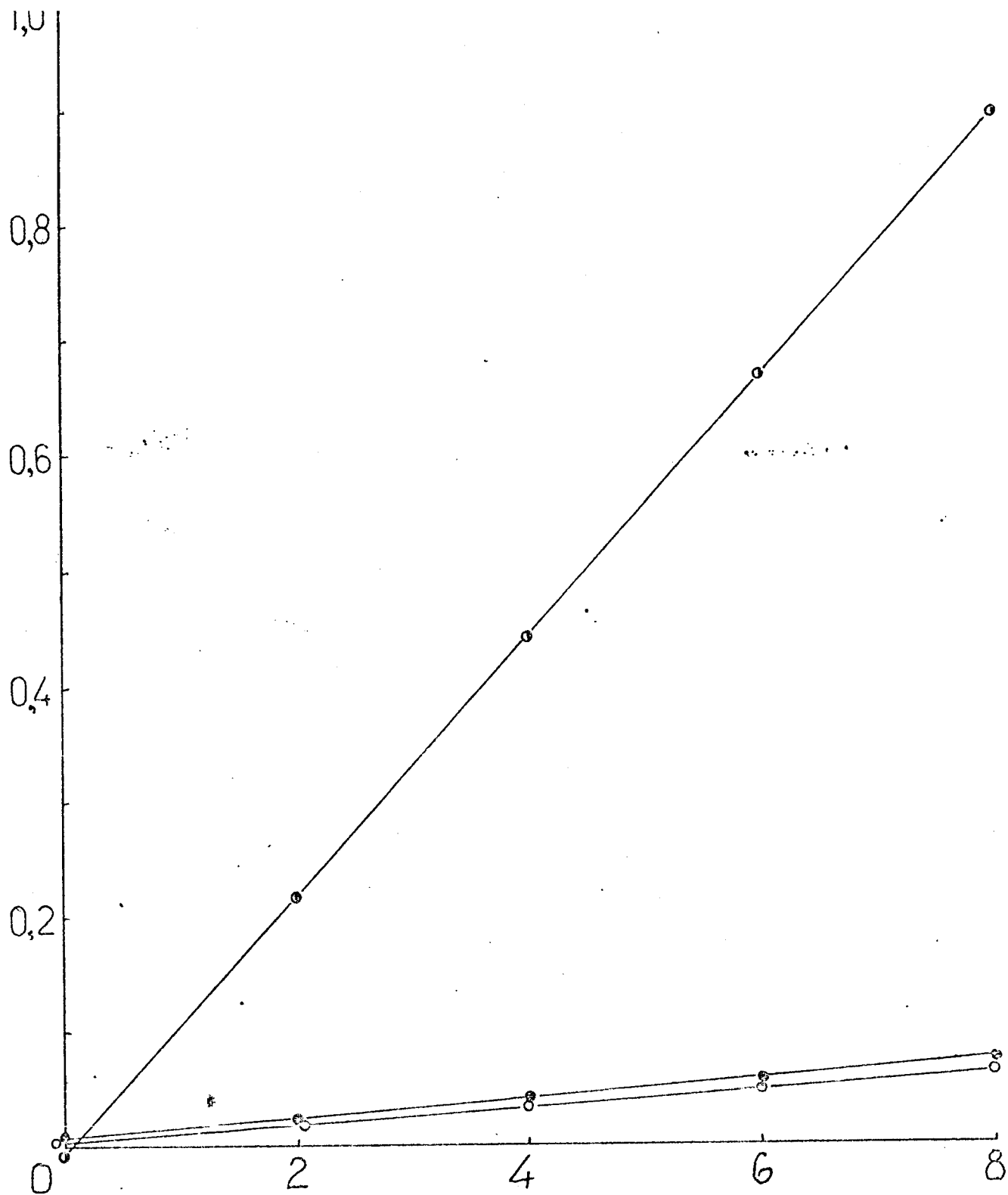


GRÁFICO Nº 3. Aplicabilidade da lei de Beer. Absorvância versus concentração de gordura (●), proteína (○) e lactose (◐) a 1065cm⁻¹

3.3.3. Quadro de Número de Onda versus Absortividade

O quadro N° 7 apresenta a correlação entre os números de onda e as absortividades relativas de cada componente. Podemos considerar que estas absortividades são significativas, desde que as absorvências utilizadas para seu cálculo são produtos de aproximações muito boas, como o demonstra o coeficiente de correlação (r) nesse mesmo quadro. Quando $r \approx 1$, diz-se que a correlação está exata.

No mesmo quadro, observa-se que as absortividades relativas dos componentes são pequenas em relação àquela do componente a ser determinado. Isto é uma indicação de que os números de onda, escolhidos para as determinações, foram os adequados; por isso, a determinação de gordura e lactose é feita diretamente do cálculo da absorvência. Embora tenha-se encontrado que as absortividades relativas de gordura e da lactose sejam pequenas, no número de onda onde se faz a determinação da proteína, utilizou-se um fator de correção para estimá-la, tal como sugerido por Goulden(19). Isto foi explicado no item 3.2.6.

QUADRO Nº 7. Relação entre Número de Onda, Absortividade, Absor-
tividade Verdadeira, Erro Padrão e Coeficiente de Correlação.*

Componente	$\bar{Q}$	a	Intcp.	a'	S.e.	r
	1735	84,9	0,015	16.422	0,0067	0,999
Gordura	1535	1,05	0,004	203	0,0019	0,987
	1065	8,10	0,011	1.567	0,0048	0,999
	1735	3,46	-0,004	669	0,0028	0,949
Proteína	1535	77,1	-0,073	14.913	0,0392	0,990
	1065	7,18	0,006	1.389	0,0030	0,997
	1735	0,76	0,004	147	0,0018	0,969
Lactose	1535	3,90	0,022	754	0,0064	0,808
	1065	113,62	-0,010	21.977	0,0084	0,999

$\bar{Q}$ = Número de onda

a = Absortividade

a' = Absortividade verdadeira: $\frac{a}{0,00517 \text{ cm}}$

S.e.=Erro padrão: $\sqrt{\frac{\sum (y - y_e)^2}{n}}$;

onde y:valores experimentais; y_e:valores calculados por re-
gressão linear; n:número de pares de valores

r = Coeficiente de correlação: $\frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$

onde x:concentração; y:absorvância

* Dados obtidos dos gráficos Nºs 1, 2 e 3.

3.3.4 Gráfico de Concentração versus Espessura da Cella

O gráfico Nº 4 ilustra a variação da espessura da célula de referência em relação a mudanças na concentração de gordura, proteína e lactose. Os dados apresentados provêm dos quadros Nºs 1, 2 e 3. Desde que o clorofórmio é um solvente de boa transparência no infravermelho, variações no conteúdo de gordura não afetam, em forma considerável, a espessura da célula utilizada para efetuar a compensação, razão porque resulta uma linha reta no gráfico. Por outro lado, temos um aumento na espessura e posterior diminuição, quando se varia as concentrações de proteína e lactose. Isto se deve ao fato de que a célula de referência contém cloreto de sódio a 5%, razão por que foi necessário incrementar a espessura da célula, para que se aumentasse o volume da água até o adequado para produzir a compensação. A diminuição posterior se explica, se argumentamos que um aumento na concentração origine uma redução na quantidade da água por unidade de volume; assim, torna-se indispensável reduzir a espessura da célula de referência para alcançar a compensação.

Achamos de boa aplicação prática o uso de células de espessura variável para efetuar a compensação do solvente, já que a mudança na espessura corresponde diretamente a uma variação no volume do solvente utilizado na célula da amostra. Isto elimina os erros resultantes das variações na quantidade da água contida nos diferentes tipos de leite.

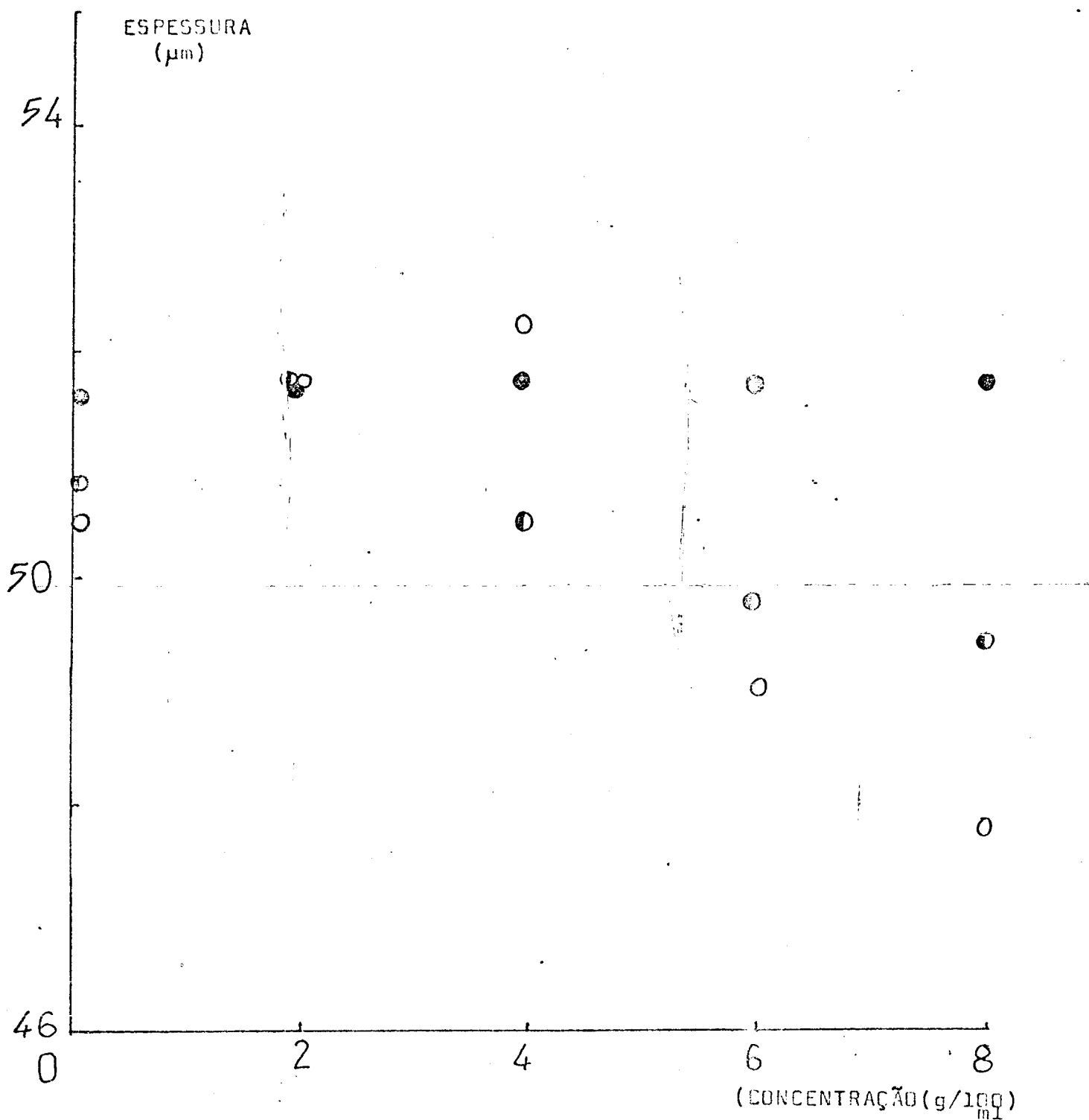


GRÁFICO Nº 4. Relação entre espessura da cela de referência e concentração de gordura (●), proteína (◐) e lactose (○).

3.3.5. Comparação dos resultados das análises do leite.

Os quadros N^{os} 8 e 9 contêm os resultados da análise do leite pelos métodos infravermelho e químicos. Estes resultados são o produto das determinações de gordura, proteína e lactose, em quatro amostras feitas em duplicatas e que foram recolhidas de quatro caixas diferentes de um mesmo lote. Todos os resultados são apresentados em forma de percentagem(%).

QUADRO N^o 8. Resultados das Análises do Leite por Infravermelho

Número de amostras	Gordura	Proteína	Lactose
1	3,70	3,01	5,02
	3,70	3,04	4,91
2	3,76	2,98	5,02
	3,76	2,98	5,02
3	3,81	2,98	5,13
	3,84	3,11	5,06
4	3,87	3,01	5,15
	3,92	3,04	5,13
Média	3,80	3,02	5,06
Desvio Padrão	0,08	0,04	0,08
C.V. ¹	2,11	1,32	1,58

1. C.V.: Coeficiente de variação $\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \times 100$

QUADRO Nº 9. Resultados das Análises do Leite por Métodos Químicos

Número de amostras	Gordura ^a	Proteína ^b	Lactose ^c
1	3,70	2,95	5,05
	3,70	3,07	4,96
2	3,70	2,76	5,08
	3,60	2,86	5,05
3	3,80	3,16	5,11
	3,80	3,17	4,99
4	4,00	3,23	5,20
	4,10	3,24	5,11
Média	3,80	3,06	5,07
Desvio Padrão	0,17	0,18	0,08
C.V.	4,47	5,88	1,58

- a- Determinada no laboratório da Companhia LECO de Produtos Alimentícios pelo método Gerber
- b- Determinada no laboratório de Análise de Alimentos pelo método Micro-Kjeldahl
- c- Determinada no laboratório de Análise de Alimentos pelo método volumétrico Lane-Eynon

O quadro Nº 10 sumariza os dados estatísticos, com a finalidade de comparar os resultados de ambos os métodos.

QUADRO Nº 10. Comparação dos métodos analíticos de Gerber, Micro-Kjeldahl, Lane-Eynon e Infravermelho, para a determinação de gordura, proteína e lactose no leite.

	Gordura	Proteína	Lactose
Média	3,80 ^a	3,02	5,06
	3,80 ^b	3,06	5,07
Desvio Padrão	0,08	0,04	0,08
	0,17	0,18	0,08
C.V.	2,11	1,32	1,58
	4,47	5,88	1,58

a- Método Infravermelho

b- Métodos Químicos

Para a determinação da gordura, observa-se que, em média, ambos os métodos concordam; porém, o desvio padrão é menor para o método infravermelho. Na determinação da proteína, o método de referência foi o Micro-Kjeldahl; a necessidade de se preparar um novo indicador, durante a realização das titulações, certamente influenciou na determinação da proteína, o que trouxe, como consequência, um desvio padrão maior. Por outro lado, os resultados obtidos pelo método infravermelho fornecem um desvio padrão menor, mas o valor médio difere em 0,04% do resultado obtido pelo

método de referência, o que pode servir como exemplo de que nem sempre precisão significa exatidão. Por último, as determinações feitas para a lactose, mediante o método infravermelho, apontam uma boa precisão e exatidão em relação ao método de referência.

Ao comparar os resultados obtidos pelo método infravermelho com os métodos químicos, observa-se que o desvio padrão é menor para o infravermelho, podendo-se obter um coeficiente de variação menor que 2,5% com este método. Fornece-se, assim, evidência da utilidade do método para a análise do leite.

CONCLUSÕES

Ao estudar o espectro infravermelho do leite, encontrou-se que:

-é possível determinar quantitativamente os seus principais componentes nos números de onda de 1735 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} e 1065 cm^{-1} , que correspondem aos picos de absorção da gordura, proteína e lactose, respectivamente;

-é vantajoso utilizar a técnica de compensação do solvente que faz uso de uma cela de espessura variável, em vez de uma cela de espessura fixa, desde que:

-a variação na quantidade do solvente na cela da amostra é proporcional às mudanças na espessura da cela de referência;

-os erros devidos à variação na quantidade da água contida nos diferentes tipos de leite (apontados por Biggs(8)) podem ser eliminados;

-obtem-se uma melhor compensação da água, utilizando-se uma solução aquosa de cloreto de sódio a 5%, no feixe de referência, em vez de água destilada. Este fato foi estabelecido por Thompson (59), em relação a soluções aquosas e confirmou-se nesta pesquisa, com relação à compensação da água contida no leite;

-a combinação dos cristais CaF_2 - BaF_2 na cela da amostra não é fator limitante para a determinação dos componentes do leite;

-o grau de homogeneização afeta a sensibilidade do método em relação à determinação da gordura, fato que é comprovado pelo espectro do leite sintético e concordante com Goulden(19);

-a comparação dos resultados das análises efetuadas pelo método infravermelho e pelos métodos químicos demonstrou que a técnica infravermelha pode ser utilizada para uma análise rápida, acurada e simples do leite.

REFERÊNCIAS

1. Adda, J., E.Blanc-Patin, R.Jeunet, R.Grappin, G.Mocquot, B. Poujardieu, G.Ricordeau. (1968) Essais d'utilisation de l'Infra-Red-Milk-Analizer. Le Lait. 48:145 e 293
2. Ashworth, U.S., R.Seals, R.Erb. (1960) An Improved Procedure for the Determination of Milk Proteins by Dye Binding. J.Dairy Sci. 43:614
3. Babko, A.K., A.T.Pilipenko. (1971) Photometric Analysis. Chapter II. MIR Publishers. Moscow
4. Biggs, D.A. (1967) Milk Analysis with the Infrared Milk Analyzer. J.Dairy Sci. 50:799
5. Biggs, D.A. IRMA by Comparison. Mimeografado- Dept. of Food Science, University of Guelph, Ontario, Canada
6. Biggs, D.A. Precision and Accuracy of Infrared Milk Analysis. Mimeografado-Dept. Of Food Science, University Guelph, Ontario, Canada.
7. Biggs, D.A., L.Szizarto. (1963) Method for Routine Determination of Lactose in Milk. J.Dairy Sci. 46:1196
8. Biggs, D.A. (1972) Infrared Milk Analyzer. J.Dairy Sci . 55:650
9. Cocks, L.V., C.Van Rede. (1973) Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts. Academic Press, Inc., New York, p.264

10. Cross, A.D., A.R.Jones, (1969) An Introduction to Practical Infra-Red Spectroscopy. 3rd ed. Butterworth & Co. Pub., London
11. Dyer, J.R. (1969) Aplicações da Espectroscopia de Absorção aos Compostos Orgânicos, Edgard Blücher Ltd., USP, Brasil
12. Folin, O., V.Ciocalteu. (1929) On tyrosine and tryptophane determination in proteins. J.Biol.Chem. 73:627
13. Gore, R.C., R.B.Barnes, E.Petersen. (1949) Infrared Absorption of Aqueous Solutions of Organic Acids and their Salts. Anal.Chem. 21:382
14. Gornall, A., C.Bardawill, M.David (1949) Determination of serum proteins by means of the Biuret Reaction. J.Biol.Chem. 177:757
15. Goulden, J.D.S. (1961) Quantitative Analysis of Milk and other Emulsions by Infra-red Absorption. Nature. 121:905
16. Goulden, J.D.S. (1958) Light Transmission by Dilute Emulsions. Trans.Faraday Soc. 54:941
17. Goulden, J.D.S. (1959) Infra-red spectroscopy of aqueous solutions. Spectrochim. Acta, 15:657
18. Goulden, J.D.S., D.J.Manning. (1967) Infra-red spectroscopy of inorganic materials in aqueous solutions. Spectrochim. Acta, 23A:2249
19. Goulden, J.D.S. (1964) Analysis of Milk by infra-red absorption. J.Dairy Res. 31:273

20. Goulden, J.D.S., D.J.Manning. (1967) Quantitative Analysis of Water-Soluble Fertilizers by Aqueous Solution Infra-Red Spectroscopy. J.Sci. Food Agric. 18:466
21. Goulden, J.D.S. (1976) Comunicação pessoal
22. Grappin, R., R.Jeunet. (1972) Facteurs biologiques responsables des variations observées dans la précision des méthodes de routine utilisées pour le dosage de la matière grasse du lait. Le Lait, N° 515-516:51
23. Grappin, R., J.C.Collin. (1975) Influence de la teneur en matière grasse du lait sur la précision des dosages de lactose avec l'appareil IRMA. Le Lait, N° 541-542:51
24. Hannah, R., J.Swinehart. (1969) Experiments in Techniques of Infrared Spectroscopy. Perkin Elmer Corp., Conn., USA
25. Hiller, A., J.Plazin, D.Van Slike. (1943) A study of conditions for the Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. J.Biol. Chem. 176:1401
26. Jacobs, M.B. (1973) The Chemical Analysis of Food and Food Products. 3rd edition. Robert Krieger Pub.Co. Inc., New York
27. Jones, R.N. (1969) Infrared Spectra of Organic Compounds: Summary Charts of Principal Group Frequencies. National Res. Council, Ottawa, Canada(reprint by the Perkin Elmer Corp.)
28. Kliman, P.G., H.J.Pallansch. (1967) Attenuated Total Reflectance of Infrared Energy by Dairy Products. J.Dairy Science 50:1211

29. Lampert, L. (1970) Modern Dairy Products. The Chemical Pub. Co. Inc., New York
30. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265
31. Manning, D.J. (1972) Aqueous Solutions and Dispersions. Laboratory Methods in Infra Red Spectroscopy. 2nd ed. Heyden & Son Ltd., London
32. Marier, J.R., M. Boulet. Direct Analysis of Lactose in Milk and Serum. National Res. Council. Manuscript N°5285, Ottawa, Canada
33. Mehlenbacher, V.C. (1960) The Analysis of Fats and Oils. Garrard Press, Illinois, USA.
34. Morcillo, J.M. (1974) Espectroscopia Infrarroja. Depto. de Asuntos Científicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA). Washington, USA
35. Nachod, F.C., C.M. Martini. (1959) Infrared Spectroscopy in H_2O , D_2O and CH_3OH^+ . Appl. Spectrosc. 13:45
36. Nakai, S., H. Wilson, E. Herreid. (1964) Spectrophotometric Determination of Protein in Milk. J. Dairy Sci. 47:356
37. Nakai, S., Anh Chi Le. (1970) Spectrophotometric Determination of Protein and Fat in Milk Simultaneously. J. Dairy Sci. 53:276
38. O'Connor, R., E. DuPre, R. Feuge. (1955) The Infrared Spectra

of Mono-, Di-, and Triglycerides. J.Am.Oil Chem.Soc. 32:93

39. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. (1975) 12th ed., USA
40. Parker, F.S. (1958) Infrared Spectra of Some Biochemical Substances in Water. Appl. Spectrosc. 12:163
41. Perkin Elmer Instructions - Model 67 Series Infrared Spectrophotometers. (1973) Norwalk, Conn., USA
42. Potts, W.J., N.Wright (1956) Quantitative Infrared Absorption Spectroscopy in Water Solutions. Anal. Chem. 28:1255
43. Price, W.J. (1972) Sample Handling Techniques. Laboratory Methods in Infra Red Spectroscopy. 2nd ed. Heyden & Son London.
44. Renner, E., S.Ömeroglu. (1971) Untersuchungen über die automatisierte Fett- und Eiweißgehaltsbestimmung in Milch mit dem Infrarot-Milchanalysator (IRMA). Deutsche Molkerei-Zeitung 92:2079 e 2116
45. Recommended Practices for General Techniques of Infrared Quantitative Analysis. (1969) American Society for Testing and Materials. Committee E-13. 3rd ed. Philadelphia, USA
46. Richardson, S.H. (1972) Status of Instrumentation for Gross Composition Analysis of Milk: A review. J.Dairy Sci. 55:649
47. Rozelle, L.T., L.J.Hallgren, J.E.Bransford, R.B.Koch.(1965) The Identification of Major Infrared Absorbing Compounds of Human Urine. Appl. Spectrosc. 19:120

48. Shipe, W.F. (1972) Current Status of The Milko-Tester. J.Dairy Sci. 55:652
49. Sir Howard Grubb Parsons & Co., New Castle upon Tyne NE6 2YB England
50. Spectroscopic Nomenclature (1975) Appl.Spectrosc. 29:459
51. Sternglanz, H. (1956) Using Water as an Infrared Solvent. Appl. Spectrosc. 10:77
52. Steyermark, A., H.Alber, V.Aluise, E.Huffman, J.Kuck, J.Moran, C.Willits. (1951) Recommended Specifications of Microchemical Apparatus. Micro Kjeldahl Nitrogen. Anal.Chem. 23:523
53. Stookey, L., A.Conetta, H.Zehnder. (1972) Automated Determination of Milk Fat in Milk. J.Dairy Sci. 55:483
54. Strong, F.C. (1952) Theoretical Basis of the Bouguer-Beer Law of Radiation Absorption. Anal. Chem. 24:338
55. Strong, F.C. (1975) Modern Methods of Qualitative Analysis. Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos. Campinas, São Paulo, Brasil.
56. Strong, F.C. (1975) Comment on Spectroscopic Nomenclature. Appl. Spectrosc. 29:265
57. Strong, F.C. (1976) Comunicação pessoal
58. Thompson, W.K. (1965) Infra-Red Spectroscopic Studies of Aqueous Solutions. Part I. Trans.Faraday Soc. 61:2635

59. Thompson, J.K. (1966) Infra-Red Spectroscopic Studies of Aqueous Solutions. Part II. Trans. Faraday Soc. 62:2667
60. Jalstra, P. (1965) Turbidimetric determination of the fat content of milk. Netherlands Milk Dairy Journal. 19:266
61. Warburg, O., W.Christian. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Z. 310:384
62. Webb, B., A.Johnson. (1965) Fundamentals of Dairy Chemistry. The AVI Pub. Co., Inc., Conn. USA
63. Wilson, J., A.Kramer, I.Ben-Gere (1973). Quantitative Determination of Fat, Protein and Carbohydrates of Soy Products with Infrared Attenuated Total Reflectance. J. Food Sci. 38:14