

**Universidade do Vale do Paraíba**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

FABRICIO LUIZ SILVEIRA

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GORDURAS SATURADAS  
E INSATURADAS EM ALIMENTOS COMERCIAIS POR  
ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA

São José dos Campos, SP

2008

Fabricio Luiz Silveira

“DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GORDURAS SATURADAS  
E INSATURADAS EM ALIMENTOS COMERCIAIS POR  
ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio G. J. Balbin Villaverde

São José dos Campos, SP

2008

S588D

Silveira, Fabricio Luiz

Determinação da concentração de gorduras saturadas e insaturadas em alimentos comerciais Por espectroscopia Raman dispersiva / Fabricio Luiz Silveira. Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco. Co-orientador: Prof. Dr. Antonio G. J. Balbin Villaverde. São José dos Campos, 2008.

1 Disco laser: Color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

I. Raman, espectroscopia 2. Gorduras insaturadas 3. Alimentos I. Pacheco, Marcos Tadeu Tavares, Orient. II. Villaverde, Antonio G. J. Balbin, Co-Orient. III. Título

CDU: 543.42

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica, desde que seu uso implique na correta citação da fonte.

Aluno:



Data: 25 de abril de 2008

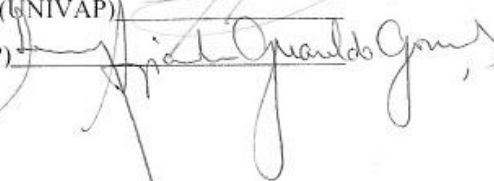
**FABRÍCIO LUIZ SILVEIRA**

**“DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GORDURAS SATURADAS E INSATURADAS  
EM ALIMENTOS COMERCIAIS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **ANTONIO G. J. BALBIN VILLAVERDE** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **MARCOS TADEU TAVARES PACHECO** (UNIVAP)

Prof.<sup>a</sup> Dra. **LIRENY A. G. GONÇALVES** (UNICAMP) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 25 de abril de 2008.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico primeiramente a Deus por toda a força recebida a cada dia em minhas orações, e de maneira especial a Nossa Senhora por sempre me acolher em meus momentos de alegrias e aflições.*

*Aos meus pais, Landulfo e Maria Helena, pelos alicerces de companheirismo, amor, e conhecimento transmitido através de suas vidas e, pelo incentivo e confiança que sempre me deram.*

*Aos meus irmãos, Luciano, Fábio e de modo especial ao Landulfo, pelo grande incentivo, companheirismo e dedicação uns para com os outros.*

*Aos meus amigos que Deus colocou em minha caminhada de vida, que acrescentaram muitos frutos para a ela, de modo especial, Lininha, Desi e Marys.*

*Agradeço ao Prof. Baptista Gargione filho, Reitor da Univap e ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, diretor do IP&D pela oportunidade a mim dada, ao Prof. Dr. Antonio G. J. Balbin Villaverde e a todos os professores que lecionaram durante a minha carreira acadêmica.*

*Aos amigos e funcionários da Univap: Biblioteca, FCS, Tudo Aqui, e IP&D.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço ao irmão e Prof. Landulfo, pela paciência e dedicação.*

# Determinação da concentração de gorduras saturadas e insaturadas em alimentos comerciais por Espectroscopia Raman Dispersiva.

## RESUMO

As doenças do sistema circulatório são as que mais causam mortes em todo o mundo. Estes óbitos são causados principalmente por trombozes, decorrentes de complicações pela aterosclerose formada em artérias de médio e grande calibre. Um dos fatores para esse elevado número de óbitos está ligado à ingestão de alimentos industrializados com alto teor de gordura. Identificar a quantidade correta de gordura nestes alimentos é de extrema importância para controlar sua ingestão. O presente trabalho tem por objetivo a utilização da Espectroscopia Raman Dispersiva (ERD) na caracterização e diferenciação espectral de diferentes tipos de gorduras alimentícias comerciais e a quantificação relativa da composição de gorduras insaturadas, comparando esta quantificação com as informações disponíveis na Tabela Nutricional dos alimentos industrializados, visando obter um padrão de quantificação da qualidade destes alimentos. Espectros Raman foram obtidos em óleo vegetal, margarinas, maioneses, manteigas, gorduras vegetais hidrogenadas e leite. O sistema Raman utilizado é composto por um laser de diodo (AsGaAl), com comprimento de onda de excitação em 830 nm e com potência de 80mW. O tempo de exposição foi de 60s para todas as amostras. Picos Raman foram identificados na região entre 800 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Os resultados demonstraram que a quantidade de gordura insaturada das amostras analisadas correlacionou-se com a informação mostrada na Tabela Nutricional. Os picos que demonstram a quantidade de gordura saturada estão em 1660, 1440, 1300 e 1260 $\text{cm}^{-1}$ . Concluiu-se que a utilização da Espectroscopia Raman Dispersiva (ERD) possibilita a quantificação relativa da composição de gorduras insaturadas em óleos vegetais, margarinas, maioneses, gorduras vegetais e leite, comparando as informações espectrais com as informações disponíveis na Tabela Nutricional destes alimentos.

**Palavras chave:** Espectroscopia Raman, gorduras saturadas e insaturadas, tabela nutricional, alimentos industrializados.

# Determination of the concentration of saturated and unsaturated fats in food trade by Dispersive Raman Spectroscopy.

## ABSTRACT

Diseases of the circulatory system are those which cause more deaths around the world. These deaths are caused primarily by strokes, complications arising from atherosclerosis formed in the arteries of medium and large sizes. One of the primary factors for the high number of deaths would be the ingestion of industrialized products with a high fat content. Identifying the correct amount of fat in industrialized food is important to control its ingestion. The present study aims the use of Dispersive Raman Spectroscopy (DRS) in the spectral characterization and differentiation of different types of fats on food and quantifies the composition of unsaturated fats, comparing this quantification with the information available in the Nutritional Table, to obtain an optical quantification standard of quality of these foods. Raman spectra of vegetable oil, margarine, mayonnaise, butter, milk and hydrogenated vegetable fats were obtained. The Raman system was composed by a laser diode (AsGaAl) with a wavelength of 830 nm and power of 80 mW. The time exposure was 60s for all samples. All spectra were analyzed in the region of 800 to 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Results showed that, in general, the amount of unsaturated fat of the samples correlated with the information shown in Nutritional Table. Raman peaks that demonstrated the amount of saturated fat were in 1660, 1440, 1300 e 1260  $\text{cm}^{-1}$ . It was concluded that Dispersive Raman Spectroscopy (DRS) has the potential for quantifying the composition of unsaturated fats in vegetable oils, margarine, mayonnaise, vegetable fats and milk, comparing spectral information to the ones available in Nutritional Tables.

Keywords: Raman Spectroscopy, Saturated and unsaturated fats, Nutritional table, Processed foods.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Gráfico da ocorrência de óbitos por região no Brasil, relatadas no ano de 2004. ....	17
<b>Figura 2</b> - Gráfico das principais causas de morte no Brasil, entre 2000 e 2003. ....	18
<b>Figura 3</b> - Gráfico da ocorrência de óbitos entre os anos de 1999 e 2004. ....	18
<b>Figura 4</b> - Esquema representativo para diferenciar os tipos de espalhamento.....	27
<b>Figura 5</b> - Esquema do sistema de Espectroscopia Raman Dispersiva no Infravermelho Próximo do Laboratório de Espectroscopia Biomolecular da UNIVAP. ....	35
<b>Figura 6</b> - Espectro do naftaleno usado para calibração do número de onda: (a) espectro bruto, com as posições das bandas em pixels; (b) espectro calibrado, utilizando-se polinômio de ordem 3, com as posições das bandas em $\text{cm}^{-1}$ .....	37
<b>Figura 7</b> - Espectro Raman do óleo de soja (a) obtido com o espectrômetro Raman, sem calibração; (b) espectro calibrado em número de onda e a interpolação por polinômio de ordem 3 (preto) e (c) o espectro Raman final, após a subtração polinomial, evidenciando as bandas Raman de alta frequência. ....	39
<b>Figura 8</b> - Espectros Raman de artéria coronária humana não-aterosclerótica; (a) representa um espectro bruto; (b) representa o mesmo espectro após filtragem do ruído de alta frequência. ....	40
<b>Figura 9</b> - Espectro Raman de amostras de óleos vegetais de soja, milho, girassol e canola. ....	45
<b>Figura 10</b> - Razão entre as intensidades Raman em: a) 1660 e 1440 $\text{cm}^{-1}$ e b) 1260 e 1300 $\text{cm}^{-1}$ , para os óleos vegetais analisados no experimento. ....	47
<b>Figura 11</b> - Porcentagem de Gordura Insaturada segundo a Tabela Nutricional das amostras de óleos vegetais analisados .....	47
<b>Figura 12</b> - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre 1660 $\text{cm}^{-1}$ e 1440 $\text{cm}^{-1}$ e o Índice de Gordura Insaturada informado pela Tabela Nutricional .....	48
<b>Figura 13</b> - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre 1260 $\text{cm}^{-1}$ e 1300 $\text{cm}^{-1}$ e o Índice de Gordura Insaturada informado na Tabela Nutricional .....	48
<b>Figura 14</b> - Espectro Raman de amostras de margarinas vegetais, dos tipos: Extra Cremosa, “Light” A, Ao Leite, “Light” B e Cremosa .....	49
<b>Figura 15</b> - Razão entre as intensidades das bandas em: a) 1660 $\text{cm}^{-1}$ e 1440 $\text{cm}^{-1}$ e b) 1260 e 1300 $\text{cm}^{-1}$ , para as amostras de margarinas utilizadas no experimento .....	50

<b>Figura 16</b> - Porcentagem de Gordura Insaturada segundo a Tabela Nutricional das amostras de margarinas analisadas. ....	50
<b>Figura 17</b> - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre $1660\text{ cm}^{-1}$ e $1440\text{ cm}^{-1}$ e o Índice de Gordura Insaturada informado na Tabela Nutricional .....	51
<b>Figura 18</b> - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre $1260\text{ cm}^{-1}$ e $1300\text{ cm}^{-1}$ e o Índice de Gordura Insaturada informado na Tabela Nutricional .....	51
<b>Figura 19</b> - Espectro Raman de amostras de maionese: “0% Colesterol”, “Light” e “Ômega 3”. .....	52
<b>Figura 20</b> - Razão entre as intensidades das bandas em: a) $1660\text{ cm}^{-1}$ e $1440\text{ cm}^{-1}$ e b) $1260\text{ cm}^{-1}$ e $1300\text{ cm}^{-1}$ para as amostras de maioneses utilizadas no experimento .....	53
<b>Figura 21</b> - Porcentagem de Gordura Insaturada informada na Tabela Nutricional das amostras de maioneses analisadas .....	53
<b>Figura 22</b> - Espectro Raman de amostras de manteiga de gordura de leite bovino. ....	54
<b>Figura 23</b> – (a) Razão entre as intensidades das bandas em $1660\text{ cm}^{-1}$ e $1440\text{ cm}^{-1}$ , (b) Índice de Gordura Insaturada para as amostras de manteigas analisadas. ....	55
<b>Figura 24</b> – (a) Razão entre as intensidades das bandas em $1260\text{ cm}^{-1}$ e $1300\text{ cm}^{-1}$ , (b) Índice de Gordura Saturada para as amostras de manteigas analisadas. ....	56
<b>Figura 25</b> - Espectro Raman de amostras de gordura vegetal hidrogenada das marcas A e B .....	57
<b>Figura 26</b> - Posição da banda em $1660\text{ cm}^{-1}$ para as gorduras vegetais analisadas. ....	58
<b>Figura 27</b> - Espectros Raman de amostras de leites pasteurizados: Tipo A, Tipo B, Tipo C e “Light”. .....	59
<b>Figura 28</b> - Espectros Raman de amostras de leites longa vida: Integral, Semi-Desnatado e Desnatado .....	59
<b>Figura 29</b> - a) Razão entre as intensidades das bandas em $1450\text{ cm}^{-1}$ e $1660\text{ cm}^{-1}$ para as sete amostras de leite analisadas no experimento, b) valor total de Gordura Saturada informada pela Tabela Nutricional.....	61
<b>Figura 30</b> - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre $1660\text{ cm}^{-1}$ e $1440\text{ cm}^{-1}$ e o Índice de Gordura Saturada encontrado na tabela nutricional. ....	61

**Figura 31** – a) Razão entre as intensidades das bandas em  $1300\text{ cm}^{-1}$  e  $1260\text{ cm}^{-1}$  para as sete amostras de leite analisadas no experimento, b) valor total de Gordura Saturada informada pela Tabela Nutricional. .... 62

**Figura 32** - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre  $1260\text{ cm}^{-1}$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  e o Índice de Gordura Saturada encontrado na tabela nutricional. .... 62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Óleos vegetais .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 2 - Margarinas .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 3 - Maioneses .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 4 - Gordura vegetal .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 5 - Manteiga .....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 6 - Leite Pasteurizado .....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 7 - Leite Longa Vida .....</b>	<b>44</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

DATASUS - Departamento de Informação e Informática do SUS.

UBS - Unidade Básica de Saúde.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

LDL - lipoproteína de baixa densidade.

HDL - lipoproteína de alta densidade

TLC - Cromatografia de Camada Delgada

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.

UV - radiação ultravioleta.

IV - radiação infravermelha.

CCD - Charge Coupled Devices

ERD - Espectroscopia Raman no Dispersivo

PCA - Análise dos Componentes Principais

UNIVAP - Universidade do Vale do Paraíba.

## LISTA DE SIGLAS

$\omega$  - Ômega

g - grama.

mL - mililitros.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 Gordura .....	20
1.1.1 Lipídios .....	20
1.1.2 Ácidos Graxos .....	20
1.2 Importância das gorduras .....	22
1.3 Métodos de análise por cromatografia .....	23
1.4 Tabela Nutricional .....	24
1.5 Espectroscopia Raman .....	26
1.5.1 Sistema de Espectroscopia Raman Dispersiva .....	28
1.5.2 Aplicações da Espectroscopia Raman .....	28
<b>2 OBJETIVO</b> .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Amostras de óleos vegetais e alimentos industrializados .....	33
3.2 Sistema de Espectroscopia Raman no Infravermelho Próximo .....	33
3.3 Calibração e processamento dos espectros Raman .....	35
3.3.1 Calibração da resposta espectral .....	35
3.3.2 Calibração do deslocamento do número de onda (deslocamento Raman) .....	36
3.3.3 Remoção da fluorescência de fundo e do ruído de alta frequência .....	37
3.4 Identificação das Bandas Raman Mais Importantes .....	40
<b>4 RESULTADOS</b> .....	42
4.1 Tabela Nutricional .....	42
4.2 Espectros Raman .....	45
4.2.1 Óleos vegetais .....	45
4.2.2 Margarina .....	49
4.2.3 Maionese .....	52
4.2.4 Manteiga .....	54
4.2.5 Gordura vegetal hidrogenada .....	56
4.2.6 Leite .....	58
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>TRABALHOS FUTUROS</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

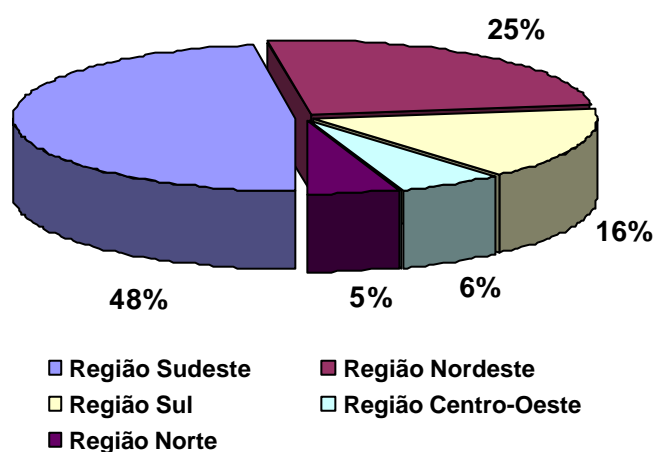




## 1 INTRODUÇÃO

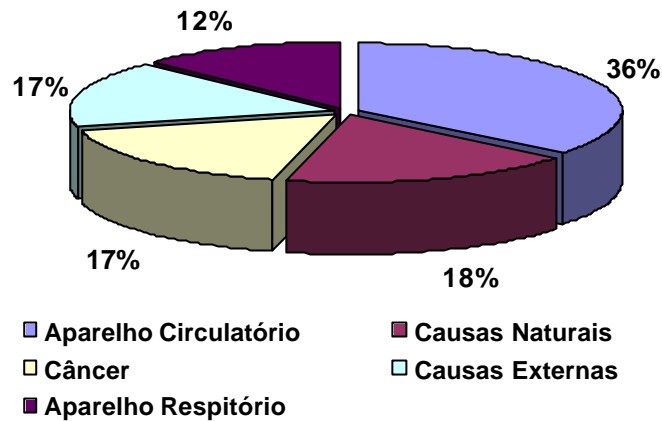
O Ministério da Saúde atribui ao Departamento de Informação e Informática do SUS - DATASUS, órgão da Secretaria Executiva do Ministério da Saúde, a responsabilidade de coletar, processar e disseminar informações sobre saúde. Estas informações vão desde simples dados, como número de atendimento em UBSs municipais, às estatísticas nacionais de números de óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

De acordo com este órgão, foram registradas cerca de 1.024.073 mortes no ano de 2004. Como pode-se observar na Figura 1 a região com maior número de óbitos é a região Sudeste com 48%, mas que possui o maior número de habitantes, seguida da região Nordeste com 25%. Em terceiro está a região Sul com 16%, logo depois a Centro-Oeste, 6% e por último a região Norte com 5% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).



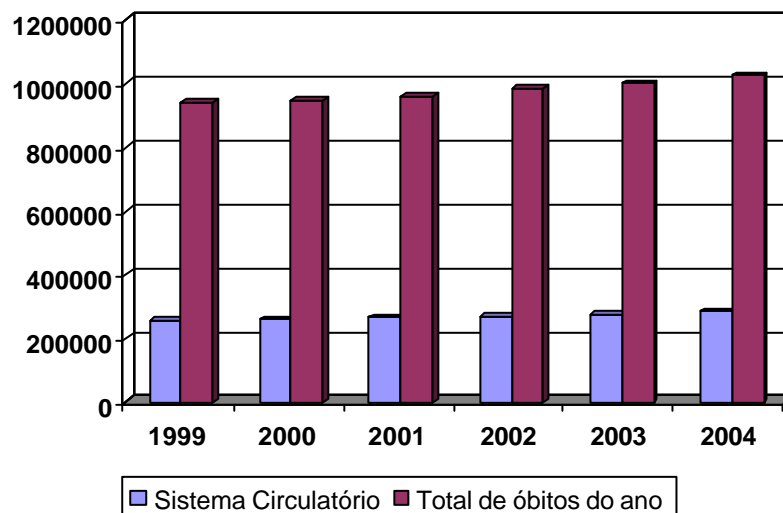
**Figura 1** - Gráfico da ocorrência de óbitos por região no Brasil, relatadas no ano de 2004. Fonte: Ministério da Saúde, DATASUS - Departamento de Informação e Informática do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As doenças do sistema circulatório são as que mais causam mortes em todo o mundo. Em 1996, o Ministério da Saúde divulgou a ocorrência de 908.883 mortes em todo o país, sendo que 27% destas mortes foram causadas por doenças no sistema circulatório. Em 2002, as doenças do sistema circulatório chegaram a 31% das mortes registradas, superando em dobro as mortes causadas por câncer, que ficaram em segundo lugar. Na Figura 2 é apresentada a estatística de mortes entre os anos de 2000 e 2003, onde verificou-se que as mortes pelo sistema circulatório chegaram a 36% dos óbitos registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).



**Figura 2** - Gráfico das principais causas de morte no Brasil, entre 2000 e 2003. Fonte: Ministério da Saúde, DATASUS - Departamento de Informação e Informática do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Na Figura 3 é apresentado um gráfico da ocorrência de óbitos causados pelo sistema circulatório em relação ao total de mortes entre os anos 1999 e 2004. Neste gráfico, verifica-se que os óbitos de causas vasculares permaneceram constantes em relação ao número total de óbitos, representando cerca de 1/4 (um quarto) dos óbitos todos os anos.



**Figura 3** - Gráfico da ocorrência de óbitos entre os anos de 1999 e 2004. Fonte: Ministério da Saúde, DATASUS - Departamento de Informação e Informática do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Com esse elevado índice de mortalidade, uma grande revista de circulação nacional (PADILLA, 2006), trouxe em abril de 2006 a seguinte matéria de capa: “Derrame, Por dentro da doença que mais mata no Brasil”. A reportagem revelou que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 15 milhões de pessoas são afetadas por derrame por ano no mundo. Estes óbitos são causados principalmente por trombozes, decorrentes de complicações pela aterosclerose formada em artérias de médio e grande calibre (GUYTON; HALL, 1998).

As doenças isquêmicas do coração, incluindo a aterosclerose e a trombose, são as principais causas do infarto do miocárdio principalmente nos países desenvolvidos, pela ocorrência de uma relação direta entre hábitos alimentares e os índices desta doença (FRIAS, 1995).

A aterosclerose, principal causa do infarto do miocárdio, é um distúrbio metabólico em que o colesterol e seus derivados se depositam nas paredes das artérias de médio e grande calibre, podendo reduzir ou obstruir o fluxo sanguíneo, causando maior dificuldade de circulação sanguínea (BEERS; BERKON, 2001; FRIAS, 1995).

Alguns fatores que causam estes elevados números de óbitos por doenças ligadas ao sistema circulatório podem ser controlados e outros não. Entre os que podem ser controlados estão: níveis de colesterol e lipídios séricos, níveis de pressão arterial, tabagismo e sedentarismo. A contribuição dos lipídios na dieta dos diferentes povos pode variar, de um modo geral, entre 10 e 45% das calorias totais diárias. A quantidade de calorias ingeridas por uma população na forma de lipídios depende, basicamente, de dois fatores: hábitos alimentares e grau de desenvolvimento e de industrialização do país (FRIAS, 1995).

Várias condições, como hipertensão arterial sistêmica, fluxo turbulento, hipoxia, diabetes mellitus, ativação imunológica sistêmica e hiperlipidemias, induzem injúria ao endotélio vascular, desencadeando a aterogênese. Dentre estes fatores, a hipercolesterolemia é o distúrbio mais fortemente associado ao desenvolvimento da aterosclerose (BITTENCOURT JR; SENNA, 2002). A hipercolesterolemia é definida como a quantidade de colesterol plasmático igual ou acima de 240 mg/dL, mas de 200 a 239 mg/dL já indicam a necessidade de intervenção médica.

Tendo em vista que a necessidade de colesterol plasmático pode ser modulada pelos lipídios provenientes da dieta, a *American Heart Association* (Associação Americana do Coração) recomenda que a ingestão de gordura total da dieta seja diminuída de 40% para 30%, com o conseqüente aumento de carboidratos para 45-55% das calorias totais da dieta (BITTENCOURT JR; SENNA, 2002).

Outro fator que contribui para a manutenção da quantidade de colesterol plasmático é o tipo de gordura da dieta. As dietas ocidentais têm alto teor de ácidos graxos saturados (AGS), especialmente de origem animal, que elevam o teor de colesterol plasmático total levando, portanto à hipercolesterolemia. Nesta, a quantidade de LDL (*low density lipoprotein* - lipoproteína de baixa densidade) plasmática é elevada, favorecendo a geração da forma oxidada da mesma, a LDL-ox, uma lipoproteína extremamente aterogênica. Por outro lado, as dietas ricas em ácidos graxos mono ou poliinsaturados reduzem os riscos de doenças vasculares obstrutivas, por elevarem as quantidades de HDL (*high density lipoprotein* - lipoproteína de alta densidade) plasmática e aumentarem a metabolização de lipoproteínas (BITTENCOURT JR; SENNA, 2002).

## **1.1 Gordura**

### **1.1.1 Lipídios**

A palavra lipídios é derivada do grego *lipos*, que significa gordura. Nesse grupo, podem ser encontradas substâncias como: os óleos (ésteres formados a partir de ácidos graxos e que se apresentam sob a forma líquida), gorduras (ésteres formados a partir de ácidos graxos e que se apresentam sob a forma sólida) e ceras (os principais componentes são ésteres formados a partir de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa); além de esteróides (como o colesterol e hormônios sexuais), terpenos (como o geraniol), sabões, detergentes e sais biliares (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Os lipídios caracterizam-se como uma série de diferentes substâncias que possuem em comum o fato de não serem solúveis em água (ZAIA, 2002).

### **1.1.2 Ácidos Graxos**

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, que podem ser representados pela forma  $\text{RCO}_2\text{H}$ . Muitos dos ácidos carboxílicos foram inicialmente isolados de fontes naturais, principalmente de gorduras e, por isso, foram denominados ácidos graxos. Na maioria das vezes, o agrupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono, onde esta cadeia carbônica pode ser saturada ou conter uma ou mais insaturações. O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia R, a região apolar da molécula (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

As gorduras pertencem a uma classe de lipídios que diferem dos demais lipídios devido à sua estrutura e suas propriedades físicas. Esta categoria de moléculas é importante para inúmeras formas de vida, atuando tanto no papel metabólico como no papel estrutural. São essenciais para a maioria dos seres heterótrofos (incluindo os seres humanos) por serem uma fonte altamente concentrada de energia, além de serem usadas para acionar uma série de reações químicas no organismo (como em vitaminas lipossolúveis, hormônios sexuais, lipoproteínas, entre outras).

As gorduras diferem-se em *saturadas* e *insaturadas*, dependendo de sua composição química. As gorduras saturadas são encontradas normalmente nos animais, e consistem de ácidos graxos com cadeia hidrocarbônica saturada, ou seja, possuem apenas ligações simples em seus radicais. As gorduras insaturadas são encontradas nos vegetais, e são constituídas de ácidos graxos com cadeia hidrocarbônica de uma ou mais ligações duplas em seus radicais. Os ácidos graxos insaturados podem ser divididos em: monoinsaturados, os que contêm apenas uma ligação dupla; e poliinsaturados, os que contêm duas ou mais ligações duplas (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002; SACKHEIM; LEHMAN, 2001). São exemplos de gorduras comestíveis: manteiga, "toucinho" (gordura de porco), óleos vegetais, margarina, entre outros.

A cadeia hidrocarbonada de um ácido graxo saturado existe, geralmente, sob uma forma estendida, uma vez que esta conformação linear e flexível é o estado de menor energia. Em contraste, os ácidos graxos insaturados contêm dobramentos rígidos em suas cadeias carbônicas, pois as duplas ligações não giram, e uma angulação de 30° é produzida para cada uma das duplas ligações presentes (configuração *cis*) (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Os ácidos graxos insaturados são divididos em quatro classes;

- Ácido Palmitoleico             $\omega$ -7
- Ácido Oléico                     $\omega$ -9
- Ácido Linoleico                 $\omega$ -6
- Ácido Linolênico                $\omega$ -3

Cada classe é composta por uma família de ácidos graxos, sendo que em todos os membros desta família podem ser sintetizados biologicamente a partir daqueles oferecidos na dieta. Contudo, o ácido graxo de uma determinada classe não pode ser biologicamente convertido em outra classe, isto é, nenhum membro da família  $\omega$ -9 (ácido oléico) pode ser convertido em  $\omega$ -6 (ácido linoleico) (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

A presença de insaturação restringe a rotação da cadeia hidrocarbonada, fazendo com que ocorra isomeria em torno da dupla ligação, que é denominada configuração *cis* ou *trans* (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Os óleos vegetais naturais contêm principalmente isômeros *cis*, mas a hidrogenação parcial produz uma mistura de isômeros *cis* e *trans*. Os isômeros *trans* estão associados a muitos efeitos indesejáveis, como a redução dos níveis de HDL (colesterol bom), o aumento de LDL (colesterol ruim) e o aumento do nível de colesterol total sanguíneo (SACKHEIM; LEHMAN, 2001).

A indústria alimentícia conta com a produção de gorduras hidrogenadas, cujo objetivo é produzir gorduras saturadas a partir de insaturadas. Um subproduto deste processo de hidrogenação é a geração das gorduras *trans*. Este artifício, além de melhorar a aparência e o sabor dos alimentos industrializados, evitando o sabor ranço dos alimentos, resulta em um custo menor para as empresas. O consumo excessivo de gorduras *trans* está associado a um aumento do LDL. As altas taxas de LDL no sangue podem resultar na aterosclerose. As gorduras *trans* são encontradas em grandes quantidades em alimentos como biscoitos recheados, sorvetes cremosos, batatas-fritas, bolos, entre outros (BITTENCOURT JR; SENNA, 2002; GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002). A necessidade de uma baixa quantidade de gorduras saturadas na dieta do homem tem sido amplamente documentada, e muitos indivíduos, bem como estabelecimentos comerciais, os substituem por óleos vegetais na preparação de alimentos (FRIAS, 1995; SACKHEIM; LEHMAN, 2001).

A OMS recomenda o consumo de alimentos que contenham gorduras de origem vegetal, ricos em ácidos graxos insaturados, pois é mais fácil quebrar as cadeias insaturadas em relação às cadeias saturadas (SACKHEIM; LEHMAN, 2001).

## **1.2 Importância das gorduras**

Os ácidos graxos têm duas particularidades: (a) são imprescindíveis ao organismo humano; e (b) não podem ser sintetizados pelo mesmo. Assim, os ácidos graxos essenciais compõem uma classe de moléculas que não podem ser sintetizadas pelo organismo, mas que são necessárias ao seu funcionamento. A ausência destes na dieta esta associada a síndromes que podem até levar à morte. Há duas subclasses de ácidos graxos essenciais - os ômega 3 e os ômega 6. A essencialidade do ômega 6 é conhecida desde a década de 30, sua deficiência está associada basicamente a problemas dérmicos. Quanto aos ácidos graxos ômega 3, apenas após a década de 80 é que se descobriu sua necessidade na dieta, para evitar principalmente

distúrbios neurológicos e visuais. Apesar do papel predominante dos ácidos graxos essenciais à pele e ao sistema nervoso, tais ácidos graxos estão também envolvidos no funcionamento de diversos órgãos e sistemas, basicamente pela sua conversão em eicosanóides, mediadores lipídicos farmacológicos que incluem, entre outros, as prostaglandinas, os leucotrienos, as tromboxanas e as lipoxinas (POMPÉIA, 2002).

A gordura tem um papel importante no organismo humano, pois serve como combustível ao corpo humano, produzindo mais energia por grama do que carboidratos e proteínas. O metabolismo da gordura produz 9 kcal/g, ao passo que o metabolismo tanto de carboidrato como o da proteína produz 4 kcal/g (SACKHEIM; LEHMAN, 2001).

As gorduras servem também como reserva de energia para o corpo. A gordura é estocada nos tecidos adiposos e também serve como elemento de proteção dos órgãos vitais, ou seja, as gorduras envolvem os órgãos vitais para mantê-los no lugar e também atuar como amortecedores de impacto. A gordura nas camadas mais externas do corpo atua como isolante térmico, auxiliando a manter o corpo aquecido em dias de frio. A gordura também serve como isolante elétrico e permite a rápida propagação dos impulsos nervosos. Gorduras são constituintes das lipoproteínas, que são encontradas nas membranas celulares e nas mitocôndrias, e também servem como meio de transporte de lipídios na corrente sanguínea. Existem vitaminas que são solubilizadas apenas pelas gorduras, conhecidas como vitaminas lipossolúveis, como exemplo as vitaminas A, D, E e K. Isso significa que elas só são digeridas, absorvidas e transportadas em conjunto com a gordura (SACKHEIM; LEHMAN, 2001).

### **1.3 Métodos de análise por cromatografia.**

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura pela distribuição destes entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra move-se através da primeira. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre ambos. Assim cada um destes é seletivamente retido na fase estacionária em função das seguintes características: carga elétrica, peso molecular, estrutura conformacional, entre outras. Isso resulta em migrações diferenciais.

A cromatografia ocupa lugar de destaque entre os métodos modernos de análise devido à sua facilidade em efetuar separação, identificação e quantificação das espécies químicas, como os ácidos graxos. Pode-se associar a esta, outras técnicas instrumentais, tais como a

espectrofotometria e a espectrometria de massa e infravermelho. Os métodos para diferenciação de ácidos graxos por cromatografia são: a Cromatografia de Camada Delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Líquida Gasosa. (GLC) (ZAIA, 2002).

A TLC é um método de separação de misturas baseado nas diferenças de afinidade dos vários componentes de uma amostra entre a mistura de solventes utilizada (fase móvel), em relação a uma substância suporte (fase estacionária). Essa técnica passou a ser largamente utilizada a partir da década de 60. O desenvolvimento desta técnica foi uma consequência natural das múltiplas vantagens que esta oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separação em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala depende da espessura da camada absorvente e da amostra em análise.

A HPLC é composta por instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas preenchidas com material especialmente preparado e uma fase móvel eluída sob alta pressão. A coluna tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

A GLC, Cromatografia gás-líquido, ou simplesmente, a cromatografia gasosa (GC), é um tipo de cromatografia em que a fase móvel é um gás, normalmente um gás como o hélio ou nitrogênio, e na fase estacionária, chamada de coluna, é utilizado um líquido ou polímero inerte fixado em um sólido, inseridos em um tubo de vidro ou metal. Esta cromatografia é a mais utilizada para quantificação de ácidos graxos saturados e insaturados, e do isômero *cis*- e *trans*-.

#### **1.4 Tabela Nutricional**

O conhecimento da composição dos alimentos consumidos é fundamental para se alcançar à segurança alimentar e nutricional. As informações de uma tabela de composição de alimentos são pilares básicos para a educação nutricional, o controle da qualidade dos alimentos e a avaliação do consumo dos nutrientes da população. Por meio delas, autoridades de saúde pública podem estabelecer metas nutricionais e guias alimentares que levem a uma dieta mais saudável. São necessárias também para a rotulagem nutricional a fim de auxiliar



aos consumidores na escolha dos alimentos. Adicionalmente, em um mercado altamente globalizado e competitivo, dados sobre a composição de alimentos servem para promover a comercialização nacional e internacional de alimentos (LIMA *et al.*, 2006).

Para evitar decisões ou conclusões equivocadas, as tabelas precisam ser confiáveis, atualizadas e mais completas possíveis, baseadas em análises originais conduzidas de acordo com plano de amostragem representativo e métodos validados, a fim de fornecer informações que verdadeiramente representem a composição dos alimentos do país (LIMA *et al.*, 2006).

O uso das informações nutricionais obrigatórias nos rótulos dos alimentos e bebidas embaladas está regulamentado no Brasil desde 2001. As indústrias fabricantes de alimentos e bebidas embalados prontos para oferta ao consumidor têm de se adequar a esta nova legislação, que determina a declaração de informação nutricional obrigatória de valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio, nos rótulos de alimentos e bebidas embalados. As informações nutricionais referem-se ao produto na forma como está exposto à venda e devem ser apresentadas em porções, e medidas caseiras correspondentes, devendo conter ainda o percentual de valores diários para cada nutriente declarado, exceto no caso dos ácidos graxos trans, cujo percentual de valor diário não deve ser declarado (ANVISA, 2005). Esta regulamentação está publicada na Resolução ANVISA RDC 359/03 - REGULAMENTO TÉCNICO DE PORÇÕES DE ALIMENTOS EMBALADOS PARA FINS DE ROTULAGEM NUTRICIONAL, e as mesmas estão disponíveis nas seguintes páginas eletrônicas:

<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9059> e;

<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9058>

A Unicamp em 2004 lança a primeira versão da tabela nutricional elaborada pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA/UNICAMP, intitulada TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos). O projeto, coordenado pelo NEPA/UNICAMP, é uma iniciativa para oferecer dados de um expressivo número de nutrientes em alimentos nacionais e regionais obtidos por meio de amostragem representativa e análises realizadas somente por laboratórios com competência analítica comprovada por estudos interlaboratoriais, segundo critérios internacionais (LIMA *et al.*, 2006).

## 1.5 Espectroscopia Raman

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

É chamado de Espectroscopia Raman o método utilizado para análise da estrutura química de compostos inorgânicos ou grupos funcionais de substâncias orgânicas. Este método de espectroscopia foi descoberto em 1928, pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, e em 1930 ganhou o Prêmio Nobel por este feito. Mas foi somente com o advento do laser, em 1960, que a técnica teve impulso e começou a ser largamente utilizada na identificação e caracterização de materiais (SILVEIRA *et al.*, 2001).

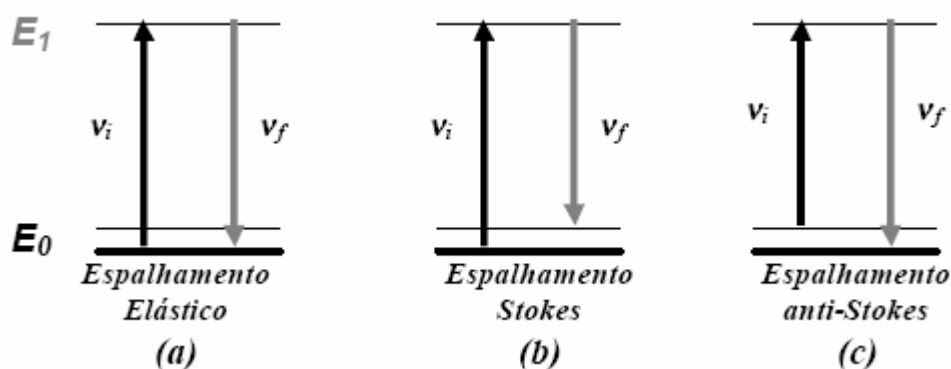
As técnicas espectroscópicas vêm sendo aplicadas a uma larga escala de amostras sólidas, líquidas e em alguns gases, dentre materiais orgânicos e inorgânicos. Esta técnica espectroscópica fornece informações importantes sobre a estrutura das moléculas e sobre a interação com moléculas vizinhas, podendo de este modo ser utilizada na identificação de moléculas presentes em um composto, e assim fornecer uma análise qualitativa e quantitativa de sua composição (ALCÂNTARA, 2002). Estas informações das moléculas são obtidas a partir da interpretação das bandas e picos dos espectros de absorção e/ou emissão dos átomos e/ou moléculas da matéria a ser analisada (ALCÂNTARA, 2002; MICHELE, 1999).

O efeito Raman que ocorre na Espectroscopia Raman é fundamentado basicamente na troca de energia entre a luz (radiação eletromagnética) incidente e a matéria incidida. Quando uma molécula é irradiada por uma radiação eletromagnética, esta radiação pode ser absorvida ou espalhada (SILVEIRA JR, 2001). Na Espectroscopia Raman o que é estudado é a radiação que foi espalhada pela matéria. Este espalhamento pode ser da mesma frequência da radiação incidente, o que chamamos de espalhamento elástico (espalhamento Rayleigh), ou quando a radiação espalhada sofre uma mudança na frequência em relação à frequência incidente, para este denominamos espalhamento inelástico (SILVEIRA JR, 2001).

O efeito Raman pode ser descrito como uma transição da molécula do seu estado fundamental ( $E_0$ ) para um estado vibracional excitado ( $E_1$ ) (Figura 4) (SILVEIRA JR, 2001). Suponhamos que a molécula se encontre no estado vibracional fundamental  $E_0$ , e absorve um fóton de energia  $E_i$  ( $E_i = h\nu_i$ , onde  $h$  é a constante de Planck e  $\nu_i$  a frequência do fóton); que a

excita para um estado intermediário ou virtual  $E_1$ . Imediatamente ela efetua uma transição de retorno ao estado fundamental, emitindo (espalhando) um fóton de energia  $E_f = h\nu_f$ , desta maneira temos que  $\nu_f = \nu_i$ , a energia espalhada é de mesma intensidade à energia de excitação, o que chamamos Espalhamento Elástico.

Além do Espalhamento Elástico, temos o Espalhamento Inelástico, onde neste, encontramos dois processos distintos: Stokes e Anti-Stokes (Figura 4). No Stokes, o fóton ao incidir sobre a molécula em nível fundamental,  $E_0$ , faz com que a molécula ganhe energia passando ao estado excitado,  $E_1$ . Ao retorno da molécula ao estado fundamental  $E_0$ , este emite um fóton com uma energia menor em relação à energia de excitação (frequência espalhada menor que a frequência incidente,  $\nu_f < \nu_i$ ). No caso do Anti-Stokes, o fóton incidente interage com a molécula que está em um estado vibracional fundamental excitado, e excita a molécula para um nível  $E_1$ , logo em seguida a mesma retorna ao estado fundamental, emitindo um fóton porém com uma energia maior em relação a energia do fóton de excitação, como resultado tem-se um fóton espalhado com energia maior que a incidente (frequência espalhada maior que a frequência incidente,  $\nu_f > \nu_i$ ) (SILVEIRA JR., 2001; GUIMARÃES, 2004).



**Figura 4** - Esquema representativo para diferenciar os tipos de espalhamento.  $E_0$ , estado fundamental -  $E_1$ , estado virtual excitado -  $\nu_i$ , frequência inicial do fóton incidente -  $\nu_f$ , frequência final do fóton espalhado.

A quantidade e a qualidade das informações que podem ser extraídas de um espectro dependem de alguns fatores: características da fonte de radiação utilizada para excitar as amostras, dentre estes fatores destacam-se a potência e o comprimento de onda do laser; da forma de coleta do sinal proveniente da amostra após a interação, como tempo de aquisição; resolução temporal ou espectral do instrumento de dispersão (espectrógrafo) utilizado, e do tipo e sensibilidade do detector do sinal, além das propriedades físicas e coeficiente de espalhamento da amostra em análise (AFSETH; WOLD; SEGTMAN, 2006; ALCÂNTARA, 2002).

### 1.5.1 Sistema de Espectroscopia Raman Dispersiva

O sistema típico para análise molecular por Espectroscopia Raman Dispersiva é composto por:

- √ Fonte de radiação monocromática, principalmente os lasers;
- √ Filtros para remoção do espalhamento elástico ou radiação de excitação do sinal retroespalhado;
- √ Espectrógrafo acoplado a um detector CCD, a fim de produzir pontos discretos (pixel) das informações da imagem espectral obtida;
- √ Computador com placa de conversão A/D, para armazenar os dados obtidos;

### 1.5.2 Aplicações da Espectroscopia Raman

Diversos autores demonstraram a possibilidade de utilização de técnicas vibracionais (particularmente a FT-Raman e espectroscopia no infravermelho) como ferramentas úteis para a elucidação da estrutura química e controle de qualidade de produtos em diversas aplicações industriais (SCHULZ; BARANSKA, 2007). A técnica de Espectroscopia Raman, restrita por um longo tempo à investigação acadêmica, aos poucos desponta como uma técnica inovadora na área de controle de qualidade. O objetivo final é utilizar a técnica como controle de qualidade *in line* e *at line*, possibilitando conhecimento das características da amostra durante o processo/processamento industrial (OLSEN *et al.*, 2007).

A técnica de espectroscopia Raman vem sendo aplicada em diversas áreas biomédicas com o objetivo de identificar diferenças espectrais entre tecidos biológicos normais e patológicos, quantificação de componentes bioquímicos e metabólicos presentes em amostras de fluidos biológicos, e controle de qualidade na indústria. Apresenta inúmeras vantagens com relação às técnicas FT-Raman e infravermelho, principalmente no que se refere à não necessidade de preparação da amostra e ao curto tempo de coleta do sinal Raman, em amostras líquidas ou sólidas, em tempo real (AFSETH; WOLD; SEGTMAN, 2006; SILVEIRA JR. *et al.*, 2002).

A técnica Raman vem sendo aplicada na prática farmacêutica com a finalidade de quantificar compostos químicos. A possibilidade de identificação e obtenção da concentração de princípios ativos em medicamentos de referência, similares e genéricos abre possibilidades

para o controle de qualidade na indústria farmacêutica, visando atender às novas demandas de controle *in line* e *at line* (VINHA JR, 2002).

A Espectroscopia Raman Dispersiva (ERD) vem sendo aplicada na caracterização de tecidos biológicos, se revelando uma técnica muito precisa para análise de materiais biológicos *in vitro* e *in vivo* de diferentes patologias (MANOHARAN; WANG; FELD, 1995). A técnica ERD fornece a “impressão digital” da amostra a ser analisada, permitindo a identificação dos componentes bioquímicos responsáveis pelas alterações patológicas (NOGUEIRA, 2004; SILVEIRA JR *et al.*, 2002).

A utilização da técnica Raman para o diagnóstico de câncer é uma linha de atuação emergente. No diagnóstico de tecidos cancerosos têm surgido vários trabalhos realizados em diversos tecidos, alguns promovem o estudo do efeito do congelamento e da fixação de amostras cancerosa de brônquio (FAOLÁIN *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2003), outros relatam a possibilidade de diagnóstico de câncer de colo de útero, onde este é o principal tipo de câncer no sexo feminino (KRISHNA *et al.*, 2006).

Manoharan, Wang e Feld (1995) realizaram uma revisão da literatura sobre a espectroscopia Raman na análise bioquímica de tecidos biológicos. Neste trabalho são relatadas as vantagens e desvantagens das diversas fontes de excitação: visível; infravermelho próximo e ultravioleta. Para isso foram analisados diversos trabalhos que utilizaram a técnica Raman em tecidos normais e malignos, como: sangue, córnea, artéria, câncer, entre outros.

Buschman *et al.* (2001) realizaram um estudo sobre o diagnóstico da placa de aterosclerose tendo como base a morfologia de uma coronária humana. Silveira JR. *et al.* (2001) utilizaram análise estatística multivariada (PCA - Análise dos Componentes Principais) aplicada aos espectros ERD em artérias coronárias humanas *in vitro* e verificaram alta sensibilidade e especificidade para a detecção de placas ateroscleróticas e calcificadas utilizando como discriminador a distância de Mahalanobis.

Romer *et al.* (1998) realizaram a quantificação dos componentes bioquímicos da placa aterosclerose em artéria coronária humana, tais como colesterol e calcificação, utilizando como parâmetro de quantificação as informações obtidas nos espectros Raman no infravermelho próximo. Para isso os autores desenvolveram um algoritmo para quantificação dos componentes químicos da placa aterosclerótica. De acordo com os autores, este algoritmo desenvolvido classificou corretamente uma grande parte de suas amostras, tendo assim uma boa exatidão nos resultados e mostrando-se eficiente.

Motz (2003) estudou a utilização da espectroscopia Raman no diagnóstico de aterosclerose *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente foi caracterizada a placa *in vitro*, com suas

bandas Raman características. Posteriormente, o autor confeccionou um cateter de fibras ópticas, na configuração “15 em torno de 1”, onde a fibra óptica central era utilizada para excitação e as 15 ao redor para coleta do sinal de espalhamento da amostra. O autor mostrou que é possível identificar a placa aterosclerótica utilizando a ERD e cabos de fibras ópticas.

Métodos clássicos para classificação de óleos e gorduras, como a cromatografia, estão sendo aos poucos substituídos pela espectroscopia vibracional, especialmente a espectroscopia Raman, devido a esta possuir uma metodologia de análise não-destrutiva e rápida (LI-CHAN,1996; OZAKI *et al.*, 1992), além de fornecer uma “impressão digital” da amostra analisada (SCHULZ; BARANSKA, 2007).

Baeten *et al.* (1998) correlacionaram a técnica de Espectroscopia FT-Raman e a análise química por cromatografia em 138 amostras, entre óleos e gorduras, tanto animais quanto vegetais. O principal componente analisado para a classificação destas amostras foi o nível de insaturação da amostra. Este trabalho relatou que a espectroscopia Raman não só forneceu informação importante sobre o tipo de gordura, nível de insaturação, como também a quantificação das mesmas, isso comparado à técnica tradicional de cromatografia. Os picos mais importantes, segundo os autores, são os relacionados às vibrações C=O ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), que aparecem com intensidade aumentada somente em amostras de ácidos graxos saturados e vibrações da ligação C=C ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ) das moléculas olefínicas. A diminuição da intensidade Raman da banda em  $1660\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao grau de insaturação da amostra.

Sadeghi-Jorabchi *et al.* (1990) determinaram o grau de insaturação total de amostras de óleo e de azeite virgem, visando à determinação da adulteração que estes produtos sofrem com adição de óleo vegetal. Os autores apresentam a banda na região de  $1440\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde à vibração de deformação da ligação C-H, como padrão de insaturação dos ácidos graxos das amostras. Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que as bandas Raman em  $1260\text{ cm}^{-1}$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem ao modo de vibração da ligação C-H e CH<sub>2</sub>, respectivamente, e a razão entre as bandas podem indicar o valor da insaturação dos ácidos graxos em análise.

Olsen *et al.* (2007) realizam o estudo de quantificação de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados em tecido adiposo de porco utilizando a técnica de Espectroscopia Raman, e foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa como referência. Os autores puderam, via análise das bandas mais importantes que ocorrem nos espectros Raman, classificar a gordura saturada, monoinsaturada e poliinsaturada em tecidos adiposos, em menos de 60s.

Meurens *et al.* (2005) aplicaram a técnica FT-Raman na identificação dos ácidos graxos linoleicos (ômega 6) em gordura de leite de vaca, justificados pelo fato de que as bandas Raman são sensíveis ao nível de saturação da gordura e que o espectro Raman é proporcional à concentração dos componentes químicos presentes na amostra analisada. Para tal, utilizaram os espectros de amostras padrões de ácidos graxos com os obtidos de gordura desidratada de leite. Os autores criaram então uma curva de calibração com os espectros das amostras padrões e confrontaram-na com os espectros obtidos da gordura do leite. Os autores concluem que a concentração de ácido graxo linoleico pode ser obtida através da análise das bandas Raman e posições específicas (1652, 1438 e 3006  $\text{cm}^{-1}$ ) com alto grau de precisão.

A motivação do estudo reside no fato de que atualmente a mídia brasileira e mesmo internacional tem apresentado vários casos de adulteração/falsificação e baixa qualidade de produtos alimentícios. Dentre estes casos, a adulteração do leite com água oxigenada e soda cáustica, a adulteração de bebidas (vodka, conhaque) com álcool etílico hidratado combustível, produtos “Light” com composição nutricional não correspondente com o rótulo do produto. Esta preocupação com a qualidade dos alimentos tem levado à busca de novas técnicas de quantificação nutricional rápida e de baixo custo.

## **2 OBJETIVO**

O presente trabalho tem por objetivo a utilização da Espectroscopia Raman Dispersiva (ERD) com excitação em 830 nm na caracterização e diferenciação espectral de diferentes tipos de gorduras alimentícias comerciais e a quantificação relativa da composição de gorduras insaturadas em amostras de óleos vegetais, margarinas, maioneses, manteigas, gorduras vegetais hidrogenadas e leite; comparando esta quantificação com as informações disponíveis na Tabela Nutricional destes alimentos, visando obter um padrão de quantificação óptico da qualidade destes alimentos.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amostras de óleos vegetais e alimentos industrializados

Foram adquiridos no supermercado Extra de São José dos Campos - SP os seguintes produtos compostos principalmente por gorduras vegetais saturadas e insaturadas:

- ✓ 4 tipos de óleos vegetais: Soja, Milho, Girassol e Canola;
- ✓ 3 tipos de maioneses: 0% Colesterol, Light e Ômega 3;
- ✓ 2 tipos de gordura vegetal hidrogenada: A e B
- ✓ 2 tipos de manteiga: A e B;
- ✓ 5 tipos de margarina: “Light” A, Extra Cremosa, Cremosa, Ao Leite e “Light” B;
- ✓ 6 tipos de leite: Tipo A, Tipo B e Tipo C; leite integral, semi-desnatado e desnatado.

Pelos rótulos dos produtos foram anotados e tabelados os valores da quantidade (g) de gordura total, gordura saturada, gordura insaturada, colesterol e gordura *trans*. Estes valores serão usados como referência para a identificação da quantidade relativa de gordura pela técnica Raman.

As amostras líquidas foram colocadas dentro de uma cubeta de quartzo para a realização da espectroscopia. Para as amostras sólidas (pastosas), foi confeccionado um porta amostras com rebaixo fresado em forma de círculo com 5 mm de profundidade na sua parede e onde foram colocadas as amostras para análise. Foram realizados dois espectros para cada amostra e destes foi tirada a média. As amostras foram mantidas em condições ambientais conforme informação no rótulo do produto.

### 3.2 Sistema de Espectroscopia Raman no Infravermelho Próximo

O sistema de Espectroscopia Raman Dispersiva no Infravermelho Próximo a ser utilizado na identificação e quantificação de gorduras compreende às seguintes partes (Figura 5):

✓ Sistema óptico de excitação, baseado em um laser de diodo (AsGaAl), fabricado pela empresa Micro Laser Systems Inc., modelo L4830S, com comprimento de onda de excitação em 830nm;

✓ Prisma com filtro óptico holográfico do tipo passa-banda para filtragem do laser de excitação, espelhos para o direcionamento do feixe laser, lentes para focalização do feixe de

excitação na amostra e para coleta do sinal retroespalhado da amostra e direcionamento ao espectrógrafo e filtro notch rejeita-faixa em 830nm para remoção da radiação espalhada do laser;

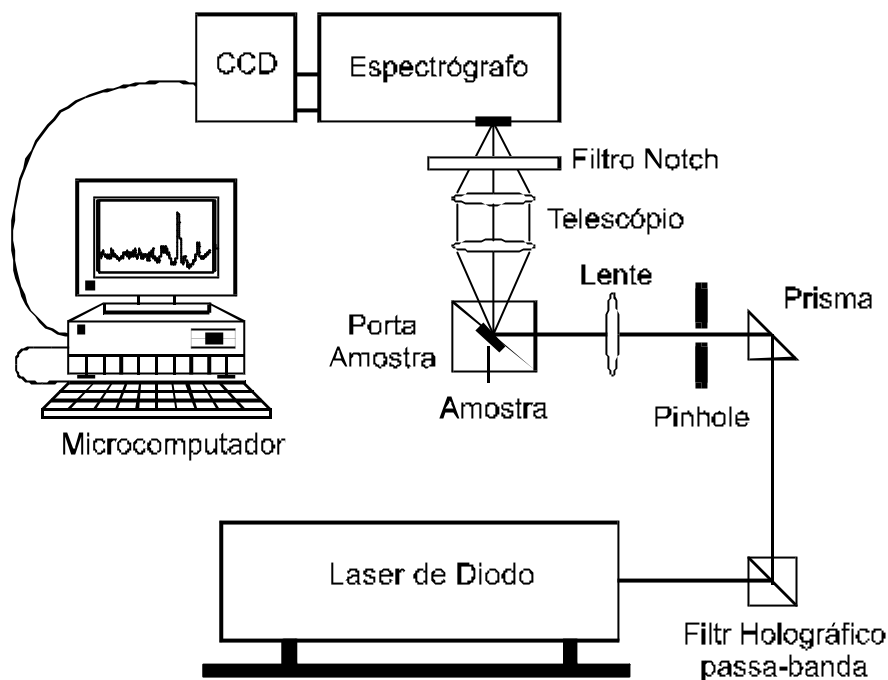
√ Espectrógrafo de imagem Chromex 250IS com grade de difração de 600 linhas/mm, que dispersa o sinal proveniente da amostra e direciona este sinal espectral ao CCD para leitura. A resolução deste espectrógrafo, que depende da abertura da fenda utilizada (normalmente 200 $\mu$ m), é de 8 $\text{cm}^{-1}$ ;

√ Detetor CCD - Charge Coupled Device, fabricado pela Princenton Instruments, modelo LN/CCD-1024-EHR/1, de 1024X256 pixels, refrigerado com nitrogênio líquido, contendo um pré-amplificador;

√ Controlador da CCD fabricada pela Princenton Instruments, modelo ST-138S, que recebe o sinal analógico da CCD, realiza uma integração, a conversão AD de alta resolução (16 bits) para depois enviá-lo para o microcomputador;

√ Microcomputador PC com uma placa de aquisição, que controla o tempo de exposição da CCD e o número de leituras do sinal e recebe o sinal digital do controlador para convertê-lo em dados digitalizados, através do software de processamento de sinais de espectro Raman.

O laser de diodo fornece uma potência óptica de 80mW após o prisma com filtro, suficiente para obter espectros Raman com relação sinal/ruído superior a 5 em amostras orgânicas, para que se possa obter um espectro de qualidade do material a ser analisado. Todo o sistema está montado em uma mesa óptica (Newport, modelo RS2000). O tempo de exposição para cada amostra analisada foi de 60s.



**Figura 5** - Esquema do sistema de Espectroscopia Raman Dispersiva no Infravermelho Próximo do Laboratório de Espectroscopia Biomolecular da UNIVAP.

### 3.3 Calibração e processamento dos espectros Raman

A obtenção dos espectros Raman de alta qualidade está ligada ao correto procedimento de calibração e subtração do *background*, bem como à filtragem do ruído de fóton (alta frequência). Os *softwares* utilizados para o manejo dos espectros foram o Matlab<sup>®</sup> (The Mathworks, MA, USA, versão 6.0) e o Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, WA, USA, versão 2000), ambos lendo arquivos do tipo ASCII formatados com separação de colunas por tabulação (extensão .prn).

#### 3.3.1 Calibração da resposta espectral

A calibração da resposta espectral corrige a dependência da intensidade da óptica de coleta do espectrômetro Raman (lentes/espectrógrafo/CCD) com relação ao comprimento de onda da radiação. Utilizou-se uma lâmpada de tungstênio, padrão de irradiância espectral de 50W (Oriel Instruments, CT, USA, modelo 63358), rastreada pelo NIST (National Institute of Standards and Technology), para a obtenção da curva de correção da resposta espectral  $RE(I)$  do sistema em função do comprimento de onda  $I$ . Mediu-se o espectro da lâmpada  $EL(I)$  a

Im da entrada do sistema óptico do espectrômetro e, a seguir, utilizou-se o espectro conhecido da lâmpada  $EC(I)$  na seguinte equação:

$$RE(I) = \frac{EC(I)}{EL(I)}$$

$RE(I)$  é a medida da imperfeição que o sistema óptico apresenta. Nesta expressão, um valor pequeno de  $EL(I)$  comparado com o valor conhecido de  $EC(I)$  indica um aumento em  $RE(I)$ , necessário para corrigir a deficiência do sistema em um determinado comprimento de onda.

Para que seja feita a correção da intensidade de qualquer espectro Raman obtido no espectrômetro, utilizou-se a resposta espectral do sistema  $RE(I)$  da seguinte forma:

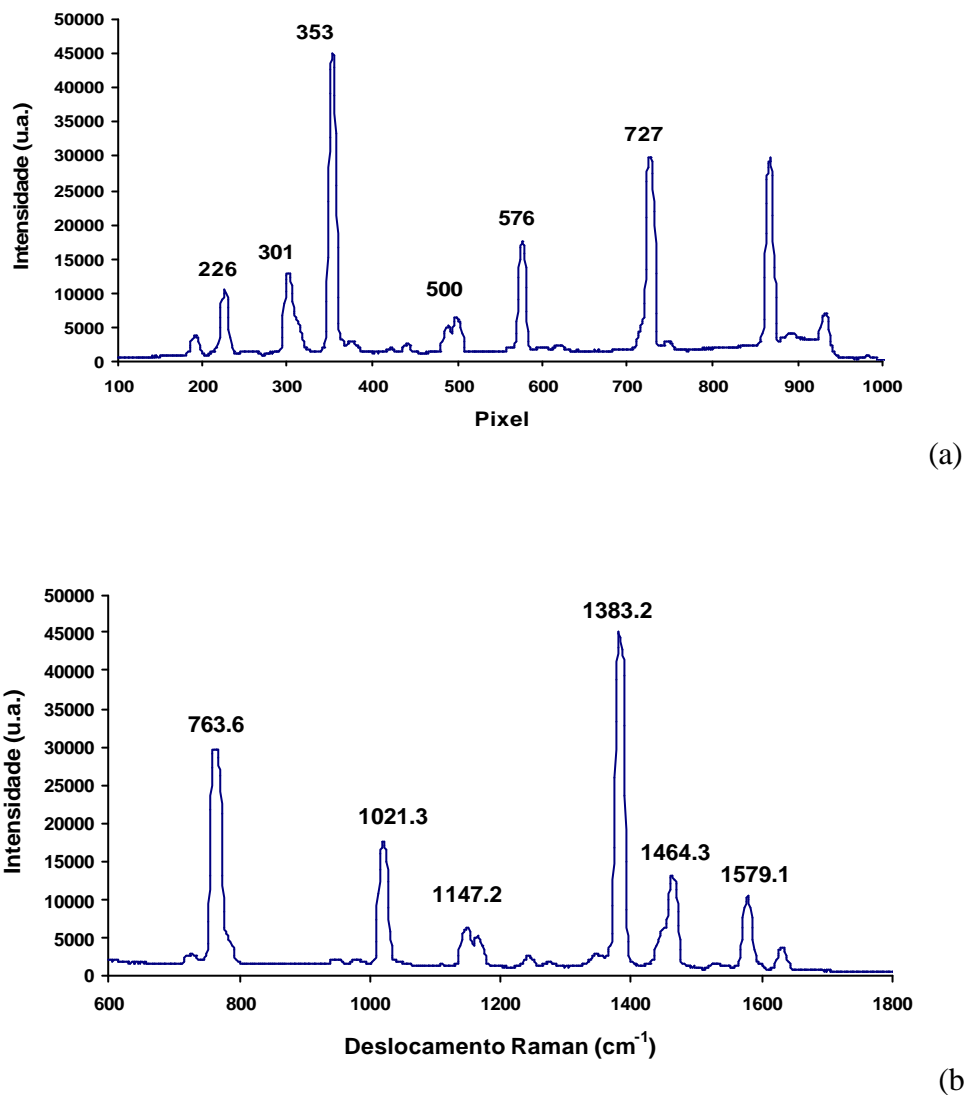
$$ERC(I) = RE(I) \times ERO(I)$$

onde  $ERC(I)$  é o espectro Raman corrigido e  $ERO(I)$  é o espectro Raman original. Para manter a intensidade original do espectro, a intensidade de  $RE(I)$  foi normalizada no centro da região espectral de interesse ( $1200 \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.3.2 Calibração do deslocamento do número de onda (deslocamento Raman)

Devido à necessidade de conhecer a localização de cada banda de um espectro em termos da sua frequência e ao fato de que a posição da amostra no espectrógrafo pode sofrer deslocamentos entre os experimentos, o espectrômetro foi calibrado a cada tomada de espectros.

Na calibração dos espectros Raman utilizou-se 7 bandas principais do naftaleno ( $C_{10}H_8$ ), porque esse composto tem a característica de bandas intensas e bem espaçadas na região espectral de  $500$  a  $1700 \text{ cm}^{-1}$ , que é a região de interesse para a espectroscopia Raman quando usada para análise de materiais biológicos. O espectro do naftaleno pode ser observado na Figura 6, com a mesma aparência com que é coletado (Figura 6a) e após a calibração do número de onda, com as posições das bandas interpoladas por uma função polinomial de ordem 3 utilizando o software Excel<sup>®</sup> (Figura 6b).



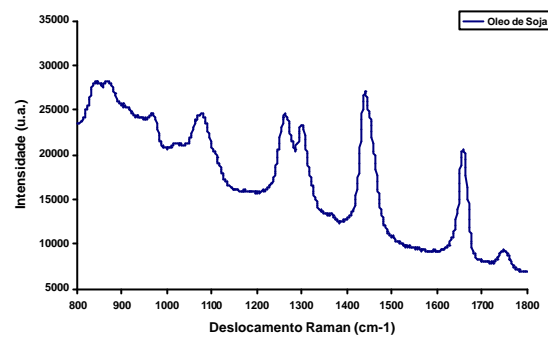
**Figura 6** - Espectro do Naftaleno usado para calibração do número de onda: (a) espectro bruto, com as posições das bandas em pixels; (b) espectro calibrado, utilizando-se polinômio de ordem 3, com as posições das bandas em  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.3 Remoção da fluorescência de fundo e do ruído de alta frequência

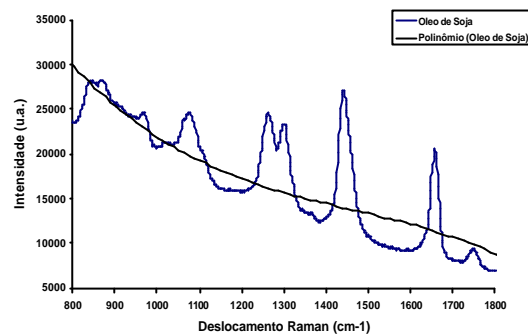
O processamento dos espectros Raman envolveu na primeira etapa a remoção da emissão de fluorescência de fundo (componente espectral de baixa frequência) e a filtragem do ruído eletrônico e ruído de fóton (componentes de alta frequência). A emissão fluorescente, sem importância em termos de características espectrais para o Raman, foi removida por meio de um filtro passa-altas com a ajuda do software Matlab<sup>®</sup>.

Uma interpolação polinomial de ordem 3 ou 4 foi utilizada em todos os pontos do espectro. A ordem foi variada em função do perfil de fluorescência do espectro e esta interpolação foi subtraída do espectro original, evidenciando as bandas de alta frequência. O resultado da aplicação do método polinomial de subtração de ruído de baixa frequência é observado na Figura 7. Na Figura 7(a) observa-se o espectro do óleo de soja com características espectrais bem definidas e alta frequência onde observa-se o sinal Raman (bandas estreitas) somadas à fluorescência de fundo. Na Figura 7(b) tem-se o espectro na região de interesse após calibração em número de onda e a função polinomial obtida. A Figura 7(c) apresenta o espectro final após a subtração da fluorescência. Com a remoção dos componentes de baixa frequência, são evidenciadas as bandas Raman característica da amostra em análise.

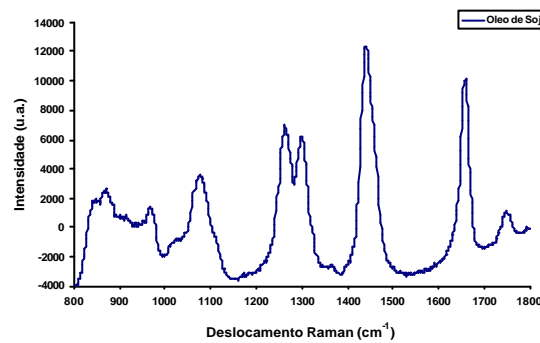
Com o objetivo de determinar eventuais distorções na posição das bandas Raman devido ao método de subtração por interpolação polinomial do componente de baixa frequência, foi verificada a posição da banda Raman em  $960\text{ cm}^{-1}$  antes e depois da subtração. Como pode ser observada nas Figuras 7(b) e 7(c), a banda Raman em  $960\text{ cm}^{-1}$  não apresentou mudança na posição, concluindo-se que o método polinomial não interferiu na calibração.



(a)



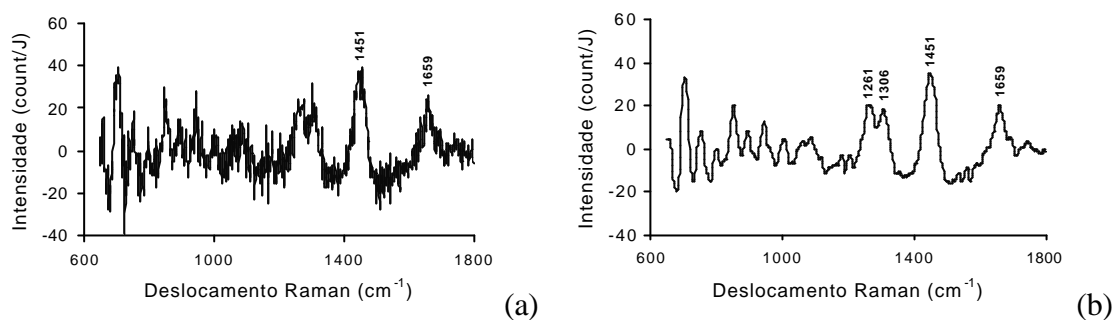
(b)



(c)

**Figura 7** - Espectro Raman do óleo de soja (a) obtido com o espectrômetro Raman, sem calibração; (b) espectro calibrado em número de onda e a interpolação por polinômio de ordem 3 (preto) e (c) o espectro Raman final, após a subtração polinomial, evidenciando as bandas Raman de alta frequência.

Após a obtenção do espectro Raman, a maior dificuldade é o tratamento dos espectros, já que estes vêm de forma bruta (adicionado de fluorescência de fundo e ruído de alta frequência) e necessita-se de aplicação de ferramentas e algoritmos de processamento de sinais. A Figura 8 apresenta um espectro de coronária humana, onde é mostrada a diferença de um espectro com ruídos de alta frequência, e um espectro após passar por um processamento de sinais básico para retirada dos ruídos de alta frequência (SILVEIRA JR., 2001):



**Figura 8** - Espectros Raman de artéria coronária humana não-aterosclerótica; (a) representa um espectro bruto; (b) representa o mesmo espectro após filtragem do ruído de alta frequência (SILVEIRA JR., 2001).

### 3.4 Identificação das bandas Raman mais importantes

As bandas Raman mais importantes dos espectros de gorduras vegetais para a identificação das quantidades de gorduras saturadas, insaturadas e *trans* foram identificadas (intensidade e posição no espectro) e utilizadas para calcular a quantidade relativa de gordura saturada e insaturada em relação à quantidade de gordura total.

Baeten *et al.*(1998), no trabalho sobre a caracterização por FT-Raman de óleos vegetais, relataram que o nível de gordura saturada pode ser mensurado através da razão entre as intensidades das bandas em  $1660\text{ cm}^{-1}$  (C=C) e  $1440\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>), pois existe uma correlação entre estas duas bandas e a saturação da amostra. No mesmo trabalho, os autores também descrevem que a razão entre as intensidades das bandas em  $1300\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) e  $1260\text{ cm}^{-1}$  (C-H) correlaciona-se com a quantidade de saturação na amostra.

As amostras foram agrupadas de acordo com o tipo de alimento, e os valores do índice de gordura insaturada, presentes na tabela nutricional, e das razões dos picos Raman foram calculados para cada grupo de amostra. Para se obter a correlação entre o índice de gordura insaturada da Tabela Nutricional e a razão dos picos Raman, foi graficado o valor do Grau de Insaturação (em porcentagem) da amostra analisada versus a Razão entre as Intensidades Raman,  $1660 / 1440\text{ cm}^{-1}$  e  $1260 / 1300\text{ cm}^{-1}$ . Entre o Grau de Insaturação e a Razão Raman, foi calculado o valor do grau de correlação ( $R^2$ ) e a equação que expressa a relação entre a Porcentagem de Gordura Insaturada e o valor da Razão da Intensidade Raman, onde através dessa equação é possível se encontrar a porcentagem de gordura através da razão das Intensidades Raman.

O desvio padrão das intensidades das bandas Raman foi calculado utilizando a intensidade da banda em  $1750\text{ cm}^{-1}$  dos óleos vegetais, uma vez que foram obtidos dois



espectros de cada amostra e analisadas quatro amostras, fornecendo um total de oito valores de intensidade para calcular o desvio padrão dos picos Raman. A banda em  $1750\text{ cm}^{-1}$  não varia significativamente em função do tipo de gordura encontrado (BAETEN *et al.*, 1998). O valor do desvio padrão encontrado foi de 2,5%, e este desvio foi utilizado em todos os gráficos de colunas.

## 4 RESULTADOS

O trabalho aqui descrito propôs-se a utilizar a técnica de Espectroscopia Raman Dispersiva no infravermelho como uma possível ferramenta de quantificação de porcentagem de gordura insaturada em amostras comerciais de óleos e produtos alimentícios industrializados cuja composição seja ácidos graxos. Para tal, espectros Raman com excitação em 830 nm foram obtidos de diferentes produtos comerciais. Após tratamento dos espectros e identificação das bandas mais importantes, os resultados das razões de bandas selecionadas foram comparados com a porcentagem de gordura insaturada com relação à gordura total fornecida pela Tabela Nutricional.

### 4.1 Tabela Nutricional

A Tabela Nutricional dos alimentos utilizados neste estudo não apresenta quantidades significativas de proteínas e carboidratos, e a quantidade de sódio, quando informada, é baixa. Portanto, estes valores foram desprezados no espectro Raman, por conta disto este foi omitido nas tabelas a seguir. Nas Tabelas 1 a 7 são apresentados os valores encontrados na tabela nutricional de cada amostra analisada.

**Tabela 1.** - Óleos vegetais.

(Porção de 13 mL)	Soja	Milho	Girassol	Canola
Valor energético	108 kcal	108 kcal	108 kcal	108 kcal
Gorduras Totais	12 g	12 g	12 g	12 g
Gorduras Saturadas	2,0 g	1,8 g	1,3 g	0,9 g
Gorduras Trans	-	-	-	-
Gorduras Monoinsaturadas	3,0 g	4,4 g	3,1 g	7,8 g
Gorduras Poliinsaturadas	7,0 g	5,8 g	7,6 g	3,3 g
Omega 3 - ácido graxo linolênico	-	-	-	0,9 g
Omega 6 - ácido graxo linoleico	-	-	-	-
Colesterol	0 mg	0 mg	0 mg	0 mg

**Tabela 2.** – Margarinas.

(Porção de 10g)	“Light” A	Extra Cremosa	Cremosa	Ao Leite	“Light” B
Valor energético	32 kcal	59 kcal	32 kcal	72 kcal	19 kcal
Gorduras Totais	3,5 g	6,5 g	3,5 g	8,0 g	2,0 g
Gorduras Saturadas	0,9 g	2,1 g	0,9 g	1,8 g	1,1 g
Gorduras Trans	0 g	0 g	0 g	1,3 g	0 g
Gorduras Monoinsaturadas	0,7 g	1,4 g	0,7	-	-
Gorduras Poliinsaturadas	1,9 g	3 g	1,9	-	-
Omega 3 - ácido graxo linolênico	-	0,3 g	0,2 g	-	-
Omega 6 - ácido graxo linoleico	-	2,7 g	1,7 g	-	-
Colesterol	0 mg	0 mg	0 mg	-	-

**Tabela 3.** – Maioneses.

(Porção 12 g)	Zero Colesterol	“Light”	Ômega 3
Valor energético	16 kcal	29 kcal	39 kcal
Gorduras Totais	1,2 g	2,8 g	3,8 g
Gorduras Saturadas	0,2 g	0,5 g	0,6 g
Gorduras Trans	0 g	0 g	0 g
Gorduras Monoinsaturadas	0,3g	-	0,9 g
Gorduras Poliinsaturadas	0,7 g	-	2,3 g
Omega 3 - ácido graxo linolênico	NC	NC	0,3g

**Tabela 4.** - Gordura vegetal.

(Porção 10 g)	A	B
Valor energético	90 kcal	90 kcal
Gorduras Totais	10g	10 g
Gorduras Saturadas	2,5 g	2,6 g
Gorduras Trans	0 g	2,9 g
Colesterol	0 mg	0 mg

**Tabela 5.** – Manteiga.

(Porção 10 g)	A	B
Valor energético	78 kcal	74 kcal
Gorduras Totais	8,6 g	8,2 g
Gorduras Saturadas	6,3 g	4,5 g
Gorduras Trans	0 g	0,7 g
Gorduras Monoinsaturadas	-	2,3 g
Gorduras Poliinsaturadas	-	0,6 g
Colesterol	-	10 mg

**Tabela 6.** - Leite pasteurizado.

(Porção 200 ml)	Tipo A	Tipo B	Tipo C	“Light”
Valor energético	-	-	-	-
Gorduras Totais	7,0 g	6,2 g	6,2 g	0,8 g
Gorduras Saturadas	4,3 g	4,0 g	4,0 g	0,5 g
Gorduras Trans	0 g	0 g	0 g	0 g
Gorduras Monoinsaturadas	-	-	-	-
Gorduras Poliinsaturadas	-	-	-	-

**Tabela 7.** - Leite Longa Vida.

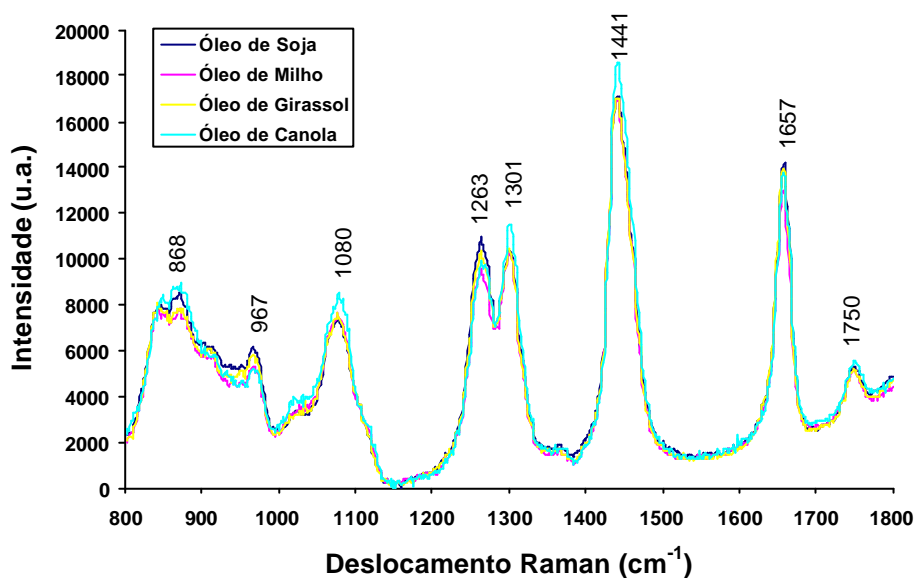
(Porção 200 ml)	Integral	Semi Desnatado	Desmatado
Valor energético	-	-	-
Gorduras Totais	6,0 g	2,0 g	0 g
Gorduras Saturadas	3,6 g	1,2 g	0 g
Gorduras Trans	não contém	-	-
Gorduras Monoinsaturadas	1,7	0,6	0 g
Gorduras Poliinsaturadas	0,5	0,1	0 g
Colesterol	18 mg	6,0 mg	0 mg

Uma observação importante da Tabela Nutricional: ela é obrigatória para os alimentos industrializados, porém nem todos os alimentos apresentam estes valores indicados no rótulo. Por exemplo, a maionese, o leite pasteurizado, uma das marcas de manteiga não apresentaram informação da quantidade de colesterol.

## 4.2 Espectros Raman

### 4.2.1 Óleos vegetais.

A Figura 9 apresenta os espectros Raman dos óleos vegetais de soja, milho, girassol e canola analisados. Estes espectros foram obtidos com tempo de exposição de 60s sem nenhum processamento das amostras antes da análise espectral.



**Figura 9** - Espectro Raman de amostras de óleos vegetais de soja, milho, girassol e canola.

Os espectros Raman de óleos vegetais apresentam bandas intensas e bem resolvidas na região espectral entre 800 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas mais importantes nos óleos ocorrem nas seguintes vibrações: na região de 1750  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem às vibrações C=O e aparecem com intensidade aumentada somente em amostras de ácidos graxos curtos e saturados (óleo de palma, coco, entre outros). Na região de 1660  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à banda de vibração da ligação C=C das moléculas olefínicas. Esta banda é muito intensa e muitos fatores a influenciam, por exemplo, a ligação C=C é conjugada com outra ligação dupla, então a frequência é alterada entre 30 e 50  $\text{cm}^{-1}$  em direção às frequências menores porque esta banda

e sensível ao número de ligações duplas. A diminuição da intensidade Raman da banda em  $1660\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao aumento do grau de insaturação da amostra (BAETEN *et al.*, 1998).

A banda na região de  $1440\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de deformação da ligação C-H. Esta banda tem sido usada para determinar o grau de insaturação total das amostras de óleo e de azeite virgem (BAETEN *et al.*, 1996; SADEGHI-JORABCHI *et al.*, 1990).

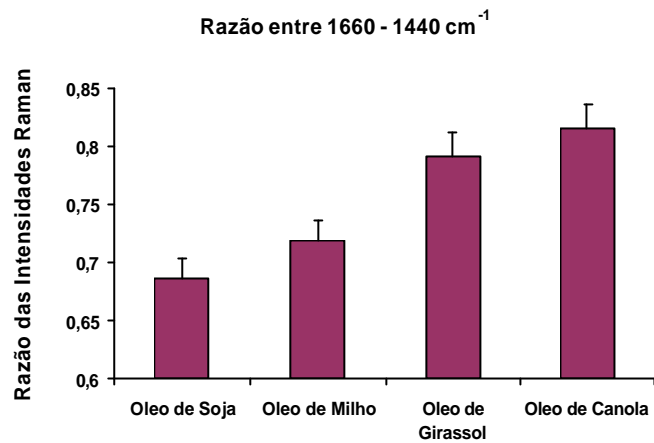
As bandas Raman em  $1260\text{ cm}^{-1}$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao modo de vibração da ligação C-H e  $\text{CH}_2$ , respectivamente. Segundo Sadeghi-Jorabchi *et al.* (1990), a banda em  $1260\text{ cm}^{-1}$  pode indicar o valor da insaturação do isômero *cis* sem a influência do isômero *trans*.

A região entre  $700\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  é conhecida como “impressão digital”. Esta região apresenta bandas características das vibrações do “esqueleto” C-C e ligação C-O. As bandas provenientes destas ligações não trazem informação adicional para identificação da cadeia de carbono, portanto são incapazes de distinguir entre os tipos de gordura.

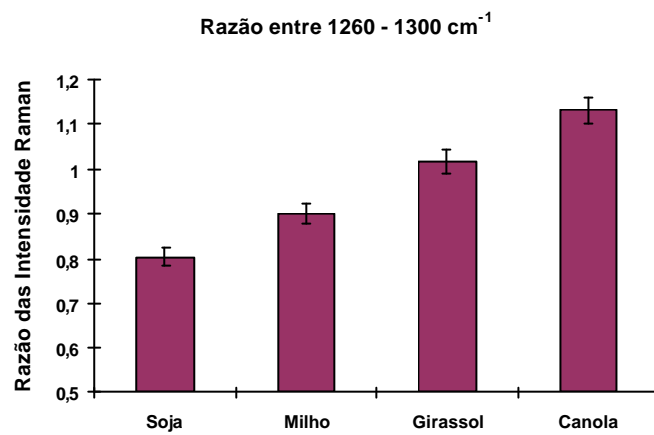
Baeten *et al.* (1998) reportaram que o índice de instauração pode ser determinado através da razão da intensidade dos picos em  $1660$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que Sadeghi-Jorabchi *et al.* (1991), apresentaram que este mesmo índice pode ser determinado entre as razões de  $1260$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$ , com uma excelente correlação comparado com a técnica de cromatografia. As razões entre  $1660$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1260$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  são mostradas na figura 10.

Os valores das porcentagens de gordura insaturada em relação à gordura total constante na Tabela Nutricional dos óleos analisados são apresentados na Figuras 11.

Nas figuras 12 e 13 foram graficados o Índice de Gordura Insaturada (em porcentagem) presente na Tabela Nutricional versus a Razão entre as Intensidades Raman, e determinado o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) entre os pontos. Além da correlação, é mostrada ainda no mesmo gráfico a equação da linha de tendência que expressa a relação entre o valor da razão entre os picos Raman e o valor da Porcentagem do Índice de Gordura Insaturada.

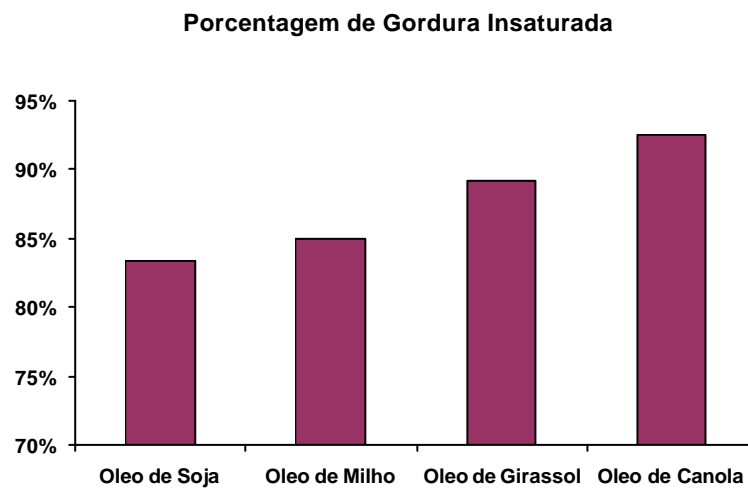


(a)

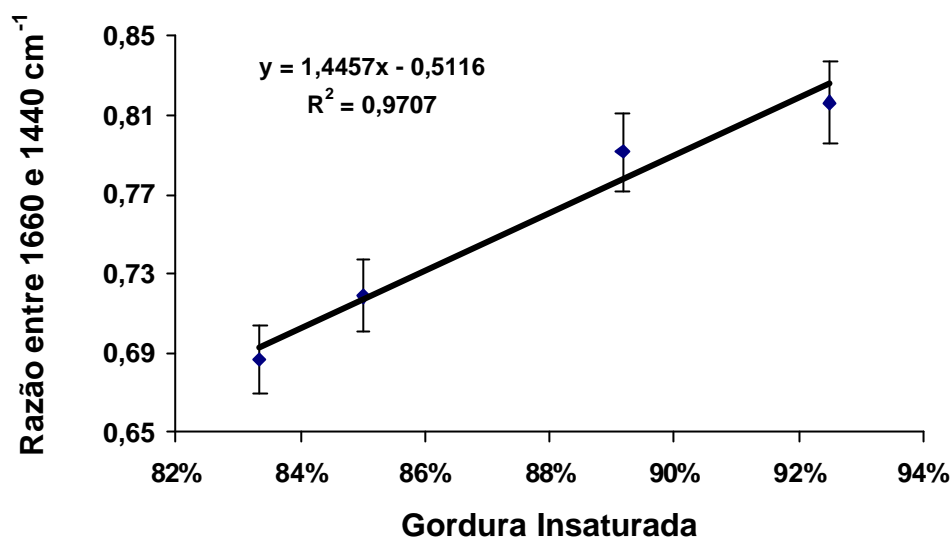


(b)

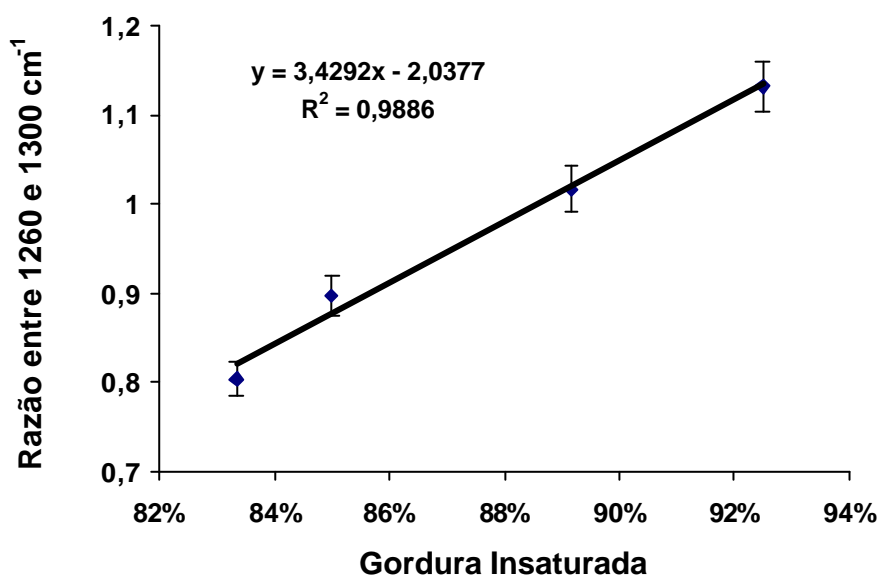
**Figura 10** - Razão entre as intensidades Raman em: (a) 1660 e 1440  $\text{cm}^{-1}$  e (b) 1260 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ , para os óleos vegetais analisados no experimento.



**Figura 11** - Porcentagem de Gordura Insaturada segundo a Tabela Nutricional das amostras de óleos vegetais analisados.



**Figura 12** - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre 1660 cm<sup>-1</sup> e 1440 cm<sup>-1</sup> e o Índice de Gordura Insaturada informado pela Tabela Nutricional.



**Figura 13** - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre 1260 cm<sup>-1</sup> e 1300 cm<sup>-1</sup> e o Índice de Gordura Insaturada informado na Tabela Nutricional.

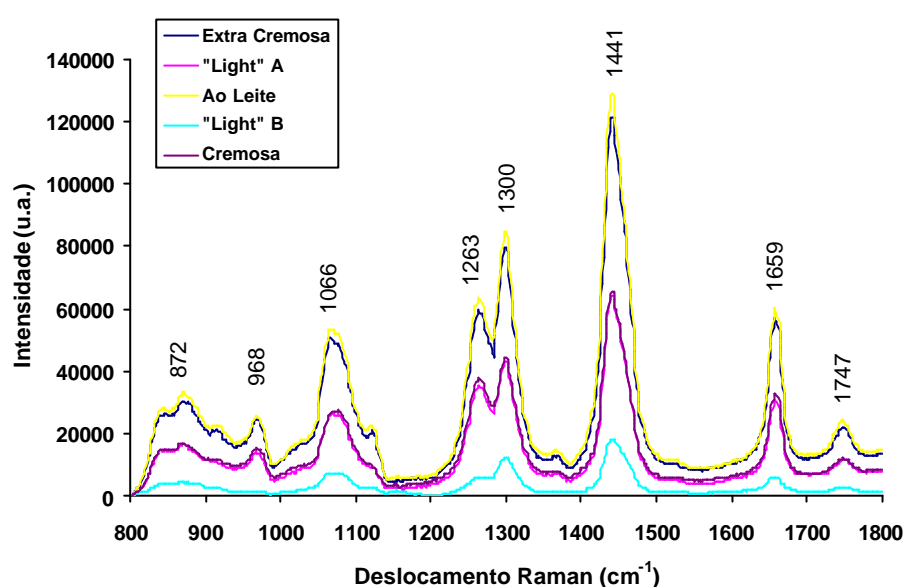
Como se pode observar nas Figuras 12 e 13, os valores de gordura insaturada correlacionam-se com os valores das razões entre as bandas indicadas, sendo que a razão entre



1260 e 1300  $\text{cm}^{-1}$  apresentou melhor correlação entre as bandas Raman e a Tabela Nutricional (Figura 12).

#### 4.2.2 Margarina

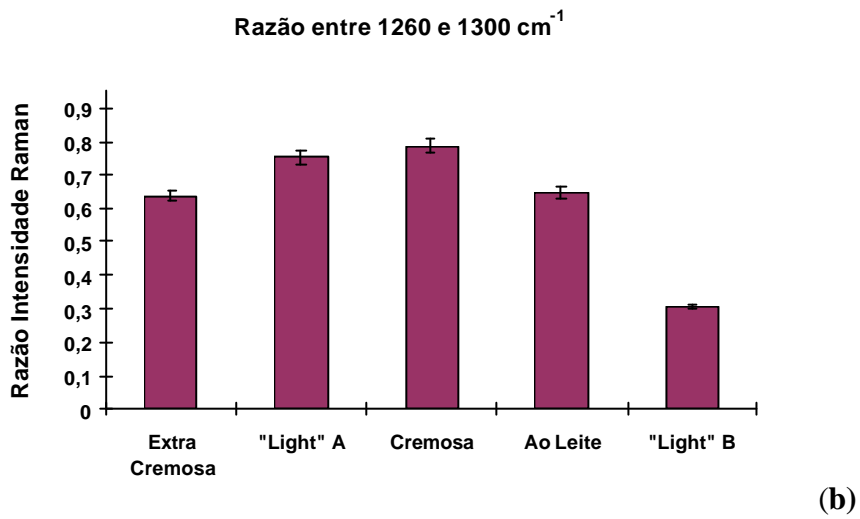
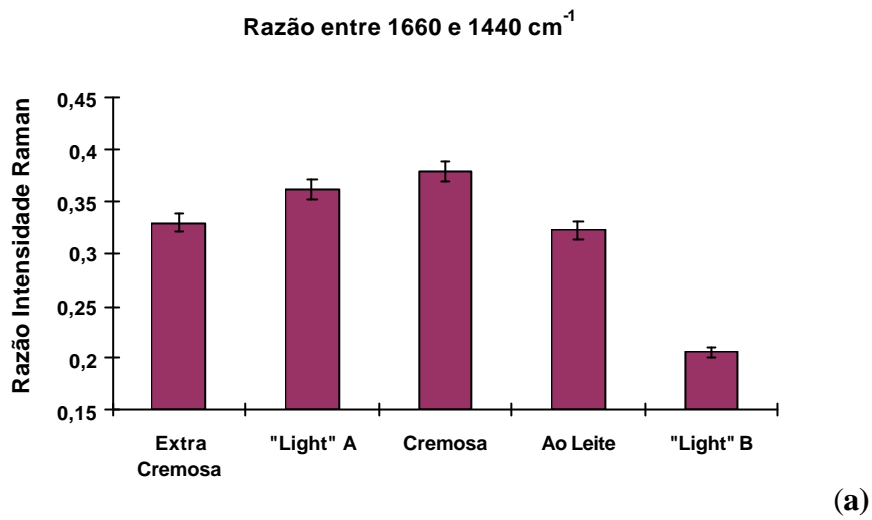
A Figura 14 apresenta o espectro Raman de diferentes tipos de margarinas analisadas neste trabalho. Os espectros contêm bandas Raman nas mesmas regiões espectrais dos óleos vegetais.



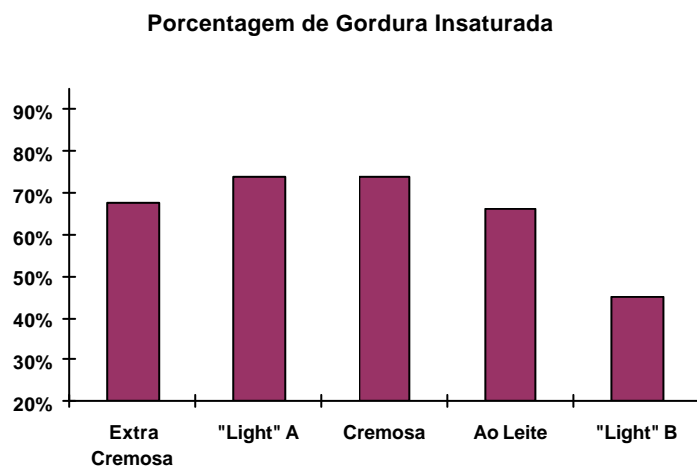
**Figura 14** - Espectro Raman de amostras de margarinas vegetais dos tipos: Extra Cremosa, "Light" A, Ao Leite, "Light" B e Cremosa.

A partir da análise espectral das margarinas analisadas, verifica-se que a composição básica das margarinas é de óleos vegetais de soja, com maior concentração de gordura saturada, devido ao fato de que a banda em 1300  $\text{cm}^{-1}$  ser mais intensa que a banda em 1260  $\text{cm}^{-1}$  (comprovado pela Tabela Nutricional).

Os valores das razões entre as intensidades das bandas em 1660 e 1440  $\text{cm}^{-1}$  e entre as intensidades das bandas em 1260 e 1300  $\text{cm}^{-1}$  para os cinco tipos de margarinas estudados são apresentados na Figura 15, e na Figura 16 são apresentados os valores das porcentagens de gordura insaturada presente nas margarinas analisadas, de acordo com a Tabela Nutricional.

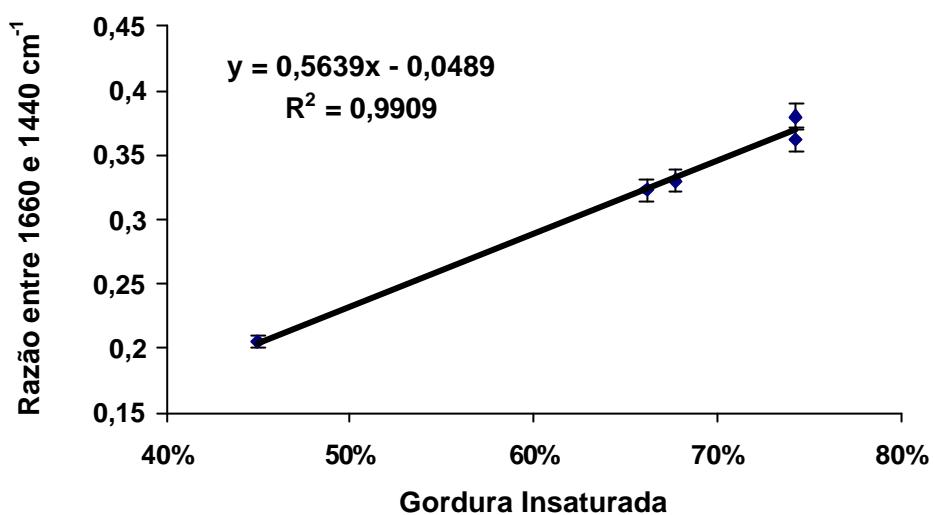


**Figura 15** - Razão entre as intensidades das bandas em: (a)  $1660 \text{ cm}^{-1}$  e  $1440 \text{ cm}^{-1}$  e (b)  $1260$  e  $1300 \text{ cm}^{-1}$ , para as amostras de margarinas utilizadas no experimento.

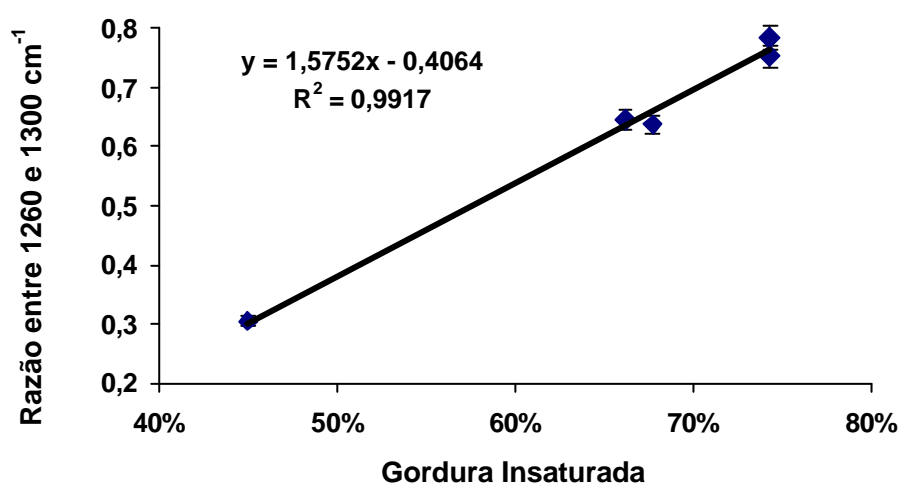


**Figura 16** - Porcentagem de Gordura Insaturada segundo a Tabela Nutricional das amostras de margarinas analisadas.

Nas figuras 17 e 18 são mostrados o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e a equação que representa a quantificação do Índice de Gordura Insaturada através do valor da Razão entre as Intensidades Raman das amostras de margarina analisadas.



**Figura 17** - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre 1660 cm<sup>-1</sup> e 1440 cm<sup>-1</sup> e o Índice de Gordura Insaturada informado na Tabela Nutricional.

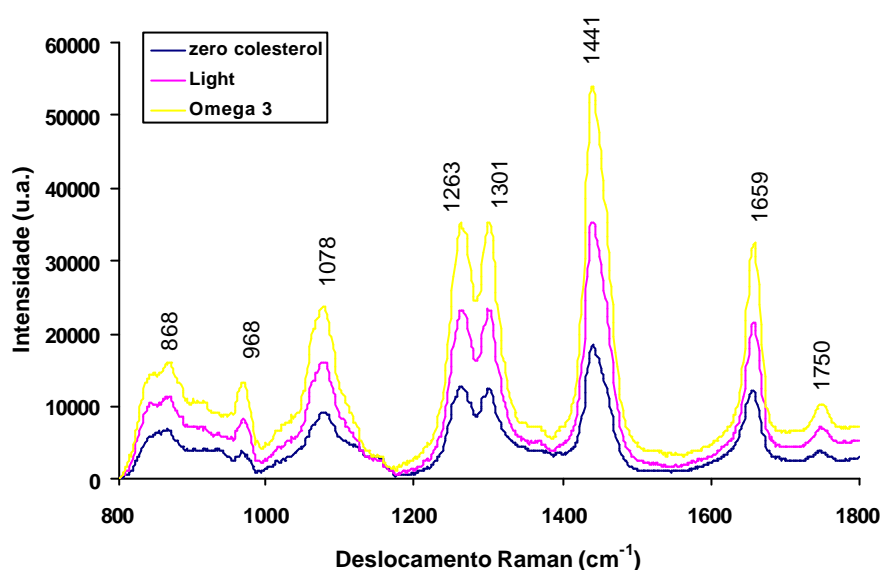


**Figura 18** - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre 1260 cm<sup>-1</sup> e 1300 cm<sup>-1</sup> e o Índice de Gordura Insaturada informado na Tabela Nutricional.

Na análise dos resultados apresentados nas Figuras 17 e 18, verificou-se que os valores de gordura insaturada correlacionam-se com os valores das razões entre as bandas indicadas.

### 4.2.3 Maionese

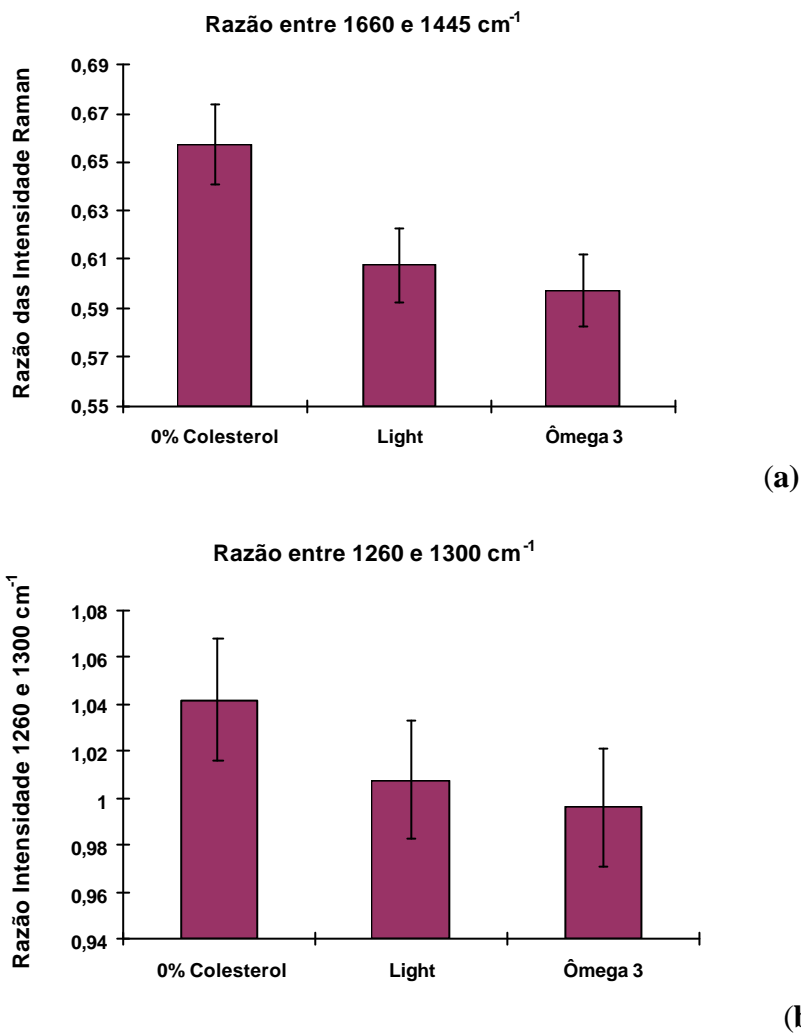
A Figura 19 apresenta o espectro Raman dos 3 diferentes tipos de maionese analisados. Os espectros contêm bandas Raman nas mesmas regiões espectrais dos óleos vegetais.



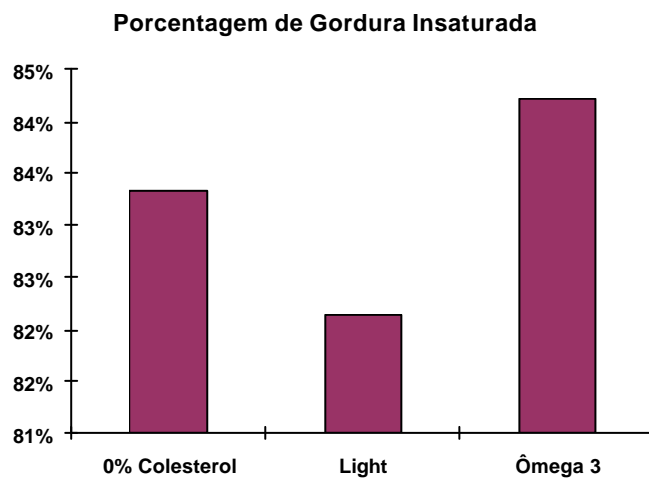
**Figura 19** - Espectro Raman de amostras de maionese “0% Colesterol”, “Light” e “Ômega 3”.

Na análise espectral dos tipos de maionese analisados verifica-se que a composição básica das margarinas é de óleos vegetais de soja com maior concentração de gordura saturada, devido ao fato de que a banda em  $1300\text{ cm}^{-1}$  ser mais intensa que a banda em  $1260\text{ cm}^{-1}$  (comprovado pela Tabela Nutricional).

Os valores das razões das bandas em  $1660$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  e das bandas em  $1260$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  para as maioneses analisadas são apresentados nas Figuras 20, e na Figura 21 é apresentado os valores das porcentagens de gordura insaturada presente nas maioneses analisadas, de acordo com a Tabela Nutricional.



**Figura 20** – (a) Razão entre as intensidades das bandas em: (a)  $1660 \text{ cm}^{-1}$  e  $1440 \text{ cm}^{-1}$  e (b)  $1260 \text{ cm}^{-1}$  e  $1300 \text{ cm}^{-1}$ , para as amostras de maioneses utilizadas no experimento.

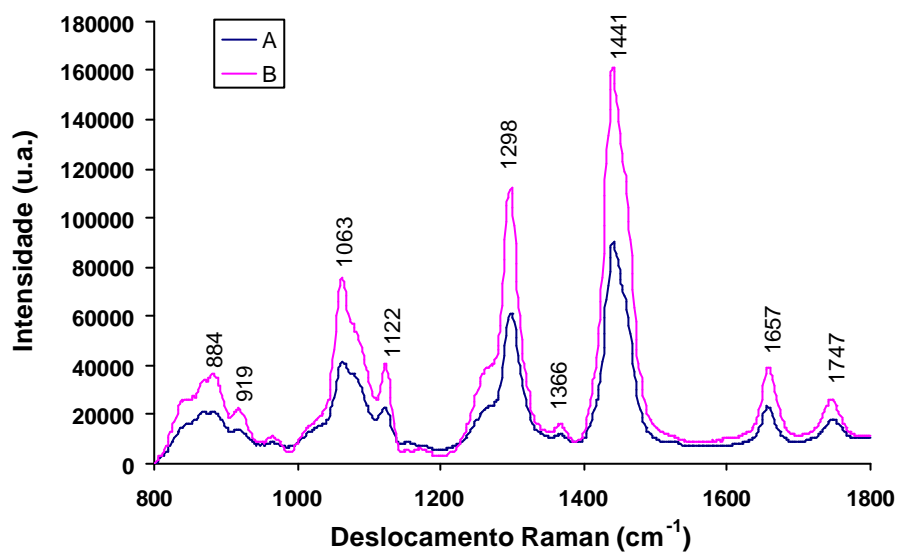


**Figura 21** - Porcentagem de Gordura Insaturada informada na Tabela Nutricional das amostras de maioneses analisadas.

Observou-se que não houve correlação entre os valores da razão Raman e Tabela Nutricional para a maionese “Ômega 3”, com a concentração calculada pela razão Raman indicando uma menor proporção de gordura insaturada quando comparado com os outros tipos de maionese. Por conta disso o valor do grau de correlação ( $R^2$ ) não foi calculado. O resultado mostrado pelas Figuras 20 e 21 não informa que a concentração de gordura é menor, e sim que a proporção entre saturada e insaturada está abaixo do informado pela Tabela Nutricional.

#### 4.2.4 Manteiga

A Figura 22 apresenta o espectro Raman de duas amostras de manteiga oriundas de gordura de leite bovino.

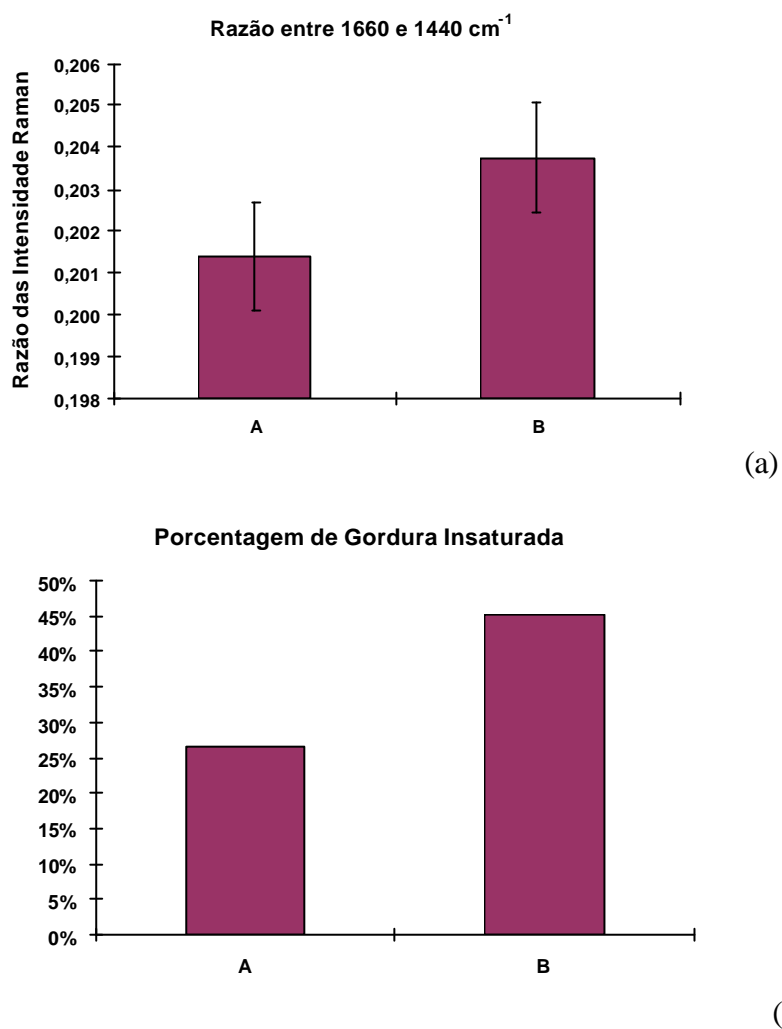


**Figura 22** - Espectro Raman de amostras de manteiga de gordura de leite bovino.

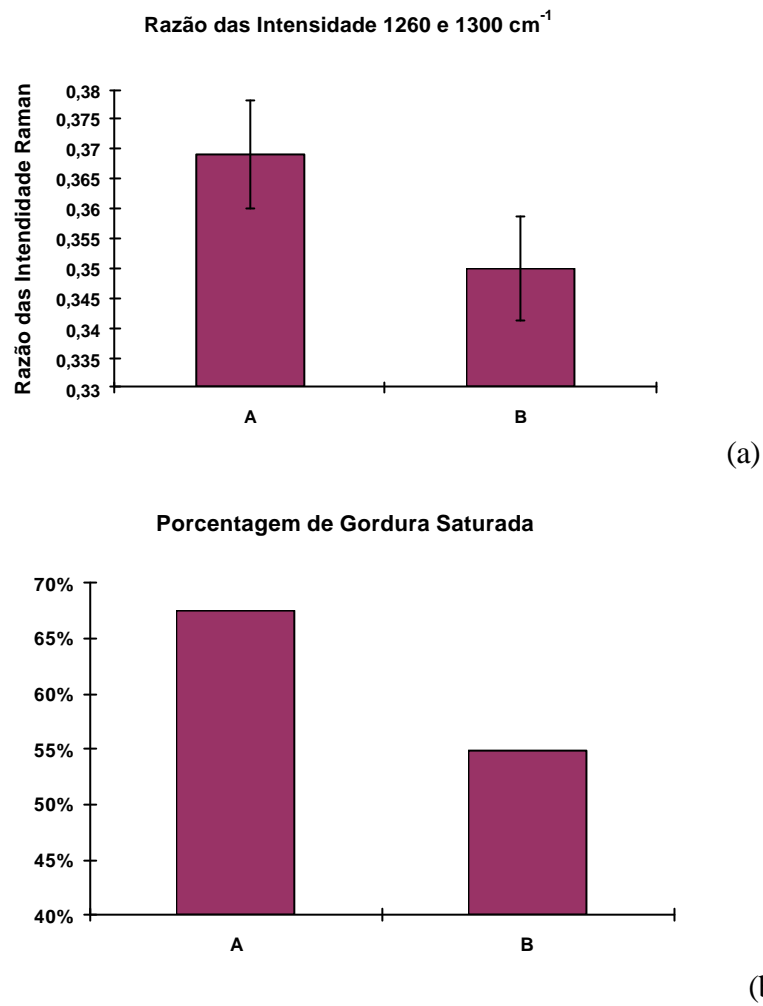
O espectro de manteiga apresenta bandas na região de  $1660\text{ cm}^{-1}$ , com intensidades menores que as encontradas nas margarinas, um indicativo de quantidade maior de gordura saturada. Apresenta também uma diminuição da intensidade da banda em  $1260\text{ cm}^{-1}$ , o que é indicativo de diminuição da quantidade de gordura insaturada. O espectro também apresenta bandas em  $1122$  e  $1063\text{ cm}^{-1}$  (vibração C-C) mais pronunciadas que nos óleos e margarinas.

Nas Figuras 23 e 24 são apresentados: os valores das razões das bandas em  $1660$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  e das bandas em  $1260$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, para as marcas de manteiga

analisadas; e os valores da porcentagem de gordura Insaturada e Saturada em relação à gordura total informada pela Tabela Nutricional.



**Figura 23** – (a) Razão entre as intensidades das bandas em  $1660 \text{ cm}^{-1}$  e  $1440 \text{ cm}^{-1}$ , (b) Índice de Gordura Insaturada para as amostras de manteigas analisadas.



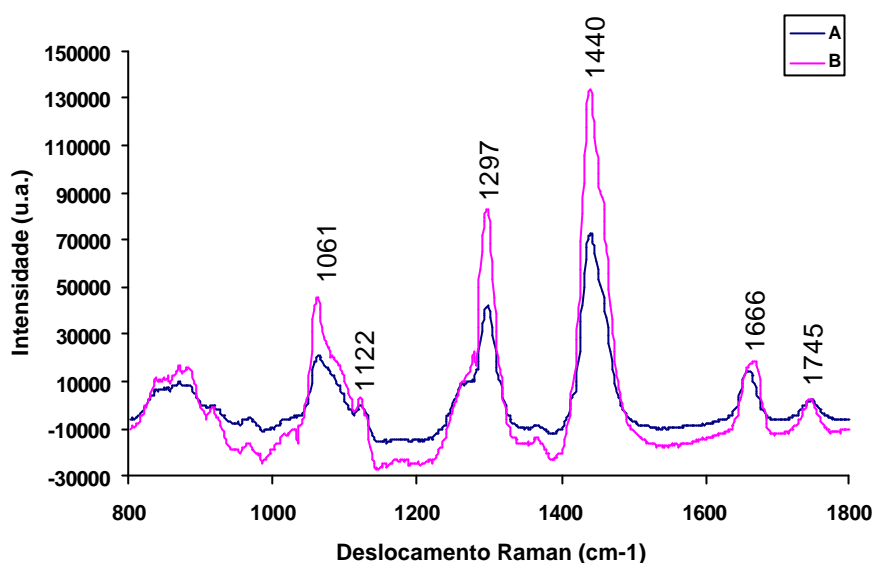
**Figura 24** – (a) Razão entre as intensidades das bandas em  $1260 \text{ cm}^{-1}$  e  $1300 \text{ cm}^{-1}$ , b) Índice de Gordura Saturada; para as amostras de manteigas analisadas.

Observou-se que ambas as razões entre as intensidades Raman correlacionam-se com o valor constante na Tabela Nutricional.

#### 4.2.5 Gordura vegetal hidrogenada.

A Figura 25 apresenta o espectro Raman de duas marcas diferentes de gordura vegetal hidrogenada.

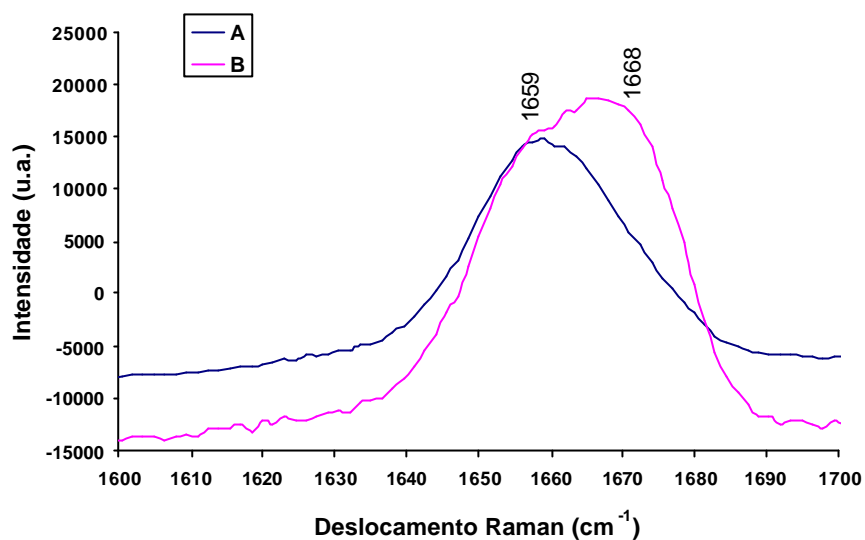




**Figura 25** - Espectro Raman de amostras de gordura vegetal hidrogenada das marcas A e B.

Pela análise da Figura 25, observou-se que os espectros de gordura vegetal apresentam diferenças em intensidade. Pela Tabela Nutricional, a gordura vegetal da marca B apresenta maior teor de gordura *trans* e gordura saturada quando comparada com a gordura vegetal da marca A. Também é observado que os espectros das gorduras vegetais são muito semelhantes aos espectros de manteiga, principalmente nas bandas em 1162 e 1203  $\text{cm}^{-1}$ , e a diminuição da intensidade da banda em 1260  $\text{cm}^{-1}$ , o que indica uma grande proporção de gorduras saturadas.

A posição da banda em 1660  $\text{cm}^{-1}$  pode ser utilizada para quantificar a relação entre o isômero *cis* e o *trans* da gordura vegetal. Para o isômero *cis*, a banda Raman C=C aparece para valores mais baixos em 1656  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que para o isômero *trans*, esta banda aparece em 1670  $\text{cm}^{-1}$  (CHMIELARZ *et al.*, 1995). Pela análise da Figura 26 verificou-se na amostra B que a banda em 1656  $\text{cm}^{-1}$  está deslocada para um valor maior, em 1666  $\text{cm}^{-1}$ , evidenciando a presença de gordura *trans* em sua composição.

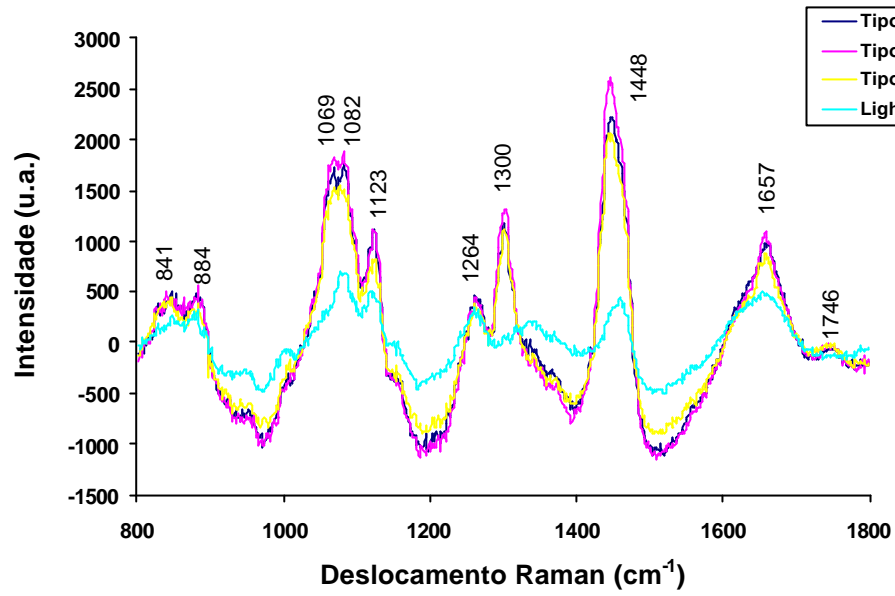


**Figura 26** - Posição da banda em  $1660 \text{ cm}^{-1}$  para as gorduras vegetais analisadas.

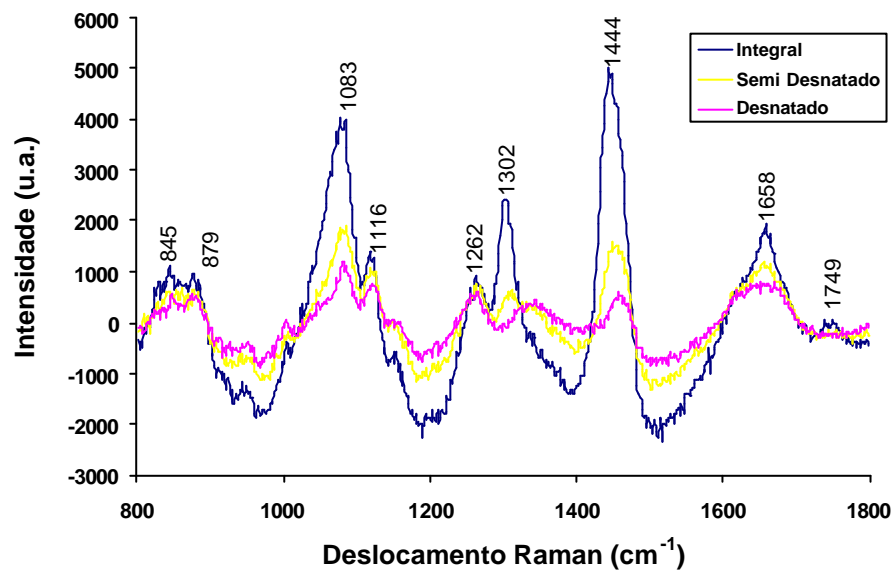
Não foi possível realizar a correlação das Razões das Intensidades Raman com o Índice de Gordura nas amostras de gordura vegetal devido à quantidade de amostras analisadas.

#### 4.2.6 Leite

A Figura 27 apresenta os espectros dos quatro tipos de leites: Tipo A, Tipo B, Tipo C e “Light”, e a Figura 28 os espectros de leite longa vida: Integral, Semi-Desnatado e Desnatado estudados neste trabalho. O espectro do leite apresenta bandas características de gordura e proteínas.



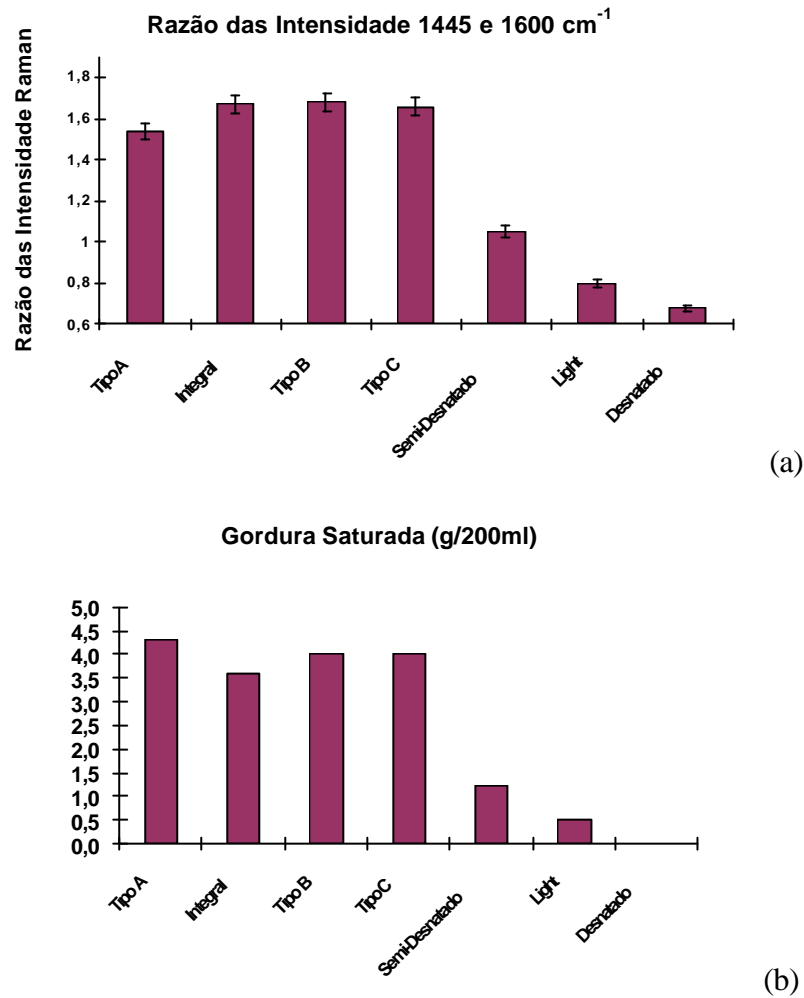
**Figura 27** - Espectros Raman de amostras de leites pasteurizados: Tipo A, Tipo B, Tipo C e “Light”.



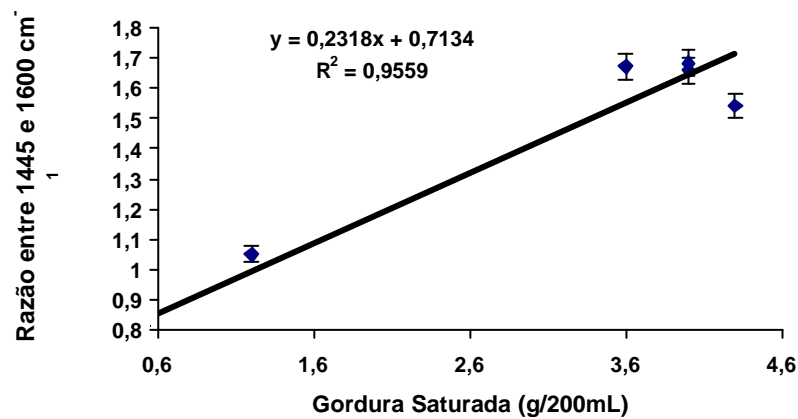
**Figura 28** - Espectros Raman de amostras de leites longa vida: Integral, Semi-Desnatado e Desnatado.

Na análise dos espectros do leite, pode-se observar a presença de bandas de gordura semelhantes às da manteiga, e também bandas mais largas na região de  $1660\text{ cm}^{-1}$ , entre  $1200$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  e também entre  $1000$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Este alargamento das bandas está relacionado à presença de proteínas do leite. A quantidade de proteína não é informada em nenhum dos rótulos dos produtos. Pela Tabela Nutricional, o leite longa vida Desnatado apresenta quantidade “zero” de gordura. Portanto, o espectro do leite Desnatado apresenta informações espectrais de proteínas do leite.

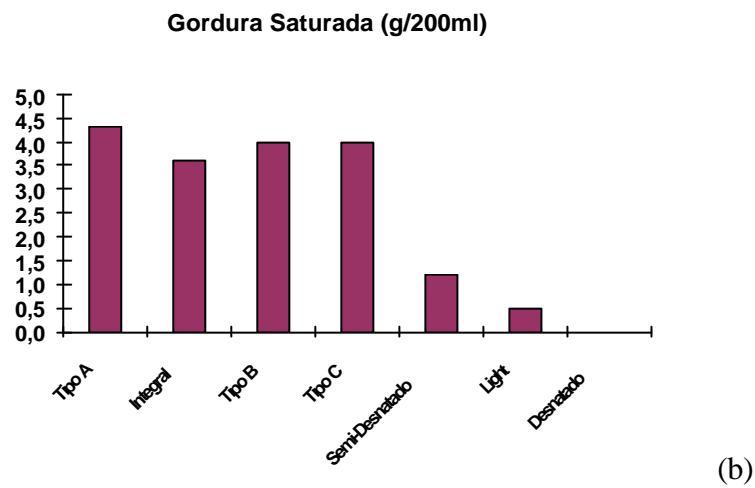
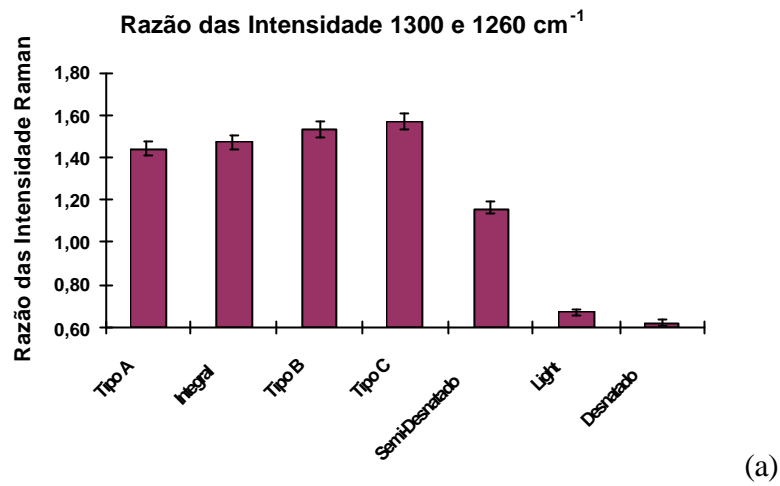
Os valores das razões entre as intensidades, agora das bandas em  $1445$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$  e entre as intensidades das bandas em  $1300$  e  $1260\text{ cm}^{-1}$  e a quantidade total de Gordura Saturada para os sete tipos de leite analisados são apresentados nas Figuras 29 e 31, respectivamente. Neste caso, foi alterada a metodologia de análise, ou seja, inverso da razão dos picos e da gordura saturada, em função da quantidade de proteína ser desconhecida para cada amostra, e sua influência não poder ser determinada. Nas figuras 30 e 32 são mostrados os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) e a equação que representa a quantificação do Valor de Gordura Saturada através do valor da Razão entre as Intensidades Raman das amostras de leites analisadas.



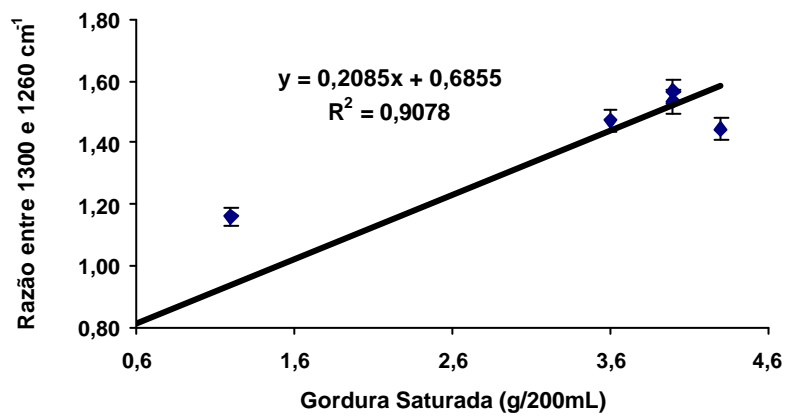
**Figura 29** – (a) Razão entre as intensidades das bandas em 1445 cm<sup>-1</sup> e 1660 cm<sup>-1</sup> para as sete amostras de leite analisadas no experimento, (b) valor total de Gordura Saturada informada pela Tabela Nutricional.



**Figura 30** - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre 1440cm<sup>-1</sup> e 1600 cm<sup>-1</sup> e o Índice de Gordura Saturada encontrado na Tabela Nutricional.



**Figura 31** – (a) Razão entre as intensidades das bandas em  $1300 \text{ cm}^{-1}$  e  $1260 \text{ cm}^{-1}$  para as sete amostras de leite analisadas no experimento, (b) valor total de Gordura Saturada informada pela Tabela Nutricional.



**Figura 32** - Correlação entre a Razão da Intensidade Raman entre  $1300 \text{ cm}^{-1}$  e  $1260 \text{ cm}^{-1}$  e o Índice de Gordura Saturada encontrado na Tabela Nutricional.

Pode-se observar que a quantidade de gordura saturada presente na Tabela Nutricional apresentou uma boa correlação com a razão entre as bandas em  $1440\text{ cm}^{-1}$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo ser possível quantificar a gordura saturada do leite utilizando estas bandas Raman.

## 5 DISCUSSÃO

No trabalho desenvolvido, inicialmente verificou-se que a informação fornecida pela Tabela Nutricional, embora obrigatória, não é atendida por todos os fabricantes. Informações não existentes, como a quantidade de colesterol (para o caso das maioneses) e a quantidade de proteínas e carboidratos (para o caso dos leites), implica em desacordo com a legislação da ANVISA, que obriga tais informações nos rótulos dos produtos.

Durante o processamento dos resultados, foi constatado que uma amostra de margarina, a “Ao leite”, possuía um valor de gordura insaturada indicado na Tabela Nutricional abaixo do valor encontrado pelas razões de 1660 por 1440  $\text{cm}^{-1}$ , e 1260 por 1300  $\text{cm}^{-1}$ . Semanas seguintes, no site dos fabricantes, foi constatado que o valor de Gordura Insaturada da amostra “Ao Leite” estava com valor diferente do valor encontrado na Tabela Nutricional no rótulo da amostra analisada. Por esta razão, este novo valor de gordura insaturada foi adotado para a análise dos resultados do índice de Gordura Insaturada.

Esta diferença nos valores entre o rótulo do produto e o *website* do fabricante deve-se ao fato de que a Tabela Nutricional apresenta valores médios, ou a metodologia utilizada pela empresa para quantificação do teor de gordura insaturada não foi realizada de maneira correta ou não era a mais indicada. Além disso, os rótulos dos produtos são fabricados em grande quantidade, com valores da Tabela Nutricional referente a uma amostra e a um lote “X”, com o tempo, o produto final sobre variações decorrentes das características da matéria-prima, estocagem, processamento, porém as empresa devem ficar atentas a este problema.

A amostra de maionese “Ômega 3” não teve correlação com ambas as razões, ficando com a concentração de gordura insaturada fornecida pelo sinal Raman, menor do que a referenciada pelo rótulo e igual à da maionese “Light”. Uma das possíveis razões é a quantidade não informada de outros elementos, conhecidos como “aditivos” que são adicionados à maionese para dar-lhe consistência. Principalmente as maioneses com baixos teores de gordura, onde os espessantes (goma xantana principalmente) desempenham papel fundamental na substituição das gorduras. É importante em um trabalho futuro a análise espectral destes elementos isoladamente a fim de verificar a sua contribuição para o espectro.

A espectroscopia de leite, não estava no escopo do trabalho, porem, devido aos casos de adulteração de leite relatados pela mídia, resolvemos realizar a espectroscopia também em leites. Estas amostras obtiveram uma boa correlação da razão Raman com a quantidade de saturação da gordura. Uma questão também importante é avaliar qual a influência da proteína



do leite no espectro Raman do leite, a fim de melhorar esta correlação e propor a utilização da técnica como parâmetro de qualidade do leite, quantificando a gordura e proteína simultaneamente pela utilização de técnicas estatísticas multivariadas, nas quais a quantidade de cada componente pode ser avaliada independentemente.

O trabalho não utilizou uma técnica padrão, como a cromatografia gasosa, para medida da quantidade de gordura das amostras. As referências obtidas que tratam do uso da espectroscopia Raman como parâmetro de quantificação apresentam níveis de correlação das bandas Raman com as quantidades de gordura bastante alto (tipicamente maiores que 0,90), o que demonstra a possibilidade de quantificação com baixos níveis de erros.

As bandas em 1660, 1450, 1260 e 1300  $\text{cm}^{-1}$  vem sendo descritas na literatura como altamente correlacionadas com os níveis de saturação ou insaturação das amostras de óleos e gorduras. As razões entre 1660 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  e entre as bandas em 1260 e 1300  $\text{cm}^{-1}$  podem ser usadas para relacionar o nível de insaturação da amostra (BAETEN *et al.*, 1998; SADEGHI-JORABCHI *et al.*, 1990) e a posição da banda em 1660  $\text{cm}^{-1}$  pode ser utilizada para avaliar a quantidade de gordura trans (CHMIELARZ *et al.*, 1995).

Os resultados demonstraram, em linhas gerais, que a quantidade de gordura insaturada das amostras analisadas, calculada pela razão entre as bandas Raman, correlaciona-se com a informação contida na Tabela Nutricional, principalmente a razão entre 1660 e 1440  $\text{cm}^{-1}$ . Como a coleta de dados foi realizada apenas com duas marcas, é necessário coleta de diferentes marcas a fim de verificar qual das bandas é a que melhor correlaciona.

Neste trabalho, a técnica Raman foi utilizada para a correlação e quantificação relativa dos níveis de insaturação das amostras de alimentos que contém ácidos graxos, visando apresentar as bases para um possível uso no controle de qualidade. A técnica apresenta como vantagem a possibilidade de análise em tempo real, sem a necessidade de preparação da amostra. Pela utilização de cabos de fibras ópticas, a avaliação do produto pode ser exercida *in line* e *at line*, com resposta rápida às demandas das áreas de qualidade e mesmo de fiscalização.

A banda em 1657  $\text{cm}^{-1}$ , mostrou-se ser uma ótima ferramenta para identificação da presença do isômero *trans* (CHMIELARZ *et al.*, 1995), porem esta não foi quantificada.

## 6 CONCLUSÕES

A utilização da Espectroscopia Raman Dispersiva (ERD) com excitação em 830nm na caracterização e diferenciação espectral de diferentes tipos de gorduras alimentícias comerciais, permitiu concluir que é possível a quantificação relativa da composição de gorduras insaturadas em óleos vegetais, margarinas, maioneses, gorduras vegetais e leite, comparando as informações espectrais com as informações disponíveis na Tabela Nutricional destes alimentos, uma vez que:

- Os espectros Raman dos diferentes tipos de gorduras apresentam bandas características de sua composição, e podem ser utilizados como elementos de identificação e classificação.

- As razões entre as bandas em  $1660$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1300$  e  $1260\text{ cm}^{-1}$  apresentaram correlação com os níveis de gorduras insaturadas, e podem ser utilizadas para a determinação do nível de insaturação das amostras.

- A banda em  $1660\text{ cm}^{-1}$  pode ser utilizada para determinar o nível de isômero *trans* das gorduras vegetais hidrogenadas.

## TRABALHOS FUTUROS

Devido aos bons resultados conseguidos neste trabalho na utilização da ERD para caracterização e quantificação de produtos industriais comercializados, sugiro então como estudos futuros:

- ✓ Contatar empresas que produzem os tipos de alimento estudados neste trabalho a fim de conhecer o valor real do teor de gordura destes alimentos, já que os valores contidos na Tabela Nutricional são apenas uma referencia, podendo assim traçar uma nova correlação entre valores reais de gordura e a espectroscopia Raman.
  
- ✓ Confrontar a técnica de espectroscopia Raman com a técnica convencional, a cromatografia, para análise de teor de gordura.

## REFERENCIAS

AFSETH, N. K.; WOLD, J . P.; SEGTNAN, V. H. The Potencial Spectroscopy for characterisation of the acid unsaturation of salmon. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 85 – 92, 2006.

ALCÂNTARA, P. JR. **Espectroscopia Molecular**. Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, 2002.[ Apostila (Curso Física Moderna II)].

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. **Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação às indústrias de Alimentos - 2º Versão**, Brasília:Universidade de Brasília –: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária ,2005, 44p.

BAETEN, V.; HOURANT, P.; MORALES, M. T.; APARICIO, R. Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy. **Jorunal of Agricultural and. Food Chemistry**, v. 46, p. 2638-2646, 1998.

BAETEN, V.; MEURENS, M.; MORALES, M. T.; APARICIO, R. Detection of virgin olive Oil by Fourries Transform Raman Spectroscopy. **Jorunal of Agricultural and. Food Chemistry**, v. 44, p. 2225-2230, 1996.

BEERS, M.H.; BERKON, R. **Manual Merck** – Diagnostico de tratamento. 17 Ed. São Paulo: Roca, 2001.

BITTENCOURT JR, P. I. H.; SENNA, S. M., Ácidos Graxos e a Aterosclerose. In.: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura** – Os ácidos graxos. Barueri/SP: Ed. Manole, 2002, p. 537 –540.

BUSCHMAN, H.P.; MOTZ, J.T.; DEINUM, G.; RÖMER, T.J.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, JR.; VAN DER LAARSE, A.; BRUSHKE, A.V.; FELD, M.S. Diagnostic of human coronary Atherosclerosis by morphology-based Raman spectroscopy. **Cardiovascular Pathology**. v. 10, p. 59-68, 2001.

CHMIELARZ, B.; BAJDOR, K.; LABUDZINSKA, A.; KLUKOWSKA-MAJEWSKA, Z. Studies on the double bond positional isomerization process in linseed oil by UV, IR and Raman Spectroscopy. **Journal Mol. Struct.**, v. 348, p. 313-316, 1995.

FAOLÁIN, E.Ó.; HUNTER, M.B.; BYRNE, J.M.; KELEHAN, P.; MCNAMARA, BYRNE, M. H.J.; LYNG, F.M. A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. v. 38, p.121–127, 2005.

FRIAS, A. C. D **Utilização de Ácidos Graxos da família Omega 3 na Prevenção de Doenças Cardiovasculares**: Revisão da Literatura. Bauru/SP: Universidade do Sagrado Coração, 1995. v. 19.

GORDURA, In: Wikipédia - A Enciclopédia Livre. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Gordura>>. Acesso em: 09 set 2007.

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V.S.; CURI, R. Estrutura química e Classificação dos ácidos Graxos. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura** – Os ácidos graxos. Barueri/SP: Ed. Manole, 2002. p. 5 –24.

GUIMARÃES, A. E. **Utilização de Espectroscopia Raman no infravermelho próximo (NIRS) para detecção e quantificação de efedrina em urina**. 2004. Mestrado (Mestrado em Engenharia Biomédica) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Fisiologia e Mecanismo das Doenças**. 6<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Granabara Koogan, 1998.p. 505-506.

HUANG, Z.; McWILLIAMS, A.; LAM, S.; ENGLISH, J.; McLEAN, D. I.; LUI, H.; SENG, H. Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues. **International Journal of Oncology**. v. 23, p. 649-655, 2003.

KRISHNA, C.M.; PRATHIMA, N.B.; MALINI, R.; VADHIRAJA, B.M.; BHATT, R.A.; FERNANDES, D.J.; KUSHTAGI, P.; VIDYASAGAR, M.S.; KARTHA, V.B. Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix. **Vibrational Spectroscopy**. v. 41, p. 136–141, 2006.

LI-CHAN, E.C.Y. The Application of Raman Spectroscopy in Food Science. **Trends Food Sci. Technol**. v.7, p.361, 1996.

LIMA, D. M.; COLUGNATI, F. A. B.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUES-AMAYA, D. B.; GALEAZZI, M. A. M. **Tabela brasileira de composição de alimentos** – TACO. 2.ed. Campinas, SP, : Ed., Unicamp, 2006.

MANOHARAN, R.; WANG, Y.; FELD, M. S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part**, v. 52, p. 215-249, 1995.

MEURENS, M.; BAETEN, V.; YAN, S H.; MIGNOLET, E.; LARONDELLE, Y. Determination of the Conjugated Linoleic Acids in Cow's Milk fat by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 2005.

MICHELE, J. **Molecular Spectroscopy**. New Jersey: Oebtuce Gakk, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, DATASUS – Departamento de Informação e Informática do SUS. Disponível em: <[www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)>. Acesso em: 12 jun. 2006.

MOTZ, J.T. **Development of In Vivo Spectroscopy of Atherosclerosis**. 2003. Doctorate (Doctor of Philosophy in Medical Physics)- MIT -Massachusetts Institute of Technology,. Cambridge, Ma .2003.

NOGUEIRA, G.V. **Diferenciação dos Tipos de Placas de Ateroscleróticas em Carótida Humana Utilizando a Técnica de Espectroscopia FT-Raman**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

OLSEN, E. F.; RUKKE, E.O.; FLATTEN, A.; ISAKSSON, T. Quantitative Determination of Saturated-, Monounsaturated- and Polyunsaturated Fatty Acids in Pork Adipose Tissue with Non-Destructive Raman Spectroscopy. **Meat Science**, v. 76, p. 628-634, 2007.

OZAKI, Y.; CHO, R.; IKEGAYA, K.; MURAISHI, S.; KAWAUCHI, K. Potential of Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy in Food Analysis. **Applied Spectroscopy**, v. 46, p.1503, 1992.

PADILLA, I. Derrame, Por dentro da doença que mais mata no Brasil. **Revista Época**, São Paulo, n. 414, p. 100-109, abril de 2006.

POMPÉIA, C. Essencialidade dos Ácidos Graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura** – Os ácidos graxos. Barueri/SP: Ed. Manole, 2002. p. 25 –32.

ROMER, T. J.; BRENNAN, J. F.; FITZMAURICE, M.; FELDSTEIN, M. L.; DEINUM, G.; MYLES, J. L.; KRAMER, J. R.; LEES, R. S.; FELD, M. S. Histopathology of Human Coronary Atherosclerosis by Quantifying Its Chemical Composition With Raman Spectroscopy. *Journal of the American Heart Association*. **Circulation**. v 97; p. 878-885, 1998

SACKHEIM, G. I.; LEHMAN, D. D.; **Química e bioquímica para Ciências Biomédicas**, 8<sup>ed</sup>. São Paulo, editora Manole, 2001. p. 357-378.

SADEGHI-JORABCHI, H.; HENDRA, P. J.; WILSON, R. H.; BELTON, P. S. Determination of the Total Unsaturation in Oils and Margarines by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **J. Am. Oil Chem Soc.**, v. 67, p. 483-486, 1990.

SADEGHI-JORABCHI, H.; WILSON, R. H.; BELTON, P. S.; EDWARDSWEBB, J. D.; COXON, D.T. Quantitative Analysis of Oils and fats by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Spectrochimistry Acta**, v. 47A, p. 1449-1458, 1991.

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

SILVEIRA JR, L.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; SATHAIAH, S.; CHAVANTES, M. C.; PASQUALUCCI, C. A. Near-Infrared Raman Spectroscopy for in vitro Human Coronary Artery Tissue Identification. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE INGENIERÍA BIOMÉDICA, 2., Havana, Cuba, 2001. **Anais....**Havana: [s.ed.], 2001.

SILVEIRA JR., L. **Correlação entre a técnica de Espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artéria coronária humana**. 2001. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVEIRA JR., L.; SATHAIAH, S.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; CHAVANTES, M. C.; PASQUALUCCI, C. A. A. G. Correlation Between Near-Infrared Raman Spectroscopy and the Histopathological Analysis of Atherosclerosis In Human Coronary Arteries. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.30, n.4, p.290-297, 2002.

VINHA JR., R. **Espectroscopia Raman na determinação quantitativa de Paracetamol. Dissertação**, 2002. (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2002.

ZAIA, D. A. M. Os Lipídios e a Origem da vida. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura** – Os ácidos graxos. Barueri/SP: Ed. Manole, 2002.p. 33 – 41.