

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Potencial de utilização de análises de imagens e análises térmicas na
cristalização de açúcares em leite condensado

- Tese de Doutorado -

Andrea Bordin Schumacher

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Potencial de utilização de análises de imagens e análises térmicas na
cristalização de açúcares em leite condensado

Andrea Bordin Schumacher

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial
a fim de obter título de Doutor em Engenharia.

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e
Operações unitárias

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Lígia Damasceno Ferreira Marczak

Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado *Potencial de utilização de análises de imagens e análises térmicas na cristalização de açúcares em leite condensado* elaborado por Andrea Bordin Schumacher, como requisito parcial para continuidade dos trabalhos a fim de obter título de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. ^a Dr. ^a Monise Helen Masuchi

Prof. ^a Dr. ^a Giandra Volpato

Prof. ^a Dr. ^a Rosane Rech

Agradecimentos

Eu dedico este doutorado ao meu orientador Nilo. Obrigada por ser um professor dedicado, persistente e competente. Eu agradeço a oportunidade de ter aprendido ao seu lado até o último minuto desta longa caminhada.

À minha orientadora Lígia eu agradeço o convite para fazer o doutorado no PPGEQ quando ela fez parte da banca avaliadora do meu mestrado. Nunca imaginaríamos naquele momento quantas situações importantes aconteceriam a partir deste convite. Agradeço as soluções apontadas e as correções nas horas de desespero.

Aos professores do DEQUI que sempre me apoiaram quer seja com ensinamentos ou com as conversas e sorrisos mais encorajadores que eu já recebi. Muito obrigada aos professores Aline, Débora, Paula, Liliana, Nilson, Isabel, Farenzena e Oscar.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e do Laboratório de Separação por Membranas (LASEM).

Ao colega e professor Alexandre H. Englert por todo auxílio na primeira etapa do trabalho.

À equipe do LAMAT Júlio, Camila, Rafael e Alberto por terem sido o meu grupo de trabalho na etapa final deste doutorado. Minhas idas ao Campus do Vale sempre resultaram em muito aprendizado e orgulho de poder aprender com vocês um pouco de análises térmicas. Especialmente ao Júlio César P. Vagheti minha gratidão por tanto envolvimento com este trabalho.

Às minhas bolsistas Rossana e Jordana que trabalharam em assuntos diferentes e em tão pouco tempo realizamos juntas tarefas tão importantes.

À minha filha Cléo que significa tudo de mais valioso na minha vida, pelo amor e pelo reconhecimento. Espero que esta nossa conquista seja sempre motivo de muito orgulho para ela.

Aos meus fiéis amigos que tornaram esta caminhada mais suave e segura.

À minha família, que mesmo sendo uma divertida bagunça, me deu todas as ferramentas para que eu pudesse chegar até aqui, e confesso, foi uma bela luta!

Resumo

O leite condensado é um produto amplamente estudado, sendo que os problemas de cristalização ao longo do processo constituem um dos aspectos de interesse quando se considera a produção em escala industrial. No entanto, não foram encontrados estudos que padronizassem técnicas de medida de tamanho de cristais e determinação da cristalinidade total em leite condensado. Este trabalho visa adaptar/desenvolver uma técnica específica para análise de tamanho de cristais de lactose em leite condensado utilizando de microscopia juntamente com processamento e análise de imagem (*software* ImageJ). Além disso, acredita-se que o grau de cristalinidade possa se tornar um parâmetro de controle de qualidade em leites condensados, de modo que se propõe o estudo da viabilidade do uso de calorimetria exploratória diferencial para a determinação deste parâmetro. A técnica de processamento e análise de imagem mostrou-se confiável e permitiu realizar comparativo eficiente entre três marcas comerciais de leite condensado. Foi possível, mediante análise estatística, otimizar a metodologia existente de preparação de lâminas visando reduzir o tempo e esforço da aplicação da técnica de acompanhamento de tamanho de cristais em ambiente industrial. Para o estudo da viabilidade do uso de análises térmicas para a determinação do grau de cristalinidade em leite condensado foram realizados estudos em térmicos simultâneos (DSC-TGA) e estudos de calorimetria exploratória diferencial em DSC e TMDSC em lactose p.a., sacarose p.a., misturas dos dois açúcares e em leite condensado. Na comparação das técnicas, observou-se que as três apresentam mesmo nível de precisão, porém exatidão distintas. A técnica de DSC foi a que permitiu obter maior definição dos picos identificados ao longo do termograma. Por outro lado, na técnica de MDSC, utilizando porta-amostras com furo, foi possível obter boa repetibilidade também com relação aos processos reversíveis e irreversíveis. A análise quantitativa de cristalinidade a partir de dados de calorimetria para misturas de sacarose e lactose é dificultada pela sobreposição dos picos dos diferentes processos térmicos sofridos pelos dois açúcares e pelo fato que foram encontrados indicativos de efeito sinérgico na resposta térmica dos dois carboidratos quando em mistura. Assim como para as misturas de açúcares estudadas, não foi possível determinar o grau de cristalinidade em amostras de leite condensado.

Palavras chave: leite condensado, cristais de lactose, processamento e análise de imagens, arenoisidade, sacarose, DSC.

Abstract

Condensed milk is a widely studied product, given that the crystallization problems throughout the production process constitute one of the aspects of interest as far as the industrial scale production is concerned. However, studies that might enable standardized crystal size measurement techniques and crystallinity determination in condensed milk have not been found yet. This work aims at adapting/developing a specific technique for the analysis of lactose crystals size in condensed milk by using microscopy along with image analysis and processing (ImageJ *software*). Besides, it is believed that degree of crystallinity may become a quality control parameter in condensed milks, in such a way that it is proposed a viability study of the use of differential exploratory calorimetry for its determination. Processing technique and image analysis have demonstrated to be reliable and allowed to carry out efficient comparison between the three commercially available brands of condensed milk. It was possible, by means of statistical analysis, to optimize the existing thin plate preparation methodology with the aim of reducing time and strain of crystal size monitoring in industrial environment. In view of studying thermal analyses aiming at determining degree of crystallinity in condensed milk, studies in simultaneous thermal instruments (DSC-TGA) along with differential exploratory calorimetry in DSC and TMDSC were carried out in analytical grade sucrose and lactose, mixtures of both sugars and condensed milk. When comparing the techniques, one can observe that all three presented the same level of precision, but different accuracies. DSC technique was the one that allowed higher definition of identified peaks along the thermogram. On the other hand, in MDSC technique, using pierced sample holder, it was possible to obtain good repeatability even in regard to reversible and irreversible processes. Crystallinity quantitative analysis from calorimetry data for sucrose and lactose mixtures is hindered by the superposition of peaks from different thermal processes undergone by both sugars and by the fact that indicatives of synergistic effect were found in the thermal response of the above mentioned carbohydrates when mixed together. As it had occurred for the sugar mixtures studied, it was not possible to determine the degree of crystallinity in condensed milk samples.

Key-words: sweetened condensed milk; lactose crystals; image processing and analysis; sandiness; sucrose, DSC.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química dos isômeros da lactose	21
Figura 2 – Fluxograma de produção de leite condensado, adaptado de Tan (2009).....	24
Figura 3 – Demonstração das etapas de processamento e análise de imagem contidas na macro desenvolvida para o processamento/análise das imagens microscópicas de cristais em leite condensado no ImageJ: (a) imagem colorida obtida em microscópio óptico (b) imagem em tons de cinza (32 bit) (c) alteração do contraste (<i>Enhanced Contrast</i>) (d) aplicação do <i>thresholding</i> (e) imagem final com os cristais analisados. ...	39
Figura 4 - Imagem de cristais na amostra de leite condensado (M3) e correspondentes imagens processadas/analizadas com o software <i>ImageJ</i> obtidas com diferentes valores de circularidade mínima (<i>c</i>): (a) imagem obtida em microscópio óptico (b) $c = 0,001$ (c) $c = 0,25$ (d) $c = 0,35$ (e) $c = 0,4$ (f) $c = 0,45$	41
Figura 5 – Fragmentos de imagem (143×157 pixels) de cristais das amostras de leite condensado (M1, M2 e M3), e correspondentes imagens processadas/analizadas variando os valores de circularidade mínima (<i>c</i>).	42
Figura 6 – Variação das médias globais de tamanho médio (xG) e máximo ($xmaxG$) de cristais nas marcas de leite condensado M1, M2 e M3 em função do número de lâminas analisado. Colocar em cada um das figura M1, M2, M3.....	48
Figura 7 – Difrátogramas de raio-X das amostras: (a) lactose p.a.; (b) lactose p.a. recristalizada; (c) SolSL_10 recristalizada; (d) SolSL_5 recristalizada; (e) sacarose p.a. recristalizada; (f) sacarose p.a.....	49
Figura 8 – Termograma obtido em SDT para sacarose p.a.....	51
Figura 9 – Termograma obtido em SDT, DSC e MDSC para sacarose p.a.....	52
Figura 10 – Termogramas em MDSC para as repetições de sacarose p.a.	55
Figura 11 – Comparativo da variação de temperatura entre DSC e MDSC na faixa de temperatura de fusão da sacarose p.a. para uma amostra.	57
Figura 12 – Gráfico obtido em análise em SDT para lactose p.a.....	58
Figura 13 – Termograma obtido em SDT, DSC e MDSC para lactose p.a.	61
Figura 14 – Termogramas em MDSC para as repetições de lactose p.a.....	63
Figura 15 – Termogramas obtidos em DSC com diferentes massas de lactose (3.7 mg e 5.5 mg).....	65

Figura 16 – Termogramas em DSC para as repetições de lactose p.a. em porta-amostra com furo.....	66
Figura 17 – Termogramas em MDSC para as repetições de lactose p.a. em porta-amostras com furo.....	68
Figura 18 – Curva de dados brutos e curva de dados interpolados para mistura de lactose e sacarose.....	70
Figura 19 – Curva de dados brutos e curva de dados interpolados para mistura de lactose e sacarose.....	70
Figura 20– Curva de dados brutos e curva de dados interpolados para mistura de lactose e sacarose.....	71
Figura 21 – Sequência de figuras geradas por programação em MATLAB para obtenção do pico isolado de desidratação das moléculas de lactose. (A) curva de dados interpolados completa com marcação dos limites para linha de corte do pico e (B) pico de desidratação isolado.....	72
Figura 22 – Termogramas experimental e teórico para as misturas: (a) LS_A, (b) LS_B e (c) LS_C.....	73
Figura 23 - Diagrama obtido em SDT para amostra da Marca M3 de leite condensado puro.....	74

Lista de Tabelas

Tabela 1- Composição centesimal típica de leite condensado	20
Tabela 2 – Valores de tamanho de cristais perceptíveis pelo paladar gerando sensação de arenosidade encontrados na literatura.....	23
Tabela 3 – Vantagens e desvantagens dos diferentes momentos de adição de sacarose durante a elaboração de leite condensado.....	26
Tabela 4 – Percentuais de açúcares para cada uma das soluções.....	32
Tabela 5 – Parâmetros obtidos referentes aos cristais avaliados em cada imagem analisada.	35
Tabela 6 – Dados comparativos da análise manual versus análise via processamento/análise de cristais para as diferentes marcas de leite condensado.....	44
Tabela 7 – Resultados de número de cristais (N_L e N_G), tamanhos médio (x_L e x_G) e máximo (x_{maxL} e x_{maxG}) para as diferentes marcas de leite condensado (M1, M2 e M3).....	45
Tabela 8 – Razão entre os picos característicos referentes a lactose e sacarose para amostras padrão e recristalizadas	50
Tabela 9 – Valores de $\Delta H_{fusão}$ para sacarose p.a. em SDT, DSC e MDSC a 10°C/min com gás de arraste nitrogênio ultra puro (SDT: 100 mL/min; DSC e MDSC:50 mL/min) ...	52
Tabela 10– Valores de ΔH para de lactose p.a. em MDSC por repetição e respectiva contribuição por fluxo de calor reversível e irreversível (percentual) para os picos de desidratação, cristalização e fusão.	63

Lista de abreviações, símbolos e siglas

LA	lactose p.a.;
SA	sacarose p.a.;
x_{lac}	fração mássica de lactose;
LS_A	mistura de lactose e sacarose com fração mássica de lactose de 0,09;
LS_B	mistura de lactose e sacarose com fração mássica de lactose de 0,18;
LS_C	mistura de lactose e sacarose com fração mássica de lactose de 0,69;
SolS	solução de sacarose (55 %);
SolL	solução de lactose (5 %);
SolSL_5	solução de sacarose e lactose (55 % SA e 5 % LA);
SolSL_10	solução de sacarose e lactose (55 % SA e 10 % LA);
$\bar{x}_{L,i}$	tamanho médio de cristal na imagem i da lâmina L (μm);
$x_{max_{L,i}}$	tamanho máximo de cristal na imagem i da lâmina L (μm);
$N_{L,i}$	número de cristais identificados na imagem i da lâmina L ;
$A_{L,i,j}$	área de cada cristal j identificado na imagem i da lâmina L (μm^2);
$\bar{A}_{L,i}$	área média de cristal na imagem i da lâmina L (μm^2);
$AT_{L,i}$	área total dos cristais na imagem i da lâmina L (μm^2);
\bar{x}_L	média do tamanho médio de cristal da lâmina L (μm);
$\overline{x_{max}_L}$	média do tamanho máximo de cristal da lâmina L (μm);
\bar{N}_L	média do número de cristais identificados da lâmina L (μm);
\bar{A}_L	média da área de cristal da lâmina L (μm^2);
\overline{AT}_L	média da área total dos cristais da lâmina L (μm^2);
\bar{x}_G	média global do tamanho médio de cristal da lâmina L (μm);
$\overline{x_{max}_G}$	média global do tamanho máximo de cristal da lâmina L (μm);
\bar{N}_G	média global do número de cristais identificados da lâmina L (μm);
\bar{A}_G	média global da área de cristal da lâmina L (μm^2);
\overline{AT}_G	média global da área total dos cristais da lâmina L (μm^2);
c	circularidade;
T_{onset}	temperatura de início do pico nos termogramas ($^{\circ}\text{C}$);
$\Delta H_{fusão}$	entalpia de fusão ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$).

Sumário

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1. Leite condensado.....	19
2.2. Cristalização da lactose	21
2.3. A cristalização da lactose no processo industrial.....	23
2.4. Microscopia e calorimetria exploratória diferencial em estudos de cristalização de açúcares.....	27
2.4.1. Microscopia.....	27
2.4.1.1. Image J.....	29
2.4.2. Calorimetria exploratória diferencial	29
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Amostras	32
3.2. Determinação da umidade dos padrões lactose e sacarose	33
3.3. Análise por Difração de Raio X (DRX).....	33
3.4. Metodologia proposta para obtenção, processamento e análise das imagens.....	33
3.4.1. Processamento/Análise de imagem	34
3.4.1.1. Procedimento de processamento e análise das imagens com o software ImageJ	34
3.4.1.2. Análise de imagens via análise visual/medida manual.....	36
3.4.1.3. Análise do número mínimo de lâminas a ser utilizado.....	36
3.4.1.4. Análise Estatística.....	36
3.4.2. Análises térmicas.....	36
3.4.2.1. Avaliação do comportamento térmico de misturas dos padrões em estado sólido..	37
.....	37
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Processamento/Análise de imagem.....	38
4.1.1 Macro para processamento e análise de imagens	38
4.1.2 Avaliação do valor mínimo de circularidade a ser utilizado	40
4.1.3 Avaliação do desempenho quantitativo do procedimento de processamento e análise de imagens.....	43
4.1.4 Análise completa utilizando o procedimento de processamento e análise de imagens	44
4.1.5 Avaliação do número mínimo de lâminas requerido.....	46
4.2 Análises Térmicas	48
4.2.1 Difração de raio-X.....	49
4.2.2 Análises térmicas para sacarose p.a.....	50
4.2.3 Análises térmicas para lactose p.a.....	58

4.2.4	Caracterização térmica das misturas dos padrões.....	69
4.2.5	Análises térmicas em leite condensado	73
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS		75
5.1	Conclusão.....	75
5.2	Sugestões para trabalhos futuros	77
Apêndice I: macro		78
Apêndice II: artigo aceito.....		79
Apêndice III: artigo submetido		80
REFERÊNCIAS.....		81

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O leite condensado é um alimento amplamente difundido pelo mundo e o seu processo produtivo apresenta algumas etapas relativamente bem definidas como homogeneização, adição de açúcar, concentração, sementeira e refrigeração (TAN, 2009). As características sensoriais do produto final podem variar significativamente em função do nível de controle que se tenha em cada uma destas etapas. Por este motivo, o uso de técnicas adequadas de caracterização é fundamental para atividades relacionadas à otimização do processo industrial de produção e para controle de qualidade do leite condensado.

Vários estudos já foram publicados sobre caracterização de leite condensado em seus diferentes aspectos, incluindo, por exemplo, formação de cristais (HUNZIKER; NISSEN, 1927), quantificação de açúcares (MURPHY, 1960), avaliação de propriedades físicas (FERNÁNDEZ-MARTÍN, 1972), determinação de cor (BIRCH; MWANGELWA, 1974) e acompanhamento de vida de prateleira (PATEL et al., 1996). Desde a época em que estes estudos foram publicados até os dias atuais, não foram encontrados novos estudos de grande relevância sobre a caracterização de leite condensado.

No que se refere à cristalização de açúcares, apesar do leite condensado conter sacarose e lactose, tem-se o tamanho dos cristais de lactose como um parâmetro de controle de qualidade particularmente importante, visto que é um parâmetro afetado significativamente pelas condições de processamento e que tem influência direta na percepção sensorial do produto (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; HOUGH; MARTINEZ; CONTARINI, 1990; KRUK, A., KISZA, J., ZIAJKA, 1974; TAN, 2009). No processamento de produtos lácteos, a formação de grandes cristais de lactose gera um defeito chamado arenosidade, que pode ser detectada pelo paladar (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). Arenosidade está relacionado com a sensação de aspereza na boca causada pela presença destes cristais grandes e pela sua baixa solubilidade em água. De acordo com Hunziker (1946), em uma solução aquosa com 62 % de sacarose (de concentração semelhante à encontrada no leite condensado), a solubilidade da lactose é de 15 g por 100 g de solução. Vários autores estudaram a dependência do grau de arenosidade causado pela lactose com o tamanho médio e /ou o número específico de cristais (isto é, o número de cristais por grama de produto) para alimentos lácteos (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; HOUGH; MARTINEZ;

CONTARINI, 1990; HUNZIKER, 1946; KRUK, A., KISZA, J., ZIAJKA, 1974). Estes estudos indicam que a arenosidade ocorre para valores de tamanho de cristal médio maiores que 10 μm , e que o número mínimo específico de cristais que vão promover efetivamente a arenosidade diminui com o aumento do tamanho médio de cristal.

Além disso, o comportamento de cristalização da lactose em condições de processamento é bastante complexo, porque: (i) a lactose existe em duas formas isoméricas, α - e β -lactose; (ii) estas duas formas alternam suas configurações por mutarrotação; (iii) a força motriz para a cristalização de lactose é a supersaturação no meio aquoso, que ocorre quando o produto é resfriado (ARES; GIMÉNEZ, 2008). No início da produção de leite condensado, quando o leite é concentrado por um processo que inclui a aplicação de calor, a proporção de α -lactose aumenta. Após o resfriamento, α -lactose irá cristalizar na solução supersaturada até que esta deixe de ser supersaturada; isto perturba o equilíbrio entre as duas formas (α e β) e mais β -lactose é transformada em α -lactose. Novamente, ocorre uma supersaturação de α -lactose, que mais uma vez volta a se cristalizar, perturbando, assim, o equilíbrio novamente. Esta sucessão de cristalização e mutarrotação ocorre até que o equilíbrio seja atingido sem a presença de supersaturação de lactose (HUNZIKER, 1946). O resfriamento de uma solução saturada de lactose ligeiramente abaixo do ponto de saturação conduz a uma solução supersaturada metaestável e a lactose não cristaliza imediatamente. Assim, o controle da quantidade e do tamanho dos cristais pode ser um tema complexo, uma vez que o nível de supersaturação e, conseqüentemente, a velocidade de cristalização, podem variar significativamente nas condições típicas de processos industriais (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). Na produção de leite condensado, resfriamento rápido e a adição de lactose em pó são duas ações tomadas para minimizar os problemas de cristalização (TAN, 2009).

Devido à importância da cristalização na qualidade do leite condensado, a disponibilidade de técnicas adequadas para quantificar e medir os cristais de lactose é uma necessidade fundamental para as empresas produtoras deste alimento, tanto do ponto de vista do controle de qualidade como para o desenvolvimento de uma ferramenta para a avaliação de desempenho e otimização de processos.

Uma das técnicas utilizadas para medir o tamanho de cristal em diferentes sistemas é a análise das imagens adquiridas diretamente de microscopia óptica, usando uma câmera digital, ou a partir de fotos que podem ser digitalizados (HIGGINS, 2000). As imagens de cristais pequenos também podem ser obtidas por microscopia eletrônica de varredura

(HIGGINS, 2000) ou por microscopia de força atômica. No entanto, estas técnicas não são parte da realidade dos setores de controle de qualidade industrial.

O uso de microscopia óptica para analisar cristais em alimentos lácteos não é recente; Hunziker e Nissen (1927) já usavam esta metodologia para avaliar a forma dos cristais de sacarose e lactose em várias soluções de alimentos lácteos, incluindo leite condensado. No entanto, a primeira tentativa de sistematizar a utilização desta técnica para contar e medir o tamanho dos cristais em alimentos lácteos surgiu com o trabalho de Hough et al. (1990). Na metodologia proposta por estes autores, para o estudo da cristalização em doce de leite por microscopia óptica, são preparadas 10 lâminas de microscópio com a amostra em estudo e, em cada lâmina, são selecionados aleatoriamente 10 regiões para a medição de número e tamanho de cristais. No entanto, para avaliação da quantidade de cristais as regiões selecionadas aleatoriamente são reduzidas até que 20 cristais possam ser contados. Assim, o valor correspondente à quantidade de cristais presentes na amostra de acordo com esta técnica é estimado.

Giménez et al. (2008) e Giménez e Ares (2008) estudaram o tamanho dos cristais em doce de leite utilizando uma versão modificada do método descrito por Hough et al. (1990). Esta versão modificada baseia-se na análise de 10 lâminas e 10 imagens por lâmina, mas diferencia-se da técnica de Hough et al. (1990) principalmente pela utilização de um software para o processamento e análise de imagem visando obter a medida dos cristais.

Como a composição do leite condensado é similar à do doce de leite (MORO; HOUGH, 1985), entende-se que a técnica para avaliação de cristais em doce de leite proposta por Hough et al. (1990) pode ser aplicada para o estudo de cristais em leite condensado. Por outro lado, a quantidade de esforço e tempo requeridos para a quantificação do número e tamanho de cristais por meio desta técnica a torna inviável para aplicação na indústria, em controle de qualidade. Dois estudos de cristalização em leite condensado já foram encontrados utilizando adaptações simplificadas da técnica de Hough et al. (1990) visando facilitar este conjunto de procedimentos de análise no acompanhamento do processo industrial (SANTOS, 2012; SOBREIRO, 2009).

Existem outras técnicas que auxiliam no intuito de compreender e mensurar a cristalização em alimentos e poderiam somar-se aos estudos de imagens de cristais em leite condensado. A calorimetria exploratória diferencial é um método possível para avaliar a cristalinidade nos alimentos (MAZZOBRE; AGUILERA; BUERA, 2003). Segundo Saleki-Gerhardt et al. (1994), análises térmicas podem ser utilizadas no estudo do percentual

cristalino de produtos que contém lactose. O grau de cristalinidade representa o percentual cristalino de uma amostra (BLACK; LOVERING, 1977) e, sendo assim, este poderia ser um novo parâmetro de controle da cristalização em alimentos no processo industrial, podendo, até mesmo, substituir a contagem de cristais no controle de qualidade de leite condensado. Em especial, para o estudo da cristalização da lactose, em grande variedade de produtos, existe a necessidade de desenvolver métodos adequados para determinar o grau de cristalização de lactose sob determinadas condições de processamento e armazenamento (KEDWARD et al., 1998). No entanto, não foram encontrados na literatura estudos específicos sobre este assunto.

Diante da hipótese de que o grau de cristalinidade possa se tornar um parâmetro de controle de qualidade em leites condensados, o emprego de calorimetria exploratória diferencial mostra-se promissor, uma vez que equipamentos convencionais de DSC podem ser utilizados em diversas investigações relacionadas aos comportamentos de fase de compostos que apresentem características amorfas e/ou cristalinas (SHAH; KAKUMANU; BANSAL, 2006), fazendo, desta técnica, a mais frequentemente utilizada em alimentos para verificar o tipo e quantidade de material cristalino presente (MAZZOBRE; AGUILERA; BUERA, 2003).

Levando em consideração a importância de estudos sobre a cristalização da lactose diante do impacto causado na qualidade de leite condensado e a possibilidade de realização de análise de imagens dos cristais juntamente com estudos em DSC para controle da cristalização de leite condensado, o presente trabalho tem por objetivo definir metodologias específicas para o acompanhamento da cristalização de açúcares em leite condensado utilizando microscopia óptica e calorimetria exploratória diferencial. No que se refere à microscopia, o trabalho visa sugerir modificações na metodologia proposta por Hough et al. (1990) para acelerar o processo de medida do tamanho de cristais em amostras de leite condensado, baseando-se no uso de um conjunto bem definido de etapas automatizadas de processamento e análise de imagens, utilizando o *software* ImageJ[®]. No que se refere às análises térmicas, este estudo visa desenvolver, inicialmente, uma metodologia padrão para análise dos açúcares presentes em leite condensado. Sacarose p.a, lactose p.a., misturas destes dois açúcares e leite condensado foram analisadas pelas técnicas de análise térmica simultânea (DSC-TGA), DSC e DSC com temperatura modulada, com o objetivo de fazer um estudo comparativo detalhado entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas e

elucidar aspectos relacionados à acurácia, interpretação e limitações de aplicabilidade das técnicas em estudo.

A proposta do presente trabalho é estudar a cristalização de leite condensado através de análises de imagens dos cristais de açúcares e de análise térmicas. A partir deste objetivo geral, os objetivos específicos são descritos a seguir.

- a) Desenvolvimento de técnica de processamento/análise de cristais utilizando *software* ImageJ[®] e, assim:
 - a. testar a análise de imagem utilizando técnica de amostragem reconhecida com a utilização de microscópio ótico e desenvolvimento da metodologia de processamento/análise usando o *software* escolhido;
 - b. validar a técnica desenvolvida através de análise estatística.
- b) Desenvolvimento de técnica de análise térmica para misturas de lactose e sacarose e para leite condensado e, assim:
 - a. testar as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (análises simultânea, DSC e DSC com temperatura modulada) para a caracterização dos padrões de sacarose p.a. e lactose p.a. e para misturas conhecidas destes dois açúcares;
 - b. caracterizar os picos de fusão para lactose p.a. e sacarose p.a. em rampas de aquecimento utilizando equipamentos de análises térmicas para cálculo de entalpia de fusão;
 - c. estabelecer comparativo teórico utilizando os picos de fusão dos padrões e respectivas frações mássicas de misturas para comparar com termogramas experimentais de misturas de lactose p.a. e sacarose p.a.;
 - d. verificar a viabilidade de determinação do grau de cristalização de amostras de leite condensado a partir de dados dos equipamentos de análise térmicas utilizados.

O presente trabalho apresenta no Capítulo 2 a revisão bibliográfica e os fundamentos teóricos, o Capítulo 3 descreve os materiais e métodos empregados nos estudos de microscopia em leite condensado e nas análises térmicas para avaliação da cristalinidade dos açúcares que compõe o leite condensado. No Capítulo 4 estão apresentados separadamente os resultados e discussão referentes a cada uma dessas áreas de estudo. Finalmente, no Capítulo 5 são apresentadas as conclusões finais e sugestões para trabalhos futuros nessa área de pesquisa.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Leite condensado

No século XIX, cientistas da área de alimentos da Europa e dos EUA já trabalhavam na possibilidade de preservação do leite como um líquido concentrado (HESS, 1993). Gail Borden (1801-1874) foi quem patenteou o leite condensado em 1856, mas foi somente mais tarde, inspirado na utilização do vácuo na conservação de sucos de frutas, que ele obteve sucesso com o produto (TAN, 2009). Nos dias de hoje, o leite condensado é um alimento difundido pelo mundo e um ingrediente utilizado em inúmeras formulações de alimentos.

O *Codex Alimentarius* (1971) define o leite condensado como o produto obtido por eliminação parcial da água do leite e adição de açúcar, ou mediante qualquer outro procedimento que permita obter um produto da mesma composição e características do leite (gordura do leite – mínimo 8%; extrato seco do leite – mínimo 28%; proteínas do leite no extrato seco desengordurado – mínimo 34%). O conteúdo de gordura e/ou proteína pode ser corrigido durante a produção, somente com a finalidade de cumprir os requisitos de composição, mediante adição ou extração dos constituintes do leite, de maneira que não se modifique a proporção entre proteína do soro e caseína do leite.

No Brasil, o leite condensado não possui atualmente um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, apenas é citado pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal da seguinte forma:

Art. 657 - Entende-se por "leite condensado" ou "leite condensado com açúcar" o produto resultante da desidratação em condições próprias do leite adicionado de açúcar.

Parágrafo único - São fases de fabricação de leite condensado: seleção do leite, padronização dos teores de gordura e de sólidos totais, pré-aquecimento, adição de xarope (solução de sacarose ou glicose), condensação, refrigeração, cristalização e enlatamento.

Art. 658 - O leite condensado deve satisfazer às seguintes especificações:

-
- 1 - apresentar características organolépticas próprias;
 - 2 - apresentar acidez em ácido láctico, entre 0,08 e 0,16 g% (oito e dezesseis centigramas por cento), quando na diluição de uma parte do produto para 2,5 (duas e meia) partes de água;
 - 3 - apresentar na reconstituição, em volume, uma parte do leite para 2,25 (duas e vinte e cinco centésimos) partes de água, teor de gordura que atinja o limite do padrão de leite de consumo correspondente, tendo 28 % (vinte e oito por cento), no mínimo, de extrato seco total do leite e, no máximo, 45 % (quarenta e cinco por cento), de açúcar, excluída a lactose.
- (BRASIL, 1981).

Cada estabelecimento produtor deste alimento possui seus segredos industriais que definem a formulação do produto e estes interferem diretamente no sabor e na textura do produto final (TAN, 2009). A composição típica de leite condensado pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1- Composição centesimal típica de leite condensado

Composição		Percentual
Carboidratos	Sacarose	44-46 %
	Lactose	10-12 %
Proteínas		8-9 %
Gordura		8 %
Sais minerais		0,25-0,35 %
Umidade		26-28 %

Adaptado de Tan (2009)

Em relação à microbiologia deste produto, a alta pressão osmótica do leite condensado, causada pela elevada concentração de açúcares, inibe o crescimento da maior parte dos microrganismos e propicia uma longa vida de prateleira mesmo sem o uso da refrigeração (SHIMODA et al., 2001). A atividade de água (a_w) do leite condensado é inferior a 0,840 (a 25 °C) após sementeira de cristais de lactose, mas é a sacarose o principal soluto responsável

pela redução da a_w (TAN, 2009). Ressalta-se que o uso de embalagens herméticas também é um fator relevante para manutenção da qualidade microbiológica do alimento, pois o envase a vácuo evita o crescimento de inúmeros microrganismos aeróbios (de SÁ et al., 2008).

2.2. Cristalização da lactose

A lactose é o principal carboidrato presente no leite e tem sido exaustivamente estudada pela suas propriedades físico-químicas, pelo seu comportamento de cristalização e pela sua importância como um meio de fermentação (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

A lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) é um dissacarídeo que compreende uma molécula de glicose ligada a uma molécula de galactose. A lactose pode estar presente nos produtos lácteos sob duas formas de cristais, uma α hidratada e outra β anidra, sendo estas formas chamadas, respectivamente, de α -lactose e β -lactose (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; PERRONE; FERRU, 2007). As formas alfa e beta da lactose podem ser vistas na Figura 1.

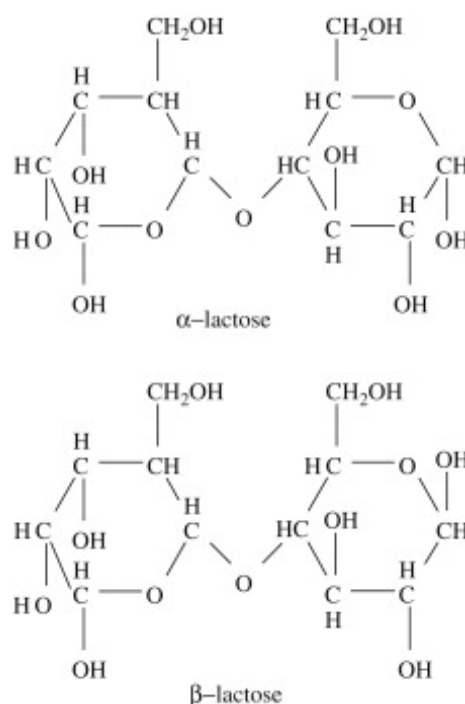


Figura 1 – Estrutura química dos isômeros da lactose

Fonte: GÄNZLE; HAASE; JELEN (2008).

Em fase aquosa é possível encontrar a lactose sob forma cristalina ou uma mistura vítrea amorfa. A taxa de cristalização da lactose depende das mudanças da forma anidra para a forma hidratada de lactose (HUNZIKER; NISSEN, 1927). Um aspecto importante a ser salientado é que, sob as condições de temperatura que o leite condensado é submetido durante o processamento, apenas a α -lactose cristaliza.

Em uma solução supersaturada, a α -lactose irá cristalizar até que a solução deixe de ser supersaturada; isso perturba o equilíbrio entre as formas alfa e beta e mais β -lactose se converte lentamente em α -lactose até que o equilíbrio se restabeleça. Restabelecido o equilíbrio, como consequência da mutarrotação, ocorre formação da α -lactose acima do limite de solubilidade da solução e, diante da supersaturação, a α -lactose torna a cristalizar-se, perturbando o equilíbrio novamente. Esta sucessão de cristalização e mutarrotação ocorre até que, finalmente, o equilíbrio se atinja sem a presença de supersaturação da lactose (HUNZIKER, 1946).

O leite condensado é uma solução supersaturada de lactose (HUNZIKER, 1946) e a cristalização da lactose tem grande impacto na aceitação do produto pelos consumidores. A cristalização gera um defeito sensorial chamado de arenosidade, no paladar, os cristais de lactose são percebidos por dois fatores: baixo nível de doçura (solução com concentração de 1 % deste açúcar tem somente 16 % de doçura quando comparado à sacarose) e baixa solubilidade da α -lactose (a solubilidade da α -lactose é de 70 g/L enquanto a da β -lactose é de 500 g/L, embora não tenha sido mencionado em qual temperatura (TAN, 2009).

Os primeiros estudos sobre a arenosidade causada pelos cristais de lactose em leites concentrados e açucarados provavelmente foram os publicados por Hunziker (1946) e Foster et al. (1957). Existem diversos valores publicados em relação ao tamanho dos cristais de lactose a partir do qual é possível sentir-se a sensação de arenosidade na boca. Na Tabela 3 foram relacionados alguns autores que definiram este parâmetro de qualidade. Hunziker (1946) e Hough et al. (1990) relacionaram quantitativamente o número e o tamanho de cristais com o grau de arenosidade causado pela lactose. Na verdade, o tamanho e número de cristais são interdependentes, porque ambos dependem da solubilidade de lactose (TAN, 2009).

Tabela 2 – Valores de tamanho de cristais perceptíveis pelo paladar gerando sensação de arenosidade encontrados na literatura.

Media de tamanho de cristal	Número de cristais	Autores
16 μm	-	Zhizhin et al. (1971)
30 μm	-	Kruk et al. (1974)
105 μm	$4 \cdot 10^3/\text{g}$	Hough et al. (1990)
45 μm	$10^5/\text{g}$	Hough et al. (1990)
15 μm	$10^7/\text{g}$	Hough et al. (1990)
10-16 μm	-	Gänzle et al. (2008)

Tan (2009) descreve alguns produtos que interferem na solubilidade da lactose quando adicionados a alimentos lácteos concentrados e açucarados: nitrato, cloreto ou brometo de cálcio, fosfatos e substâncias tensoativas. Além disso, interferem na solubilidade da lactose também a natureza do solvente, a presença de sais ou outros açúcares e a presença de coloides de leite em alta concentração. No doce de leite - uma solução supersaturada de açúcares - assim como leite condensado, a adição de fosfatos e ou bicarbonatos são frequentemente utilizadas para catalisar o escurecimento e inibir a gelatinização das proteínas, porém, algumas vezes, também são usados para aumentar a solubilidade da lactose (TAN, 2009).

2.3. A cristalização da lactose no processo industrial

Atualmente, existe uma grande variedade de métodos e equipamentos usados para a fabricação de leite condensado. Em relação às possíveis variações no processo produtivo deste alimento, sabe-se que a fase em que o açúcar é adicionado, a fase de homogeneização do leite, os parâmetros e metodologias de aquecimento e a história de cisalhamento têm grande influência nas características reológicas do produto (TAN, 2009).

As propriedades reológicas também servem como um meio de controlar e monitorar o produto ao longo do processo produtivo. De acordo com Colombo et al. (2009 *apud* Terán-Ortiz, 1998) a viscosidade também interfere na velocidade de crescimento dos cristais de lactose em doces açucarados a base de leite. Isto ocorre porque a formação e o aumento do

tamanho de cristais estão relacionados diretamente com a mobilidade das moléculas dentro do produto. Uma vez que o tamanho e a quantidade de cristais são parâmetros de qualidade importantes que podem modificar-se ao longo do processo de produção de leite condensado, a seguir são discutidas as influências das operações unitárias que compõem o fluxograma deste processo na cristalização da lactose.

De forma resumida, o processo produtivo de leite condensado inclui as seguintes operações unitárias: homogeneização, adição de açúcar, concentração, semeadura e refrigeração (TAN, 2009). A Figura 2 esquematiza as etapas do processo produtivo de leite condensado. As linhas pontilhadas indicam os diferentes momentos de homogeneização. Neste fluxograma podem ser vistos alguns caminhos opcionais para o processo, como duas opções de possibilidade para adição de açúcar e a opção de um único ou múltiplos estágios de concentração.

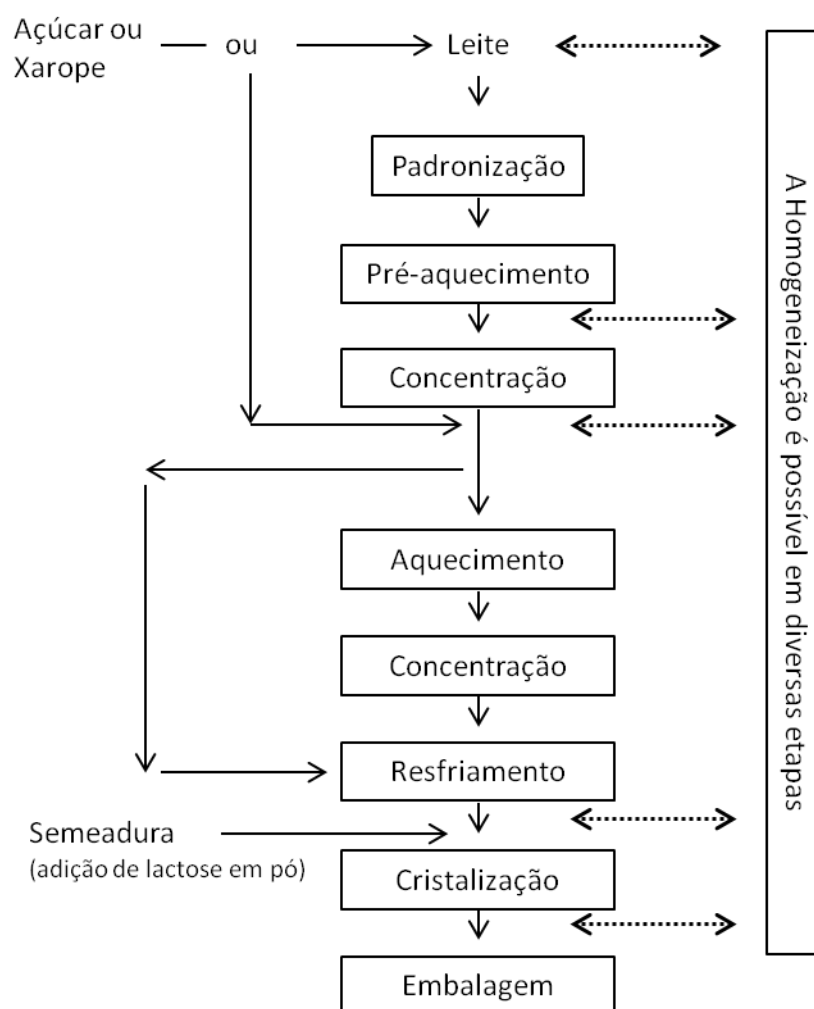


Figura 2 – Fluxograma de produção de leite condensado, adaptado de Tan (2009).

Na padronização, primeira etapa do processo de elaboração de leite condensado, ocorrem os ajustes do teor de gordura e de sólidos não gordurosos de origem láctea do leite; já nesta fase podem ocorrer interferências no processo de cristalização da lactose, pois no leite condensado a presença de coloides do leite em alta concentração dificulta a cristalização da lactose (JOUPPILA; ROOS, 1994; TAN, 2009). Esta dificuldade é causada pelo aumento da viscosidade, e toda alteração no produto que influenciar na redução da velocidade de difusão da lactose para a superfície dos cristais interfere no aumento do tamanho de cristais (HUNZIKER, 1946) e essa é uma interferência relevante em todas as etapas sequenciais deste processo produtivo. Ressalta-se que a adição de coloides do leite aumenta a viscosidade, mas não interfere na solubilidade da lactose (HUNZIKER; NISSEN, 1927).

As etapas de aquecimento têm como objetivo concentrar o leite, mas também reduzir a carga de contaminação microbiológica e aumentar a estabilidade das proteínas do leite diante da possibilidade de coagulação das mesmas (BYLUND, 1995). Durante o aumento da temperatura, muitas proteínas do soro do leite são desnaturadas, enquanto os sais de cálcio precipitam e, assim, o complexo proteico do leite se estabiliza. Esta estabilização ocorre porque as proteínas desnaturadas ligam-se às micelas de caseína através de ligações covalentes evitando a coagulação durante a etapa de concentração (ORDOÑEZ, 2005).

Hartel (2013) ressalta a importância das taxas de transferências de calor e massa no controle da cristalização de produtos em geral, assim como as condições de aquecimento (tempo, temperatura) e de energia de agitação, pois todos estes fatores influenciam diretamente nas características e quantidade de cristais a serem formados. O tratamento térmico afeta diretamente a viscosidade do produto final de forma que os parâmetros de tempo e temperatura devem ser estabelecidos de acordo com as condições do equipamento e da viscosidade desejada. Para evaporar a água presente no leite é fornecida uma grande quantidade de energia sob forma de vapor e, por isso, a planta de evaporação é frequentemente desenhada com um sistema de múltiplos efeitos.

A adição de sacarose é um ponto determinante do processo produtivo. A quantidade de sacarose adicionada é limitada pelo fato de soluções com concentrações de sacarose acima de 65,5% correrem alto risco de sofrer a cristalização. Além disso, a solubilidade da lactose reduz em presença da sacarose em soluções aquosas (ELIASSON, 2006), chegando a tornar-se de 1/3 a 1/6 da solubilidade original (HUNZIKER; NISSEN, 1927). A sacarose pode ser adicionada no produto em diferentes momentos do processo produtivo, de modo que esta decisão afetará a

viscosidade do produto e, como consequência, serão obtidos produtos com diferentes características. Para Ordoñez (2005) são três os momentos nos quais podem ser adicionada a sacarose ao produto e as vantagens e desvantagens em relação à escolha de qual momento estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Vantagens e desvantagens dos diferentes momentos de adição de sacarose durante a elaboração de leite condensado.

	Antes do pré-aquecimento	Antes da evaporação	Depois da evaporação
Vantagens	Dissolução e distribuição homogênea da sacarose.	Dissolução e distribuição homogênea da sacarose .	Não há risco de caramelização. Não há aumento excessivo da viscosidade.
Desvantagens	Possibilidade de caramelização da sacarose*. Maior risco de caramelização (dois tratamentos térmicos) Redução da capacidade de eliminação de microrganismos da etapa.	Possibilidade de caramelização da sacarose*.	Requer a adição de um xarope de sacarose a uma temperatura de 55 °C, pois a alta viscosidade adquirida após a evaporação impede a adição de sacarose cristalina.

* Formação de crostas no evaporador, aumento da viscosidade do leite, baixa transferência de calor, redução do trânsito do produto

Adaptado de Ordoñez (2005).

A concentração do produto baseia-se na evaporação de uma grande quantidade de água que é removida do mesmo. Para reduzir o impacto que o calor pode causar aos alimentos de origem láctea, é comum o uso de vácuo no sistema de evaporação para que a água vaporize a temperaturas mais baixas (BYLUND, 1995; GILMORE; SHELL, 1992). Na concentração do leite normalmente são utilizados dois ou mais evaporadores que operam em pressões progressivamente menores e pontos de ebulição progressivamente menores também. A indústria de laticínios pode utilizar até sete efeitos para concentração do produto final (BYLUND, 1995).

Após a concentração, o produto deve ser resfriado. A cristalização da lactose é dependente da temperatura e, em geral, uma solução saturada atinge o valor de saturação a 30 °C (FOX; MCSWEENEY, 1998). O resfriamento de uma solução saturada de lactose levemente abaixo do ponto de saturação leva a uma solução supersaturada metaestável, e a lactose não cristaliza de forma imediata. O efeito do resfriamento rápido é a contribuição na padronização do tamanho dos cristais formados, porque a redução brusca de temperatura aumenta o número de núcleos homogêneos gerados pela supersaturação da solução. De acordo com Buera et al. (2005), a nucleação provavelmente seja o fenômeno que cause o maior impacto sobre a distribuição de

tamanhos de cristais durante o processo de cristalização. Em níveis mais altos de resfriamento, forma-se uma solução supersaturada lábil onde a cristalização da lactose é imediata (FOX; MCSWEENEY, 1998). A mutarrotação e a cristalização da lactose continuam enquanto a solução está supersaturada e finaliza quando o ponto de saturação é atingido (TAN, 2009).

Após a concentração ocorre a etapa de cristalização, ou seja, ocorre a nucleação secundária, processo em que é feita a inoculação de lactose em pó, sob agitação e temperatura controladas. Esta etapa é indicada para produtos lácteos que sejam considerados soluções saturadas de sacarose em água (PERRONE; FERRUA; ABREU, 2006). Os finos cristais de lactose atuam como sementes para induzir a cristalização da lactose com a finalidade de controlar o tamanho dos cristais e evitar a arenosidade nestes produtos. Assim, são adicionados um grande número de núcleos de cristalização de forma a induzir a formação de cristais menores.

Tan (2009) apresenta equações empíricas que auxiliam os fabricantes a conhecer a quantidade correta de semente (cristais de lactose com tamanho padronizado) a ser usada para controlar o tamanho dos cristais no produto, e/ou para saber o tamanho de cristal esperado no produto dependendo do tamanho das sementes utilizadas. O autor exemplifica da seguinte forma: se as sementes de lactose utilizadas são de 3 μm , 0,20 % (m/m) deve ser adicionado a fim de limitar o crescimento de cristais, de forma que os cristais formados sejam menores que 10 μm .

Após a etapa de indução da cristalização da lactose, o leite condensado é embalado e destinado ao encaixotamento para posterior distribuição do produto. Com o decorrer do tempo de armazenamento, existe uma tendência à aglomeração dos cristais de lactose, formando cristais maiores e, conseqüentemente, verifica-se a redução da quantidade de cristais presentes (MENDES, 2011).

2.4. Microscopia e calorimetria exploratória diferencial em estudos de cristalização de açúcares

Nesta seção serão apresentados aspectos importantes encontrados em estudos sobre cristalização de açúcares utilizando análise de imagens de cristais e técnicas de calorimetria exploratória diferencial.

2.4.1. Microscopia

A microscopia é provavelmente a técnica mais amplamente utilizada para caracterizar o conteúdo de cristais em alimentos, podendo ser usada para estudar a taxa de cristalização e para medidas de tamanho, quantidade ou, ainda, para avaliar os tipos de cristais presentes em um

sistema (MAZZOBRE; AGUILERA; BUERA, 2003). No entanto, a primeira proposta de sistematização do uso desta técnica para contagem e medida de tamanho de cristais em alimentos lácteos surgiu com o trabalho de Hough et al. (1990). Na metodologia proposta por esses autores para o estudo da cristalização em doce de leite por microscopia óptica, 10 lâminas de microscópio foram preparadas com a amostra em estudo e, em cada lâmina, 10 regiões foram selecionadas aleatoriamente para a medição do número e tamanho dos cristais. Cada uma destas 10 regiões foi avaliada por meio da maior ampliação possível de forma que cerca de 20 cristais de lactose aparecessem no campo de visão do microscópio. O eixo mais longo dos cristais foi o parâmetro de tamanho e o número específico de cristais foi estimado com base no peso total da amostra colocada sobre a lâmina e da razão entre a área total da lâmina e a área da sub-região observada.

Giménez et al. (2008) avaliaram o tamanho dos cristais em amostras comerciais de doce de leite utilizando uma versão modificada da metodologia descrita por Hough et al. (1990). Esta versão baseia-se na análise de 10 lâminas e de 10 fotos por lâmina. No entanto, a quantificação dos cristais em cada foto já foi realizada utilizando um software para processamento e análise de imagens, o ImageTool for Windows versão 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX), com base na seleção aleatória de 100 cristais por foto. Esta técnica também foi utilizada por Ares e Giménez (2008) para estudar a influência da temperatura no aumento de cristais de lactose em amostras de doce de leite.

Ressalta-se que Hough et al. (1990) estudaram amostras de doce de leite e que Sobreiro (2009) realizou o primeiro trabalho encontrado utilizando esta técnica de forma simplificada para estudo de tamanho de cristais em leite condensado especificamente, visando reduzir o número de imagens necessários para análises em ambiente industrial. A técnica de Hough et al. (1990) foi adaptada reduzindo o número de fotos de 11 para 2 para cada lâmina com erro de 10%. Sobreiro (2009) afirma que esta redução não gerou grandes perdas de significância nos resultados e promoveu ganho de tempo, trabalho e resultados confiáveis para a empresa, viabilizando, assim, o melhor controle da qualidade do leite condensado.

Santos (2012) utilizou a técnica de microscopia para estudo de medida e quantificação de cristais descrita por Hough et al. (1990). Nesse estudo, 8 marcas de leite condensado produzidos no Brasil foram avaliadas e o autor definiu como procedimento realizar as análises montando 6 lâminas de vidro para microscópio e não 10 como sugerido pela técnica. As análises foram realizadas com auxílio do programa MSI Ima Win para o registro fotográfico, mensuração do tamanho e contagem do número dos cristais de lactose. Santos (2012) concluíram que a análise microscópica para leites condensados contribuiu para a avaliação da qualidade do produto e do processo de microcristalização e, mediante a

facilidade de manuseio e relevância das informações obtidas, esta se torna uma importante ferramenta disponível ao controle de qualidade das indústrias.

Sobreiro (2009) e Santos (2012) não evidenciaram em seus estudos de tamanho de cristais os detalhes sobre a seleção das dimensões a serem medidas. Para determinação de tamanho de partículas analisadas em microscópios normalmente utiliza-se o diâmetro de Feret como medida. De acordo com Allen (2003), o diâmetro de Feret (dF) pode ser definido como a distância entre um par de tangentes paralelas projetadas no contorno da partícula em uma direção fixa. Por vezes, as coordenadas do diâmetro de Feret (FeretX e FeretY) e o ângulo ($0 - 180^\circ$), chamado *FeretAngle*, são exibidos em análises de imagens.

2.4.1.1. Image J

O software ImageJ foi criado para ser um sistema de análise de imagens de baixo custo em que os cientistas pudessem pagar e implementar um programa sem interfaces complexas (SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S., & ELICEIRI, 2012). ImageJ é baseado em Java, de código aberto, independente de plataforma, de domínio público e foi desenvolvido no National Institutes of Health (NIH), Maryland EUA (RASBAND, 2008).

O ImageJ é utilizado para análise de imagens em diversos campos da Ciência e da Engenharia, podendo ser citados: imagens médicas, microscopia, ciências dos materiais, entre outros (COLLINS T. J., 2007). Na indústria agrícola e de alimentos este software tem sido cada vez mais utilizado na inspeção de qualidade (BROSNAN; SUN, 2002; SUN, 2000). BROSNAN e SUN (2002) relataram as vantagens das verificações de qualidade serem realizadas em computador, dentre elas podem ser citadas: a obtenção de dados precisos de forma rápida e objetiva, a redução do envolvimento humano e o registro permanente de dados.

2.4.2. Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial é a técnica que possibilita a determinação da diferença de energia ocorrida entre a amostra e um material de referência diante variações de temperatura programadas (BROWN, 1998). Os eventos térmicos são registrados pelo equipamento como

derivações da linha de base que dependem da energia fornecida à amostra em relação à referência (FREIRE, 2010).

Existem diferentes equipamentos para realização de análises térmicas e dentre eles pode-se citar a calorimetria exploratória diferencial (DSC), a análise térmica simultânea (DSC-TGA, i.e., calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica), e o DSC com temperatura modulada (TMDSC). Nesses equipamentos ocorre a medição do fluxo de calor causado pela resposta fornecida pela amostra quando a mesma é submetida a uma programação térmica; no entanto, a quantidade e a qualidade de informações obtidas está intrinsicamente associada aos mecanismos de análise de cada equipamento (hardware, software e aspectos estruturais). As técnicas que utilizam análises simultâneas apresentam a vantagem de avaliar não só o fluxo de calor como a estabilidade térmica da amostra, porém apresentam menor sensibilidade por utilizarem porta amostras abertos, permitindo a perda de massa e, normalmente, não possibilitam um bom contato da amostra com o fundo do cadinho. A sensibilidade do DSC convencional, por sua vez, é maior do que a apresentada nos equipamentos de análises simultâneas por ser projetado para medidas específicas de fluxo de energia; associado a esta característica, esses equipamentos utilizam porta amostras selados, permitindo maior contato da amostra com o fundo do mesmo.

Os equipamentos convencionais de DSC podem ser usados em diversas investigações relacionadas aos comportamentos de fase de compostos que apresentam características amorfas e/ou cristalinas (SHAH; KAKUMANU; BANSAL, 2006). As principais vantagens de estudar cristalização por DSC são o pequeno tamanho da amostra necessária para a análise e a alta sensibilidade da técnica (MAZZOBRE; AGUILERA; BUERA, 2003).

Os eventos térmicos registrados em DSC podem ser endotérmicos ou exotérmicos, e a forma dos picos obtidos em DSC dependerão fortemente das condições de ensaio e dos parâmetros estabelecidos para análise. A posição do ponto máximo do pico, por exemplo, muda com a taxa de aquecimento, a condutividade térmica e a massa da amostra (HURTTA; PITKÄNEN; KNUUTINEN, 2004). Além disso, a seleção prévia da taxa de aquecimento a ser utilizada nos ensaios precisa ser realizada de acordo com a finalidade do estudo (MAZZOBRE; AGUILERA; BUERA, 2003).

Segundo Ottenhof (2003), em especial para os sistemas de carboidratos, utiliza-se a técnica de DSC para estudar a cristalização. No entanto, os açúcares degradam a altas temperaturas (KEDWARD et al., 1998) e alguns carboidratos podem caramelizar concomitantemente com o processo de fusão ou, ainda, podem se decompor antes de fundir (HURTTA; PITKÄNEN; KNUUTINEN, 2004); esses podem ser fatores dificultadores do processo de análise de amostras

açúcaradas em DSC. Além disso, as temperaturas de fusão do mesmo açúcar diferem substancialmente entre diferentes referências bibliográficas (BECKETT et al., 2006; HURTTA; PITKÄNEN; KNUUTINEN, 2004) e, desta forma, o ponto de fusão por si só não pode ser usado para a identificação de algumas amostras de açúcar como a sacarose, a glicose e a frutose (HURTTA; PITKÄNEN; KNUUTINEN, 2004).

Mazzobre et al. (2003) afirmam que a análise em DSC para soluções de lactose permitiu obter dados precisos de entalpia de cristalização, dos tempos de indução, das temperaturas de transição vítrea e foi possível estudar a cinética de cristalização do açúcar nos sistemas propostos. No entanto, os autores afirmam que esta técnica tem a sua utilização por vezes limitada em alimentos ou em sistemas complexos em que ocorrem transições de gelatinização, vaporização da água, reações químicas, por exemplo, pois as análises térmicas em DSC podem resultar em termogramas complexos que são, frequentemente, difíceis de interpretar.

Segundo Saleki-Gerhardt et al. (1994), análises térmicas podem ser utilizadas no estudo do percentual cristalino de produtos que contém lactose. O grau de cristalinidade representa o percentual cristalino de uma amostra (BLACK; LOVERING, 1977) e a calorimetria exploratória diferencial é a técnica mais frequentemente utilizada em alimentos para verificar o tipo e quantidade de material cristalino presente em alimentos (MAZZOBRE; AGUILERA; BUERA, 2003). Em especial, para o estudo da cristalização da lactose, e em grande variedade de produtos, existe a necessidade de desenvolver métodos adequados para determinar o grau de cristalização de lactose sob determinadas condições de processamento e armazenamento (KEDWARD et al., 1998).

Apesar de ser extremamente sensível, a técnica de DSC convencional informa somente o fluxo de energia total (resultado final de processos físicos ou químicos, exotérmicos ou endotérmicos ocorridos com a amostra) e não possui a propriedade de especificar a origem dos fluxos energéticos. Visando compreender a origem do fluxo de energia total existe a técnica TMDSC (baseada na programação específica de temperatura associada a um tratamento matemático de dados) que permite separar os fluxos de calor oriundos de processos reversíveis daqueles provenientes dos irreversíveis. Assim, processos que ocorram concomitantemente na amostra durante uma programação térmica (sejam eles reversíveis ou irreversíveis) podem ser separados e estudados.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

Três marcas comerciais de leite condensado foram adquiridas em mercado local na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, para avaliação da cristalização de lactose através de processamento e análise das imagens de cristais. As marcas foram designadas como M1, M2 e M3.

Os açúcares usados como padrões para as análises térmicas e de difração de Raio X foram lactose p.a. (Watters) (LA) e sacarose p.a. (Watters) (SA). Foram elaboradas também três misturas com diferentes percentuais de sacarose p.a. e lactose p.a., com frações mássicas de lactose (x_{lac}) de 0,09 (LS_A); 0,18 (LS_B) e 0,69 (LS_C). As cinco amostras (LA, SA, LS_A, LS_B e LS_C) foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial utilizando três diferentes equipamentos.

Para simular o que ocorre em muitas aplicações práticas nas quais é de interesse a avaliação de açúcares recristalizados em produtos nos quais estes açúcares encontram-se inicialmente em solução, ou pelo menos parcialmente solubilizados, foram avaliados também cristais obtidos pela recristalização de açúcares a partir de soluções de concentração conhecida. Para isto foram elaboradas 4 soluções de açúcares em água destilada, sendo uma de sacarose pura, uma de lactose pura e duas contendo misturas destes dois açúcares. As composições destas soluções são apresentadas na Tabela 4. As soluções foram pesadas, misturadas em *vortex* por 3 minutos e colocadas em cápsulas de alumínio. As amostras foram secas em estufa a 65 °C (48 h). O material recristalizado foi triturado manualmente em gral de porcelana para obter um pó fino e analisado em análise térmica simultânea (DSC-TGA) e difração de raio X (DRX).

Tabela 4 – Percentuais de açúcares para cada uma das soluções.

	SA	LA	Água destilada
SolS (solução de SA)	55%	-	45%
SolL (solução de LA)	-	5%	95%
SolSL_5 (solução de SA e LA)	55%	5%	40%
SolSL_10 (solução de SA e LA)	55%	10%	35%

3.2.Determinação da umidade dos padrões lactose e sacarose

A determinação de umidade dos padrões de lactose e sacarose foi realizada por gravimetria, utilizando estufa a vácuo mantida a 70°C (Tecnal, TE-395) até obtenção de peso constante da amostra (IAL, 1985). A determinação da umidade dos padrões de sacarose p.a. e de lactose p.a. foi feita devido à influência que o nível de umidade dos açúcares pode afetar nas suas temperaturas de fusão (HURTTA; PITKÄNEN; KNUUTINEN, 2004).

3.3.Análise por Difração de Raio X (DRX)

A técnica de DRX foi utilizada para avaliar a possibilidade de interação entre os dois padrões p.a. de açúcares e consequentes possíveis alterações na conformação dos cristais quando estes são recristalizados a partir de soluções. As análises de difração de Raio-X foram realizadas para avaliação da fase cristalina das amostras de lactose, sacarose e das soluções recristalizadas contendo a mistura destes dois açúcares. Os difratogramas foram obtidos utilizando um difratômetro de Raios-X Siemens D5000, através da radiação Cu-K α , empregando o método do pó avaliado na faixa de 5° a 45° com passo de 0,02 a cada segundo, utilizando-se monocromador de grafite e filtro de níquel. A cristalinidade dos padrões de açúcares e das soluções recristalizadas foi determinada a partir do método ASTM D 5758 (*Integrated Peak Area Method*, ASTM).

3.4.Metodologia proposta para obtenção, processamento e análise das imagens

O ponto de partida do estudo foi a aplicação das etapas iniciais da técnica originalmente descrita por Hough *et al.* (1990) para a caracterização das amostras de leite condensado M1, M2 e M3.

3.4.1. Processamento/Análise de imagem

Obtenção das imagens

A obtenção das imagens, para cada marca de leite condensado, foi feita seguindo os seguintes passos: (i) foram preparadas 11 lâminas de microscópio contendo cada uma $0,003 \pm 0,0003$ g de amostra, cobertas com lamínulas de vidro levemente pressionadas; (ii) para cada uma das 11 lâminas foram registradas 12 imagens (1260×960 pixels) de diferentes regiões da amostra, selecionadas aleatoriamente utilizando um microscópio óptico ($40 \times 1600 \times$ TIM-107, OPTON) com magnificação de $10 \times$ acoplado a uma câmera fotográfica digital.

Fotografias de uma régua micrométrica (Nikon, $10 \mu\text{m}$), obtidas nas mesmas condições de imagem das lâminas com as amostras de leite condensado, foram utilizadas para a calibração das imagens obtidas, i.e., para a obtenção da relação de número de pixels (pontos) por micrômetro ($\text{pixels}/\mu\text{m}$).

3.4.1.1. Procedimento de processamento e análise das imagens com o software ImageJ

O processamento/análise das imagens obtidas através do *software* ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) consistiu nas seguintes etapas: (i) conversão das imagens coloridas (RGB) para tons de cinza (32 bit); (ii) alteração do contraste utilizando a ferramenta *Enhanced Contrast*, para que os contornos dos cristais ficassem melhor definidos; (iii) aplicação da ferramenta *thresholding* para converter a imagem de escala de cinza para preto-e-branco e promover a distinção dos contornos dos cristais; e (iv) análise da imagem final processada utilizando a ferramenta “Analyze Particles...” do *software*, especificando-se os valores mínimo e máximo de circularidade e tamanho utilizados para identificação de objetos (note-se que somente são analisados e quantificados objetos com valores de circularidade e tamanho dentro dos intervalos estabelecidos).

Para automatizar o procedimento de processamento/análise das imagens descrito acima, foi desenvolvida uma macro (*script*) no *software* ImageJ, a qual é apresentada como material suplementar (anexo).

Os valores utilizados para tamanho mínimo e máximo de objeto foram 5 e 10000 pixels, respectivamente. Como os cristais não são de forma esférica, foi necessário especificar uma dimensão característica para mensurar o seu tamanho. A dimensão característica escolhida foi o diâmetro de Feret (Feret Máximo), sendo este considerado a medida da maior dimensão da partícula (ALLEN, 2003).

O parâmetro circularidade (c) pode assumir valores entre 0 (zero) e 1,0 (um), sendo 1,0 o valor de um círculo perfeito. Como foi observado em testes preliminares, o valor mínimo de circularidade utilizado tem forte influência no resultado final da análise de imagem. Assim, foi efetuada uma etapa de avaliação de qual o valor mais adequado deste parâmetro para análise das imagens das amostras de leite condensado.

Na etapa de análise de imagens (etapa iv do procedimento) são avaliados os parâmetros apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros obtidos referentes aos cristais avaliados em cada imagem analisada.

Parâmetro	Medida
$\bar{x}_{L,i}$	tamanho médio de cristal na imagem i da lâmina L
$xmax_{L,i}$	tamanho máximo de cristal na imagem i da lâmina L
$N_{L,i}$	número de cristais identificados na imagem i da lâmina L
$A_{L,i,j}$	área de cada cristal j identificado na imagem i da lâmina L
$\bar{A}_{L,i}$	área média de cristal na imagem i da lâmina L
$AT_{L,i}$	área total dos cristais na imagem i da lâmina L ($AT_{L,i} = \sum_1^{N_{L,i}} A_{L,i,j}$)

A partir dos parâmetros descritos na Tabela 5 foram calculados os respectivos valores médios por lâmina (\bar{x}_L , \overline{xmax}_L , \bar{N}_L , \bar{A}_L e \overline{AT}_L) e os valores médios globais (\bar{x}_G , \overline{xmax}_G , \bar{N}_G , \bar{A}_G e \overline{AT}_G) de cada marca de leite condensado. Os valores médios por lâmina foram calculados como as médias aritméticas dos parâmetros determinados nas 12 imagens obtidas ($i = 1, 2, \dots, 12$) para a lâmina correspondente (L), enquanto os valores médios globais correspondem às médias aritméticas calculadas com base no total de dados obtidos, ou seja, considerando todas as lâminas e suas respectivas imagens.

3.4.1.2. Análise de imagens via análise visual/medida manual

Para a validação da metodologia desenvolvida com base na ferramenta de processamento/análise de imagens do software ImageJ[®], descrita nos parágrafos anteriores, foi realizada a medida manual de todos os cristais com contorno definido contidos em uma imagem (850×960 pixels). Esta determinação manual foi feita utilizando a ferramenta de medida direta – *Measure* - do ImageJ[®]. Com esta ferramenta a maior dimensão é marcada manualmente e o software registra a medida para posterior análise. A comparação dos resultados obtidos para $\bar{x}_{L,i}$ e $xmax_{L,i}$ com a metodologia proposta e aqueles obtidos manualmente foi realizada para uma imagem digital de cada marca de leite condensado. Para esta análise estatística específica, o valor do desvio-padrão de $xmax_{L,i}$ foi estimado com base nas dimensões dos 2 maiores valores de cristais medidos em cada caso.

3.4.1.3. Análise do número mínimo de lâminas a ser utilizado

A etapa final do desenvolvimento da metodologia consistiu em avaliar a possibilidade de redução do número de lâminas necessárias para aplicação da técnica de processamento/análise de imagem de cristais; isto foi feito calculando-se médias globais referentes aos grupos variando de 2 até 11 lâminas e avaliando-se a significância da diferença entre as diferentes médias obtidas por meio de testes estatísticos.

3.4.1.4. Análise Estatística

Os dados foram comparados através de Análise de Variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey. Em todos os casos, a análise estatística foi feita utilizando o software SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc., 1985), considerando um nível de confiança de 95 %.

3.4.2. Análises térmicas

Para a análise térmica simultânea (DSC-TGA) foi utilizado o equipamento tipo SDT (TA Instrumets, SQT-600), sendo que os açúcares foram pesados diretamente no cadinho de

alumina (aproximadamente 10 mg de amostra para os açúcares e 20 mg para leite condensado). As curvas de fluxo de calor foram obtidas e todas as análises foram realizadas em triplicata. As rampas de aquecimento foram de T_{amb} (temperatura ambiente < 30°C) até 300 °C. A taxa de aquecimento foi de 10 °C/min.

Para a análise por DSC e MDSC (DSC Q2000, *TA Instruments*), foram utilizados nitrogênio ultra-puro (50 mL/min) e porta amostra tipo TZero Aluminium Hermetic/ TZero Aluminium. As rampas de aquecimento foram as mesmas aplicadas no ensaio em análise térmica simultânea. As massas das amostras foram de aproximadamente 5 mg para as análises de DSC e MDSC. Os ensaios em MDSC foram realizados em duplicata e os parâmetros de análise aplicados foram conforme os citados por Chiou et al. (2008). Os ensaios foram realizados em duplicata para as análises em DSC e MDSC dos padrões e em triplicata para os resultados em SDT e MDSC das misturas.

Os materiais avaliados foram lactose p.a., sacarose p.a e misturas com diferentes percentuais destes açúcares. Para o cálculo dos valores de entalpia de fusão ($\Delta H_{fusão}$) e temperatura no ponto de mínimo (picos endotérmicos) ou no ponto de máximo (picos exotérmicos) foram marcados o início e o fim de pico manualmente e os valores obtidos foram calculados pelo software de análise de dados dos equipamentos.

3.4.2.1. Avaliação do comportamento térmico de misturas dos padrões em estado sólido

A fim de avaliar a possibilidade de interação entre os diferentes tipos de cristais durante o aquecimento de misturas de lactose e sacarose, os dados obtidos em SDT para as misturas dos padrões em estado sólido foram comparados com as curvas teóricas obtidas pela soma ponderada dos termogramas obtidos no aquecimento dos padrões puros. Para isto foi desenvolvida uma função no software MATLAB, a qual realiza os seguintes passos: i) leitura dos dados originais; ii) interpolação sobre os vetores de dados modificados para gerar versões destes com pontos igualmente espaçados; iii) soma ponderada dos espectros dos padrões, utilizando as respectivas frações em massa na mistura analisada, obtendo-se o termograma teórico associado à hipótese de não interação entre os dois tipos de cristais durante o processo de aquecimento e fusão; iv) geração de gráficos comparando os dados experimentais obtidos para a mistura com o termograma obtido no passo (iii).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados deste trabalho e a apresentação será feita em duas seções. Na Seção 4.1 são apresentados os resultados relacionados à quantificação de cristais em amostras de leite condensado a partir do processamento e análise de imagens obtidas por microscopia ótica. Na Seção 4.2, apresentam-se os resultados referentes ao estudo do uso das técnicas de análise térmica para caracterização da cristalinidade em amostras de leite condensado.

4.1 Processamento/Análise de imagem

4.1.1 Macro para processamento e análise de imagens

A macro (*script*) desenvolvida no *software ImageJ* para execução do procedimento de processamento/análise das imagens obtidas permitiu que todas as etapas de processamento e análise descritas na seção Materiais e Métodos pudessem ser feitas de forma sequencial e automática; este procedimento permitiu padronizar e acelerar a execução das análises. A Figura 3 apresenta um exemplo da evolução de uma imagem (1260×960 pixels) da amostra M3 à medida que os diferentes passos da macro, descritos na Seção 3.4.1.1, são efetuados.

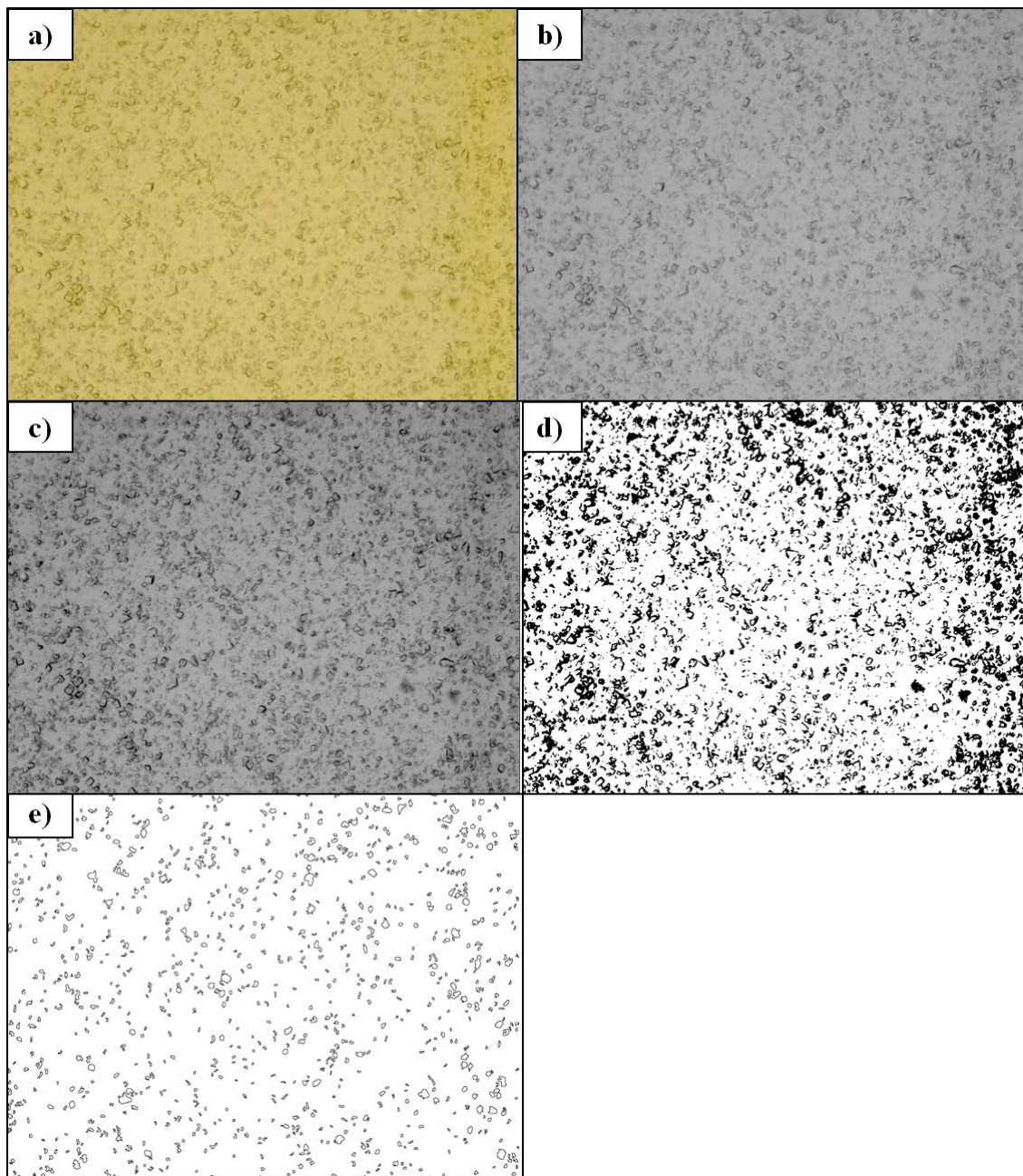


Figura 3 – Demonstração das etapas de processamento e análise de imagem contidas na macro desenvolvida para o processamento/análise das imagens microscópicas de cristais em leite condensado no ImageJ: (a) imagem colorida obtida em microscópio óptico (b) imagem em tons de cinza (32 bit) (c) alteração do contraste (*Enhanced Contrast*) (d) aplicação do *thresholding* (e) imagem final com os cristais analisados.

4.1.2 Avaliação do valor mínimo de circularidade a ser utilizado

Foram testados valores mínimos de circularidade de 0,01, 0,25, 0,35, 0,4 e 0,45. As respectivas imagens (1260×960 pixels) processadas/analizadas estão apresentadas na Figura 4, juntamente com a imagem original correspondente. Os três valores menores (0,01, 0,25 e 0,35) resultaram na detecção de mais cristais; no entanto, os objetos reconhecidos consistiam em agregados de cristais e/ou sua forma não se assemelhava a dos cristais identificados visualmente na imagem. Por outro lado, usando o valor de 0,45, alguns cristais da imagem original já não eram detectados pelo software. O melhor resultado, ou seja, a melhor concordância entre imagem processada/analizada e análise visual direta, foi obtida com valor mínimo de circularidade igual a 0,4, sendo que este valor foi selecionado para as análises posteriores.

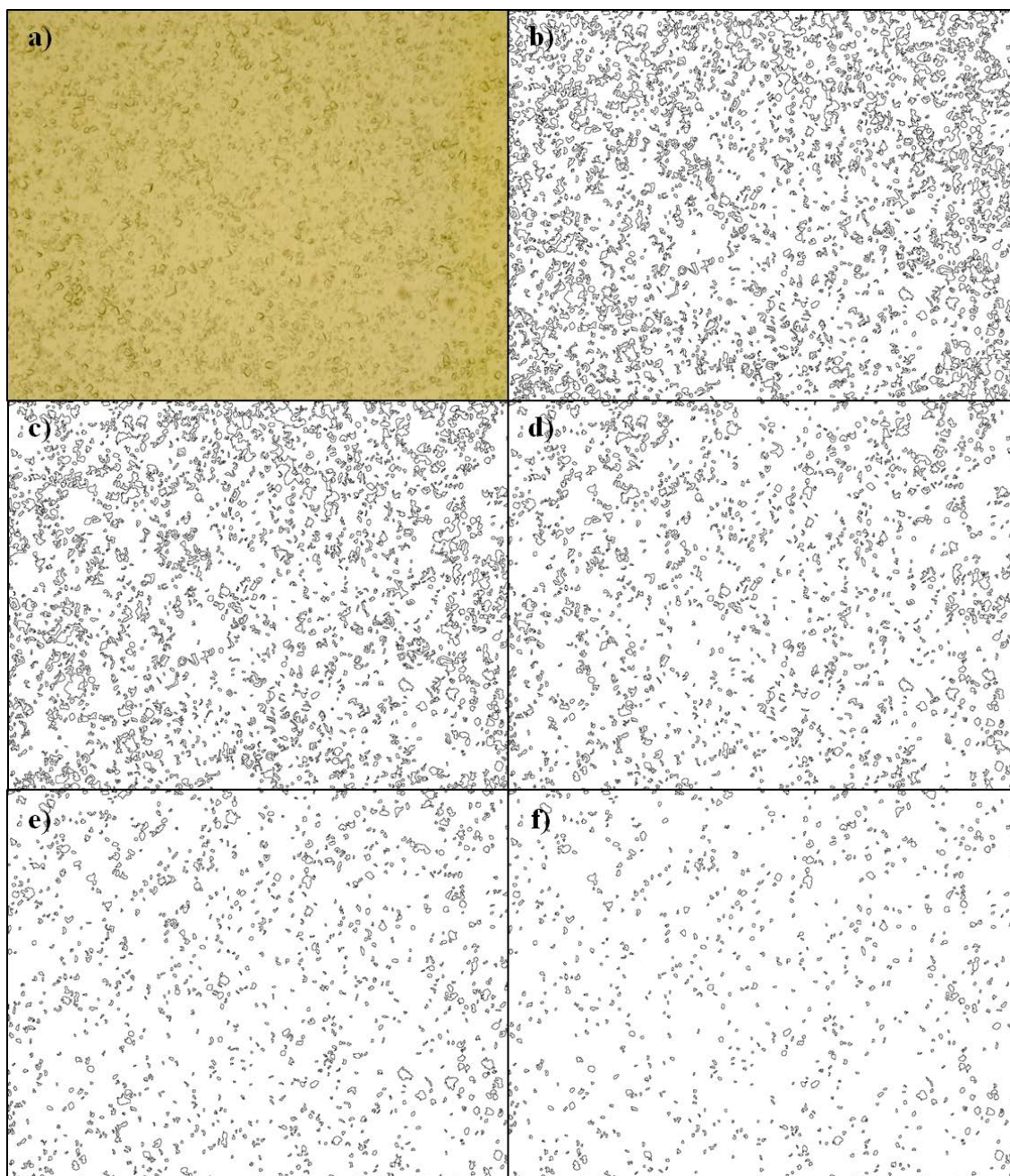


Figura 4 - Imagem de cristais na amostra de leite condensado (M3) e correspondentes imagens processadas/analizadas com o software *ImageJ* obtidas com diferentes valores de circularidade mínima (c): (a) imagem obtida em microscópio óptico (b) $c = 0,001$ (c) $c = 0,25$ (d) $c = 0,35$ (e) $c = 0,4$ (f) $c = 0,45$.

Um detalhamento desta análise é apresentado na Figura 5, na qual um pequeno fragmento de imagem (143×157 pixels) de cada uma das três marcas de leite condensado foi analisado utilizando a macro de processamento/análise de imagens, variando os valores de circularidade mínima (c). Evidencia-se assim que, para as três marcas, os valores de circularidade mínima iguais a 0,01, 0,25 e 0,35, quando utilizados para compor a macro, não

seriam adequados para utilizar na avaliação dos três diferentes produtos testados. Observa-se que, para o fragmento de imagem da marca M1, o valor mínimo de $c = 0,35$ forneceu a mesma imagem que os valores maiores testados, porém para M2 e M3 o valor mínimo de $c = 0,40$ eliminou alguns objetos com pouca identificação com a imagem do microscópio. Além disso, ressalta-se que o programa (macro) seleciona evidentemente apenas os cristais com contorno bem definido.

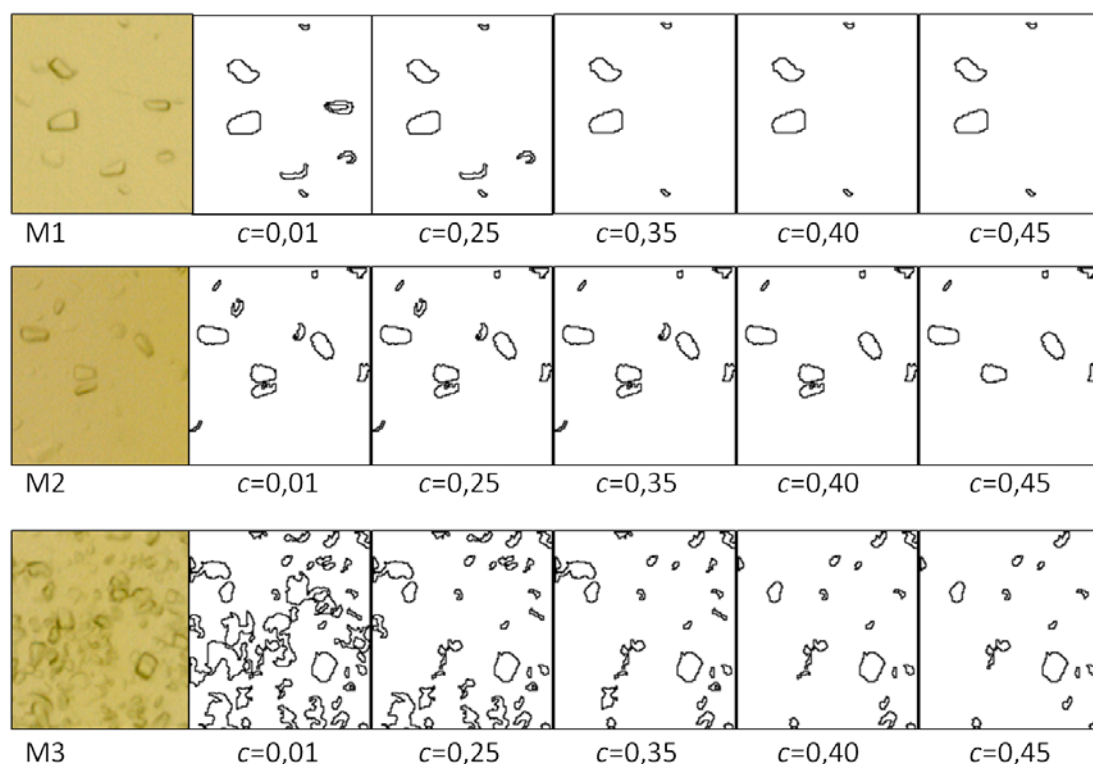


Figura 5 – Fragmentos de imagem (143×157 pixels) de cristais das amostras de leite condensado (M1, M2 e M3), e correspondentes imagens processadas/analísadas variando os valores de circularidade mínima (c).

Deve-se ainda mencionar que os testes realizados indicam que o valor adequado de circularidade mínima a ser considerada pode depender da quantidade de cristais encontrados e dos formatos mais frequentes destes. Sendo assim, sugere-se que a adequação do valor usado para este parâmetro seja verificado quando amostras de características muito diferentes em termos de forma e quantidade de cristais tenham que ser analisadas.

4.1.3 Avaliação do desempenho quantitativo do procedimento de processamento e análise de imagens

A avaliação do procedimento de processamento de imagens foi feita tomando como referência os valores de número de cristais ($N_{L,i}$) e tamanhos médio ($\bar{x}_{L,i}$) e máximo ($xmax_{L,i}$) obtidos para imagens específicas. Foram comparados os valores destes parâmetros obtidos pelo procedimento de processamento/análise desenvolvido com o *software ImageJ* e por medida direta (ou seja, análise visual/medida manual) para 3 imagens, sendo cada uma correspondente a uma das amostras de leite condensado estudadas (M1, M2 e M3). Ressalta-se uma maior dificuldade de análise da imagem referente à marca M3, pois esta apresentou maior número de cristais, maior sobreposição dos mesmos e maior número de cristais com contorno indefinido. Os dados desta comparação são apresentados na Tabela 6. Observa-se que os números de cristais identificados pelas duas técnicas são diferentes, principalmente, para a amostra M3. Além disso, deve-se ter em mente que o número de cristais identificados, em ambas as técnicas, é certamente menor que o número real de cristais presentes na região analisada na imagem, pelos seguintes motivos: i) análise somente de cristais com contorno bem definido, na análise manual; ii) influência dos parâmetros de análise (tamanhos mínimo e máximo e circularidade mínima) no caso da análise com o *ImageJ*. No entanto, de acordo com a análise estatística realizada com base nas estimativas de desvio-padrão (S) mostradas na Tabela 6, as diferenças encontradas em cada amostra entre os valores de $\bar{x}_{L,i}$ e $xmax_{L,i}$ calculados pelas duas técnicas não apresentaram diferenças significativas. Destes resultados pode-se inferir que a técnica apresentada não é adequada para quantificar o total de cristais na amostra, mas fornece estimativas confiáveis para $\bar{x}_{L,i}$ e $xmax_{L,i}$, que são parâmetros importantes na resposta sensorial do leite condensado.

Tabela 6 – Dados comparativos da análise manual versus análise via processamento/análise de cristais para as diferentes marcas de leite condensado.

Marca	Medida	$N_{L,i}$	$\bar{x}_{L,i}$ (μm)	$s_{\bar{x}_{L,i}}$ * (μm)	$xmax_{L,i}$ (μm)	$s_{xmax_{L,i}}$ ** (μm)
M1	Manual	75	7,74	3,6	21,89	7,6
M1	Processamento/análise	79	8,55	3,1	20,53	11,5
M2	Manual	136	6,76	2,58	12,24	0,15
M2	Processamento/análise	142	6,31	2,38	17,21	3,17
M3	Manual	444	6,69	2,27	16,17	1,79
M3	Processamento/análise	683	6,44	2,48	18,72	0,73

* estimativa do desvio-padrão com base nos $N_{L,i}$ pontos da imagem considerada (i.e, desvio padrão amostral)

** estimativa do desvio-padrão para $xmax_{L,i}$ com base nas dimensões dos 2 maiores cristais medidos na imagem considerada

4.1.4 Análise completa utilizando o procedimento de processamento e análise de imagens

As marcas de leites condensados (M1, M2 e M3) foram analisadas utilizando o procedimento de processamento e análise de imagens proposto neste trabalho. O termo análise completa indica a análise com base no tamanho amostral semelhante ao sugerido por Hough et al. (1990), i.e., análise de 12 imagens por lâmina, com um total de 11 lâminas por amostra. A Tabela 7 apresenta as médias do número de cristais identificados e dos tamanhos médio e máximo de cristal para cada uma das lâminas, juntamente com as médias globais para estes parâmetros e os respectivos desvios padrões (as variáveis utilizadas na Tabela 7 estão descritas na Seção 3.4.1.1). Diante destes resultados foi possível comparar estatisticamente ($p < 0,05$) as três marcas estudadas.

Tabela 7 – Resultados de número de cristais (\bar{N}_L e \bar{N}_G), tamanhos médio (\bar{x}_L e \bar{x}_G) e máximo (\overline{xmax}_L e \overline{xmax}_G) para as diferentes marcas de leite condensado

(M1, M2 e M3).

	M1			M2			M3		
	$\bar{N}_L \pm s_{\bar{N}_L}$	$\overline{xmax}_L \pm s_{\overline{xmax}_L}$ (μm)	$\bar{x}_L \pm s_{\bar{x}_L}$ (μm)	$\bar{N}_L \pm s_{\bar{N}_L}$	$\overline{xmax}_L \pm s_{\overline{xmax}_L}$ (μm)	$\bar{x}_L \pm s_{\bar{x}_L}$ (μm)	$\bar{N}_L \pm s_{\bar{N}_L}$	$\overline{xmax}_L \pm s_{\overline{xmax}_L}$ (μm)	$\bar{x}_L \pm s_{\bar{x}_L}$ (μm)
Lâmina									
1	181 \pm 25	22,9 \pm 3,2	7,7 \pm 0,5	491 \pm 81	19,7 \pm 2,9	6,8 \pm 0,2	883 \pm 62	23,2 \pm 2,4	6,7 \pm 0,2
2	154 \pm 23	22,6 \pm 3,0	7,8 \pm 0,7	183 \pm 28	16,5 \pm 3,4	6,0 \pm 0,2	887 \pm 94	23,0 \pm 2,4	6,6 \pm 0,1
3	140 \pm 32	21,9 \pm 3,9	7,9 \pm 0,7	277 \pm 104	18,4 \pm 2,8	6,4 \pm 0,3	766 \pm 110	23,2 \pm 2,2	6,8 \pm 0,2
4	169 \pm 27	20,8 \pm 3,3	7,7 \pm 0,5	304 \pm 82	18,6 \pm 2,8	6,4 \pm 0,2	869 \pm 72	24,0 \pm 3,4	6,5 \pm 0,1
5	172 \pm 31	20,4 \pm 2,0	7,5 \pm 0,5	196 \pm 53	16,8 \pm 4,2	6,1 \pm 0,2	891 \pm 53	22,5 \pm 2,3	6,5 \pm 0,1
6	121 \pm 24	21,5 \pm 3,3	7,6 \pm 0,5	195 \pm 37	15,8 \pm 2,1	6,0 \pm 0,3	856 \pm 83	17,7 \pm 1,7	6,6 \pm 0,1
7	151 \pm 40	21,4 \pm 3,4	7,7 \pm 0,7	186 \pm 17	16,1 \pm 2,5	6,1 \pm 0,2	932 \pm 80	23,2 \pm 3,1	6,6 \pm 0,1
8	272 \pm 50	21,8 \pm 3,0	7,5 \pm 0,5	189 \pm 60	14,5 \pm 2,3	6,2 \pm 0,3	849 \pm 71	23,7 \pm 3,2	6,6 \pm 0,1
9	97 \pm 14	21,8 \pm 4,1	7,5 \pm 0,6	254 \pm 90	18,6 \pm 3,7	6,3 \pm 0,2	881 \pm 78	22,7 \pm 1,6	6,5 \pm 0,2
10	173 \pm 55	21,9 \pm 3,9	7,9 \pm 0,7	491 \pm 81	14,9 \pm 1,6	5,9 \pm 0,2	875 \pm 62	23,2 \pm 3,8	6,5 \pm 0,1
11	180 \pm 16	21,7 \pm 2,9	7,6 \pm 0,6	298 \pm 27	17,5 \pm 3,0	6,3 \pm 0,2	906 \pm 55	24,3 \pm 2,9	6,6 \pm 0,1
Lâmina	$\bar{N}_G \pm s_{\bar{N}_G}$	$\overline{xmax}_G \pm s_{\overline{xmax}_G}$ (μm)	$\bar{x}_G \pm s_{\bar{x}_G}$ (μm)	$\bar{N}_G \pm s_{\bar{N}_G}$	$\overline{xmax}_G \pm s_{\overline{xmax}_G}$ (μm)	$\bar{x}_G \pm s_{\bar{x}_G}$ (μm)	$\bar{N}_G \pm s_{\bar{N}_G}$	$\overline{xmax}_G \pm s_{\overline{xmax}_G}$ (μm)	$\bar{x}_G \pm s_{\bar{x}_G}$ (μm)
1 - 12	164,50 \pm 44,3	21,7 ^a \pm 0,7	7,7 ^a \pm 0,1	278,38 \pm 114,8	17,0 ^b \pm 1,7	6,2 ^b \pm 0,3	872,30 \pm 41,9	22,8 ^a \pm 1,8	6,6 ^c \pm 0,1

Conforme já discutido na Seção 4.1.3, a marca M3 apresentou o maior número de cristais selecionados/analizados com $\bar{N}_G = 872,30 \pm 41,9$, seguido das marcas M2 ($\bar{N}_G = 278,38 \pm 114,8$) e M1 ($\bar{N}_G = 164,50 \pm 44,3$). Deve-se ressaltar que os altos valores de desvio-padrão para o parâmetro \bar{N}_L não se devem a uma limitação do procedimento de processamento/análise, mas sim ao fato de os cristais não estarem uniformemente distribuídos entre as diferentes regiões microscópicas analisadas.

Ainda que o número de cristais identificados seja menor que o número real de cristais presentes na imagem, o parâmetro \bar{N}_G tem, mesmo assim, potencial para ser utilizado como parâmetro de referência no controle de qualidade em processos industriais de produção de leite condensado.

Quando comparadas estatisticamente ($p < 0,05$) as médias globais de tamanho máximo de cristais (\overline{xmax}_G) para as diferentes marcas, verifica-se que M3 ($\overline{xmax}_G = 22,8 \pm 1,8$) e M1 ($\overline{xmax}_G = 21,7 \pm 0,7$) diferem estatisticamente quando comparadas à marca M2 ($\overline{xmax}_G = 17,0 \pm 1,7$). Assim, a marca M2 foi a que apresentou menor valor médio (global) para tamanho máximo de cristais.

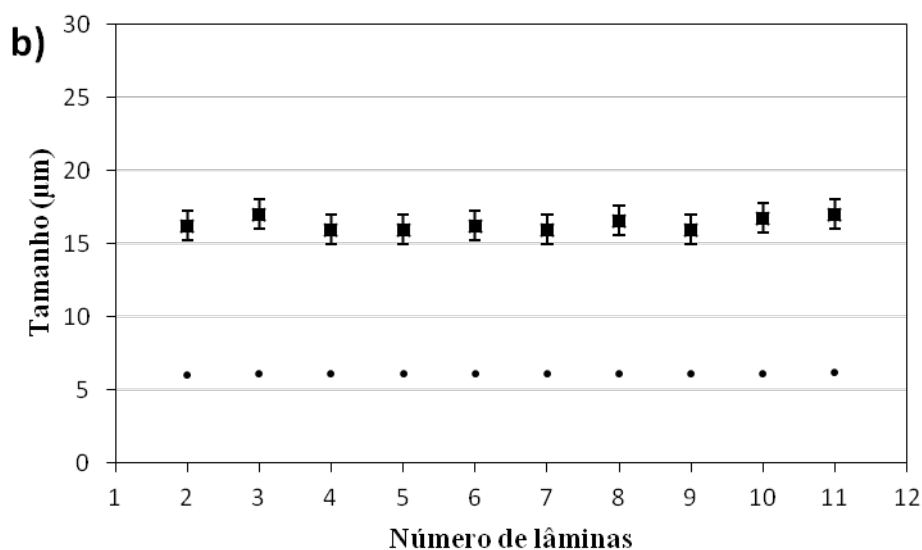
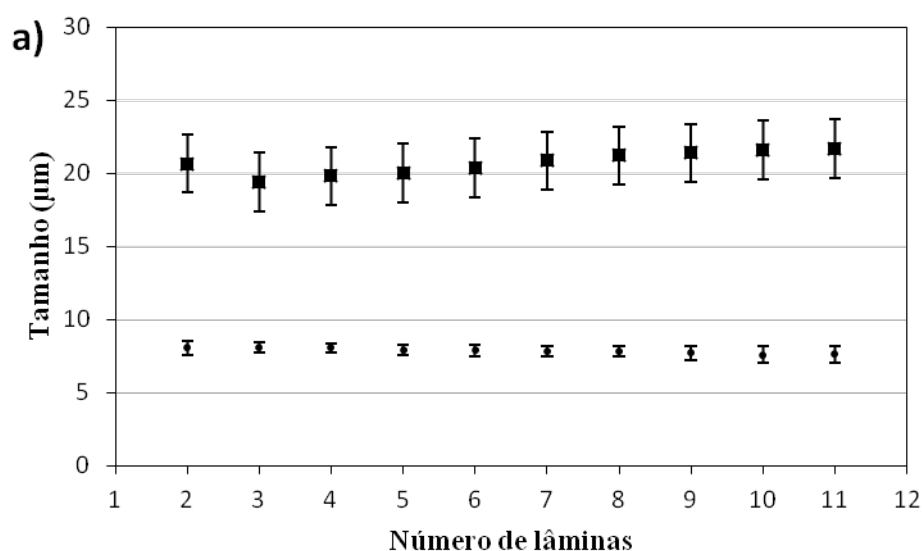
Na comparação entre as médias de tamanho médio dos cristais (\bar{x}_L) não foi verificado desvio-padrão percentual maior que 9,0% para nenhuma das marcas estudadas. Além disso, nenhuma das marcas apresentou média global do tamanho médio (\bar{x}_G) maior que 16 μm , que é o limite a partir do qual os cristais podem ser percebidos pelo paladar (HOLSINGER, 1997). Quando comparadas estatisticamente as médias globais em relação ao tamanho médio de cristais (\bar{x}_G) para as diferentes marcas, verifica-se que as 3 marcas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Estes resultados indicam que a metodologia desenvolvida neste trabalho para processamento e análise de imagens para cristais de açúcar em leite condensado é confiável como foi demonstrado através da comparação entre a análise visual e o uso da metodologia.

4.1.5 Avaliação do número mínimo de lâminas requerido

A Figura 6 apresenta a variação dos valores das médias globais (\overline{xmax}_G e \bar{x}_G) obtidas com o tratamento das imagens em função do número de lâminas analisadas para as três marcas de leite condensado. A aplicação da análise de variância (ANOVA) mostrou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de \overline{xmax}_G e \bar{x}_G obtidos à medida que

o número de lâminas foi reduzido, mesmo quando somente 2 lâminas foram consideradas. Uma análise semelhante indicou que o mesmo ocorre para as demais médias consideradas (\bar{N}_G , \bar{A}_G e \bar{AT}_G). Na comparação, por exemplo, com os valores propostos por Hough et al. (1990), esta grande diminuição no número de lâminas (e imagens) requerido para a obtenção de médias confiáveis para as variáveis de interesse pode ser atribuída ao processamento/análise automático das imagens e à padronização do procedimento para este fim. Esta redução constitui outra característica importante da metodologia proposta no que diz respeito ao seu potencial para uso em controle de qualidade de leite condensado.



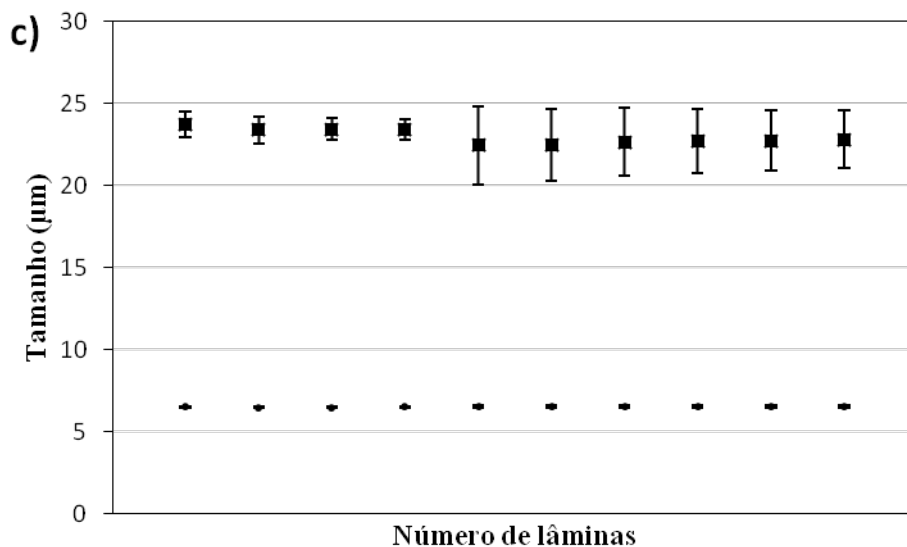


Figura 6 – Variação das médias globais de tamanho médio (\bar{x}_G) e máximo (\overline{xmax}_G) de cristais nas marcas de leite condensado a) M1, b) M2 e c) M3 em função do número de lâminas analisado.

4.2 Análises Térmicas

A proposta de utilização das técnicas de análise térmica (SDT, DSC e MDSC) para caracterização da cristalinidade total em amostras de leite condensado baseia-se na possibilidade de quantificar o grau de cristalização de uma dada amostra a partir da comparação quantitativa de seu termograma com aqueles referentes aos padrões de sacarose e lactose. Assim, a análise da viabilidade desta proposta foi dividida nos seguintes itens: (i) caracterização térmica de padrões de lactose e sacarose; (ii) caracterização térmica de misturas de lactose e sacarose de composição conhecida e análise dos resultados obtidos a fim de determinar se os termogramas das misturas podem ser obtidos a partir dos termogramas dos padrões utilizando regras de mistura simples; (iii) aplicação da metodologia a amostras de leite condensado.

4.2.1 Difração de raio-X

Os difratogramas de raio-X das amostras p.a. de lactose e sacarose e das quatro amostras recristalizadas a partir das soluções descritas na Tabela 4 são apresentados na Figura 7. No difratograma da amostra de sacarose p.a. foi observado o pico típico em $18,8^\circ$ (Saleki-Gerhardt et al,1994), com intensidade de 1994.9 u.a., que foi utilizado juntamente com os picos em $8,36$ e $25,28^\circ$ no cálculo da razão entre os picos. Para a amostra de lactose p.a. observaram-se os quatro picos característicos da forma cristalina α -lactose monoidratada nos valores de 2θ iguais a $12,54$; $16,40$; $19,12$ e $19,98^\circ$ (GOMBÁS et al., 2003).

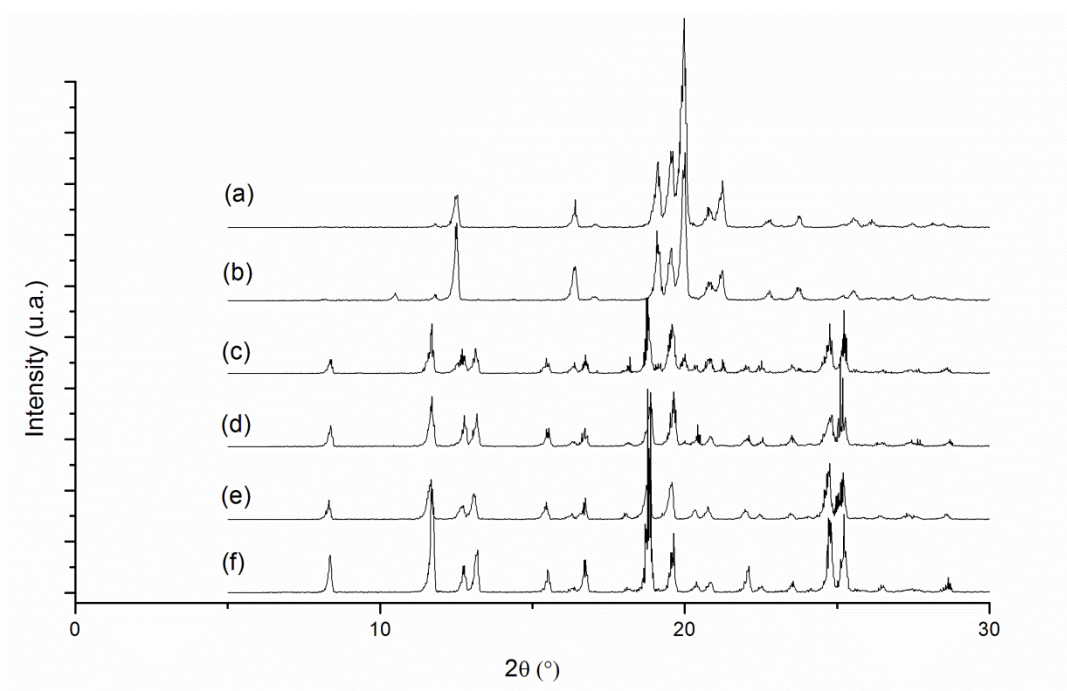


Figura 7 – Difratogramas de raio-X das amostras: (a) lactose p.a.; (b) lactose p.a. recristalizada; (c) SolSL_10 recristalizada; (d) SolSL_5 recristalizada; (e) sacarose p.a. recristalizada; (f) sacarose p.a..

Na Figura 7 observa-se também que os picos característicos para cada um dos açúcares apareceram nas mesmas posições quando puros ou nas amostras recristalizadas a partir de soluções. Isto pode ser tomado como um indicativo de que os parâmetros de rede cristalina são os mesmos para os dois tipos de amostra (SANTOS et al., 2005), indicando que a estrutura básica cristais não é alterada pela recristalização a partir de solução. No entanto, é possível notar que as proporções relativas destes picos nas amostras recristalizadas se alteram com relação àquelas observadas nos padrões. Estas

alterações foram quantificadas, e estão mostradas na Tabela 8, através das razões entre as intensidades de dois picos característicos de cada açúcar nas diferentes amostras. Observa-se que a recristalização promoveu alteração da proporção entre os picos. Estas alterações na intensidade relativa dos picos está provavelmente relacionada à desordem na rede cristalina (SANTOS et al., 2005). Esta informação é relevante no estudo de alimentos contendo os dois açúcares, nos quais parte do conteúdo total de açúcares cristalizados pode ser decorrente de processos de recristalização que ocorrem durante as etapas de processamento e armazenamento do produto.

Tabela 8 – Razão entre os picos característicos referentes a lactose e sacarose para amostras padrão e recristalizadas

Razão ($R_{2\theta/2\theta}$)	LA	SolL rec	SolSL_10 rec	SolSL_5 rec	SolS rec	SU
R _{12,54/16,40}	1	2	2	1	-	-
R _{19,98/16,40}	7	4	3	1	-	-
R _{18,78/8,36}	-	-	2	2	2	5
R _{18,78/25,28}	-	-	5	3	4	5

*rec após o nome da amostra indica a solução recristalizada.

4.2.2 Análises térmicas para sacarose p.a.

Os resultados das medidas para a sacarose p.a. utilizando equipamento tipo SDT são apresentados na Figura 8, com base nos dados obtidos para uma das amostras analisadas, visto que não se observou diferença significativa entre as triplicatas realizadas. A análise da curva de perda de massa ao longo da rampa de aquecimento mostra que não houve decréscimo da massa na temperatura de 100 °C, o que está de acordo com os resultados obtidos na análise de umidade em estufa, que indicaram que a sacarose utilizada apresentava menos de 0,01 % de umidade. Por outro lado, observa-se que a partir de 216 °C inicia um processo de perda de massa que pode ser atribuído à degradação da sacarose. No termograma da Figura 8 podem ser observados dois picos bem pronunciados, sendo que o primeiro (185.9 °C) está associado à fusão dos cristais (BECKETT et al., 2006; HURTTA; PITKÄNEN; KNUUTINEN, 2004; TE BOOY; RUITER; MEERE, 1992), enquanto o

segundo, em torno de 220,6 °C, pode estar associado ao processo de degradação da sacarose identificado nas curvas de perda de massa. Observa-se, ainda, a aparente presença de um terceiro pico, em torno de 158.0 °C, o qual também já foi reportado por outros autores (BECKETT et al., 2006; BHANDARI; HARTEL, 2002). A discussão detalhada sobre este suposto pico será realizada mais adiante, após a apresentação dos resultados de DSC e MDSC.

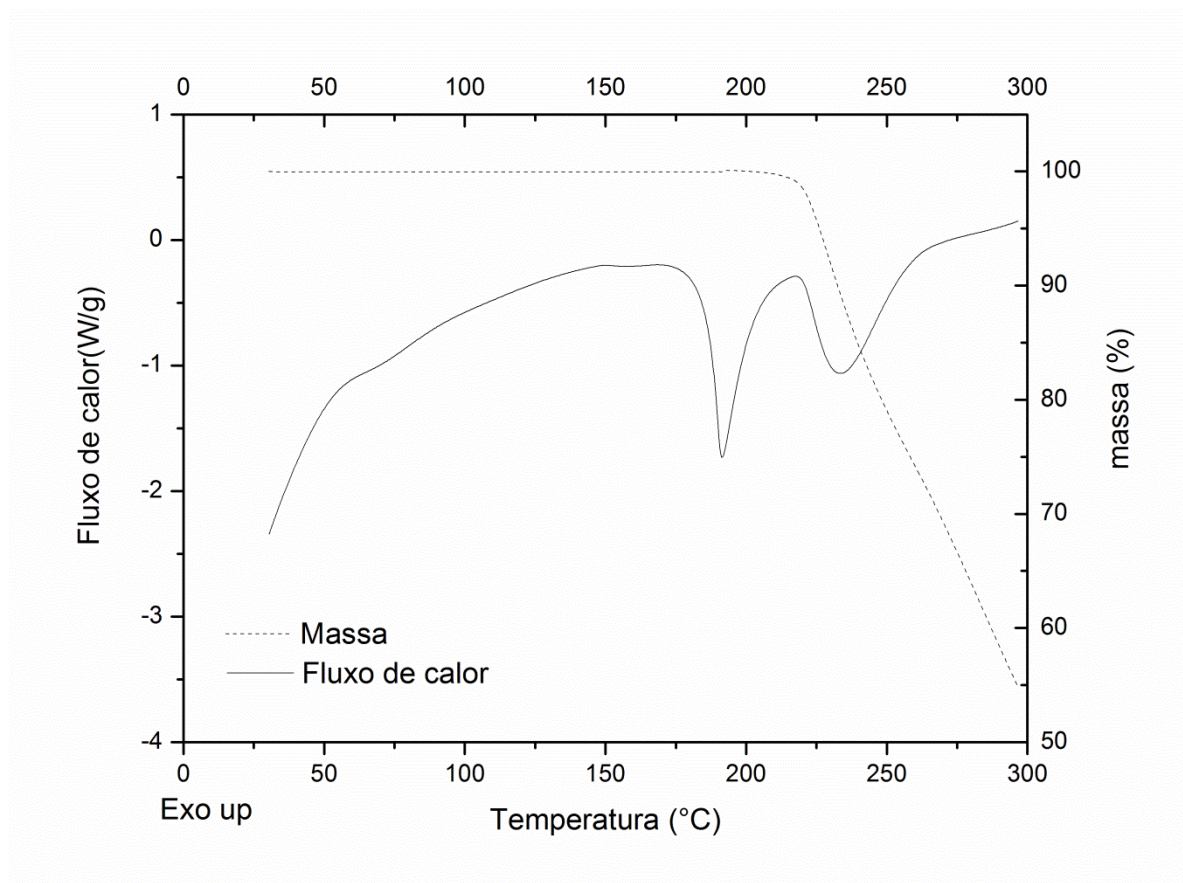


Figura 8 – Termograma obtido em SDT para sacarose p.a.

A comparação dos resultados obtidos para a amostra de sacarose p.a. nos três equipamentos de análise térmica utilizados (SDT, DSC e MDSC) é apresentada na Tabela 9, que mostra os valores dos parâmetros do pico de fusão (185,9 °C) obtidos por cada técnica, e na Figura 9, onde se visualiza os respectivos termogramas completos a fim de permitir uma comparação mais detalhada entre as respostas obtidas.

Tabela 9 – Valores de $\Delta H_{\text{fusão}}$ para sacarose p.a. em SDT, DSC e MDSC a 10°C/min com gás de arraste nitrogênio ultra puro (SDT: 100 mL/min; DSC e MDSC:50 mL/min)

	SDT	DSC	MDSC
T_{onset} (°C)	185,93 ± 0,0	183,62	176,45 ± 0,15
$\Delta H_{\text{fusão}}$ (J.g ⁻¹)	111,45 ± 1.2	131,0	128,20 ± 0,99
Pico (°C)	191,47 ± 0.2	190,77	189,84 ± 0,21

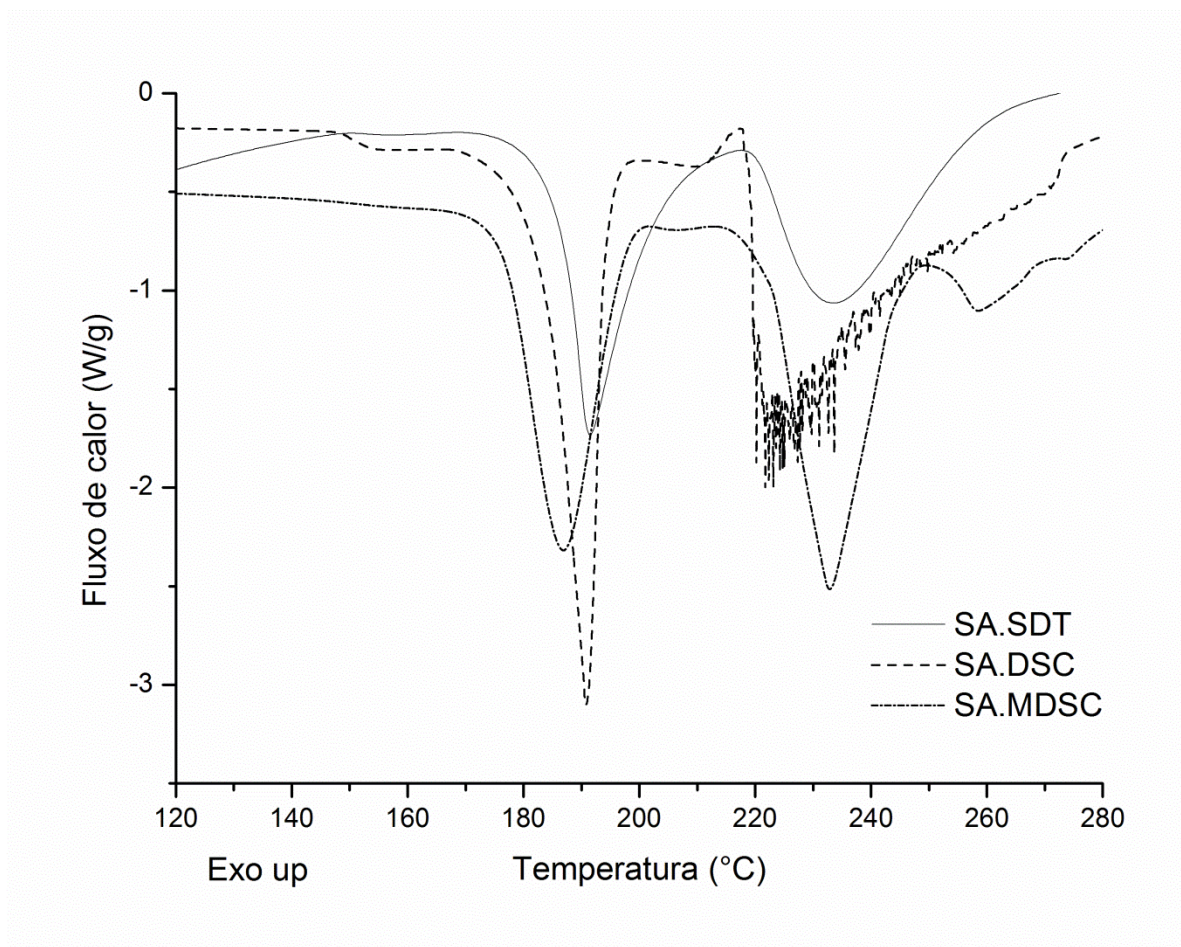


Figura 9 – Termograma obtido em SDT, DSC e MDSC para sacarose p.a.

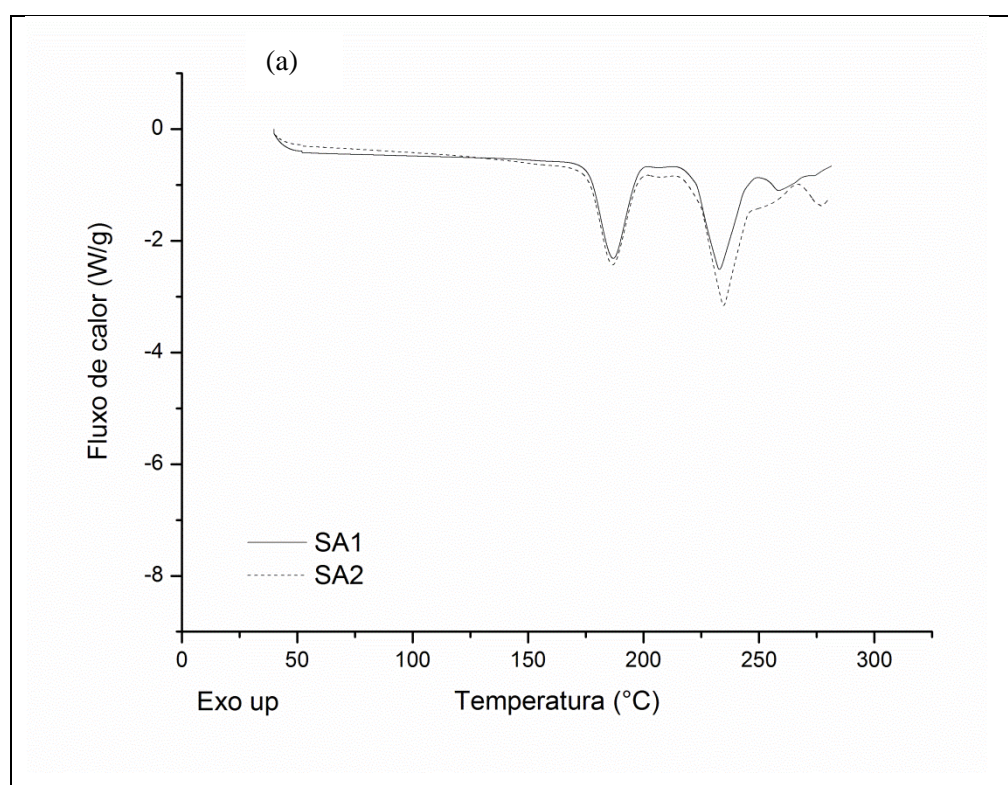
Os valores reportados na Tabela 9 estão dentro da faixa de valores encontrados por outros autores para a mesma taxa de aquecimento (BECKETT et al., 2006; TE BOOY; RUITER; MEERE, 1992). Observam-se ainda que os desvios padrões medidos são menores que 2 %, o que mostra a alta precisão de medida nos três aparelhos utilizados.

Com relação aos termogramas da Figura 9, cabe mencionar que no caso do uso de porta-amostras selados hermeticamente (DSC e MDSC), para a maioria das amostras analisadas o pico de degradação da sacarose não pôde ser definido com precisão, devido ao comportamento irregular como o que observado na Figura 9 para o termograma de DSC. Estas irregularidades podem ser atribuídas ao aumento de pressão no porta-amostras no final da rampa de aquecimento e sua conseqüente ruptura. Outro aspecto importante a ser ressaltado na Figura 9 é a diferença de forma observada para o pico de fusão nos três equipamentos, para a mesma taxa de aquecimento. Nesse sentido, deve-se salientar que em análise térmica, picos mais estreitos, para uma mesma amostra, indicam maior precisão na quantificação do processo associado ao pico (DANLEY, 2003) e, desta forma, maior exatidão de medida. O pico de fusão mais estreito da sacarose em DSC indica que a troca térmica ocorreu de forma mais eficiente e rápida comparada às outras técnicas o que indica maior sensibilidade do método. A troca térmica consiste em vários processos de transferência de energia ocorrida com a amostra dentro do cadinho, começando pela entrada de energia pelo cadinho, distribuição da energia de forma homogênea na amostra, fusão da sacarose e absorção da energia do sistema fato que diminui a temperatura do termopar provocando o fluxo de calor no forno do DSC. No SDT, devido ao fato do cadinho de alumina possuir menor condutividade térmica, quando comparado ao porta-amostra de alumínio utilizado em DSC e MDSC ($30 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ e $205 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$, respectivamente), o pico mais largo pode estar associado à maior resistência ao fluxo de calor entre a amostra e o termopar do equipamento e à demora da passagem de energia pela alumina. Outra possível causa para a maior largura do pico no SDT é o fato do contato da amostra com o fundo do porta-amostra no SDT não ser tão eficiente em comparação ao DSC, visto que no DSC a amostra é compactada antes da selagem do porta-amostra. Estas hipóteses estão de acordo com o fato de que tanto o início quanto o máximo do pico de fusão no SDT aparecem deslocados para temperaturas superiores com relação aos do pico de DSC.

A melhor definição do DSC com relação ao SDT também fica clara na análise do processo que acontece em torno de $158,0 \text{ }^\circ\text{C}$. No SDT este processo é identificado como um aparente pico de fusão, também já citado por Beckett et al. 2006, que reportaram para este pico calores de fusão de $1,1$ e $0,9 \text{ J.g}^{-1}$ para duas marcas de sacarose analisadas. Deve ser ressaltada a baixa magnitude destes valores, que são da mesma ordem que os desvios padrões apresentados na Tabela 9. Por outro lado, pelo termograma de DSC da Figura 9, fica

claro que o referido processo gera uma inflexão e não um pico, representando, na verdade, um processo de transição vítrea.

Com relação ao termograma obtido por MDSC apresentado na Figura 9, observa-se um pico de fusão mais largo do que aquele encontrado no DSC. Isto é a princípio surpreendente, visto que a técnica de MDSC é mais sensível que o DSC convencional (JIN et al., 1996; RAHMAN; AL-MARHUBI; AL-MAHROUQI, 2007; VERMEER; NORDE, 2000). Para avaliar mais detalhadamente este resultado, são apresentados na Figura 10 os termogramas sobrepostos para as repetições de sacarose p.a. em MDSC para fluxo de calor total (Figura 10a), fluxo de calor reversível (Figura 10b) e fluxo de calor irreversível (Figura 10c).



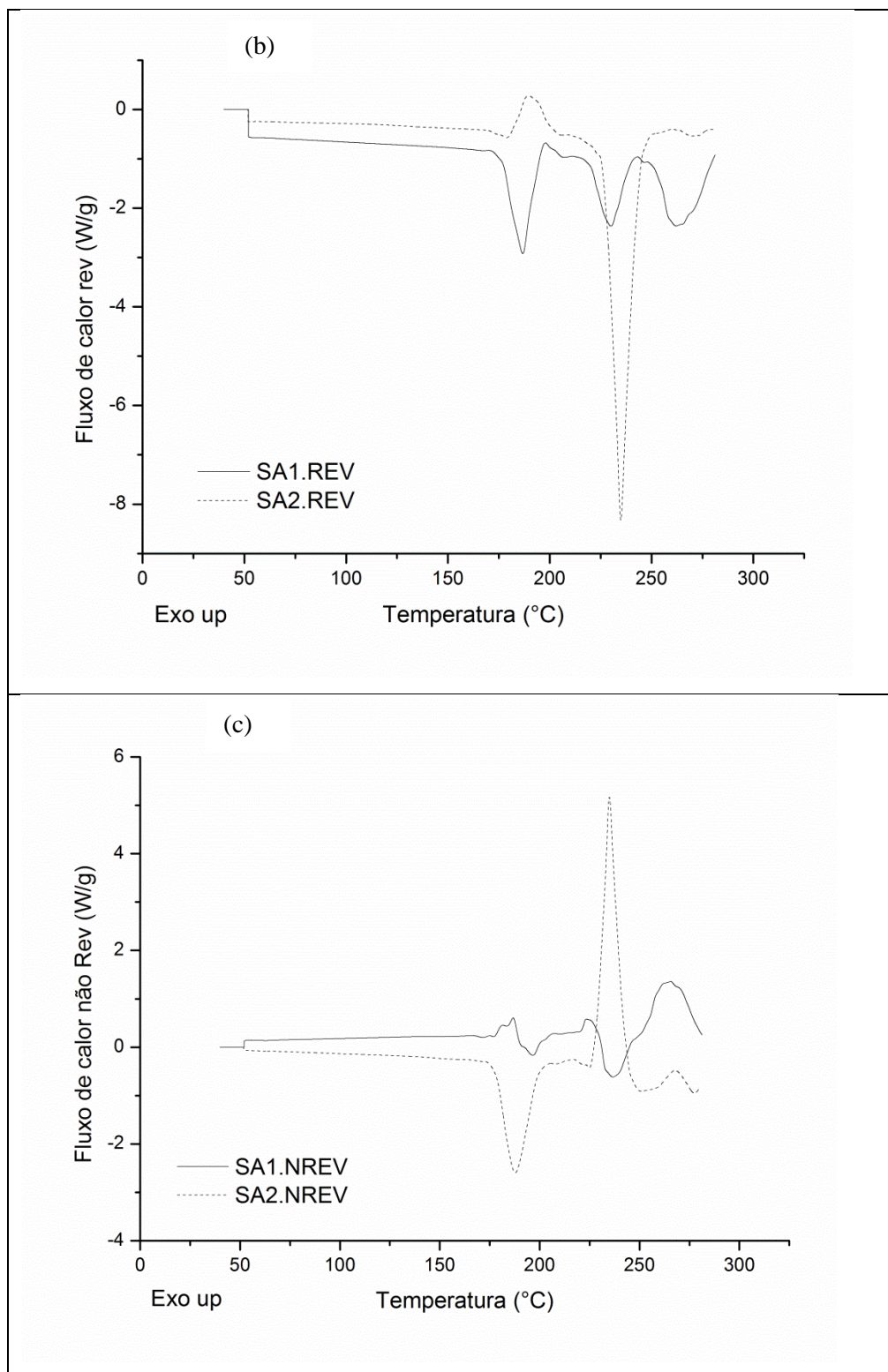


Figura 10 – Termogramas em MDSC para as repetições de sacarose p.a.

Na Figura 10 observa-se que os termogramas correspondentes ao fluxo de calor total foram similares para as duas repetições, apesar de apresentarem uma repetibilidade menor

do que a geralmente observada para outros tipos de amostra, como polímeros fundidos. No entanto, os termogramas referentes às parcelas de fluxo de calor reversível e irreversível apresentam, em algumas regiões, picos espelhados, isto é, revertidos (endo/exotérmico) entre as repetições, além de variações significativas em suas áreas.

A boa repetibilidade observada na Figura 10 para os termogramas correspondentes ao fluxo de calor total mostram que existe realmente uma diferença significativa entre os picos de fusão medidos por MDSC e DSC. A maior largura do pico de fusão no MDSC pode ser consequência do fato de que, apesar de ter sido empregada a mesma taxa global de aquecimento nos dois casos (10 °C/min), a história térmica utilizada nas duas técnicas é diferente devido à variação senoidal de temperatura utilizada no MDSC. Isto faz que a temperatura no MDSC oscile com o tempo entre valores maiores e menores que os correspondentes em DSC. O comportamento senoidal da variação da temperatura em MDSC comparado ao aquecimento linear em DSC, na faixa de temperatura em que aparece o pico de fusão da sacarose, podem ser vistos na Figura 11. Como a temperatura na qual inicia a decomposição da sacarose é dependente da taxa de aquecimento, sendo menor a taxas menores de aquecimento (Lee, 2010), o histórico térmico do MDSC pode possibilitar que algum nível de decomposição aconteça em temperaturas menores, gerando um desaparecimento adicional de cristais por decomposição do açúcar em lugar do processo de fusão puramente térmico aumentando, desta forma, a largura do pico de fusão medido.

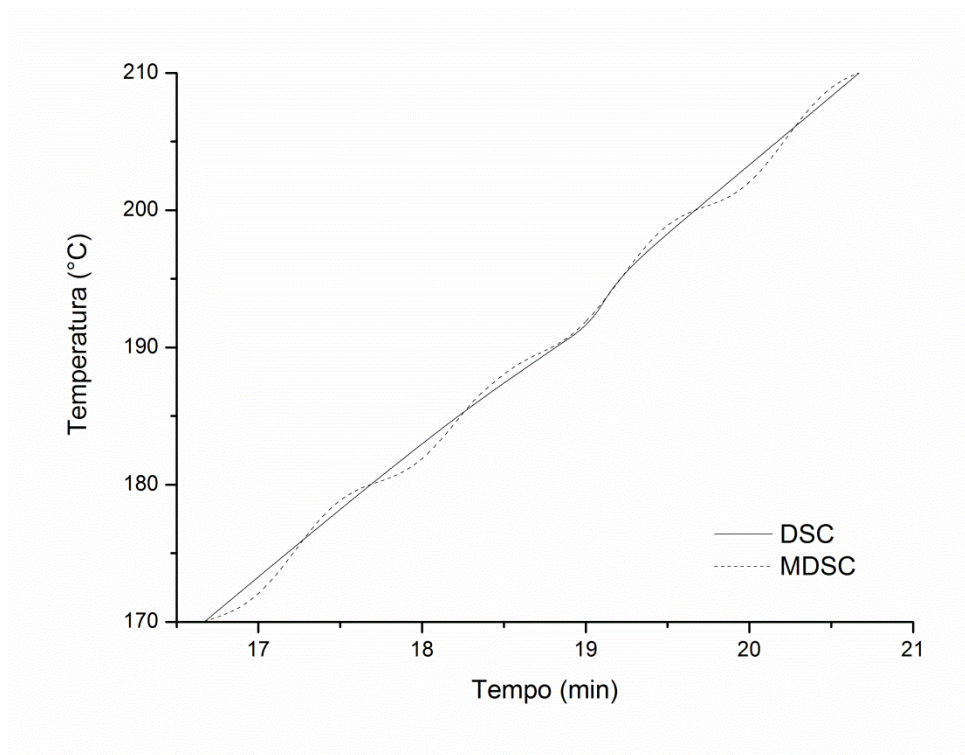


Figura 11 – Comparativo da variação de temperatura entre DSC e MDSC na faixa de temperatura de fusão da sacarose p.a. para uma amostra.

O outro problema observado, ou seja, a reversão de picos entre repetições nos termogramas de fluxo de calor reversível e irreversível, é ainda mais difícil de justificar ou explicar. Neste sentido a primeira hipótese levantada está relacionada à provável alteração do meio em que a amostra se encontra causada pelo rompimento do selo hermético do porta-amostra. Este rompimento afeta o fluxo de calor e, devido ao fato do forno ser fechado, não é possível detectar a temperatura exata em que este evento ocorre. Ao romper o porta-amostra, a atmosfera na qual a amostra se encontra é modificada, sendo este um fator que pode direcionar o fluxo de calor. Em meios oxidantes ocorrem degradações exotérmicas, enquanto que em meios inertes as degradações possuem caráter endotérmico. Para as análises realizadas neste trabalho a degradação poderia deixar de ser exotérmica (em presença de ar) e passar a ser endotérmica em meio inerte (N_2). Além disso, é preciso levar em conta os seguintes fatores: (i) o tamanho do orifício aberto durante o rompimento também afeta a natureza do fluxo de calor medido; (ii) o rompimento do selo hermético é o resultado final de um processo de aumento da pressão interna do porta-amostras selado. Com relação a este último aspecto, deve-se mencionar que a dinâmica da variação desta modificação de pressão depende da quantidade exata de amostra na cápsula e da porosidade

final da amostra prensada, podendo variar entre uma repetição e outra. A segunda hipótese está relacionada ao fato de que a taxa de aquecimento de 10 °C/min possa ser muito alta e não permita uma separação confiável dos sinais em MDSC.

4.2.3 Análises térmicas para lactose p.a.

Também para a lactose p.a. as medidas utilizando equipamento tipo SDT não apresentaram diferenças significativas entre as triplicatas, de forma que somente os dados de uma das repetições são apresentados na Figura 12.

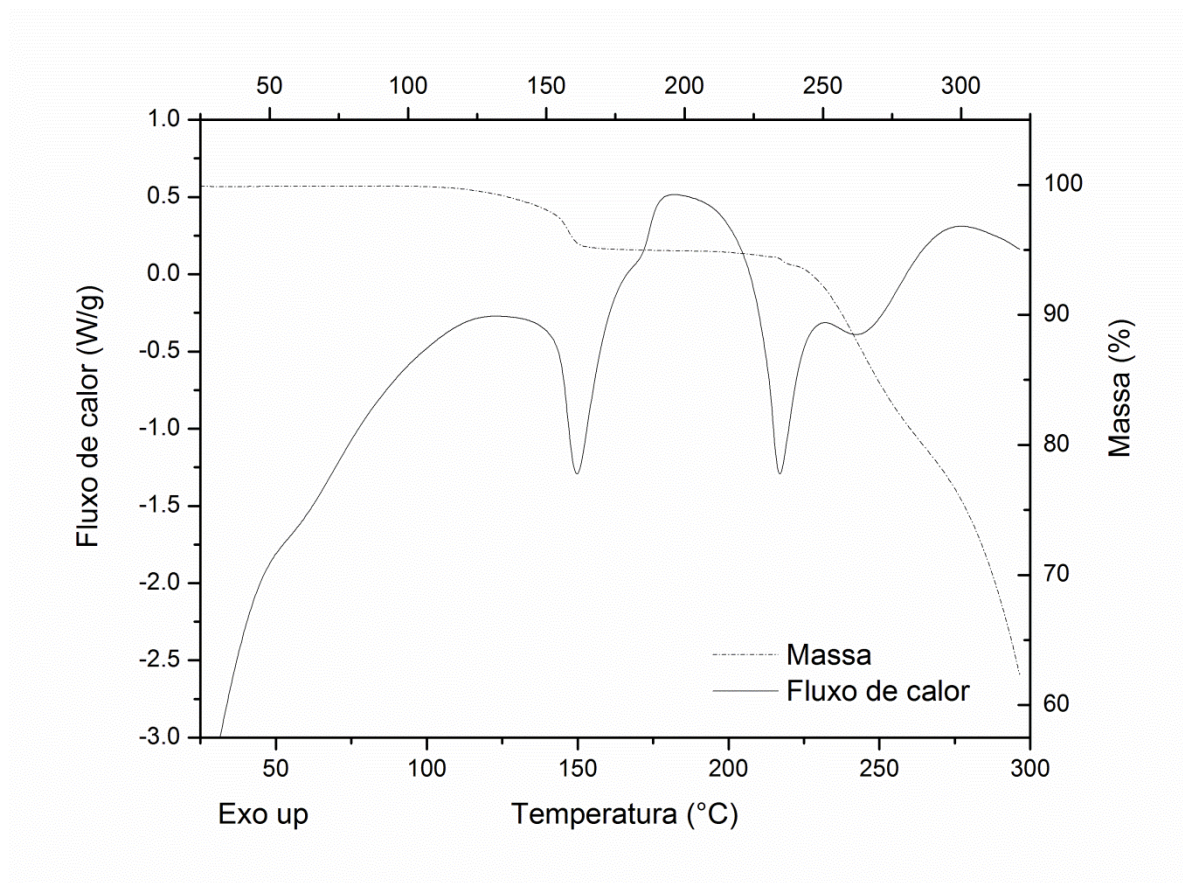


Figura 12 – Gráfico obtido em análise em SDT para lactose p.a.

A análise da curva de perda de massa ao longo da rampa de aquecimento mostra que não houve decréscimo mássico na temperatura em torno de 100°C, o que está de acordo com os resultados obtidos na análise de umidade em estufa, que indicaram que a lactose utilizada

apresentava menos de 0,03 % de umidade. O primeiro processo de perda de massa, acima de 120 °C e valor médio de perda de água de 4,8%, está associado à desidratação das moléculas de lactose. Finalmente, para temperaturas a partir de aproximadamente 205 °C, observa-se uma diminuição progressiva de massa, relacionada à degradação da lactose.

No termograma da Figura 12 são observados dois picos endotérmicos de maior intensidade. O primeiro, com início em 143,8°C e mínimo em 150,1°C, é resultado da desidratação das moléculas de lactose (ISLAM; LANGRISH, 2010; LISTIOHADI et al., 2009). O segundo, com início em 212,5 °C e mínimo em 220,0 °C, tem interpretação mais controversa. Apesar de alguns autores assumirem que este pico é devido à fusão dos cristais de lactose e reportam valores de calor de fusão calculados a partir da integração direta deste pico (DRAPIER-BECHE et al., 1997; GOMBÁS et al., 2003; ISLAM; LANGRISH, 2010; LISTIOHADI et al., 2009), a comparação do termograma com a curva de perda de massa mostra que a fusão ocorre simultaneamente à decomposição da lactose. Desta forma, o valor de ΔH obtido na integração deste pico é o resultado da soma das contribuições de dois eventos térmicos sobrepostos (fusão e decomposição). Na Figura 12 observa-se ainda um terceiro processo que ocorre em torno de 170 °C, que pode corresponder a um pico ou a uma modificação da linha de base do termograma. Este comportamento foi observado também por outros autores, sendo atribuído a uma mudança da forma cristalina, de α -lactose para β -lactose (ISLAM; LANGRISH, 2010; LISTIOHADI et al., 2009). É importante ainda ressaltar que de acordo aos picos identificados é possível afirmar que a lactose p.a. utilizada neste trabalho apresenta as características referentes à lactose α -monoidratada descritas por Listiohadi et al. (2009), confirmando os resultados obtidos em DRX apresentados na Seção 4.2.1.

A Figura 13 contém os termogramas obtidos para a análise de lactose p.a. em SDT, DSC e MDSC. Assim como na análise de sacarose (Seção 4.2.2), observa-se algumas diferenças marcantes na comparação dos termogramas obtidas pelas três técnicas. Com relação ao primeiro dos três eventos observados no termograma obtido por SDT, nota-se que o pico correspondente à desidratação da α -lactose monoidratada é identificado nos três equipamentos, na faixa de temperaturas de 136 a 200 °C. No entanto, o processo que aparece no termograma de SDT como um ombro ou perturbação na linha de base em torno de 170 °C é identificado como um segundo pico endotérmico no DSC e no MDSC (com início e mínimo em 190 °C no DSC e em 164 °C com mínimo em 173 °C no MDSC). A existência deste pico para a lactose foi observada também por Listiohadi et al. (2009) (a

aproximadamente 177 °C), que o atribuíram à anomerização da lactose (mutarrotação de α para β -lactose), a qual pode ocorrer na presença de água. Assim, a ocorrência desta anomerização em estudos em DSC com porta-amostra selado pode ser atribuída à presença de vapor de água após a desidratação das moléculas de lactose, conforme proposto por Angberg (1995). Portanto, a diferença entre as respostas encontradas em DSC e MDSC comparadas com a obtida em SDT poderia ser atribuída à diferença de concentração de vapor d'água na atmosfera em contato com a amostra durante a medida. No SDT, no qual se utiliza um porta-amostras aberto, com circulação de nitrogênio na atmosfera de análise, espera-se uma menor concentração de vapor em torno da amostra e uma consequente redução de intensidade do pico de anomerização. Ainda com relação ao pico de anomerização, é importante mencionar a grande variação na temperatura de mínimo e na largura dos picos obtidos em DSC e MDSC. A eficiente troca térmica que ocorre em DSC, verificada pela formação de um pico bem definido e estreito, provavelmente está relacionada à taxa linear de aquecimento deste equipamento. Supõe-se neste caso que o histórico térmico ocorrido em MDSC (oscilações de temperatura devido ao aquecimento senoidal) seja responsável pela solubilização de parte da lactose de forma antecipada quando comparado ao ocorrido em DSC.

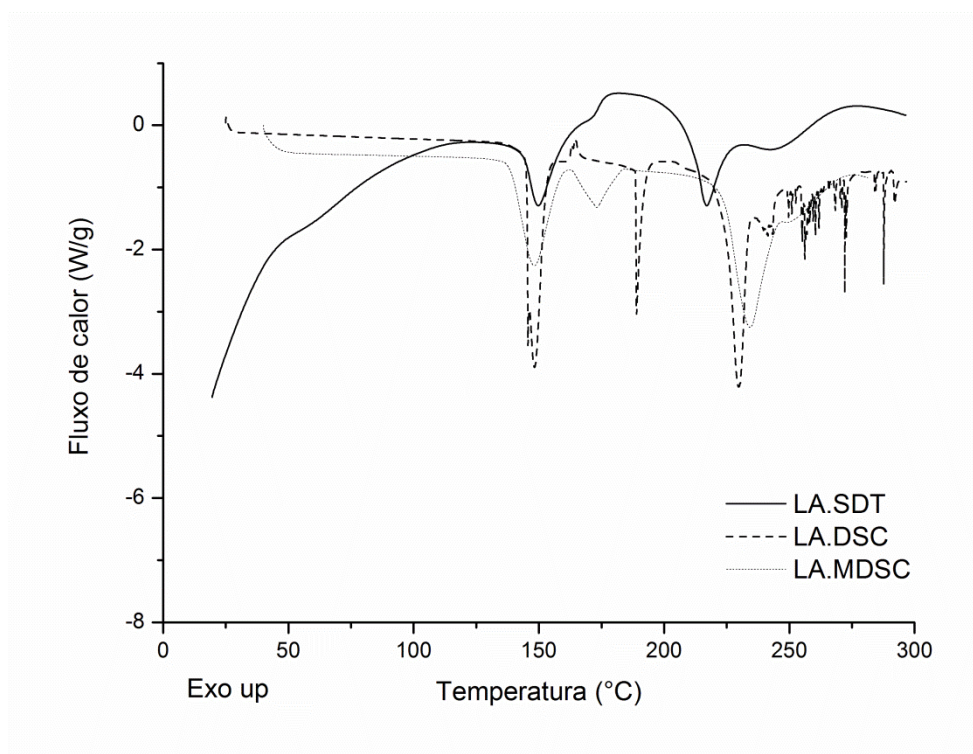
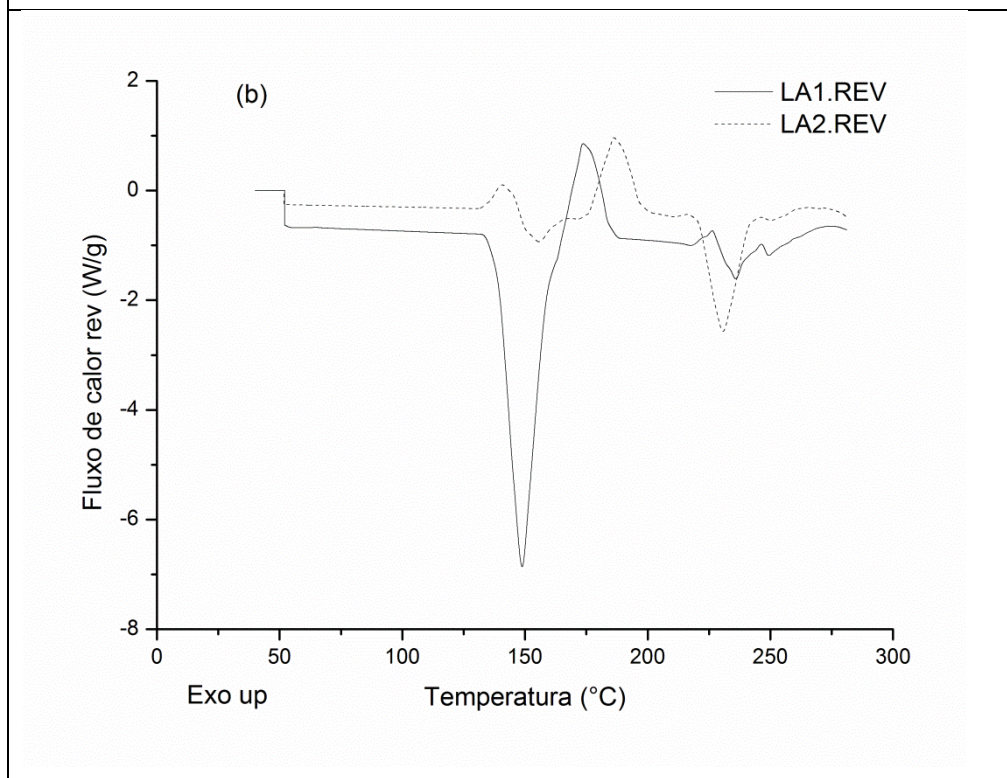
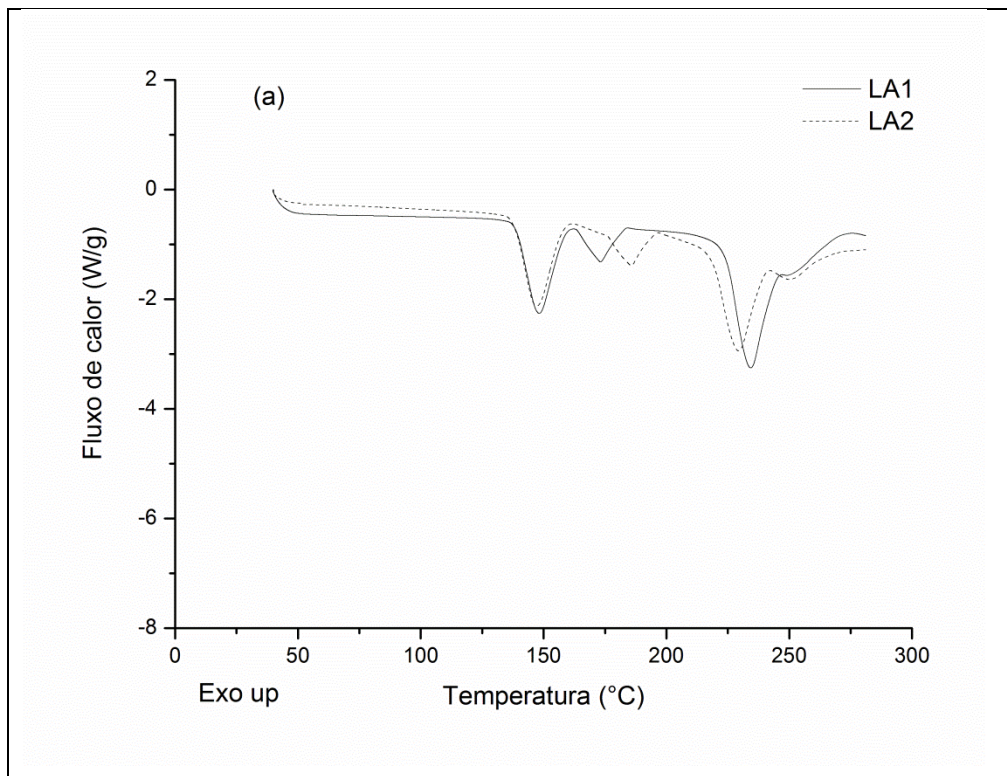


Figura 13 – Termograma obtido em SDT, DSC e MDSC para lactose p.a.

O pico de fusão foi evidentemente melhor representado em DSC com T_{onset} de 225°C e mínimo em 230°C, sendo mais estreito e intenso, quando comparado aos picos obtidos em MDSC e SDT. Isto se justifica pelo fato de que quando não há atraso térmico entre amostra e equipamento, as temperaturas de início e fim do pico são ligeiramente mais baixas e, assim, o retorno de linha de base no final da fusão é muito mais rápido, o que corresponde a uma melhor resposta com maior resolução (DANLEY, 2003). Nota-se ainda que os picos de fusão em DSC e MDSC aparecem a uma temperatura maior quando comparados ao observado por SDT. Esse efeito está provavelmente relacionado à extensão de anomerização ocorrida durante a análise em cada equipamento, visto que a β -lactose apresenta temperatura de fusão mais elevada do que a α -lactose monoidratada (Angberg 1995; Listiohadi et al. 2009). Um último aspecto a mencionar com relação às características do pico de fusão lactose em cada equipamento é que, mesmo com a melhor definição deste pico no DSC, pode-se afirmar que em nenhum dos três equipamentos foi possível evitar completamente a sobreposição dos processos de fusão e degradação. Isso sugere que é inviável determinar o grau de cristalinidade da lactose a partir dos valores de ΔH obtidos por calorimetria.

A Figura 14 apresenta os termogramas sobrepostos para as repetições de lactose p.a. em MDSC para fluxo de calor total (Figura 14a), fluxo de calor reversível (Figura 14b) e fluxo de calor irreversível (Figura 14c). Observa-se que não foi possível obter a separação das contribuições reversíveis e irreversíveis do fluxo de calor no estudo térmico da lactose. Assim como ocorreu para as repetições de sacarose (Seção 4.2.2), foram evidenciadas contribuições extremamente diferentes entre as repetições. Acredita-se que as possíveis causas para este comportamento anômalo sejam as mesmas discutidas para o caso da sacarose, i.e., dinâmica de variação de pressão, ruptura do porta-amostras, características da atmosfera nas proximidades da amostra e taxa de aquecimento elevada. Os dados da Tabela 10, que apresenta os percentuais do fluxo total de calor representados pelas parcelas de fluxo de calor reversível e irreversível, servem como suporte para a afirmação anterior, pois mostra que as contribuições relativas destes fluxos variam significativamente entre repetições para os três picos analisados, apesar de que a variação entre amostras em termos de fluxo total de calor é baixa.



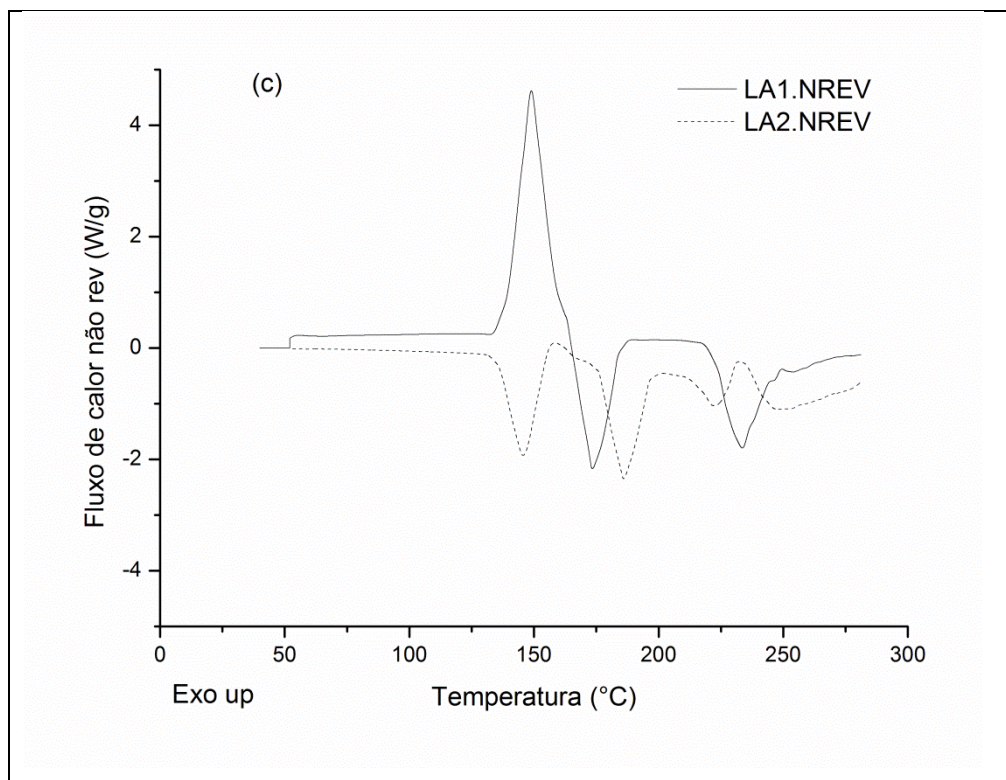


Figura 14 – Termogramas em MDSC para as repetições de lactose p.a..

Tabela 10– Valores de ΔH para de lactose p.a. em MDSC por repetição e respectiva contribuição por fluxo de calor reversível e irreversível (percentual) para os picos de desidratação, cristalização e fusão.

	Pico de Desidratação		Anomerização da lactose		Pico de Fusão	
	ΔH LA(1)	ΔH LA(2)	ΔH LA(1)	ΔH LA(2)	ΔH LA(1)	ΔH LA(2)
Total ($J.g^{-1}$)	111,2	112,1	36,5	34,0	142,3	126,4
Reversível (%)	58,3	6,1	43,5	41,6	13,9	92,7
Irreversível (%)	41,7	93,9	56,5	58,4	86,1	7,3

*Os números (1) e (2) referem-se as repetições da amostra LA.

Os resultados apresentados até este ponto, tanto para sacarose como para lactose, indicam que as condições da atmosfera ao redor da amostra e, portanto, o tipo de porta-amostras utilizado, podem gerar diferenças significativas nos resultados da análise calorimétrica destes açúcares. Além disso, foi feita também a hipótese de que este fator é uma das causas principais para que efeitos não observados na análise calorimétrica de outros materiais tenham lugar na análise dos açúcares em estudo, como é o caso da grande variação

entre as parcelas de fluxo reversível e irreversível na comparação entre repetições. A fim de encontrar suportes mais definitivos para tais hipóteses, foram definidas três análises adicionais. A primeira consistiu em comparar os resultados obtidos em DSC com porta-amostras selado utilizando amostras de lactose de massa diferente. Na segunda compararam-se os resultados obtidos em DSC com amostras de lactose de mesma massa utilizando porta-amostras selado e porta-amostras com furo. A terceira consistiu na comparação dos resultados obtidos em MDSC em duas análises de lactose feitas utilizando porta-amostras com furos.

A comparação dos resultados obtidos em DSC com porta-amostras selado utilizando amostras de lactose de massa diferente é apresentada na Figura 15. Observa-se que apesar das duas massas utilizadas (3,7 g e 5,5 mg) estarem na faixa usual de massas sugeridas para análise por DSC, os resultados obtidos em cada caso foram significativamente diferentes entre si. Uma destas diferenças é o nível de irregularidade observado nos termogramas em temperaturas superiores a aproximadamente 230 °C. O termograma da amostra de maior massa é bem mais irregular nesta região, sendo que as oscilações no termograma acontecem provavelmente a partir da ruptura do selo do porta-amostras e as oscilações observadas podem ser atribuídas a obstruções temporárias do ponto de ruptura. Por outro lado, na amostra de menor massa, na qual se tem menor quantidade de água liberada e maior volume livre para ser ocupado pela massa de água evaporada, se espera que menores pressões sejam atingidas, justificando o fato de que, para esta amostra, aparentemente, não ocorreu ruptura do porta-amostras e obteve-se um termograma regular na região considerada. A maior concentração de vapor d'água na atmosfera e maiores pressões atingidas na análise da amostra de maior massa também estão de acordo com o fato de que esta amostra apresenta um pico de anomerização pronunciado, enquanto que na análise de menor massa, este pico não foi perceptível.

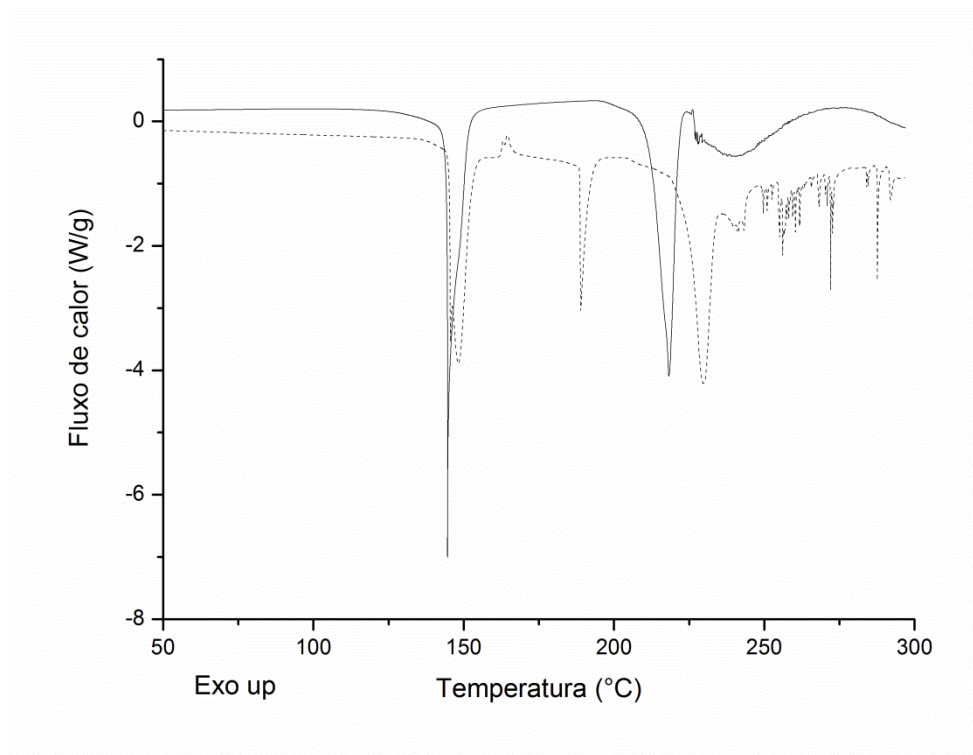


Figura 15 – Termogramas obtidos em DSC com diferentes massas de lactose (3,7 mg e 5,5 mg). A linha contínua refere-se a amostra de 3,7 mg e a linha pontilhada refere-se a massa de 5,5 mg.

A Figura 16 apresenta os resultados obtidos em DSC com duas amostras de 5,5 mg de lactose, uma utilizando porta-amostras selado e outra porta-amostras com furo. Observa-se que o termograma obtido com o porta-amostras com furo é muito similar ao apresentado na Figura 9 para análise em porta-amostras selado com massa de 3,7 mg, com maior regularidade do termograma para altas temperaturas e ausência de pico perceptível de anomerização, o que está de acordo com a menor concentração de vapor d'água na proximidade da amostra quando da utilização do porta-amostras com furo.

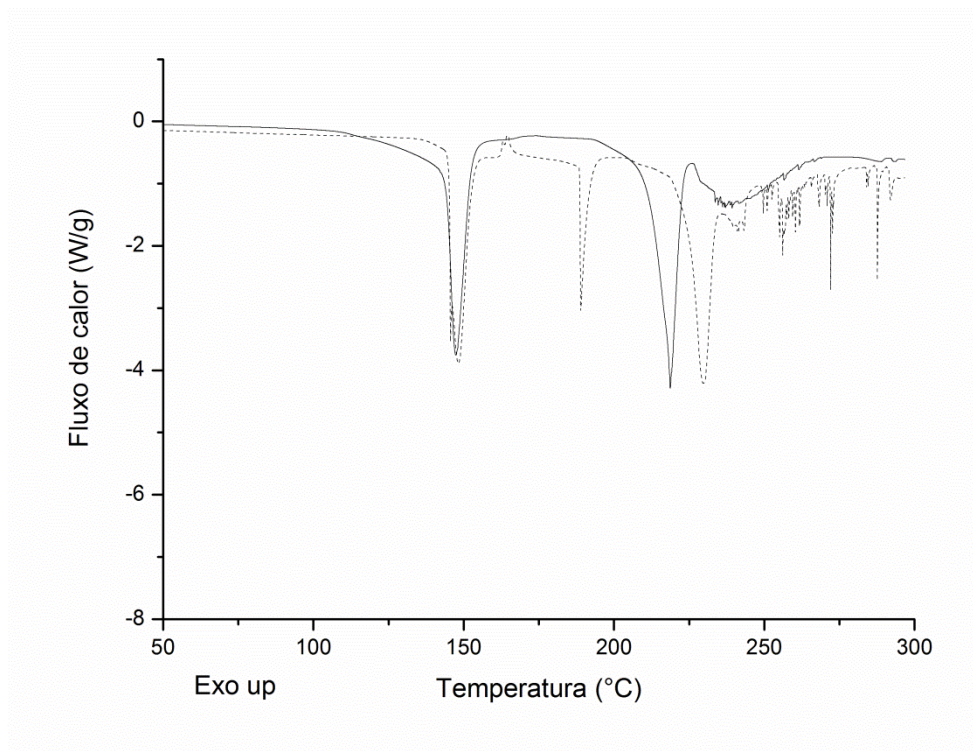
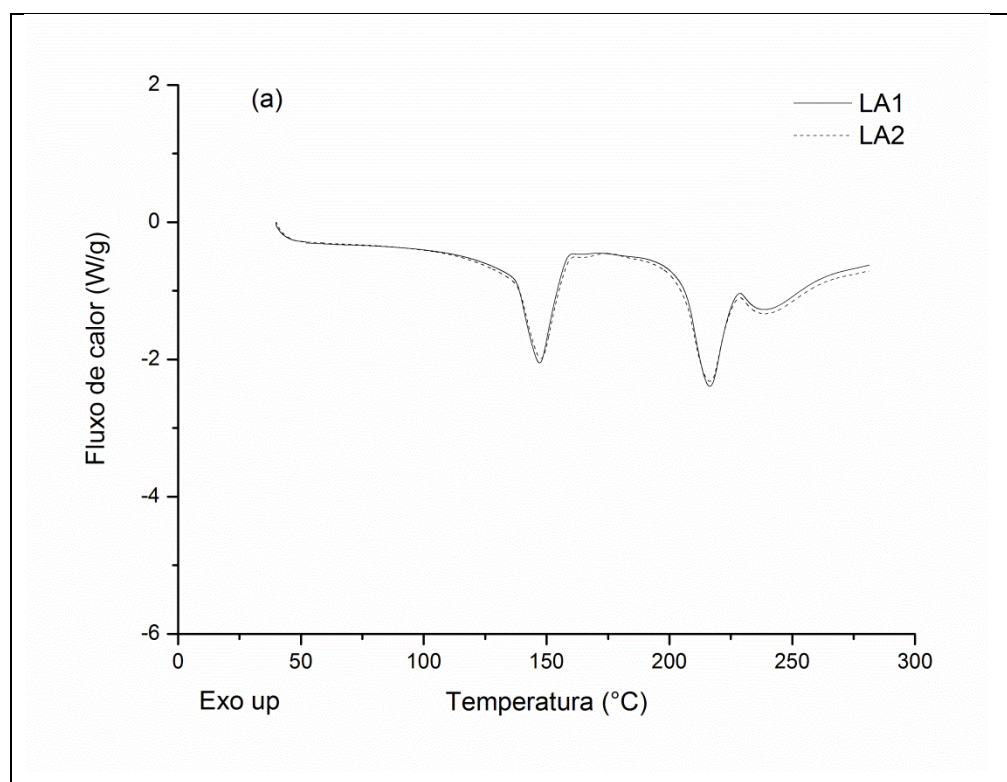


Figura 16 – Termogramas em DSC para as repetições de lactose p.a. em porta-amostra com furo. A linha pontilhada refere-se a amostra analisada em porta-amostra hermeticamente selado enquanto a linha contínua refere-se a amostra analisada em porta-amostra com furo.

Os comparativos dos resultados obtidos em MDSC em duas análises de lactose feitas utilizando porta-amostras com furos estão apresentados na Figura 17. Da mesma forma como aconteceu na análise de DSC em porta-amostras com furo (Figura 16), o pico de anomerização não foi perceptível. Além disso, com a utilização do cadinho com furo foi possível obter para as direções dos fluxos de calor reversível (Figura 17b) e irreversível (Figura 17c) o mesmo nível de reprodutibilidade obtido para o fluxo de calor total (Figura 17a), o que não foi observado nos ensaios em cadinhos selados hermeticamente (Figura 14b,c). Este resultado é importante pois permite que a informação proveniente do MDSC seja aproveitada de maneira mais efetiva para a compreensão dos processos que acontecem com a lactose durante o aquecimento na faixa de temperaturas analisada. No termograma de fluxo de calor reversível (Figura 17b) têm-se dois picos endotérmicos. O pico endotérmico em aproximadamente 150,0°C refere-se, possivelmente, ao processo de desidratação da α -lactose monoidratada, enquanto que o pico em 218,0°C está relacionado à fusão α -lactose monoidratada. No termograma de fluxo de calor irreversível (Figura 17C) verifica-se também a presença de dois picos, porém neste caso exotérmicos. Com relação ao pico

exotérmico irreversível em 150 °C, não foi possível a identificação de sua natureza; além disso, não foram encontradas na literatura referências a este pico. O pico irreversível em 220 °C está, possivelmente, associado ao processo de degradação da lactose. A comparação deste pico com o pico reversível na mesma região (Figura 17b) mostra que a análise por MDSC permitiu separar adequadamente as contribuições dos picos de fusão e de degradação. Além disso, o termograma da Figura 17c parece apresentar ainda um terceiro pico exotérmico na região de final da faixa de temperaturas, o qual pode estar associado a um segundo processo de degradação e estaria de acordo com o comportamento observado e apresentado na curva de perda de massa da Figura 12. Ainda com relação à região de 220 °C é importante ressaltar que a interpretação geralmente realizada para aos dois picos (fusão e degradação) que aparecem nos termogramas de DSC (ou no termograma de fluxo de calor total do MDSC) pode não ser correta. Diante da soma das contribuições reversíveis e irreversíveis na região de 200 a 270 °C, o segundo pico ou ombro que aparece nesta região na curva de DSC não seria o pico de degradação, mas sim uma parcela do pico endotérmico de fusão da lactose que sobra da soma com a contribuição exotérmica do processo de degradação.



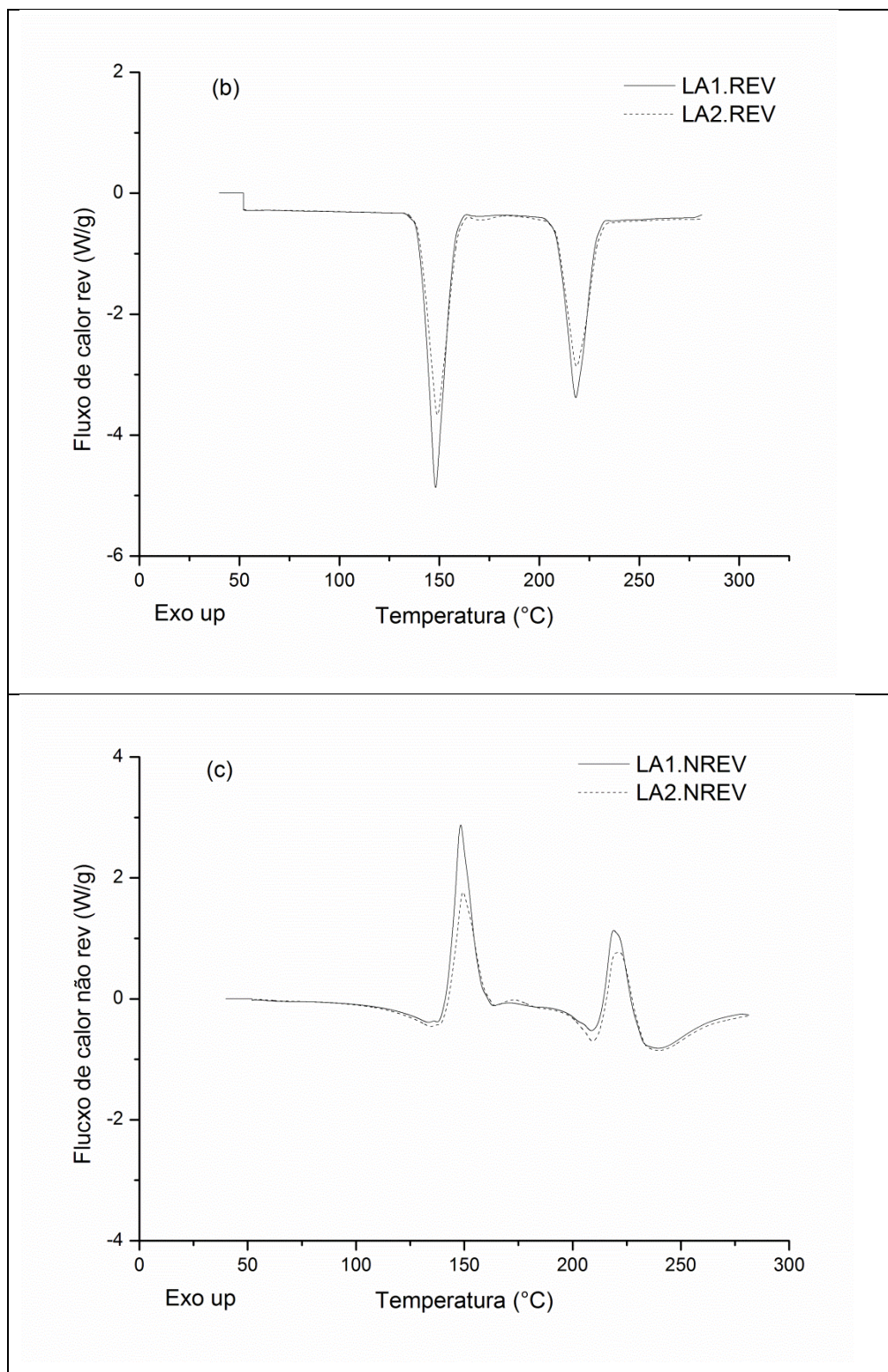


Figura 17 – Termogramas em MDSC para as repetições de lactose p.a. em porta-amostras com furo

4.2.4 Caracterização térmica das misturas dos padrões

Os resultados de análise térmica apresentados para os respectivos padrões p.a. de sacarose e lactose evidenciam um aspecto limitante para a avaliação da cristalinidade de misturas, que consiste no fato de que os componentes puros apresentam eventos energéticos em faixas de temperaturas que são coincidentes. No entanto, na hipótese de não ocorrer na mistura nenhum tipo de efeito sinérgico entre os processos térmicos relativos a cada componente, existiria ainda a possibilidade de obter do termograma da mistura informação sobre os eventos relativos a cada componente na análise de misturas de composição conhecida. Para isso, foi utilizado o MATLAB como ferramenta para separação de partes dos termogramas de interesse para estudos comparativos entre as misturas e respectivos padrões. Tratamento dos dados obtidos em análises térmicas para as misturas dos padrões utilizando MATLAB será descrito a seguir.

A primeira etapa estabelecida para o uso do MATLAB como ferramenta para possibilitar a comparação entre os termogramas das misturas estudadas neste trabalho foi a importação/transferência de dados das análises obtidas em SDT. Para isso, inicialmente foi necessário implementar um procedimento de interpolação de pontos e uma definição de tamanho de vetor de entrada para os dados (colunas de fluxo de calor e temperatura). Este procedimento tem o objetivo de gerar pontos igualmente espaçados na escala de temperatura e, desta forma, facilitar/possibilitar as operações subsequentes de tratamento dos dados. As Figuras 18 e 19 apresentam os dados brutos e os dados interpolados para uma repetição da análise térmica de sacarose e uma repetição de lactose, respectivamente. Nestas figuras verifica-se a sobreposição das curvas correspondentes aos dados brutos (linha azul) e dados interpolados (linha verde), indicando a adequação do procedimento implementado.

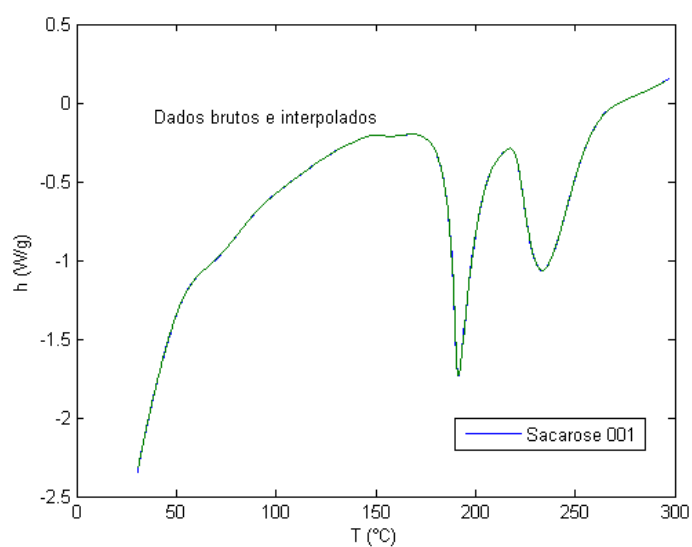


Figura 18 – Curva de dados brutos e curva de dados interpolados para mistura de lactose e sacarose.

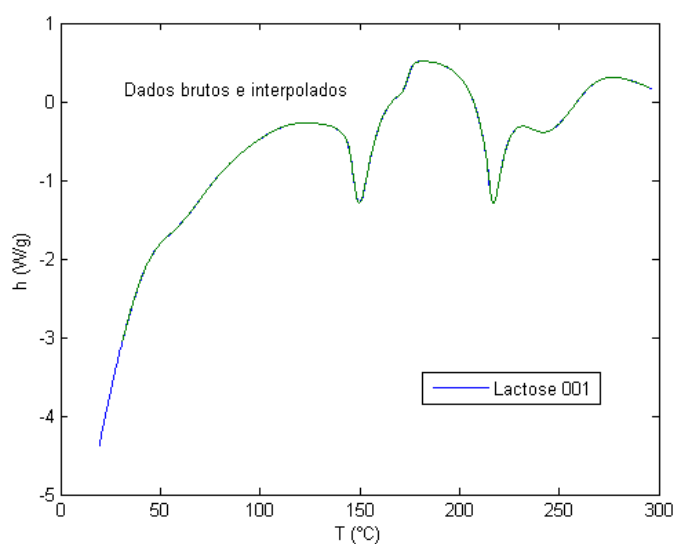


Figura 19 – Curva de dados brutos e curva de dados interpolados para mistura de lactose e sacarose.

O procedimento foi testado também para cada um dos conjuntos de dados provenientes da análise em SDT das misturas. Na Figura 20 estão mostradas as curvas obtidas com os dados brutos e com os dados interpolados para uma mistura que assim como foi evidenciado para os padrões, também estão sobrepostas.

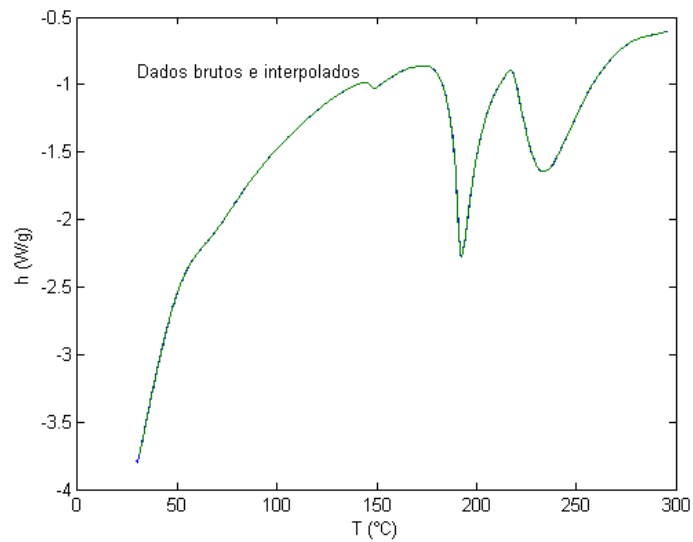


Figura 20– Curva de dados brutos e curva de dados interpolados para mistura de lactose e sacarose.

Na segunda etapa deste estudo foram implementados no MATLAB os procedimentos para análise de regiões específicas dos termogramas de interesse. Estes procedimentos incluíram: (i) especificação dos limites de temperatura da região de interesse; (ii) criação de dois vetores contendo a informação extraída (valores de temperatura e fluxo de calor) do termograma interpolado na região de interesse; (iii) estabelecimento de uma linha de base com base nos extremos do intervalo escolhido; (iv) subtração da linha de base dos dados originais. A Figura 21 mostra um exemplo da aplicação destes passos, onde se tem o termograma original (Figura 21a) e o resultado final da aplicação dos referidos passos (Figura 21b). Na Figura 21a podem ser vistos o termograma original (linha azul), o termograma interpolado (linha verde sobreposta ao termograma original), a região de dados selecionada (linha vermelha) e a linha de base correspondente (reta verde).

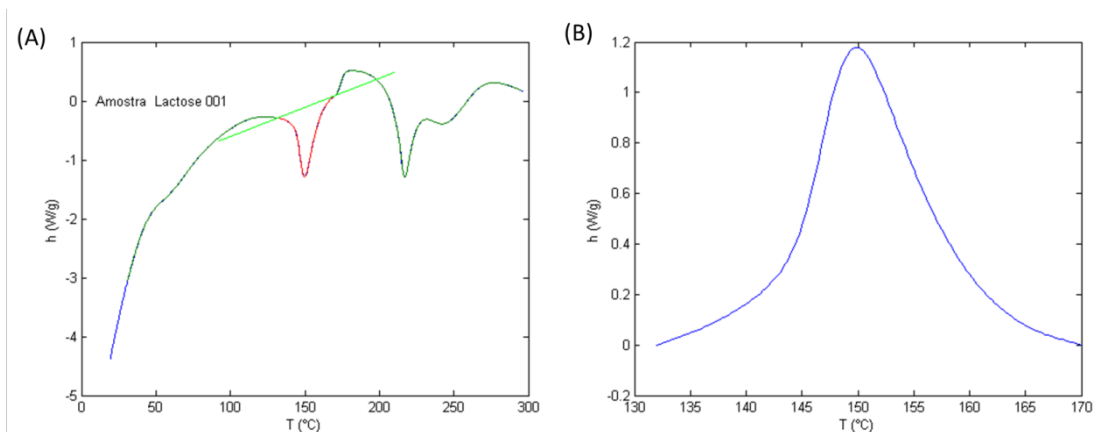
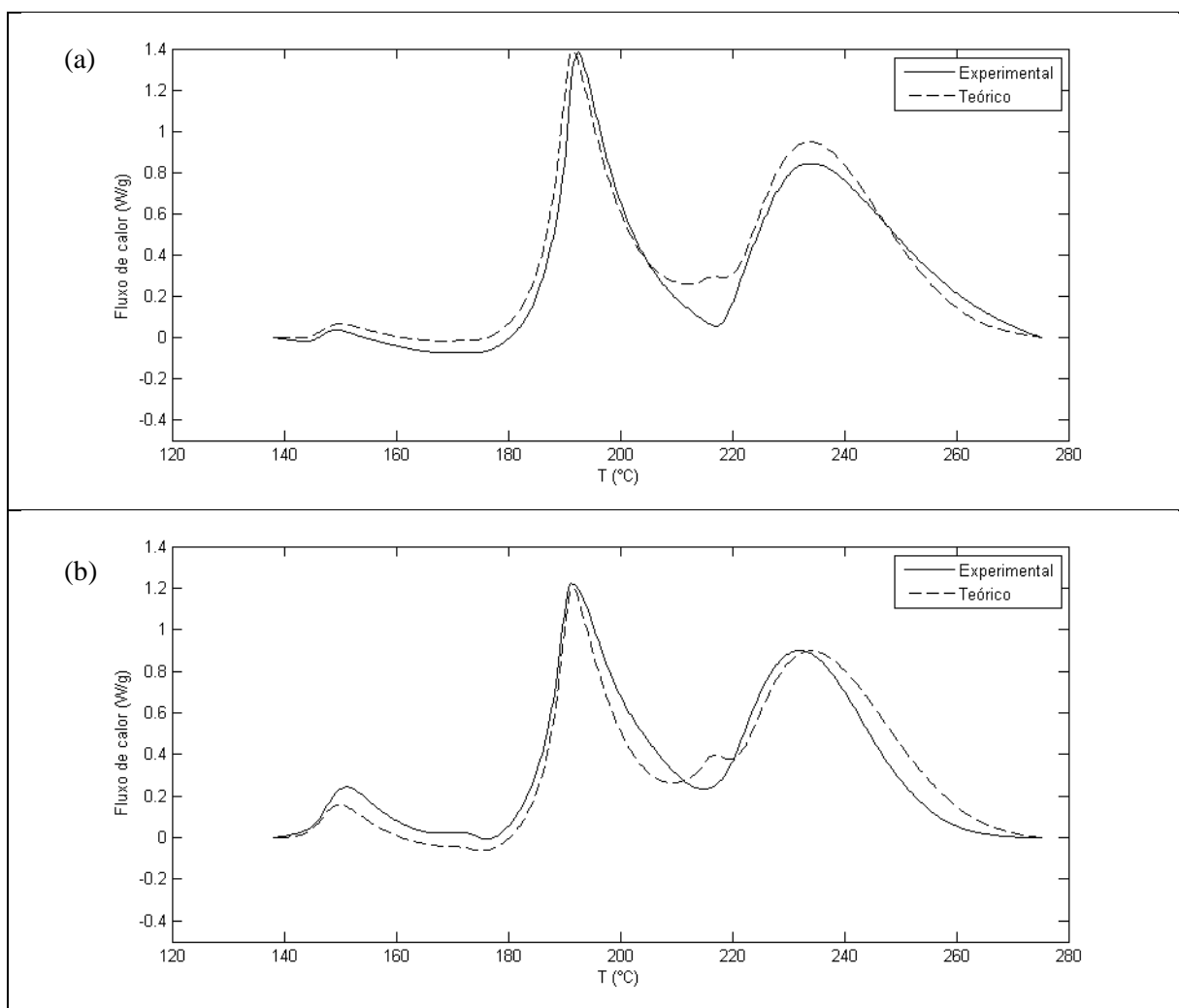


Figura 21 – Sequência de figuras geradas por programação em MATLAB para obtenção do pico isolado de desidratação das moléculas de lactose. (A) curva de dados interpolados completa com marcação dos limites para linha de corte do pico e (B) pico de desidratação isolado.

Para avaliar a possibilidade de ocorrer na mistura algum tipo de efeito sinérgico entre os processos térmicos relativos a cada componente foi feita a comparação entre os termogramas obtidos experimentalmente para 3 misturas e os respectivos termogramas teóricos, obtidos pela soma ponderada dos termogramas dos componentes puros, utilizando a função desenvolvida em MATLAB. Esta comparação é apresentada na Figura 22, para as misturas LS_A ($x_{lac}=0,09$), LS_B ($x_{lac}=0,18$) e LS_C ($x_{lac}=0,69$), na faixa de temperaturas de 138,0 a 275,3 °C.



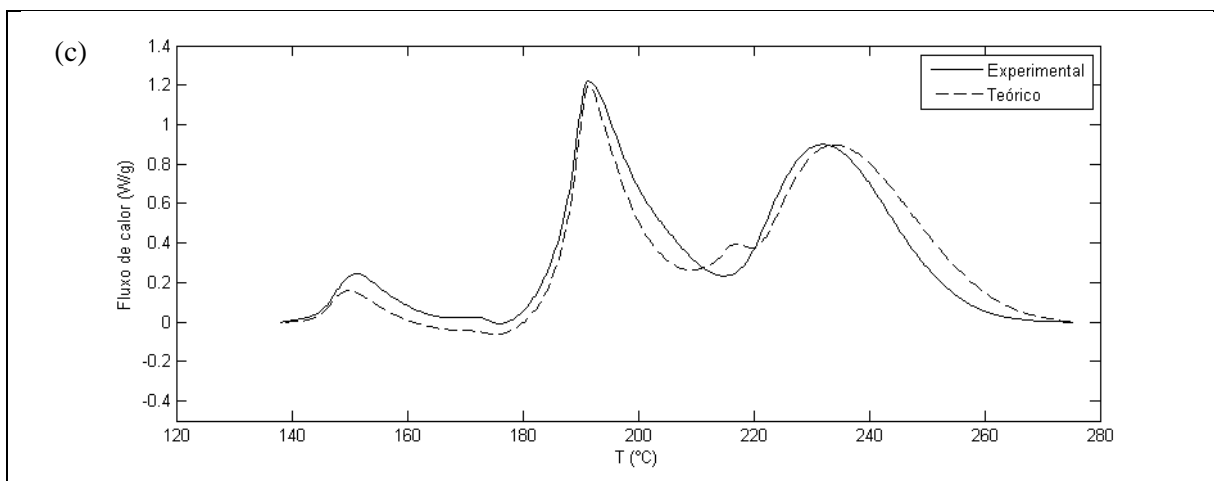


Figura 22 – Termogramas experimental e teórico para as misturas: (a) LS_A, (b) LS_B e (c) LS_C.

Para as três misturas analisadas observa-se diferenças entre os termogramas experimental e teórico da mistura, principalmente na faixa de temperatura próxima àquela onde se observou a fusão da lactose na análise do padrão p.a. deste componente. Estes resultados indicam que os processos térmicos ocorridos para os dois açúcares em mistura não têm o mesmo comportamento verificado na análise dos componentes puros, sugerindo que a presença da sacarose, que tem menor temperatura de fusão, afeta o comportamento de fusão da lactose na mistura. Além disso, pode-se indicar que as faixas de temperatura em que ocorre maior diferença entre o resultado teórico e o experimental variam com a fração mássica de açúcares na mistura.

4.2.5 Análises térmicas em leite condensado

A Figura 23 contém um termograma representativo do comportamento de amostras de leite condensado em análises em SDT; no entanto, diante da prévia caracterização do comportamento térmico dos açúcares que compõe o leite condensado fica evidente que não é possível obter diretamente os valores de $\Delta H_{\text{fusão}}$ para o cálculo do grau de cristalinidade da sacarose e da lactose neste tipo de alimento. Ressalta-se que a visualização do pico em 123°C poderia ser referente à perda de água da α -lactose monoidratada e em 215°C poderia ter-se o pico de fusão da lactose. No entanto, sabe-se que estes picos certamente são

resultantes do somatório de energia de diferentes processos térmicos que correm simultaneamente devido à presença de sacarose e lactose neste alimento.

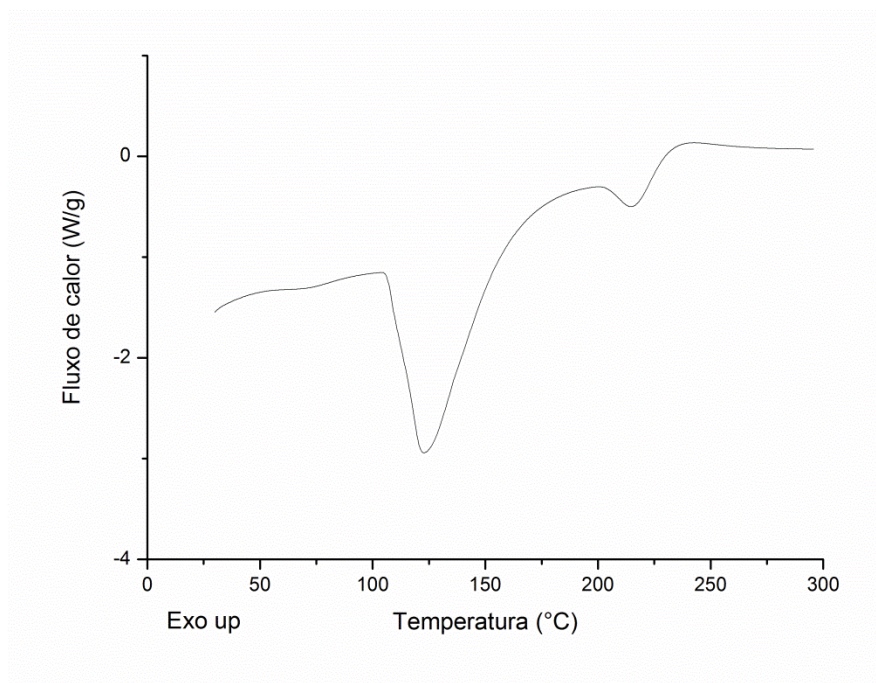


Figura 23 - Diagrama obtido em SDT para amostra da Marca M3 de leite condensado puro.

Apesar de que os resultados apresentados na Figura 23 não permitiram determinar o grau de cristalização em açúcares em leite condensado, espera-se que futuros desenvolvimentos neste sentido possam ser alcançados a partir da aplicação dos principais resultados discutidos nas seções anteriores. Assim, acredita-se, por exemplo, que alternativas de determinação mais precisas da entalpia de fusão em DSC da sacarose e da lactose quando em misturas poderiam possibilitar a separação adequada dos picos referentes à cada um dos açúcares utilizando o procedimento implementado em Matlab (Secção 4.2.4). Neste sentido, próximas etapas de estudo seriam:

- 1) O estudo completo utilizando o porta-amostra com furo em MDSC para sacarose, lactose, misturas conhecidas dos dois açúcares e amostras de leite condensado na mesma taxa de aquecimento usada neste estudo (10 °C/min) ou ainda em taxas de aquecimento menores em que a separação entre calor reversível e irreversível seja mais precisa.
- 2) O estudo completo utilizando porta-amostra hermeticamente fechado em MDSC para sacarose, lactose, misturas conhecidas dos dois açúcares e amostras de leite condensado com taxas de aquecimento menores que 10 °C/min.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusão

Na primeira parte deste trabalho foi proposta uma técnica para medida de tamanho de cristais em amostras de leite condensado. Esta metodologia foi baseada na preparação de lâminas de acordo ao procedimento proposto por Hough et al. (1990) e no processamento/análise de imagens digitais utilizando o *software* ImageJ. A macro desenvolvida para o processamento/análise de imagem com este *software* possibilitou a análise rápida e automática das imagens obtidas. O comparativo entre a análise direta (visual) e o processamento/análise de imagens confirmou a confiabilidade do procedimento de processamento/análise proposto.

Com esta metodologia foi possível avaliar e comparar três marcas comerciais de leite condensado com características próprias. Mediante análise estatística foi comprovado que o número de lâminas necessárias para a obtenção de médias globais confiáveis para os parâmetros de interesse (tamanhos médio e máximo de cristais e número, área individual e área total de cristais) pode ser diminuído de 11 para 2. Assim, a metodologia proposta torna-se ágil, requerendo resumidamente apenas as amostras de produto, elaboração de duas lâminas para microscópio com 0,003 g de amostra coberta por lamínula levemente pressionada, seguido do registro de 12 imagens de cada lâmina e análise automatizada destas imagens. O número de cristais determinado pela metodologia proposta é menor do que o número total de cristais presente na amostra, mas para condições padronizadas de preparação e análise de amostra pode ser utilizada como referência na análise comparativa de amostras ou como parâmetro para controle de qualidade do produto.

Na segunda etapa deste trabalho, um estudo aprofundado sobre o comportamento térmico dos padrões p.a. de sacarose e lactose e de misturas conhecidas destes açúcares foi realizado, mas, contudo, a determinação do grau de cristalinidade em amostras de leite condensado não pode ser concluída.

A comparação sistemática das técnicas de SDT, DSC e MDSC na caracterização de sacarose e lactose mostrou que podem ocorrer diferenças significativas entre os resultados obtidos em cada uma das técnicas, sendo algumas diferenças associadas às características específicas de cada técnica e outras relacionadas ao procedimento de análise especificado.

Com relação à influência do procedimento de análise utilizado, o aspecto mais importante a ser considerado na análise parece ser a seleção do tipo de porta-amostras a ser utilizado, selado ou com furo. O uso de porta-amostras com furo foi identificado como a opção mais adequada, pois: (i) permite trabalhar com pressão constante no porta-amostras apesar dos processos de desidratação e/ou degradação da amostra que acontecem durante o aquecimento; (ii) permite, no caso da lactose, minimizar a ocorrência de anomerização.

Na comparação das técnicas, observou-se que as três apresentam mesmo nível de precisão, porém acurácias distintas, ou seja, o desvio padrão obtido para as técnicas foi pequeno, mas o nível de definição dos picos e os valores de entalpia diferiram. A técnica de DSC foi a que permitiu obter maior definição dos picos identificados ao longo do termograma, além de detectar mais claramente a transição vítrea da sacarose. Por outro lado, na técnica de MDSC, utilizando porta-amostras com furo, foi possível obter boa repetibilidade também com relação aos processos reversíveis e irreversíveis, o que permite explorar mais esta técnica na busca de uma melhor identificação e compreensão dos eventos térmicos que ocorrem com os açúcares estudados.

No que diz respeito especificamente aos carboidratos estudados, os aspectos mais importantes a destacar são os seguintes: (i) para a sacarose, os picos de fusão e degradação aparecem bem separados; (ii) para a lactose em porta-amostras selado são encontrados três picos principais, correspondentes à desidratação de α -lactose monoidratada, à fusão dos cristais de lactose e à decomposição deste açúcar, porém com o uso de porta-amostras fechado verifica-se um quarto pico relacionado ao processo de anomerização; (iii) a análise quantitativa de cristalinidade a partir de dados de calorimetria para misturas de sacarose e lactose é dificultada pela sobreposição dos picos dos diferentes processos térmicos sofridos pelos dois açúcares e pelo fato que foram encontrados indicativos de efeito sinérgico na resposta térmica dos dois carboidratos quando em mistura.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Algumas sugestões para trabalhos futuros relacionados à continuação desse trabalho são apresentadas a seguir.

No que se refere à microscopia poderia ser realizado acompanhamento tanto da vida de prateleira de marcas de leite condensado como da cristalização ao longo do processo produtivo deste alimento, utilizando a metodologia de análise de imagens microscópica de cristais desenvolvida nesse trabalho.

Para continuidade dos estudos utilizando análises térmicas, uma sugestão seria realizar os ensaios utilizando porta-amostras furados em experimentos com sacarose pura, lactose pura e misturas destes dois açúcares em MDSC. Assim, seria possível verificar se os picos identificados separadamente em MDSC (porta-amostras com furo) para lactose, nos termogramas de fluxo de calor reversível e irreversível, também são visualizados no caso das misturas. Sendo possível calcular o grau de cristalização em misturas de lactose e sacarose, a próxima etapa poderia ser testar o porta-amostras com furo em amostras de leite condensado visando obter valores de entalpia de fusão dos açúcares. Além disso, sugere-se que sejam realizados testes com taxas de aquecimento menores que 10 °C/min com o objetivo de melhorar a separação entre os sinais de calor reversível e irreversível em MDSC.

Apêndice I: macro

```
run("Set Scale...", "distance=363.08 known=200 pixel=1 unit=um");
run("32-bit");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=5-10000 circularity=0.40-1.00 show=[Bare Outlines]
display clear include summarize in_situ");
run("Tiff...");
```

Apêndice II: artigo aceito

Artigo “An automated measuring methodology for crystal size in sweetened condensed milk using digital image processing and analysis” submetido para a revista Food Analytical Methods e aceito em 26 de novembro de 2014 para publicação (DOI:10.1007/s12161-014-0054-x).

Apêndice III: artigo submetido

Artigo “*Limiting aspects in crystallinity degree analysis by differential calorimetry in lactose, sucrose and their mixtures*” que foi submetido para a revista *Food Analytical Methods* em setembro de 2015.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, T. **Powder Sampling and Particle Size Determination**. 1st.ed. ed. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- ANGBERG, M. **Lactose and thermal analysis with special emphasis on microcalorimetry** *Thermochimica Acta*, 1995.
- ARES, G.; GIMÉNEZ, A. Influence of temperature on accelerated lactose crystallization in dulce de leche. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 3, p. 277–283, ago. 2008.
- BECKETT, S. T. et al. DSC study of sucrose melting. **Carbohydrate research**, v. 341, n. 15, p. 2591–9, 6 nov. 2006.
- BHANDARI, B. R.; HARTEL, R. W. Co-crystallization of sucrose at high concentration in the presence of glucose and fructose. **J. Food. Sci.**, v. 67, n. 5, p. 1797–1802, 2002.
- BIRCH, G. G.; MWANGELWA, O. M. Colorimetric determination of sugars in sweetened condensed milk products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 25, n. 11, p. 1355–1362, nov. 1974.
- BLACK, D. B.; LOVERING, E. G. Estimation of the degree of crystallinity in digoxin by X-ray and infrared methods. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 684–687, 12 set. 1977.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. LANARA. Métodos analíticos oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos.** Brasília, 1981.
- BROSNAN, T.; SUN, D.-W. Inspection and grading of agricultural and food products by computer vision systems—a review. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 36, n. 2-3, p. 193–213, nov. 2002.
- BROWN, M. E. **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry: Principles and Practice**. [s.l.] Elsevier, 1998.
- BUERA, P.; SCHEBOR, C.; ELIZALDE, B. Effects of carbohydrate crystallization on stability of dehydrated foods and ingredient formulations. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 157–165, mar. 2005.
- BYLUND, G. **DAIRY PROCESSING HANDBOOK**. 1. ed. LUND: TETRA PAK PROCESSING SYSTEMS AB, 1995.
- CHIOU, D.; LANGRISH, T. A. G.; BRAHAM, R. The effect of temperature on the crystallinity of lactose powders produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 2, p. 288–293, maio 2008.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Stan 282, FAO**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CODEX>>. Acesso em: 21 jan. 2014.
- COLLINS T. J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**, v. 43, n. 1, p. 25–30, 2007.

-
- COLOMBO, M. et al. **Avaliação da viscosidade durante a fabricação do doce de leite tradicional adicionado de amido de milho nativo.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 2009. Disponível em: <<http://www.revistadoilct.com.br/ri/ct/article/view/94>>. Acesso em: 7 mar. 2014
- DANLEY, R. L. **New modulated DSC measurement technique** *Thermochimica Acta*, 2003.
- DE SÁ, J. F. O. et al. Perfil microbiológico do leite condensado produzido no Brasil. **Revista Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 364, n. 63, p. 42–45, 2008.
- DRAPIER-BECHE, N. et al. Evaluation of Lactose Crystalline Forms by Nondestructive Analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 3, p. 457–463, 1997.
- ELIASSON, A.-C. **Carbohydrates in Food**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.
- FERNÁNDEZ-MARTÍN, F. Influence of temperature and composition on some physical properties of milk and milk concentrates. II. Viscosity. **Journal of Dairy Research**, v. 39, n. 01, p. 75, 1 jun. 1972.
- FOSTER, E. M. et al. Microbiology of sweetened condensed milk and dry milk products. In: **Dairy microbiology**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc., 1957. p. 247–270.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. [s.l.: s.n.].
- FREIRE, R. M. L. **Estudo da estabilidade térmica de adoçantes naturais e artificiais**. [s.l.] Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.
- GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685–694, jul. 2008.
- GILMORE, T.; SHELL, J. Dairy Equipment and Supplies. In: **Dairy Science and Technology Handbook**. New York: Wiley-VCH, 1992. p. 155–294.
- GIMÉNEZ, A.; ARES, G.; GÁMBARO, A. CONSUMER PERCEPTION OF SANDINESS IN DULCE DE LECHE. **Journal of Sensory Studies**, v. 23, n. 2, p. 171–185, abr. 2008.
- GOMBÁS, Á. et al. **Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by Near Infrared Spectroscopy (NIRS)** *International Journal of Pharmaceutics*. **Anais...**2003
- HARTEL, R. W. Advances in food crystallization. **Annual review of food science and technology**, v. 4, p. 277–92, 6 jan. 2001.
- HESS, H. J. Condensed milk. In: **Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 1194–1201.
- HIGGINS, M. D. Measurement of crystal size distributions. **American Mineralogist**, v. 85, n. 9, p. 1105–1116, 1 set. 2000.
- HOLSINGER, V. H. Physical and Chemical Properties of Lactose. In: FOX P.F. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry**. 2th. ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 1–38.
- HOUGH, G.; MARTINEZ, E.; CONTARINI, A. Sensory and Objective Measurement of Sandiness in Dulce de Leche, a Typical Argentine Dairy Product. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 3, p. 604–611, mar. 1990.
- HUNZIKER, O. F. **Condensed Milk and Milk Powder**. IL: [s.n.].
- HUNZIKER, O. F.; NISSEN, B. H. Lactose Solubility and Lactose Crystal Formation. **Journal of Dairy Science**, v. 10, n. 2, p. 139–154, mar. 1927.

-
- HURTTA, M.; PITKÄNEN, I.; KNUUTINEN, J. Melting behaviour of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 13, p. 2267–73, 13 set. 2004.
- ISLAM, M. I. U.; LANGRISH, T. A. G. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 46–56, jan. 2010.
- JIN, Y. et al. **A study of PBT/PC blends by modulated DSC and conventional DSC** *Journal of Thermal Analysis*, 1996.
- JOUPPILA, K.; ROOS, Y. H. Glass Transitions and Crystallization in Milk Powders. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 2907–2915, out. 1994.
- KEDWARD, C. J. et al. Crystallization Kinetics of Lactose and Sucrose Based On Isothermal Differential Scanning Calorimetry. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 192–197, 28 jun. 1998.
- KRUK, A., KISZA, J., ZIAJKA, S. Effect of viscosity on lactose crystallization in sweetened condensed milk. **Roczniki Instytutu Przemysłu Mleczarskiego**, v. 16, p. 21–30, 1974.
- LEE, J. W. **INVESTIGATION OF THERMAL DECOMPOSITION AS THE CAUSE OF THE LOSS OF CRYSTALLINE STRUCTURE IN SUCROSE, GLUCOSE, AND FRUCTOSE**. Disponível em: <https://www.ideals.illinois.edu/bitstream/handle/2142/15570/Lee_JooWon.pdf?sequence=4>. Acesso em: 20 ago. 2015.
- LISTIOHADI, Y. et al. Thermal analysis of amorphous lactose and α -lactose monohydrate. **Dairy Science and Technology**, v. 89, n. 1, p. 43–67, 17 dez. 2009.
- MAZZOBRE, M. F.; AGUILERA, J. M.; BUERA, M. P. Microscopy and calorimetry as complementary techniques to analyze sugar crystallization from amorphous systems. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 6, p. 541–548, mar. 2003.
- MENDES, P. N. **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LEITE CONDENSADO EMPREGANDO PRÉ-CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANAS**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2011.
- MORO, O.; HOUGH, G. Total Solids and Density Measurements of Dulce de Leche, a Typical Argentine Dairy Product. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 3, p. 521–525, mar. 1985.
- MURPHY, F. E. A Routine method for determining sucrose in sweetened condensed milk. **Analyst**, v. 85, p. 720–723, 1960.
- ORDOÑEZ, J. A. **Tecnología de Alimentos: Vol.2: Alimentos de Oríem Animal**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2005.
- OTTENHOF, M.-A.; MACNAUGHTAN, W.; FARHAT, I. A. FTIR study of state and phase transitions of low moisture sucrose and lactose. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 21, p. 2195–2202, out. 2003.
- PATEL, A. A. et al. SHELF-LIFE MODELING OF SWEETENED CONDENSED MILK BASED ON KINETICS OF MAILLARD BROWNING. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n. 6, p. 431–451, dez. 1996.
- PERRONE, Í. T.; FERRUA, F. Q.; ABREU, L. R. DE. EFEITO DA NUCLEAÇÃO SECUNDÁRIA SOBRE A CRISTALIZAÇÃO DO DOCE DE LEITE. **Revista Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 249, n. 61, p. 3–12, 2006.

PERRONE, I. T.; FERRUA, Q. F. APLICAÇÃO DO MODELO DE SOLUBILIDADE IDEAL A DADOS EXPERIMENTAIS DE SOLUÇÕES DE LACTOSE EM ÁGUA. **Revista Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 355, n. 62, p. 33–36, 2007.

RAHMAN, M. S.; AL-MARHUBI, I. M.; AL-MAHROUQI, A. Measurement of glass transition temperature by mechanical (DMTA), thermal (DSC and MDSC), water diffusion and density methods: A comparison study. **Chemical Physics Letters**, v. 440, n. 4-6, p. 372–377, jun. 2007.

RASBAND, W. **ImageJ 1997-2007**. [s.l.: s.n.].

SALEKI-GERHARDT, A.; AHLNECK, C.; ZOGRAFI, G. Assessment of disorder in crystalline solids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 101, n. 3, p. 237–247, jan. 1994.

SANTOS, C. et al. Caracterização estrutural por difração de raios X de alta resolução de SiAlONs sinterizados com diferentes aditivos. **Cerâmica**, v. 51, n. 320, p. 313–317, dez. 2005.

SANTOS, M. C. DOS. **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE LEITES CONDENSADOS PRODUZIDOS NO BRASIL**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, 2012.

SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S., & ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SHAH, B.; KAKUMANU, V. K.; BANSAL, A. K. Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 8, p. 1641–65, ago. 2006.

SHIMODA, M. et al. Volatile Flavor Compounds of Sweetened Condensed Milk. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6, p. 804–807, ago. 2001.

SOBREIRO, A. A. **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE CRISTAIS EM LEITE CONDENSADO COM AÇÚCAR**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2009.

SUN, D.-W. Inspecting pizza topping percentage and distribution by a computer vision method. **Journal of Food Engineering**, v. 44, n. 4, p. 245–249, jun. 2000.

TAKAHASHI, H. et al. Acetaminophen particle design using chitosan and a spray-drying technique. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 1, p. 37–41, jan. 2005.

TAN, R. Volume 3: lactose, Water, Salt and Minor Constituents. In: MCSWEENEY, P.L.H. AND FOX, P. F. (Ed.). **Advanced dairy Chemistry**. 3. ed. New York: Springer Science Business, 2009. p. 295–349.

TE BOOY, M. P. W. M.; RUITER, R. A. DE; MEERE, A. L. J. DE. Evaluation of the Physical Stability of Freeze-Dried Sucrose-Containing Formulations by Differential Scanning Calorimetry. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 109–114, 1 jan. 1992.

VERMEER, A. W.; NORDE, W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. **Biophysical journal**, v. 78, n. 1, p. 394–404, 2000.

ZHIZHIN, V.I., KOVALENKO, M.S., KNYAGINICHEV, M. I. Intensity of lactose crystallization in sweetened condensed milk. **Izvestiya-Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Pishchevaya Teknologiya**, v. 2, p. 130–132, 1971.