



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL**

ADEMIR MORAIS DE MEDEIROS

**DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS EM SUCOS DE
LARANJA COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

**CAMPINA GRANDE – PB
2014**

ADEMIR MORAIS DE MEDEIROS

**DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS EM SUCOS DE
LARANJA COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a coordenação do curso de Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, como cumprimento à exigência para obtenção do título de graduação.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Simone da Silva Simões

CAMPINA GRANDE – PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

M488d Medeiros, Ademir Morais de.
Determinação de sólidos solúveis totais em sucos de laranja comerciais utilizando espectroscopia e calibração multivariada [manuscrito] / Ademir Morais de Medeiros. – 2013.
39 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologias, 2014.
“Orientação: Profa. Dra. Simone da Silva Simões, Departamento de Química.”

1. Espectroscopia. 2. Sucos artificiais. 3. Calibração multivariada. I. Título.

21. ed. CDD 547

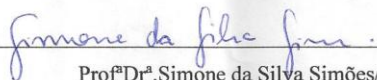
ADEMIR MORAIS DE MEDEIROS

**DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS EM SUCOS DE
LARANJA COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a coordenação do curso de
Química Industrial da Universidade
Estadual da Paraíba, como cumprimento
à exigência para obtenção do título de
graduação.

Aprovada em 14 / Março /2014.

BANCA EXAMINADORA



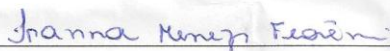
Profª Drª. Simone da Silva Simões/UEPB

Orientadora



Profª Msc. Maria da Conceição da Nóbrega Machado / UEPB

Examinadora



Drª. Isanna Menezes Florêncio/UEPB

Examinadora

CAMPINA GRANDE – PB

2014

DEDICATÓRIA

Agradeço à Deus por ser
sempre fonte de misericórdia e
amor e está sempre me
protegendo nos momentos
críticos, e a cada dia
fortalecendo para poder
seguir a caminhada, com
preceitos da verdade, amizade,
dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

À Conceição Machado, coordenadora do curso de Química Industrial, por sua dedicação e compromisso.

À professora Dr^a Simone da Silva Simões pela orientação, supervisão, dedicação, correção e leituras sugeridas ao longo desse trabalho.

À minha mãe Maria da Conceição pelo incentivo, colaboração e conselhos ao longo da minha vida;

Aos meus irmãos André e Andréia pelo apoio ao longo do curso

A família Amorim por ter me acolhido com muito carinho e amor em especial à Evaldo Xavier de Amorim e Folrizé Dantas de Amorim , proporcionando condições favoráveis a minha formação profissional, sendo mais que amigos .

Aos meus professores da UEPB pela incessante dedicação, companheirismo, e orientação, criando um laço de amizade, em especial aos professores Socorro Marques, Conceição, Rejane Pinheiro, Lígia, Suzana que contribuíram ao longo de trinta meses, por meio das disciplinas e debates, para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Professor Dr. Germano Vêras pelo apoio em seu laboratório com os materiais e equipamentos para realização dos experimentos, que sem o apoio não seria possível a realização das análises.

Aos meus amigos do LQAQ David, Fernando, Felipe, Ana Paula, e Adriana por estarem sempre à disposição e contribuição das análises.

**“Construí amigos,
enfrentei derrotas,
venci obstáculos, bati
na porta da vida e
disse-lhe: Não tenho
medo de vivê-la”**

(Augusto Cury)

RESUMO

Os sucos de frutas são caracterizados por serem, em sua maioria, misturas aquosas e tem como um dos seus parâmetros de controle de qualidade o teor de sólidos solúveis totais, que é dado pela escala do índice de refração chamada de (^oBRIX). A refratometria é a técnica geralmente utilizada para a determinação dos sólidos totais em sucos, podendo também ser usada a cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE. Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia baseada no uso da espectroscopia e métodos de calibração multivariada para a determinação de sólidos solúveis totais em sucos de laranja comerciais, que atenda aos princípios da tecnologia analítica de processos. O método tem como vantagens ser rápido, não usar reagentes químicos e poder ser usado em linha. Para isto foram coletadas amostras de 3 lotes distintos de uma marca de sucos de laranja comercial. Para ampliar a faixa de Brix dos sucos comerciais para a construção do modelo de calibração, os mesmos foram diluídos e adicionados de açúcar, de forma que abrangeu uma faixa de 1,01 a 18,59^oBRIX. Totalizando 66 amostras. Todas as amostras foram analisadas pelo método de referência e por espectroscopia. Devido a presença de ruído espectral e deslocamento de linha de base verificada nos dados espectrais, alguns pré-tratamentos espectrais foram avaliados e aquele que apresentou o melhor resultado foi a 1^a derivada com polinômio de 1^a ordem e janela de 61 pontos. Para a seleção das amostras de calibração e previsão foi utilizado o algoritmo SPXY. Deste modo, do conjunto de 66 amostras, 40 foram selecionadas para a etapa de calibração e 23 para a etapa de validação externa. Três amostras foram excluídas do conjunto por apresentarem alto resíduo e alta influência. A validação externa foi feita por validação cruzada completa (cross validation). O número ideal de fatores para a construção do modelo foi 5. O erro apresentado pelo modelo nas etapas de calibração, validação interna e validação externa foi de 1,24; 1,64 e 1,31 ^oBRIX, respectivamente. O coeficiente de correlação na etapa de calibração (R^2) foi de 0,9381 e para etapa de validação externa foi de 0,9745, mostrando uma boa correlação entre os dados instrumentais (espectro) e o valor de sólidos sol. De acordo com a análise estatística, utilizando os testes F e t-Student, não há diferença estatística significativa entre os valores medidos pelo método de referência e os previstos pelo modelo.

Palavras-chave: Sólidos solúveis totais, sucos artificiais, espectroscopia, calibração multivariada.

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|-----------------|---|---|----|
| TABELA 1 | – | Regiões espectrais da espectroscopia ótica | 17 |
| TABELA 2 | – | Diluição e adição de açúcar | 25 |
| TABELA 3 | – | Variância explicada em y e X para os primeiros 20 fatores | 31 |
| TABELA 4 | – | Valores de $(^{\circ}\text{BRIX})$ previsto e $(^{\circ}\text{BRIX})$ | 34 |

LISTA DE FIGURAS

| | | | |
|------------------|---|--|----|
| FIGURA 1 | – | Regiões do espectro eletromagnético | 17 |
| FIGURA 2 | – | Processo de absorção de radiação | 18 |
| FIGURA 3 | – | Relação entre a absorção e a concentração | 19 |
| FIGURA 4 | – | Espectro de absorção UV-VIS | 20 |
| FIGURA 5 | – | Espectros brutos variando a faixa de absorção de 3000 à 200nm | 27 |
| FIGURA 6 | – | Espectros bruto da faixa de trabalho variando de 1340 à 880nm | 28 |
| FIGURA 7 | | Espectros tratado da faixa de trabalho variando de 1340 à 880nm | 29 |
| FIGURA 8 | – | Variância explicada versus número de resíduos | 30 |
| FIGURA 9 | – | Modelo de regressão para o (°BRIX) | 32 |
| FIGURA 10 | – | Valor de referência (°BRIX) versus o valor previsto pelo modelo | 32 |
| FIGURA 11 | | Valor de (°BRIX) medido versus valor de (°BRIX) previsto pelo modelo | 33 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------|---|
| UEPB | Universidade Estadual da Paraíba |
| LQAQ | Laboratório de Química Análise Quimiometria |
| NIR | Infravermelho Próximo |
| PLS | Regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados |
| MLR | Regressão Linear Múltipla |
| CCT | Centro de Ciência e Tecnologia |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatographic |
| PCA | Análise de Componentes Principais |
| PLS | Regressão pelo Métodos dos Mínimos Quadrados |
| PC`s | Componentes Principais |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.0 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2.0 | OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 14 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 14 |
| 3.0 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 15 |
| 3.1 | Controle de Qualidade de Sucos | 15 |
| 3.2 | Espectroscopia | 15 |
| 3.2.1 | Espectroscopia óptica | 18 |
| 4.0 | QUIMIOMETRIA, ORIGEM, EVOLUÇÃO E USO | 21 |
| 4.1 | Métodos de Calibração Multivariada (PCA) PLS | 22 |
| 4.1.1 | Análises de Componente Principal | 22 |
| 4.1.2 | Calibração Multivariada PLS | 23 |
| 5.0 | EXPERIMENTAL | 25 |
| 5.1 | Amostras | 25 |
| 5.1.1 | Diluições das amostras de suco | 25 |
| 5.2 | Análises Instrumentais | 26 |
| 5.3 | Software | 26 |
| 6.0 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 6.1 | Método de referência | 27 |
| 6.1.1 | Espectros | 27 |
| 6.1.2 | Construção do modelo de calibração | 29 |
| 7.0 | CONCLUSÃO | 35 |
| | REFERÊNCIAS | 36 |

1.0 INTRODUÇÃO

Os sucos de frutas são caracterizados por serem em sua maioria misturas aquosas, no entanto, já existem sucos adicionados de extrato de soja. São constituídos de vários componentes orgânicos voláteis e instáveis, responsáveis pelo sabor e aroma do produto. No processo industrial para a produção de sucos cítricos, são adicionadas essências de frutas cítricas e água potável ao suco concentrado e congelado que apresenta 65° Brix, de modo a obter um suco com padronização final de 11,5° Brix (MAPA, 1974).

Além dos açúcares, que são o componente majoritário, contêm ácidos, sais minerais, vitaminas e corantes. Os sucos de fruta podem ser divididos em dois grupos: os cítricos, que são obtidos da mistura da laranja, limão e tangerina e os de frutas tropicais como: maracujá, caju, abacaxi, goiaba e manga (Abecitrus, 2013).

A espectroscopia aliada aos métodos de calibração multivariada tem sido utilizada em diversos segmentos industriais. Neste trabalho será avaliada a potencialidade desta metodologia para prever o valor de Brix em sucos de laranja comerciais. O atrativo para a implantação deste tipo de metodologia na indústria é a possibilidade de realização de análises rápidas, com pouca manipulação das amostras e sem a utilização de reagentes químicos.

Em meados da década de 80, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de laranjas, por possuir mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território. E ainda hoje ocupa a liderança na produção e nas exportações mundiais de sucos cítricos (Latado, R.R., Neto, A.T., et. al., 2001).

Com o desenvolvimento econômico e a correria do dia a dia, os alimentos enlatados assim como os sucos engarrafados e encaixados, vem ganhando espaço em meio à população, devido a sua praticidade para consumo. Deste modo, o consumo de sucos industrializados é cada vez maior. No entanto, muitas vezes não é levado em consideração o risco que pode estar se submetendo ao tomar bebidas sem se quer verificar no rótulo a composição do mesmo. Além disto, a população está consumindo esse produto já nos primeiros anos de idade, não levando em consideração o alto nível de açúcar que num futuro pode causar a alta taxa de glicose no sangue, causado não só pela ingestão dos sucos, mas também por outros alimentos (MAPA, 1994).

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Objetivo principal deste trabalho é desenvolver uma metodologia, baseada nos métodos espectroscópicos aliados aos métodos quimiométricos e em consonância com as tecnologias analíticas de processo, que possa ser uma alternativa aos métodos convencionais para análise de sólidos totais em sucos de laranja comerciais.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a capacidade das espectroscopia nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo aliada a técnicas de calibração multivariada para a quantificação do valor de BRIX em sucos comerciais de laranja.

3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Controle de qualidade de sucos

Quanto a composição, o suco de laranja deve obedecer às características de cor amarela, sabor e aroma próprios e apresentar um limite mínimo para teores de sólidos solúveis totais de 10,5 °Brix (a 20°C) para relação de sólidos solúveis em Brix, acidez de 7,0g/100g de ácido cítrico anidro, teor de ácido ascórbico de 25mg/100g e 0,035% de óleo essencial de laranja. Assim, de acordo com a Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000, suco de laranja é definido como a “bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis*), através de processo tecnológico adequado” (MAPA, 2000).

O controle de qualidade de produtos e processos é de extrema importância para a sobrevivência da indústria no mercado, pois é durante esta etapa que são avaliadas as matérias prima, produtos intermediários, produto final e o processo de produção como um todo. O controle de qualidade garante a boa qualidade para os consumidores, bem como garante que o produto final satisfaça as exigências e requisitos do mercado e dos órgãos reguladores.

Um dos parâmetros de qualidade utilizados na produção de sucos artificiais é o Brix. A escala Brix é bastante utilizada na indústria de alimentos para medir a quantidade aproximada de açúcares em sucos de frutas, vinhos e na indústria de açúcares. A quantidade de compostos solúveis corresponde ao total de todos os compostos dissolvidos em água, começando com açúcar, ácidos e etc. E os valores de leitura medido é a soma de todos eles. A escala numérica do índice de refração de uma solução é denominada de Brix (°Bx). Esta escala é usada de forma indireta para determinar a quantidade de compostos solúveis numa solução de sacarose.

A refratometria é um dos métodos mais utilizados para análises de sucos na indústria alimentícia e baseia-se na refração (ou mudança de direção) do feixe de luz ao penetrar em um meio líquido. O ângulo de refração, medido em graus, indica à mudança de direção do feixe de luz. Um refratômetro obtém e transforma os ângulos de refração em valores de índices de refração (nD), que são usados para determinar a concentração de uma solução, pois o índice de refração varia de acordo com a concentração do meio.

Quanto maior a concentração de sólidos totais maior é valor lido do índice de refração (Skoog, 2002).

A refratometria é utilizada como método universal para quantificação dos sólidos solúveis totais em sucos, também referido com Brix. Neste trabalho trataremos sólidos solúveis totais por Brix. De acordo com a norma descrita pelo instituto Adolfo Lutz a medida deve ser realizada a uma temperatura de 20°C utilizando um refratômetro Abbe com circulador de água a 20°C. Após a leitura a conversão deve ser realizada através da tabela de Chataway, fazendo-se a correção da temperatura para 20°C, caso a medida tenha sido realizada em outra temperatura (Lutz, 1985).

O refratômetro é um instrumento simples que pode ser usado para medir concentrações de sólidos totais em soluções aquosas, consumindo apenas poucas gotas da solução. Sua aplicação estende-se pelas áreas de alimentos, agricultura, química e em indústrias de manufaturados. A medida dos sólidos totais também pode ser realizada por a cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE. No entanto, a refratometria é o método mais utilizado por ser mais simples. Já a CLAE, apesar de ser uma técnica mais complexa, oferece uma maior precisão nas medidas, pois quantifica cada um dos sólidos totais contidos na amostra, o que não é possível na refratometria.

Apesar das qualidades da refratometria e CLAE, ambas apresentam a limitação de trabalharem apenas de forma amostral, ou seja, para que seja analisado o Brix de um lote de suco produzido, é necessário que se colete uma amostra representativa deste lote e posteriormente determine-se o Brix desta amostra que servirá como parâmetro para o lote o qual representa. Apesar desta ser uma prática comum na indústria, a possibilidade de ter-se acesso a uma técnica onde seja possível realizar a medida do Brix em todo o lote produzido de maneira rápida e precisa constitui uma inovação que pode significar ganhos para a indústria. Dentro deste contexto as técnicas espectroscópicas se mostram como uma ótima alternativa.

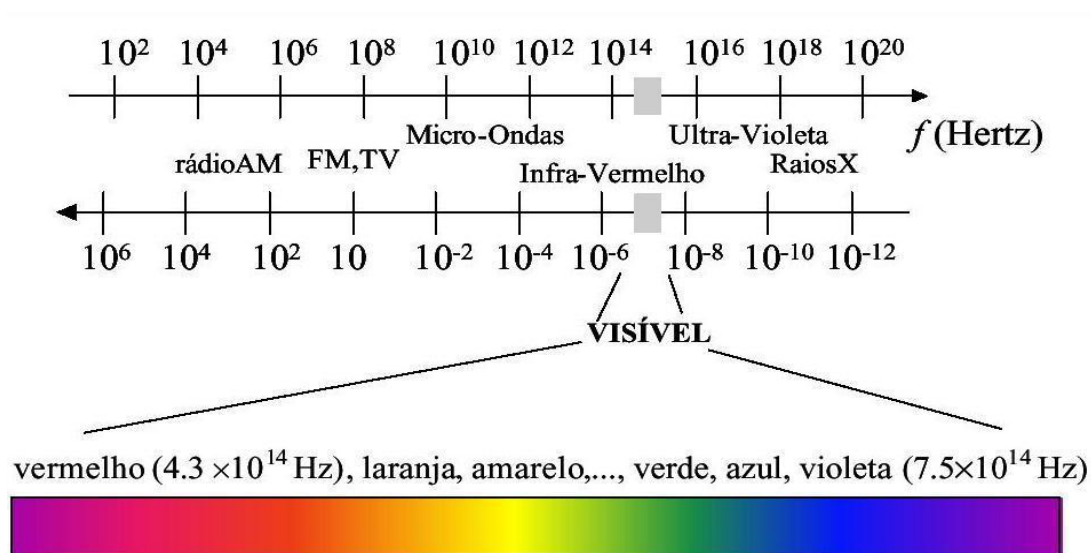
3.2 Espectroscopia

A espectroscopia pode ser definida como a ciência que estuda a interação da matéria com diversos tipos de radiação. Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na quantidade de radiação produzida ou absorvida por moléculas

(espectroscopia molecular) ou espécies atômicas (espectroscopia atômica), (Skoog, 2005).

O espectro eletromagnético compreende uma gama de energias que vão dos raios gama às ondas de rádio, Figura 1. Os tipos de interações que podem ser observadas dependem da energia da radiação utilizada e do modo de detecção.

Figura 1: Regiões do espectro eletromagnético



Fonte: vision

Os métodos espectroscópicos que compreendem as regiões ultravioleta, visível e infravermelho são também denominados por métodos ópticos de análise. Nesta região a luz excita os elementos ou moléculas que tem seu comprimento de onda característico, representada pela letra grega lambda (λ). Na Tabela 02 podemos observar a faixa de comprimentos de onda para as regiões do ultra-violeta, visível e infravermelho próximo (Skoog, 2002).

Tabela 01: Faixas espectrais para as regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo.

| Região do espectro | Faixa de comprimento de Onda (nm) |
|------------------------|-----------------------------------|
| Ultravioleta | 180 – 380 |
| Visível | 380 – 780 |
| Infra Vermelho Próximo | 780 – 2500 |

A região ultravioleta do espectro é compreende a faixa de 180 a 380 nm, a região do visível entre 380 a 780 nm e a região do infravermelho de 780 a 2500 nm.

As medidas espectroscópicas são bastante utilizadas para fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre uma dada amostra e bastante utilizada em diversos ramos como: química, biologia, farmácia, ciências forenses, agricultura, análises clínicas, entre outros.

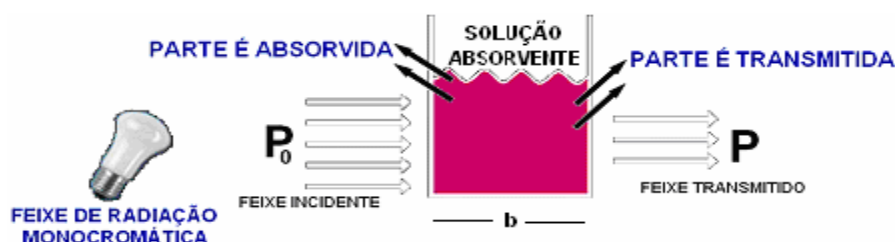
3.2.1 Espectroscopia óptica

Quando submetidas a radiação ultravioleta e visível, as moléculas ou espécies atômicas do analito podem sofrer transições eletrônicas por ocasião da absorção de energia quantizada. Esta absorção de energia leva a transição do estado se menor energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado). Ao retornar o seu estado fundamental pode ocorrer a emissão de radiação. (Atkins, Petter; Jones, 2005). Já a absorção de energia no infravermelho não é capaz de causar transições eletrônicas, mas apenas vibrações moleculares

Quando um sólido, líquido ou gás é submetido ao contato com a radiação, pode ocorrer a atenuação de frequências por um processo de absorção. Durante a absorção é preciso que a radiação incidente seja de frequência específica da faixa dos pontos absorventes do analito em análise, pois cada molécula ou espécie atômica tem um comprimento de onda específica.

A espectrometria UV-VIS é baseada na medida de absorção ou transmissão de soluções contidas em células transparentes com caminho óptico de b em centímetros. Quando uma solução contendo a espécie absorvente é submetida à um feixe de radiação mono cromática, parte da energia radiante é absorvida e a outra é transmitida (Skoog, 2005), como ilustra a figura 2.

Figura 2: Processo de absorção de radiação, onde P_0 é o feixe incidente e P é o feixe transmitido.



Fonte: Ebah

A razão entre a potência radiante (energia do feixe/segundo) do feixe transmitido P e potência radiante do feixe incidente, P_0 , é conhecida como Transmitância T . E pode ser representada pela equação 1.

$$T = (P/P_0) \quad (1)$$

O logaritmo decimal do inverso da transmitância é denominado de absorbância e é calculado pela **Equação 2**.

$$A = -\log T = \log (P/P_0) = abc \quad (2)$$

Onde a é uma constante denominada de absortividade (quando a concentração c é expressa em gramas por litro) e b é o comprimento do caminho óptico em cm.

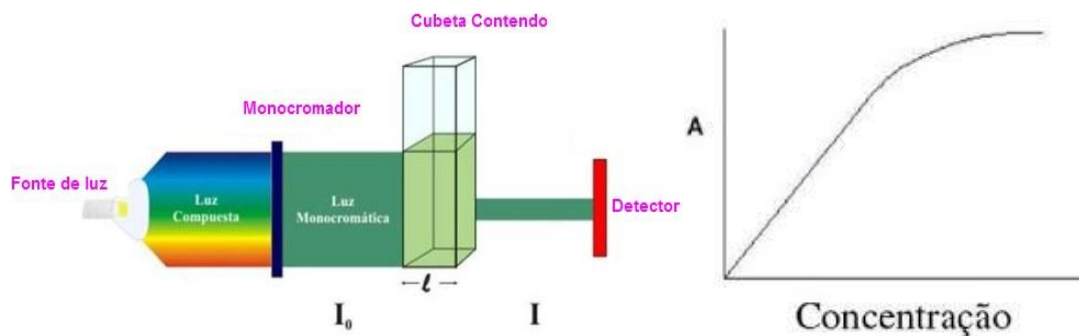
Quando a concentração da espécie absorvente é expressa em mols por litro, a absortividade é denominada de absortividade molar, ϵ , e a lei de Beer é escrita pela Equação 3.

$$A = \epsilon bc \quad (3)$$

A absortividade molar expressa em unidades $\text{litro mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, é uma constante característica de uma espécie absorvente em um meio, a um determinado λ . A sensibilidade de um método espectrométrico é governada pela absortividade molar da espécie absorvente (Fapepi, 2013).

De acordo com a Lei de Lambert-Beer, a concentração do analito varia linearmente com a absorção da radiação. Assim podemos concluir que a absorbância de uma solução é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente quando se fixa o caminho óptico; e diretamente proporcional ao caminho óptico quando se fixa a concentração. A figura 03, representa o processo de análise de uma amostra utilizando a espectroscopia de absorção. O gráfico representa a relação linear entre absorbância e concentração, a região onde se apresenta uma curvatura é relativa a região onde não existe uma relação linear entre estes parâmetros e conseqüentemente não obedece a Lei de Beer.

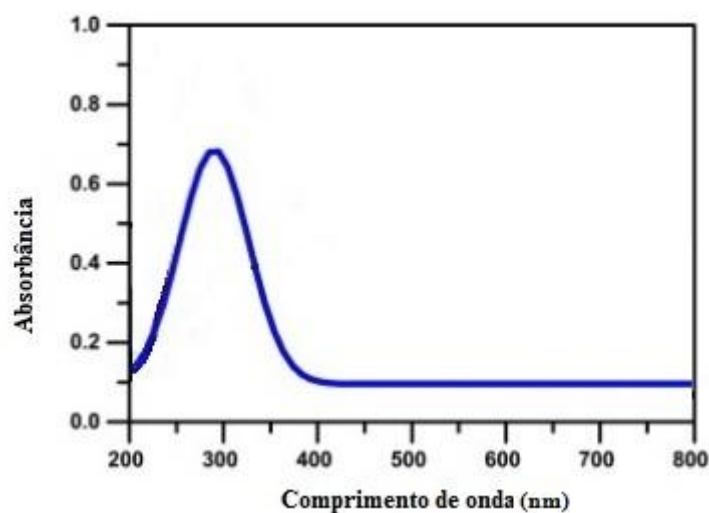
Figura 03: Relação entre a absorção e a concentração



Fonte: scribd

Os espectros UV-VIS são usualmente obtidos utilizando um espectrofotômetro e são representados por um gráfico de comprimentos de onda (ou número de onda) versus absorvância (ou transmitância). As características principais de uma banda de absorção são seu comprimento de onda de absorção (ou número de onda) e intensidade, como mostra a Figura 04.

Figura 04: Espectro de absorção UV-VIS



Fonte: Olhar Nano

Tipicamente os espectros de absorção na região UV-VIS caracterizam-se por apresentar curvas do tipo gaussianas distorcidas e alargadas, que são denominadas de bandas de absorção. A posição das bandas ao longo dos espectros é característica das substâncias absorventes (Silverstein, R.M., 1994).

Os espectros eletrônicos de absorção apresentam outra característica marcante que consiste da forte sobreposição de bandas associadas a duas ou mais substâncias presentes em uma amostra. Essas características decorrem da natureza alargada das bandas e da modesta correlação entre o espectro e a estrutura molecular. Com efeito, substâncias com estruturas moleculares muito diferentes, mas contendo o(s) mesmo(s)

cromóforo(s), podem apresentar espectros UV-Vis com perfis similares e bandas localizadas nas mesmas regiões de comprimentos de onda (Skoog, 2002).

A espectrofotometria UV/VIS, por sua simplicidade e custo, é um dos métodos analíticos mais utilizados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação e quantificação do princípio ativo de fármacos (Vinadé, 2009).

4.0 QUIMIOMETRIA, ORIGEM, EVOLUÇÃO E USO

A quimiometria surgiu por volta do ano 1971 com a criação da palavra Kemometri das combinações das palavras suecas Kemo e metri, pelo Prof. Svante Wold, da Universidade de Umea na Suécia (Chemometrics, Journal Of, 2007). Posteriormente foi sugerido o equivalente em inglês, chemometrics. No ano seguinte, o Prof. Svante Wold formou o primeiro grupo de estudos em quimiometria denominado de Research Group of Chemometrics.

No ano de 1973 foi publicado, pelo grupo de Svante Wold, o primeiro artigo utilizando o termo “chemometrics”. Em 1974, o Prof. Svante Wold idealizou a primeira definição de quimiometria, onde a exprimia como: “A arte de extrair a informação química relevante de dados produzidos em experimentos químicos, é chamada de quimiometria em analogia a “biometria e econometria” (Chemometrics, Journal Of, 2007).

Com o desenvolvimento tecnológico, a criação de dispositivos eletrônicos sofisticados com um grande conjunto de informação deu-se a necessidade de interpretar estas informações. Com a sofisticação crescente das técnicas instrumentais, impulsionada pela invasão de e microcomputadores no laboratório químico, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades) (Quimiometria, Unicamp, 2010).

A quimiometria é considerada uma área da química e não da matemática ou estatística, é mesmo que o quimiometrista, utilize métodos matemáticos, estatísticos e técnicas computacionais para resolver estes problemas encontrados em laboratório, os dados são de origem química (Kowalski, 1986). De acordo com Kowalski, "as ferramentas quimiométricas são veículos que podem auxiliar os químicos a se moverem

mais eficientemente na direção do maior conhecimento". Este pensamento nos faz definir quimiometria como sendo: "uma disciplina da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química.

4.1 Métodos de Calibração Multivariada (PCA) PLS

Dentre as diversas áreas da quimiometria podemos citar 4: planejamento e otimização de experimentos, pré-tratamentos matemáticos, métodos de classificação e métodos de regressão ou calibração multivariada. Neste trabalho nos limitaremos a discutir os métodos de calibração multivariada por ser o nosso objeto de estudo.

Um dos principais problemas em química é a determinação de propriedades físicas ou químicas, de um ou mais analitos, a partir de uma resposta instrumental (Rodriguez, 1988). O processo matemático pelo qual se relaciona a resposta instrumental as propriedades do analito é chamado calibração. O tipo de calibração mais conhecido é a calibração univariada, onde a partir de métodos de regressão linear é encontrado um modelo de regressão capaz de prever as propriedades de um analito através de sua resposta instrumental. De forma geral a calibração é composta por três etapas: calibração, predição e validação.

4.1.1 Análises de Componente Principal

A análise em componentes principais (PCA) é a base dos métodos de calibração. A partir da PCA é diminuída a dimensionalidade dos dados e um novo espaço n-dimensional é construído. Os novos eixos são chamados componentes principais (PC's). Para que ocorra a construção do novo espaço n-dimensional, a matriz \mathbf{X} é decomposta em um produto de duas matrizes, denominadas escores (\mathbf{T}) e pesos (\mathbf{P}), mais uma matriz de erros.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (4)$$

Os escores (T) representam as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos. Como cada componente principal é composto pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são chamados pesos. Algebricamente, os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e as Pcs. A primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido de maior variação no conjunto de dados, enquanto que a (PC2) é traçada no sentido ortogonal à primeira, com o objetivo de descrever a maior porcentagem possível da variação não explicada pela PC1 e assim subsequentemente, os escores representam a similaridade das amostras e a avaliação dos pesos permite entender quais variáveis contribuem mais para o agrupamento de dados representados no gráfico dos escores, no entanto é através da análise conjunta dos gráficos de escores e pesos, que é possível verificar quais variáveis contribuem para as diferenças observadas entre as amostras. Sendo determinado o número de componentes principais a ser usado pela variância explicada. Selecionando o número de componentes principais de forma a representar a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais obtidas (Marcelo, André; Poppi, Roney, 2011).

4.1.2 Calibração Multivariada PLS

A regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) é um método de calibração multivariada amplamente utilizado em Quimiometria. É possível calibrar para o componente(s) desejado enquanto modelagem implícita (cômputo) das outras fontes de variação. Neste caso utilizando as variações oriundas da amostra ou do equipamento que são os ruídos, pois através de técnicas de pré-processamento é possível corrigir a linha de base e além do mais a variação torna-se constante (Beebe et al, 1998).

A estimativa do modelo envolve a inversão de uma matriz, geralmente instável. PLS resolve este problema através da substituição de inversão das variáveis originais com combinações lineares. Onde a idéia central da técnica PLS é extrair das medidas disponíveis as variáveis latentes otimizando as variáveis para construção do modelo. Podendo ser empregada quando o número de variáveis medidas é maior do que o número de concentrações e quando existe multicolinearidade entre as medidas.

A base do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) é a decomposição de uma matriz de dados \mathbf{X} , em termos da soma de várias matrizes \mathbf{M}_i , que não podem mais

ser expandidas, mais uma matriz de erros (que corresponde a parte não modelada de \mathbf{X}). As matrizes \mathbf{M}_i constituem os chamados componentes principais, e são formadas pelo produto dos vetores, t (os escores) e p (os pesos).

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_a + \mathbf{E} \text{ ou (5)}$$

$$\mathbf{X} = t_1 p_1 + t_2 p_2 + \dots + t_a p_a + \mathbf{E} \text{ ou (6)}$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \text{ (7)}$$

No PLS, tanto a matriz das variáveis independentes \mathbf{X} , como a das variáveis dependentes \mathbf{Y} , são representadas pelos scores e loadings:

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \text{ (8)} \end{aligned}$$

Uma relação entre as duas matrizes de dados \mathbf{X} e \mathbf{Y} pode ser construída, correlacionando-se os scores de cada bloco, utilizando um modelo linear.

$$\mathbf{U} = \mathbf{Bt} \text{ (9)}$$

$$\mathbf{U} = \mathbf{BT} + \mathbf{G} \text{ (10)}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{BTQT} + \mathbf{H} \text{ (11)}$$

Onde: \mathbf{B} é a matriz dos coeficientes de regressão, \mathbf{G} é a matriz de resíduos dos escores e \mathbf{H} a matriz de resíduos de concentração.

5.0 EXPERIMENTAL

5.1 Amostras

As amostras de suco de laranja artificial foram coletadas em supermercados e hipermercados da cidade de Campina Grande- PB. Um total de três lotes distintos, sendo que de cada lote foram adquiridos 2 amostras com um volume de 200 ml cada, totalizando 6 amostras de sucos.

5.1.1 Diluições das amostras de suco

Como a faixa de variação do Brix nos sucos comerciais, é muito pequena, foram feitas diluições e adições de açúcar nos mesmos para ampliar a faixa de variação das amostras para a construção do modelo de calibração. A Tabela 03 representa as diferentes proporções das diluições suco:água e adições de açúcar utilizadas para a construção do modelo. As adições de açúcar ao suco variaram de 500 mg a 1000mg. Num total foram feitas 36 diluições dos sucos puros (A), 12 adições de açúcar (B) e 12 diluições das amostras adicionadas de açúcar (C).

Tabela 2: Diluições dos sucos e adições de açúcar.

| Proporções suco:água (A) | Proporções suco:açúcar (B) | Diluições de B (proporções B:água) (C) |
|-----------------------------|-------------------------------|---|
|-----------------------------|-------------------------------|---|

| | | |
|--------|--------------------------|------------|
| 1:0,25 | 20 ml : 500 mg (B 1) | 1(B1):1 |
| 1:1 | 20 ml + 1000 mg (B 2) | 1 (B2):2,5 |
| 1:2 | - | - |
| 1:2,5 | | |
| 1:3 | - | - |
| 1:4 | - | - |

5.2 Análises Instrumentais

O Brix de todas as 66 amostras foi medido utilizando um densímetro Densito 30 PX da marca Mettler Toledo.

Também foram registrados os espectros de todas as amostras utilizando um espectrofotômetro UVVIS/NIR 3100 Lambda 750 da marca Perkin Elmer, abrangendo uma faixa espectral de 200 à 3300 nm, com resolução de 1 nm.

5.3 Software

O tratamento quimiométrico dos dados foi realizado utilizando os softwares Unscrambler9.7, MatlabX e excel 2010.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Método de referência

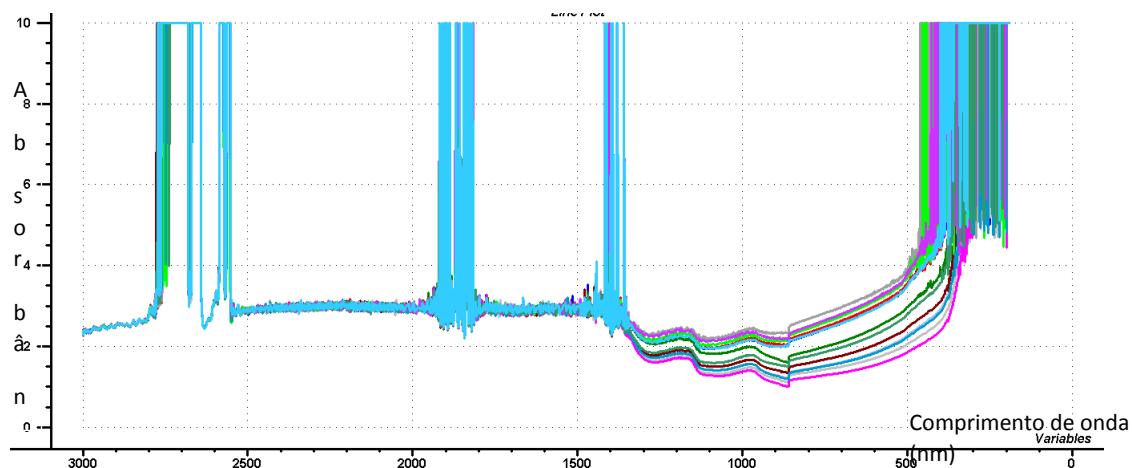
Para avaliar a repetitividade do método de referência, densimetria, foi medido o Brix de uma alíquota do suco puro e da água pura 10 vezes e em seguida foi calculada o desvio padrão e a repetitividade das medidas. Para o suco o desvio padrão foi de 0,12 e a repetitividade foi de 0,055 °BRIX. Já para a água pura o desvio padrão foi de 0,062 e a repetitividade foi de 0,055 °BRIX.

Em relação as 10 repetições para o valor de Brix do suco puro foi verificada uma tendência de aumento do brix ao longo das 10 análises. Já para a medida dos valores de Brix da água pura, isto não foi verificado.

6.1.1 Espectros

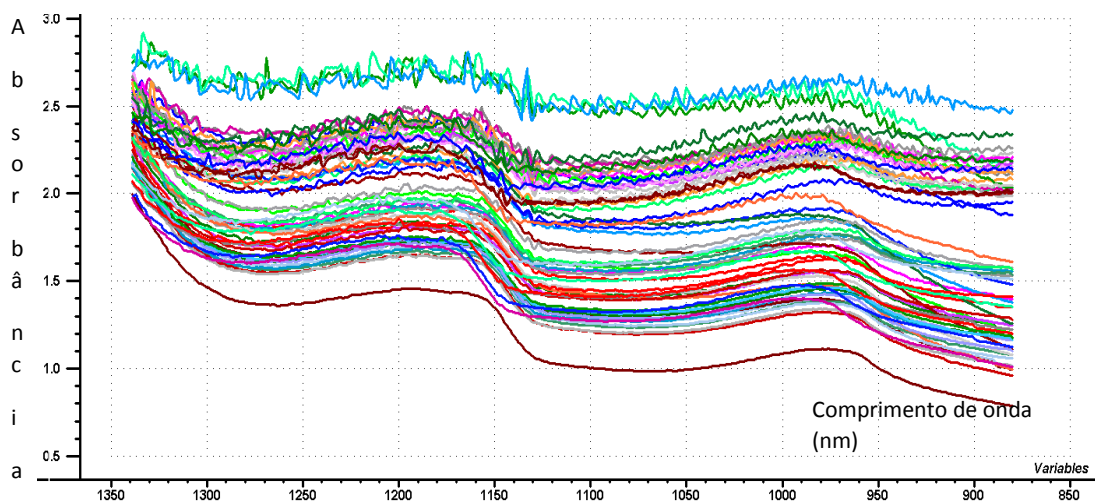
A figura 5, apresenta os espectros brutos das amostras de sucos puros, diluídos e adicionados de açúcar.

Figura 05: Espectros brutos variando a faixa de absorção (3000 à 200nm)



Como pode ser observado na figura 05, as regiões 3000 a 1340 nm e de 880 a 200 nm regiões com valores de absorvância muito altos e por este motivo foram excluídas para o tratamento quimiométrico. Deste modo, a faixa de trabalho utilizada foi de 1340 a 880 nm (Figura 06). Deste modo, o uso das espectroscopias UV-visível foi descartada e os modelos foram construídos utilizando apenas a região do infravermelho próximo.

Figura 06: Espectro bruto da faixa de trabalho (1340 à 880nm)

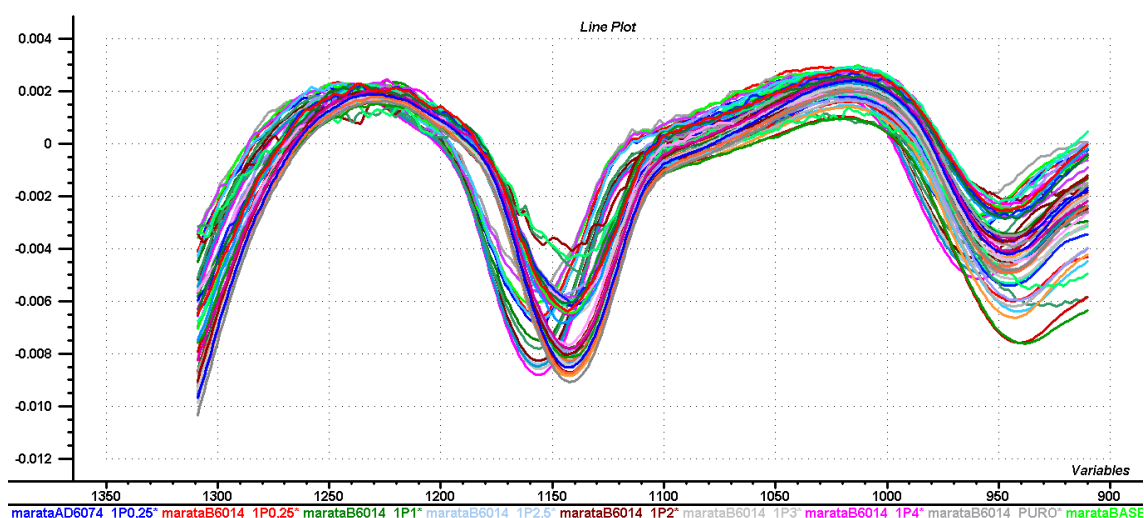


Como pode ser observado na figura 06, os espectros são bastante ruidosos e possuem um deslocamento da linha de base, o que pode interferir na capacidade preditiva do modelo construído. Os espectros mais ruidosos estão relacionados aos sucos mais concentrados, como era de se esperar, estes também possuem os maiores

valores de absorvância. Os sucos menos diluídos possuem espectros menos ruidosos e menores valores de absorvância. A intensidade de absorvância esta relacionado ao valor do Brix.

Deste modo, para retirar estas interferências espectrais foram testados alguns pré-tratamentos espectrais como: derivação, suavização, correção de linha de base, entre outros. O melhor pré-tratamento foi a 1ª derivada com polinômio de 1ª ordem e janela de 61 pontos. Figura 07.

Figura 07: Espectro com pré-tratamento da faixa de trabalho (1340 à 880nm)



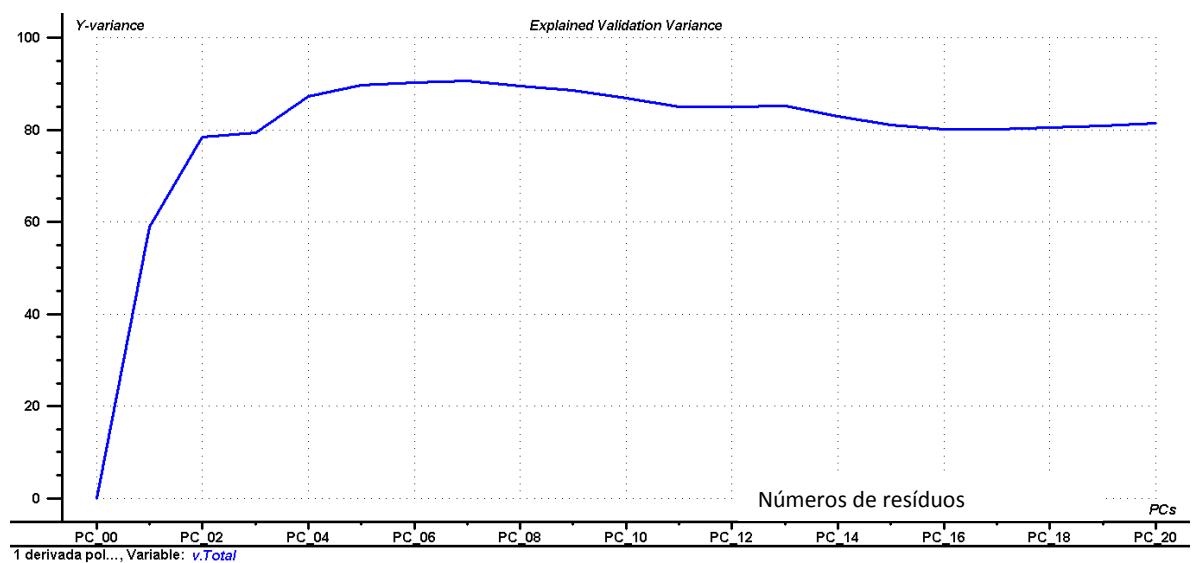
6.1.2 Construção do modelo de calibração

Para se construir um modelo de calibração é necessário que se possua amostras representativas do processo que se quer descrever. Deste modo, para ampliar a faixa de Brix das amostras comerciais, os sucos foram diluídos e adicionados de açúcar. Assim

a faixa de Brix inicial que era de 13 a 14,93 °BRIX foi ampliada para a faixa de 1,01 a 18,59 °BRIX. Essas diluições e adições foram feitas nos sucos dos três lotes, de modo que também foi contemplada as variações das condições de produção industrial. Para selecionar adequadamente as amostras que fariam parte do conjunto de calibração foi utilizado o algoritmo SPXY (Simões, 2008). Que selecionou 40 amostras para o conjunto de calibração e 26 amostras para a validação externa. A validação interna foi realizada por validação cruzada completa (full cross validation). Foi verificada a presença de 3 amostras anômalas que foram excluídas do conjunto devido ao seu alto resíduo e alta influência.

O modelo PLS foi construído utilizando as 40 amostras selecionadas pelo SPXY. E o número ideal de fatores para a construção do modelo foi 5 fatores (ou variáveis latentes), de acordo com o gráfico da variância explicada versus o número de fatores (Figura 08).

Figura 08: Variância explicada versus número de fatores



A tabela 04 mostra a variância explicada em y e X para os primeiros 20 fatores, como pode ser observado o primeiro fator explica 58,94% e 51,16%, da variância em X e y, respectivamente. O segundo fator explica 19,39% e 23,76% da variância em y, respectivamente. O modelo construído com os 5 primeiros fatores explica um total de 89,73% da variância em y e 99,12% em X.

A figura 09 mostra a reta do modelo de regressão para o Brix. Os pontos azuis representam as amostras de calibração e os pontos vermelhos representam a sua previsão durante a etapa de validação interna.

O erro do modelo na etapa de calibração (RMSEC – root mean square error of calibration) e de validação interna (RMSECV - root mean square error of cross validation) foram de 1,24 e 1,64 °BRIX, respectivamente. O coeficiente de correlação na etapa de calibração (R^2) foi de 0,9381 mostrando uma boa correlação entre os dados instrumentais (espectro) e o valor de Brix.

Tabela 03: Variância explicada em y e X para os primeiros 20 fatores

| No de fatores | Variância total explicada para y | | Variância total explicada para X | |
|---------------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
| | | (%) | | (%) |
| 00 | | 0 | | 0 |
| PC_01 | | 58.939 | | 51.158 |
| PC_02 | | 78.332 | | 74.915 |
| PC_03 | | 79.364 | | 98.064 |
| PC_04 | | 87.332 | | 98.875 |
| PC_05 | | 89.733 | | 99.119 |
| PC_06 | | 90.187 | | 99.179 |
| PC_07 | | 90.682 | | 99.217 |
| PC_08 | | 89.442 | | 99.305 |
| PC_09 | | 88.5 | | 99.338 |
| PC_10 | | 86.853 | | 99.377 |
| PC_11 | | 85.072 | | 99.397 |
| PC_12 | | 84.997 | | 99.407 |
| PC_13 | | 85.104 | | 99.432 |

| | | |
|-------|--------|--------|
| PC_14 | 82.866 | 99.457 |
| PC_15 | 81.046 | 99.489 |
| PC_16 | 80.088 | 99.51 |
| PC_17 | 80.173 | 99.521 |
| PC_18 | 80.461 | 99.531 |
| PC_19 | 80.935 | 99.542 |
| PC_20 | 81.475 | 99.547 |

O modelo construído foi utilizado para prever a concentração de 26 amostras externas ao modelo de calibração (validação externa). Os resultados são apresentados na tabela 05. O desvio padrão médio entre o valor de referência e o valor previsto foi de 1,11°BRIX.

A figura 10 mostra o gráfico do valor de referência versus o valor previsto pelo modelo. O erro da etapa de validação externa (RMSEP – root mean square error of prediction) foi de 1,31 °BRIX. E o coeficiente de correlação na etapa de previsão foi de 0,9745.

Figura 09: Modelo de regressão para o °BRIX

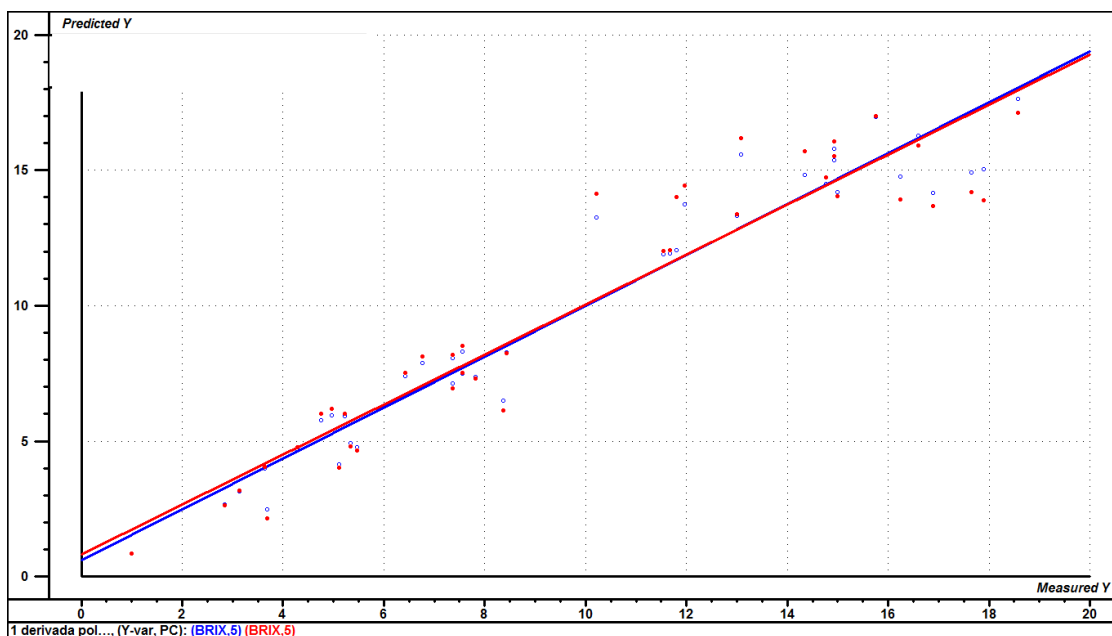


Figura 10: Valor de referência °BRIX versus o valor previsto pelo modelo

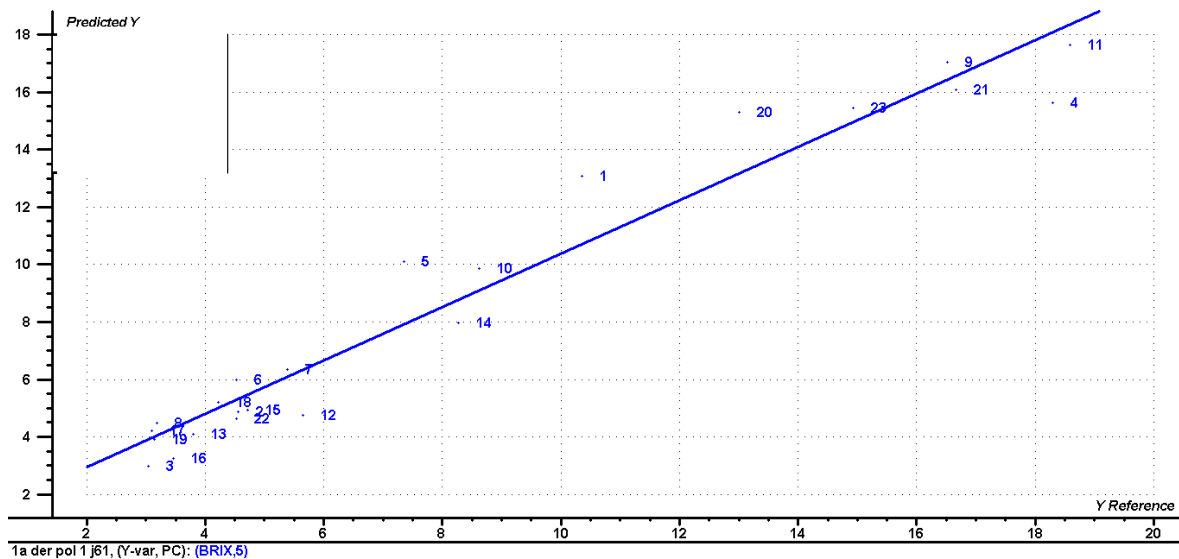


Tabela 04: Valores de °BRIX previstos pelo modelo.e medidos pelo método de referência

| Amostra | Valor previsto (°BRIX) | Valor de referência (°BRIX) |
|---------|---------------------------|--------------------------------|
| Suco 01 | 13.068 | 10.36 |
| Suco 02 | 4.865 | 4.56 |
| Suco03 | 2.968 | 3.04 |
| Suco 04 | 15.616 | 18.3 |
| Suco 05 | 10.116 | 7.36 |
| Suco 06 | 5.992 | 4.53 |
| Suco 07 | 6.351 | 5.39 |
| Suco 08 | 4.485 | 3.18 |
| Suco 09 | 17.05 | 16.52 |
| Suco 10 | 9.853 | 8.62 |
| Suco 11 | 17.627 | 18.58 |
| Suco 12 | 4.745 | 5.65 |
| Suco 13 | 4.096 | 3.8 |

| | | |
|---------|--------|-------|
| Suco 14 | 7.965 | 8.27 |
| Suco 15 | 4.92 | 4.71 |
| Suco 16 | 3.238 | 3.46 |
| Suco 17 | 4.217 | 3.1 |
| Suco 18 | 5.21 | 4.22 |
| Suco 19 | 3.926 | 3.14 |
| Suco 20 | 15.288 | 13 |
| Suco 21 | 16.086 | 16.67 |
| Suco 22 | 4.64 | 4.53 |
| Suco 23 | 15.447 | 14.93 |

A figura 11 mostra a concordância entre os valores previstos pelo modelo e os valores de referência, já que ambos se distribuem em torno de uma diagonal com inclinação de 45°. As amostras simbolizadas pelos círculos pretos representam as amostras de calibração e as simbolizadas pelos círculos brancos representam as amostras de previsão. Como pode ser verificado, a faixa de valores de Brix abrangida pelas amostras de calibração é mais ampla que aquela abrangida pelas amostras de previsão, o que assegura que não há extrapolação de valores.

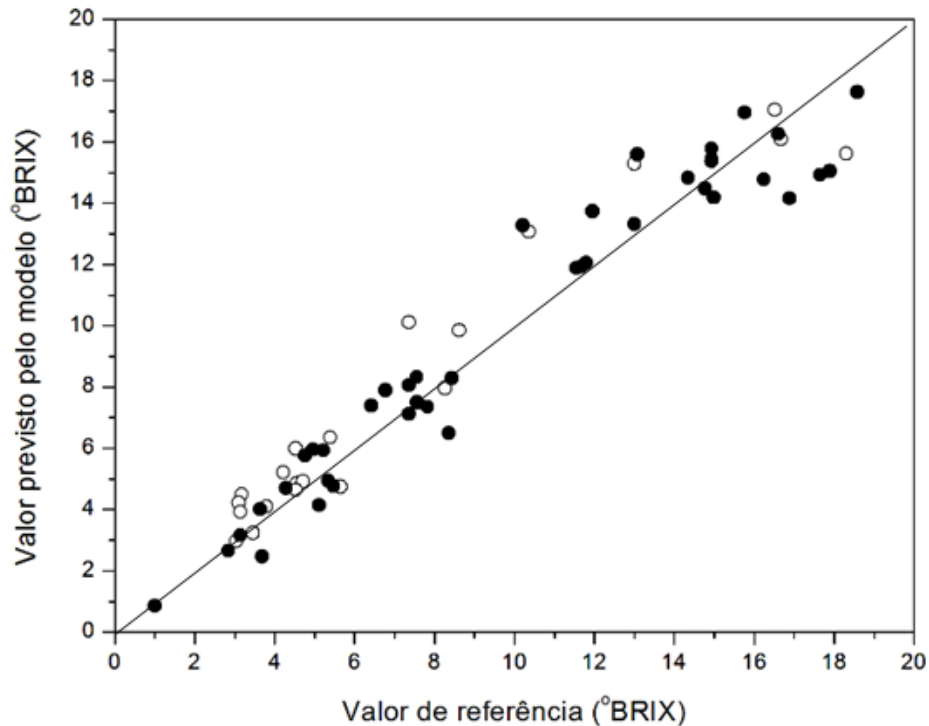


Figura 11: Valor de °BRIX medido versus valor de °BRIX previsto pelo modelo

Foi realizada uma análise estatística utilizando os testes F e t-Student para verificar se, a um nível de 95% de confiança, os valores estimados pelo modelo foram estatisticamente semelhantes aos determinados pelo método de referência. Foi obtido um valor de $F_{\text{calculado}}$ igual a 0,8289 que é inferior ao $F_{\text{crítico}}$ (4,03, para $n=9$). Já para teste t-Student foi obtido um valor para o $T_{\text{calculado}}$ de 0,7442 que é inferior ao valor do $t_{\text{crítico}}$ (2,262, para $n=9$). Os valores de T_{cal} e F_{cal} estão disponíveis nas tabelas do anexo 01. De acordo com a avaliação destes valores é possível concluir que há diferença estatística significativa entre os valores medidos pelo método de referência e os previstos pelo modelo.

7.0 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a potencialidade desta metodologia para prever o valor de Brix em sucos de laranja comerciais. Foi verificado que devido a alta

absorbância, as regiões visível e ultravioleta traziam mais ruídos que informação, por isso foi utilizada apenas a região do infravermelho próximo para a construção dos modelos multivariados.

Os resultados obtidos neste trabalho não foram satisfatórios se comparado as medidas realizadas pelo método de referência. Pois o erro apresentado pelo modelo (1,31) foi bem maior que a repetitividade do método de referência (0,055). Isto pode ser atribuído a composição do suco analisado, que possuía sólidos em suspensão o que resultou em espectros muito ruidosos devido ao espalhamento da luz incidente. Já que os espectros foram registrados no modo de transmitância e não de reflectância, devido a disponibilidade do equipamento. A má qualidade dos modelos foi comprovada pelas avaliações estatísticas realizadas.

REFERÊNCIAS

ATKINS, P; JONES, L. Princípios de Química :Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente. 3 edição, Tradução Ricardo Bisca de Alen castro: Porto Alegre: Bookman[®], 2006. 968 p.

Associação Brasileira Exportadores de Cítricos, disponível em www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/historia-da-laranja (Acesso em 12/08/2013).

BEEBE, K. R.; RANDY, J. P.; SEASHOLTZ, M. B., Chemometrics: A practical guide, Wiley-Interscience, New York, 1998.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. Instrução normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de fruta. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do>> Brasil. (Acesso em 20/09/2013).

Determinação simultânea de duas substâncias absorventes, Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfoxUAB/derminacao-simultanea-duas-substancias-absorventes>, (Acesso em 28/08/13)

Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I, Quím. Nova vol.35 no.1 São Paulo, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000100039, (Acesso em 18/09/2013).

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do>> BRASIL.?operacao= visualizar&id=1010>. (Acesso 17/07/2013).

Ministério da Agricultura. Portaria n. 371 de 19 de setembro de 1974. Complementa padrões de identidade e qualidade para suco de laranja. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19 de setembro de 1974. Disponível em: <http://www.ivegetal.com.br/p4.htm> (Acesso em 10/12/2013).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3ed. São Paulo; Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1.].

Journal of chemometrics A. 2007, vol. 20, n° 6-7, pp. 247-272 [26 pages]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0103-5053&lng=en&nrm=iso (Acesso em 13/08/2013).

Latado, R.R., Neto, A.T., Ando, A., Jemma, A.F., Junior, J.P., Figueiredo, J.O., Pio, R.M., Machado, M.A.; Namekata, T., Ceravolo, L., Rossi, A.C. Mutantes de Laranja – Pêra com número reduzido de sementes, obtidos através de mutações induzidas. Rev. Bras. Frutic 23 (2001) 339-344.

Regressão por mínimos quadrados parciais: Tutorial, Geladi, P.; Kowalski, B. R.; Anal. Chim. Acta **1986**, 185, 1. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003267086800289> (Acesso em 22/08/2013).

Rodriguez, A.M.G., Torres, A.G., Cano Pavon, J.M., Bosch Ojeda, C. Simultaneous determination of iron, cobalt, nickel and copper by UV-visible spectrophotometry with multivariate calibration. Talanta 47 (1998) 463-470.

Ronaldo, Fumio Hashimoto. Visão e Processamento de Imagens 2003, Disponível em: http://www.vision.ime.usp.br/~ronaldo/mac0417-03/aula_02.html, (Acesso em 23/09/2013)

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos 5ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.

Simões, Simone da Silva; Tese: Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada, UFPB, 2008.

Síntese de quantum dots de zno e medida de seu band gap, Disponível em: <http://www.olharnano.com/artigos/1003/129001/S%C3%ADntese-de-quantum-dots-de-ZnO-e-medida-de-seu-band-gap>, (Acesso em 27/09/2013).

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª edição, editora Thomson Learning, 2005.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Princípios de Análise Instrumental, 5ª edição editora Thomson Learning 2002.

Vinadé, Maria Elisabeth do Canto; Vinadé, Elsa Regina do Canto, Métodos espectroscópicos de análise quantitativa, editora UFSM. 2009.

