



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE FARINHAS
FUNCIONAIS E CAFÉS**

Anna Luiza Bizerra de Brito

João Pessoa – PB - Brasil

Fevereiro / 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Tese de Doutorado

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE FARINHAS FUNCIONAIS E CAFÉS

Anna Luiza Bizerra de Brito

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes

2ª orientadora: Profa. Dra. Amália Geiza Gama Pessoa

João Pessoa – PB - Brasil

Fevereiro / 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B862d Brito, Anna Luiza Bizerra de.

Desenvolvimento de métodos analíticos para monitoramento da qualidade de farinhas funcionais e cafés / Anna Luiza Bizerra de Brito. - João Pessoa, 2018.

155 f. : il.

Orientação: Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes.

Coorientação: Amália Geiza Gama Pessoa.

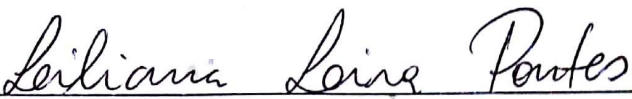
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Química analítica. 2. Métodos analíticos - Desenvolvimento. 3. Parâmetros de qualidade - Farinhas funcionais. 4. Alimentos funcionais. I. Pontes, Liliana de Fátima Bezerra Lira de. II. Pessoa, Amália Geiza Gama. III. Título.

UFPB/BC

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

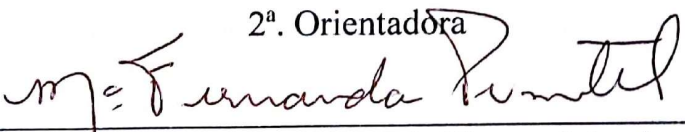
Aprovada:



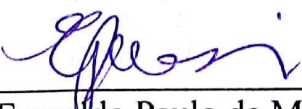
Prof. Dra. Liliana de Fátima Bezerra Lira de Pontes
Orientadora/Presidente



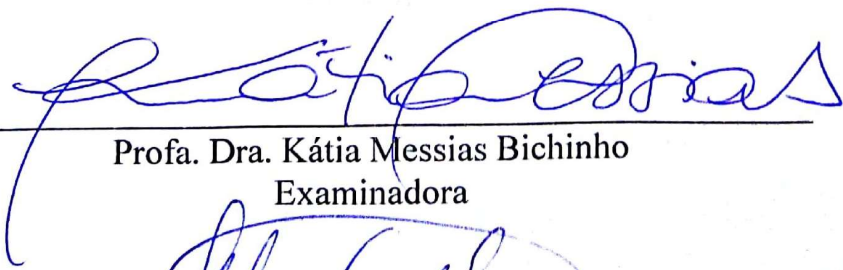
Prof. Dra. Amália Geiza Gama Pessoa
2ª. Orientadora



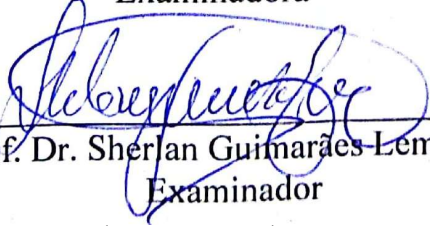
Prof. Dra. Maria Fernanda Pimentel Avelar
Examinadora



Prof. Dr. Everaldo Paulo de Medeiros
Examinador



Prof. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora



Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Examinador

“Desenvolvimento de métodos analíticos para monitoramento da qualidade de farinhas funcionais e cafés”

por

Anna Luiza Bizerra de Brito
Departamento de Química
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal da Paraíba
João Pessoa-PB-Brasil
23 de Fevereiro de 2018

Aos meus professores: Carmelita Gonçalves (colégio), Germano Vêras (iniciação científica e TCC), Liliana Pontes (mestrado e doutorado) e Fátima Bizerra (minha mãe). Me ensinaram a não desistir, a ser forte, a conviver com todos e a viver a vida de uma forma mais tranquila. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre ter estado comigo, me orientando e me dando força nos momentos mais difíceis. A Ele entrego, confio, aceito e agradeço a minha vida todos os dias.

Aos meus amados pais, Luiz Brito e Fátima Bizerra, por serem a minha base e o meu objetivo para continuar buscando sempre o melhor, para dar a eles um repouso merecedor de tanto empenho dado aos meus irmãos (Luis Carlos e Luis Filho) e a mim. Sempre me encorajando para a finalização do doutorado.

Aos meus irmãos pelo amor, carinho e orgulho que sentem por mim, levantando-me nos momentos mais difíceis e não me deixando desestimular. Amo vocês.

Ao meu marido, Edson, por todo apoio, amor, paciência e compreensão nos momentos que tive que me ausentar e de estresse.

À Professora Liliana Pontes, *teacher*, a quem tenho muito apreço e muita gratidão por todos os ensinamentos (acadêmicos e pessoais), durante esses seis anos de convivência (mestrado e doutorado). Sempre tão dedicada, sincera, objetiva, compreensiva e amiga.

À Professora Amália Pessoa pelos ensinamentos, disponibilidade e oportunidades que nos proporcionou.

Aos Professores Kátia Bichinho e Sherlan Lemos pela disponibilidades e pelas excelentes contribuições na qualificação do doutorado.

Ao Professor Márcio Coelho por ter sido o primeiro a me acolher na UFPB e sempre disposto a nos ajudar.

Aos Professores Maria Fernanda Pimentel, Joaquim Nóbrega, Ana Rita Nogueira, Gilberto Souza, Samuel Anderson Sousa, José Luiz Sá e Mário Ugulino pelo ensinamentos, contribuições e principalmente, pelo acolhimento e disponibilidade em abrir as portas dos seus laboratórios.

Às minhas amigas: Valeria Visani, Viviane Tibúrcio, Karla Danielle, Welma Vilar e Luzia Honório por todo o companheirismo, cumplicidade e presteza. Com elas usufruí horas de muitas conversas com risos e choros. Obrigada por terem estado comigo nesta luta.

À Marcos Pequeno pela companhia e amizade durante todo esse período.

Aos meus parentes e amigos que sempre torceram por mim.

À Adriano Araújo e Sófacles Soares pelo desenvolvimento dos algoritmos utilizados nesta tese.

À todos os colegas dos laboratórios que utilizei: LAC, Embrapa Pecuária Sudeste, GAIA, Geratec, LACOM, LAQA e salinha de estudo do LEQA pela boa convivência e sempre dispostos a ajudar, em especial, aos que mais me ajudaram na elaboração deste trabalho: Neirivaldo Cavalcante, Carolina Santos, Aline Oliveira, Aline Aparecida, Aline Brandão e Bernardo.

À Capes e ao NUQAAPE/FACEPE pela bolsa concedida e ajuda de custo, respectivamente.

Ao Departamento de Química/UFPB e ao programa de Pós Graduação de Química.

Neste período, abdiquei de muitas coisas para me dedicar a realização deste trabalho. Passei por momentos difíceis, que não foram raros. Aprendi que nada acontece no nosso tempo e que não somos independentes. Dependemos de muitos fatores como: disponibilidade do equipamento, parceria dos professores, ajuda das pessoas, entre muitos outros. Aprendi a chegar e a sair, e principalmente, que temos que ser gratos acima de tudo. Logo, finalizo com uma imensa gratidão a todos que fizeram parte desta caminhada e aqueles que contribuíram de uma forma geral, para a finalização desta gratificante etapa.

Obrigada!!!

Título: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE FARINHAS FUNCIONAIS E CAFÉS.

RESUMO

A busca por uma melhor qualidade de vida tem levado ao aumento do consumo de alimentos com propriedades funcionais. Garantir a qualidade de tais alimentos é um aspecto de grande relevância e, por isso, os parâmetros de qualidade vêm sendo constantemente monitorados por órgãos de fiscalização. Assim, este trabalho de tese de doutorado apresenta o desenvolvimento de métodos analíticos que foram avaliados para monitorar alguns parâmetros de qualidade em amostras de farinhas funcionais e cafés. O trabalho foi dividido em três etapas. A primeira etapa (capítulo II) relata a determinação das concentrações dos macrelementos, microelementos e elementos não essenciais em 60 amostras de farinhas funcionais de 20 diferentes tipos. A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foram utilizadas nas determinações destes elementos. Uma abordagem estatística utilizando Análise por Componentes Principais (PCA) foi realizada para análise exploratória dos dados (elementos) na caracterização das amostras de farinhas. As concentrações dos macrelementos ($K > P > Ca > Mg$), variaram de 746,4 a 30.328 mg kg⁻¹, e as concentrações dos microelementos (em ordem decrescente para Fe, Al, Mn, Cu, Mo e Cr), variaram de 0,03 até 160,1 mg kg⁻¹. Os elementos não essenciais, As, Cd e Pb, determinados em algumas amostras das farinhas apresentaram concentrações que estavam dentro da faixa requerida para uma ingestão diária. Na segunda etapa (Capítulo III) foram investigadas diferentes estratégias de transferência de modelos de calibração para determinar propriedades de proteínas brutas e fibras em amostras de farinhas com propriedades funcionais utilizando instrumentos que trabalham na região do infravermelho próximo (NIR) portátil e de bancada. Neste estudo, métodos de padronização direta (DS), padronização direta por partes (PDS) e padronização reversa (RS) foram avaliados para a transferência dos espectros obtidos nos dois instrumentos e diferentes números de amostras de transferência foram testados. Os modelos de calibração dos Mínimos Quadrados Parciais com o espectro completo (PLS_{espectro completo}), PLS com os coeficientes de regressão significativos selecionados pelo algoritmo *Jack-Knife* (PLS/JK) e Regressão Linear Múltipla (MLR) com prévia seleção de variáveis pelo Algoritmo das Projeções Sucessivas (MLR/SPA) foram avaliados. Os resultados mostraram que os menores valores da Raiz do Erro Quadrático Médio de Predição (RMSEP) foram obtidos com os modelos PLS_{espectro completo} (1,10) e MLR/SPA (1,45) para o parâmetro proteína bruta usando o método DS, enquanto para fibra, o valor RMSEP mais baixo foi obtido utilizando o PLS_{espectro completo} (2,34) com RS, embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre os valores de RMSEP obtidos para os modelos analisados, confirmados através do teste F (95% de nível de confiança). Por fim, na terceira etapa (Capítulo IV) a Análise Termogravimétrica (TGA) aliada a Análise Discriminante Linear (LDA) foi usada para classificar amostras de cafés quanto ao tipo cafeinado ou descafeinados. Os modelos de classificação foram construídos através da associação da LDA e algoritmos de seleção de variáveis: SPA, Algoritmo Genético (GA) e *Stepwise* (SW). O modelo GA/LDA não apresentou nenhum erro na classificação das amostras de teste (cafeinado: 8; descafeinado: 5) enquanto os modelos SPA/LDA e SW/LDA apresentaram 1 erro em cada. Os modelos foram comparados em termos de exatidão e dos valores de especificidade e sensibilidade obtidos para as amostras de teste, em que o GA/LDA apresentou a melhor performance com 100% de exatidão e 1,00 nos valores de sensibilidade e especificidade para cada classe.

Palavras-chave: alimentos; ICP OES; ICP-MS; transferência de calibração; NIR; TGA; LDA.

Title: DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR QUALITY MONITORING OF FUNCTIONAL FLOURS AND COFFEES.

ABSTRACT

The search for a better quality of life has led to increased consumption of functional foods. Ensure a quality of food is an aspect of great relevance and, therefore, the parameters of quality in all cases and being constantly monitored by inspection agencies. Thus, this thesis presents the development of analytical methods that were evaluated to monitor some quality parameters in samples of functional flours and coffee. The work was divided into three stages. The first stage (Chapter II) reports the determination of the concentrations of macroelements, microelements and non-essential elements in 60 samples of functional flours of 20 different types. The spectroanalytical techniques: optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) were used in the determinations of these elements. A statistical approach utilizing Principal Component Analysis (PCA) was realized for exploratory data analysis (elements) in characterization of the flour samples. The concentrations of macroelements (K > P > Ca > Mg), ranged from 746.4 up to 30,328 mg kg⁻¹, and concentrations of the microelements (in descending order for Fe, Al, Mn, Cu, Mo, and Cr) ranged from 0.03 up to 160.1 mg kg⁻¹. The non-essential elements, As, Cd and Pb, determined in some samples of the flours presented concentrations that are within the range required for a daily intake. The second stage (Chapter III) were investigates different strategies of calibration model transfer to determine crude protein and fiber properties in samples of flours with functional properties using portable and benchtop near infrared (NIR) region instruments. In the study, direct standardization (DS), Piecewise Direct Standardization (PDS), and reverse standardization (RS) methods were evaluated for the transfer of the spectra obtained with the two instruments and different numbers of transfer samples were tested. The Partial Least Squares with the full spectrum (PLS_{full spectrum}), PLS with regression coefficients selected by the Jack-Knife algorithm (PLS/JK) and Multiple Linear Regression (MLR) with previous selection of variables by the Successive Projections Algorithm (MLR/SPA) calibration models were evaluated. The results showed that the lowest values of the Root Mean Squared Error of Prediction (RMSEP) were obtained with the PLS_{full spectrum} (1.10) and MLR/SPA (1.45) models for the crude protein parameter using the DS method, while for fiber the lowest RMSEP value was obtained using the PLS_{full spectrum} (2.34) with RS, although no statistically significant difference was found among the RMSEP values obtained for the analyzed models, confirmed through F test (95% confidence level). Finally, in the third stage (Chapter IV), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Linear Discriminant Analysis (LDA) were used to classify coffee samples as caffeinated or decaffeinated. The classification models were constructed through the association of LDA and algorithms of selection of variables: SPA, Genetic Algorithm (GA), and Stepwise (SW). The GA/LDA model presented no error in the classification of the test samples (caffeinated: 8, decaffeinated: 5), while the SPA/LDA and SW/LDA models presented 1 error in each. The models were compared in terms of accuracy, specificity and sensitivity values obtained for the test subsets, in which GA / LDA presented the best performance with 100% accuracy and 1.00 in sensitivity and specificity values for each class.

Keywords: food; ICP OES; ICP-MS; calibration transfer; NIR; TGA; LDA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Diagrama típico de um ICP OES.	38
Figura 2.2 - Diagrama representativo do processo de transformação que ocorre no ICP.	41
Figura 2.3 - Teor de carbono residual (mg L^{-1}) para amostras de farinhas de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), grão de bico (GB), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB), por ICP OES.	49
Figura 2.4 - Concentrações de Ca (a), K (b) e Mg (c) (mg kg^{-1}) determinadas por ICP OES para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).	54
Figura 2.5 - Concentrações de P (a), Fe (b) e Mn (c) (mg kg^{-1}) determinadas por ICP OES para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).	56
Figura 2.6 - Concentrações de Al (mg kg^{-1}) determinadas por ICP OES para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).	58
Figura 2.7 - Concentrações de Cu (a), Mo (b) e Cr (c) (mg kg^{-1}) determinadas por ICP-MS/MS para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça	

(L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB). 60

Figura 2.8 - Concentrações de As (a), Cd (b) e Pb (c) (mg kg^{-1}) determinadas por ICP-MS/MS para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB). 62

Figura 2.9 - Gráfico da PC2 x PC1 escores (a) e pesos (b) da matriz das amostras de farinhas: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB). 66

Figura 3.1 - Espectros NIR das amostras de farinhas: (a) NIR portátil e (b) NIR de bancada. 90

Figura 3.2 - Espectros NIR de bancada das médias das classes de farinhas funcionais. 91

Figura 3.3 - Gráfico dos escores da (PC2 x PC1) dos espectros do instrumento NIR portátil (a); *leverage* x resíduos dos espectros (b) da matriz das amostras de farinhas: amaranto (), arroz (), aveia (), banana verde (), berinjela (), beterraba (), centeio (), chia (), feijão branco (), gergelim (), girassol (), grão de bico (), linhaça (), linhaça dourada (), maçã (), mandioca (), maracujá (), milho (), quinoa (), soja () e “Seca Barriga” (). 92

Figura 3.4 - Gráfico dos escores (PC2 x PC1) dos espectros do instrumento NIR de bancada (a); *leverage* x resíduos dos espectros (b) da matriz das amostras de farinhas: amaranto (), arroz (), aveia (), banana verde (), berinjela (), beterraba (), centeio (), chia (), feijão branco (), gergelim (), girassol (), grão de bico (), linhaça (), linhaça dourada (), maçã (), mandioca (), maracujá (), milho (), quinoa (), soja () e “Seca Barriga” (). 93

Figura 3.5 - Espectros médios NIR das amostras de farinha obtidos utilizando os instrumentos primários e secundários antes e depois da padronização pelos métodos DS (a) e RS (b), para 20 amostras de transferência.	97
Figura 3.6 - RMSEP em função do número de amostras de transferência após procedimentos DS e RS, para o parâmetro da proteína bruta.	98
Figura 3.7 - RMSEP em função do número de amostras de transferência após procedimentos DS e RS, para o parâmetro fibra.	99
Figura 3.8 - Variação (%) dos valores de Y no conjunto de calibração das amostras de transferência, N _{trans} , para cada propriedade.	100
Figura 3.9 - Gráfico dos valores preditos × referência dos subconjuntos de predição do modelos pelos métodos DS e RS, para o parâmetro proteína bruta. PLS _{espectro} completo – DS (a), PLS _{espectro} completo – RS (b), PLS/JK – DS (c), PLS/JK – RS (d), MLR/SPA – DS (e) e MLR/SPA – RS (f).	103
Figure 3.10 - Gráfico dos valores preditos × referência dos subconjuntos de predição do modelos pelos métodos DS e RS, para o parâmetro fibras. PLS _{espectro} completo – DS (a), PLS _{espectro} completo – RS (b), PLS/JK – DS (c), PLS/JK – RS (d), MLR/SPA – DS (e) e MLR/SPA – RS (f).	104
Figura 3.11 - Representação das variáveis selecionadas pelo algoritmo SPA para os parâmetros de proteína bruta (a) e fibra (b).	105
Figura 4.1 - Efeitos da cafeína no sistema imunológico.	110
Figura 4.2 - Termogramas sem pré-processamento das 38 amostras de cafés.	121
Figura 4.3 - Termogramas após pré-processamento de normalização e suavização S.G nas 38 amostras de cafés.	123
Figura 4.4 - Gráfico dos escores PC2 x PC1, para as 38 amostras de cafés (●: cafeinado e ■: descafeinado).	124
Figura 4.5 - Gráfico de influência (<i>leverage</i> x resíduos) dos termogramas das amostras de cafés (●: cafeinado e ■: descafeinado).	125
Figura 4.6 - Representação das variáveis selecionadas pelo algoritmo SPA (a), GA (b) e SW (c) para as amostras de cafés.	127
Figura 4.7 - Gráfico dos escores de índice das amostras x DF1 para os modelos SPA/LDA (a), GA/LDA (b) e SW/LDA (c), considerando 36 amostras de cafés (● : cafeinado e ■: descafeinado).	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Valores diários de ingestão dos constituintes inorgânicos.	34
Tabela 2.2 - Programação de aquecimento do forno de radiação micro-ondas para digestão das amostras.	46
Tabela 2.3 - Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES.	46
Tabela 2.4 - Parâmetros operacionais utilizadas no ICP-MS/MS.	47
Tabela 2.5 - Concentrações determinadas e certificadas dos elementos (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$), teste de recuperação, LOD e LOQ para farinha de arroz SRM (NIST 1568a) por ICP OES e ICP-MS/MS.	50
Tabela 2.6 - Parâmetros de LOD (mg kg^{-1}), LOQ (mg kg^{-1}), R^2 e % recuperação das linhas de emissão dos analitos determinando por ICP OES.	51
Tabela 2.7 - Parâmetros de LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$), LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$), R^2 e % recuperação na razão massa/carga dos analitos determinados por ICP-MS/MS.	53
Tabela 2.8 - Faixa das concentrações (mg kg^{-1}) / média $\pm$ S.D. de Ca, K, Mg, P, Fe, Mn e Al determinadas em amostras de farinhas por ICP OES, $n = 3$	59
Tabela 2.9 - Faixa das concentrações (mg kg^{-1}) / média $\pm$ S.D. de Cu, Mo, Cr, As, Cd e Pb determinadas em amostras de farinhas por ICP-MS/MS, $n = 3$	65
Tabela 3.1 - Teor de proteína bruta e fibras (%) em amostras de farinhas (média $\pm$ S.D., $n = 2$).	89
Tabela 3.2 - Valores R^2 e RMSEP_S^S (n° de PC's ou variáveis selecionadas) das amostras de farinhas a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR portátil.	95
Tabela 3.3 - Valores R^2 e RMSEP_P^P (n° de PC's ou variáveis selecionadas) das amostras de farinhas a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR de bancada.	96
Tabela 3.4 - Valores de RMSEP obtidos com os modelos $\text{PLS}_{\text{spectro completo}}$, PLS/JK e MLR/SPA antes e depois das técnicas DS e RS para determinação de proteína bruta e fibra. O número de fatores PLS e variáveis MLR são indicados em parênteses. A faixa de calibração para os dois parâmetros são encontrados nos colchetes.	101
Tabela 3.5 - Valores de RMSEP_{P-PDS}^S para os modelos analisados e usando diferentes janelas e 20 amostras de transferência por PDS.	106

Tabela 4.1 - Matriz de confusão dos resultados dos modelos SPA/LDA, GA/LDA e SW/LDA para o conjunto de teste das amostras de cafés (1) cafeinado e (2) descafeinado.	125
Tabela 4.2 - Matriz de confusão dos resultados dos modelos SPA/LDA, GA/LDA e SW/LDA para o conjunto de teste das amostras de cafés (1) cafeinado e (2) descafeinado, e valores de exatidão, especificidade e sensibilidade.	126

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BEC	Concentração equivalente ao sinal fundo, do inglês <i>Background Equivalente Concentration</i>
DS	Padronização Direta, do inglês <i>Direct Standardization</i>
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial, do inglês <i>Differential Scanning Analysis</i>
DTA	Análise Térmica Diferencial, do inglês <i>Differential Thermal Analysis</i>
EDXRF	Espectrometria de Fluorescência de Raio-X por energia dispersiva, do inglês <i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry</i>
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
FD	Função Discriminante, do inglês <i>Discriminant function</i>
FDA	Administração de Alimentos e Drogas, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FIR	Infravermelho distante, do inglês <i>Far Infrared</i>
GA	Algoritmo Genético, do inglês <i>Genetic Algorithm</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HCA	Análise por Agrupamento Hierárquico, do inglês <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
KS	Kennard-Stone
KNN	K-Ésimos Vizinhos mais Próximos, do inglês <i>K-Nearest Neighbors</i>
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LDA	Análise Discriminante Linear, do inglês <i>Linear Discriminant Analysis</i>
LIBS	Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser, do inglês <i>Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
MIR	Infravermelho Médio, do inglês <i>Middle Infrared</i>
MLR	Regressão Linear Múltipla, do inglês <i>Multiple Linear Regression</i>
MP AES	Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma por Micro-ondas, do inglês <i>Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer</i>

MSC	Correção de Espalhamento Multiplicativa, do inglês <i>Multiplicative Scatter Correction</i>
NIR	Infravermelho Próximo, do inglês <i>Near Infrared</i>
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
NIPALS	Método dos Mínimos Quadrados Parciais Iterativo não Linear, do inglês <i>NonLinear Iterative Partial Least Square</i>
PC	Componentes Principal, do inglês <i>Principal Components</i>
PCA	Análise por Componentes Principais, do inglês <i>Principal Components Analysis</i>
PCR	Regressão por Componentes Principais, do inglês <i>Principal Components Regression</i>
PDS	Padronização Direta por Partes, do inglês <i>Piecewise Direct Standardization</i>
PLS	Mínimos Quadrados Parciais, do inglês <i>Partial Least Squares</i>
RMSEP	Raiz do Erro Quadrático Médio de Predição, do inglês <i>Root Mean Squared Error of Prediction</i>
R ²	Coefficiente de determinação
RCC	Teor de Carbono Residual, do inglês <i>Residual Carbon Content</i>
REP	Erro Relativo de Predição, do inglês <i>Relative Error of Prediction</i>
RF	Rádio Frequência, do inglês <i>Radio Frequency</i>
RP	Reconhecimento de Padrões, do inglês <i>Pattern Recognition</i>
RS	Padronização Reversa, do inglês <i>Reverse Standardization</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SBR	Razão sinal analítico/sinal de fundo, do inglês <i>Signal-to-Background Ratio</i>
SDV	Decomposição de Valores Singulares, do inglês <i>Singular Value Decomposition</i>
SIMCA	Modelagem Independente e flexível por analogia de classes, do inglês <i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
SD	Desvio padrão, do inglês <i>Standard Deviation</i>
SPA	Algoritmo das Projeções Sucessivas, do inglês <i>Successive Projections Algorithm</i>
SRM	Material de referência padrão, do inglês <i>Standard Reference Material</i>
SNV	Variação Normal Padrão, do inglês <i>Standard Normal Variate</i>
SW	<i>Stepwise</i>
TGA	Análise Termogravimétrica, do inglês <i>Thermogravimetric Analysis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

CAPITULO I: INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização geral da problemática.	19
1.2 Objetivo geral.	23
1.3 Objetivos específicos.	23

CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS E ELEMENTOS NÃO ESSENCIAIS EM AMOSTRAS DE FARINHAS FUNCIONAIS UTILIZANDO ICP OES E ICP-MS

2.1 Introdução.	25
2.2 Fundamentação Teórica.	27
2.2.1 Farinhas funcionais.	27
2.2.2 Constituintes inorgânicos nos alimentos.	31
2.2.3 Preparo de amostras.	35
2.2.4 Técnicas Espectroanalíticas.	37
2.2.4.1 ICP OES.	37
2.2.4.2 ICP-MS.	40
2.3 Determinações dos constituintes inorgânicos em alimentos por ICP OES e ICP-MS.	41
2.4 Procedimento experimental.	44
2.4.1 Amostras.	44
2.4.2 Soluções e reagentes.	44
2.4.3 Instrumentação.	45
2.4.3.1 Condições operacionais.	46
2.4.4 Análise por componentes principais (PCA).	48
2.5 Resultados e discussão.	48
2.5.1 Avaliação do procedimento de digestão das amostras.	48
2.5.2 Exatidão do método de análise.	49
2.5.3 Avaliação das linhas de emissão e isótopos.	50
2.5.4 Determinação de Ca, K, Mg, P, Fe, Mn e Al em amostras de farinhas por ICP OES.	53

2.5.5 Determinação de Cu, Mo, Cr, As, Cd e Pb em amostras de farinhas digeridas por ICP-MS/MS.	60
2.5.6 PCA.	66
2.6 Considerações finais.	67

CAPÍTULO III: TRANSFERÊNCIA DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO ENTRE INSTRUMENTOS NIR DE BANCADA E PORTÁTIL PARA PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES DE FARINHAS FUNCIONAIS

3.1 Introdução.	70
3.2 Fundamentação Teórica.	71
3.2.1 Espectroscopia na região do Infravermelho próximo (NIR) e Quimiometria.	71
3.2.1.1 Técnicas de pré-processamento dos dados.	72
3.2.1.2 Técnicas de seleção de variáveis.	73
3.2.1.3 Técnicas multivariadas.	75
3.2.1.3.1 <i>Calibração multivariada</i>	76
3.2.1.4 Transferência de modelos de calibração.	78
3.3 Espectroscopia NIR, métodos de calibração multivariada e métodos de padronização aplicados ao monitoramento da qualidade de alimentos.	81
3.4 Procedimento experimental.	85
3.4.1 Amostras.	85
2.4.2 Análises físico-químicas.	85
3.4.3 Instrumentação e aquisição dos espectros.	86
3.4.4 Processamento quimiométrico e <i>softwares</i>	87
3.5 Resultados e discussão.	89
3.5.1 Análises físico-químicas.	89
3.5.2 Espectros NIR.	90
3.5.3 Detecção de amostras anômalas.	92
3.5.4 Pré-processamento dos dados.	94
3.5.5 Transferência de calibração.	97
3.6 Considerações finais.	106

CAPÍTULO IV: CLASSIFICAÇÃO DE CAFÉS USANDO A TERMOGRAVIMETRIA E ANÁLISE DISCRIMINTE LINEAR

4.1 Introdução.	108
4.2 Fundamentação Teórica.	109
4.2.1 Cafés.	109
4.2.2 Análise termogravimétrica.	111
4.2.3 Quimiometria.	112
4.2.3.1 Técnicas de reconhecimento de padrão.	112
4.2.3.2 Técnicas de seleção de variáveis.	114
4.3 Análise termogravimétrica e quimiometria.	116
4.4 Procedimento experimental.	119
4.4.1 Amostras.	119
4.4.2 Instrumentação e aquisição dos termogramas.	119
4.4.3 Processamento quimiométrico e <i>softwares</i> .	119
4.5 Resultados e discussão.	121
4.5.1 Termogramas dos cafés.	121
4.5.2 Pré-processamento dos termogramas.	122
4.5.3 PCA.	124
4.5.4 Modelos de classificação.	125
4.6 Considerações finais.	129
 CAPÍTULO V: CONCLUSÕES	
5.1 Conclusões gerais.	131
5.2 Perspectivas.	132
REFERÊNCIAS.	134
APÊNDICES.	

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização geral da problemática

A alimentação é considerada uma das atividades humanas mais importantes, não só por razões biológicas evidentes, mas também por envolver aspectos econômicos, sociais, políticos, científicos, psicológicos e culturais, fundamentais na dinâmica da evolução das sociedades (PROENÇA, 2010). Assim, alimentar-se bem é o primeiro passo quando se busca por uma melhor qualidade de vida. Uma alimentação saudável nas quantidades e proporções corretas é fundamental para a manutenção das diversas funções do corpo (MACDIARMID et al., 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que uma dieta saudável ajuda a proteger contra a desnutrição em todas as suas formas, bem como uma gama de doenças e agravos não-transmissíveis, incluindo diabetes, obesidade, anemia, doenças cardíacas, derrame e câncer, além de prevenir o envelhecimento precoce, melhorar a circulação, combater a depressão, o estresse, a ansiedade e a insônia (OMS, 2015). Dessa forma, o consumo de alimentos com menos calorias, ricos em fibras, vitaminas, elementos essenciais e outros constituintes tem aumentado consideravelmente (CALISKAN, 2015).

Alimento é definido como toda substância ou mistura de substâncias, que tem por propósito fornecer os nutrientes que sejam necessários à formação, manutenção e desenvolvimento do organismo humano, podendo apresentar-se no estado sólido, líquido, pastoso ou qualquer forma adequada (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016).

Em meio à gama de alimentos, alguns que até pouco tempo eram desconhecidos vêm ganhando espaço na mesa dos consumidores que buscam efeitos benéficos, como o caso das farinhas funcionais de diversas espécies vegetais (CHAUHAN; SAXENA; SINGH, 2015; JULIANTI et al., 2017).

As farinhas funcionais produzidas a partir de frutas, grãos de cereais e leguminosas, apresentam-se como uma maneira mais prática e versátil de ingestão e são ricas em macro e microelementos, fibras e nutrientes bioativos. De fato, são ricas em carboidratos análogos e fitonutrientes com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso, agem aumentando a imunidade, a reparação de danos no DNA causados pela exposição a toxinas, a desintoxicação do organismo, a proteção contra agentes cancerígenos e as atividades do fígado (PAN et al., 2017).

Outro alimento que tem sido discutido sobre as suas propriedades funcionais é o café. Nos últimos anos, o consumo de café atraiu um grande número de pesquisas devido ao seu impacto na saúde (SHARIF et al., 2017; DZIKI et al., 2015; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). O café é uma das bebidas mais consumidas do mundo. Sharif et al. (2017) apresentaram em seu

estudo de revisão que a ingestão de café pode estar associada à diminuição da mortalidade por doenças cardiovasculares e neurológicas, diabetes tipo II, bem como por câncer de endométrio e fígado, dentre outras. Tradicionalmente, os efeitos benéficos foram atribuídos unicamente ao seu ingrediente mais intrigante e investigado, a cafeína, pois quando ingerido em doses elevadas pode provocar vários efeitos tóxicos, como arritmia, hipopotassemia, hiperglicemia, vômitos, convulsões, entre outros (DIZIKI et al., 2015; LAFUENTE-LAFUENTE et al., 2008).

A escolha do produto por parte do consumidor geralmente está associada a sua aparência e, principalmente à informação nutricional descrita na embalagem. Porém, estes parâmetros nem sempre são eficazes na garantia de escolha segura do alimento desejado. Informação incorreta ou mesmo a falta de informação podem causar problemas mais graves, como hiperglicemias e problemas cardiovasculares, especialmente em caso de pessoas intolerantes ao glúten, pessoas que apresentam alta sensibilidade a algum constituinte do alimento, por exemplo, a cafeína ou aos portadores de doenças, como os diabéticos.

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1999), a comprovação da segurança de alimentos e de ingredientes é realizada a partir da avaliação das informações encaminhadas pela empresa a respeito da finalidade e das condições de uso do alimento ou ingrediente, bem como suas respectivas avaliações do risco na ingestão.

O monitoramento da qualidade de alimentos se refere, entre outros fatores, ao controle de amostras de diversos produtos alimentícios expostos ao consumo por meio, por exemplo, da análise de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e contaminantes. Já os alimentos processados, por sua vez, têm sua qualidade relacionada às suas características físicas, químicas, nutricionais e sensoriais, além de outros componentes como o seu custo, apresentação, facilidade de manuseio e consumo, embalagem, entre outros (TORREZAN, 2017).

Garantir a qualidade de um produto é um aspecto de grande relevância e, por isso, os parâmetros de qualidade vêm sendo constantemente monitorados pelos órgãos de fiscalização, o que beneficia a população, aumenta a concorrência entre os fornecedores e desperta o interesse de grandes empresas em gerar projetos de excelência em qualidade de seus produtos, desde a matéria-prima até o produto final (TORREZAN, 2017).

Um controle de qualidade efetivo pode evitar, por exemplo, o aumento do número de fraudes, ou seja, alimentos que podem conter componentes, nutrientes ou não nutrientes com ação biológica, que em quantidades suficientes causem efeitos adversos à saúde (BRASIL, 1999).

Ensaio físico-químico são comumente empregados na análise dos alimentos e cada tipo de alimento deve passar por ensaios específicos para que sua qualidade seja comprovada. Tais métodos analíticos possuem, algumas vezes, inconvenientes por serem destrutivos, oferecerem riscos ao analista, consumir grande quantidade de amostras, usarem solventes tóxicos, reagentes químicos, ter alto custo e em alguns casos apresentar-se como análises subjetivas, além de demandarem muito tempo (BOTELHO, 2014).

Neste sentido, surge a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos precisos, robustos, seguros e de baixo custo que possam ajudar a qualificar com segurança as amostras de farinhas funcionais e cafés. Tais métodos possuem grande importância tanto do ponto de vista econômico, quanto de saúde pública.

Para quantificação dos constituintes inorgânicos em amostras de alimentos, as técnicas espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), em meio a diferentes técnicas analíticas, têm sido largamente utilizadas por apresentarem vantagens como: baixos limites de detecção e quantificação para a maioria dos elementos, elevada sensibilidade, robustez, rapidez, precisão e por permitir análise multielementar (YILDIZ et al., 2016; JÚNIOR; DANTAS, 2016; HIGUCHI; OHKAWARA, 2015; SHAHBAZI; AHMADI; FAKHARI, 2016; BARBOSA et al., 2015; CZIPA; ANDRÁSI; KOVÁCS, 2015; WRUSS et al., 2015; VRČEK et al., 2014; BARBOSA, 2013).

A espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) é outra técnica analítica importante no desenvolvimento de métodos que determinam parâmetros de qualidade em alimentos. É uma técnica não destrutiva e permite análises rápidas com determinação de diferentes propriedades simultaneamente (MAGWAZA et al., 2016; ALAMAR et al., 2016; PASQUINI, 2003). Além disso, instrumentos NIR portáteis tem sido desenvolvidos oferecendo um menor custo para aquisição e maior facilidade de adaptação a diferentes condições de análise (BASRI et al., 2017; MARQUES et al., 2016; PLANS et al., 2013; SÁNCHEZ; HABA; PÉREZ-MARÍN, 2013; SALGUERO-CHAPARRO et al., 2013).

Com uma vasta aplicabilidade, a análise termogravimétrica (TGA) tem se mostrado útil para o controle de qualidade de alimentos (CHEN et al., 2017), bem como de novos materiais (LOGANATHAN et al., 2017), produtos farmacêuticos (RISOLUTI et al., 2016) e combustíveis (OTERO et al., 2011). Esta técnica utiliza uma quantidade muito pequena de amostra (até 20 miligramas), não gera resíduo e não utiliza reagente. Todavia, de forma semelhante à espectroscopia NIR, as interações físico-químicas que ocorrem entre os

componentes de uma amostra e sobreposição de alguns eventos térmicos (no caso da TGA) podem dificultar a elucidação visual dos termogramas da TGA (OTERO et al., 2011).

Nesse contexto, o uso da quimiometria pode ser uma ferramenta útil para extrair informações fornecidas por equipamentos de TGA e NIR quando a determinação direta do componente desejado não é possível devido às informações estarem distribuídas em várias variáveis e muitas vezes, por sobreposições destas informações.

Diante do exposto, este trabalho de tese apresenta o desenvolvimento de métodos analíticos para avaliar atributos importantes na qualidade dos alimentos funcionais (farinhas e cafés).

1.2 Objetivo geral

Desenvolver métodos analíticos para avaliar a qualidade de amostras alimentícias de farinhas e cafés utilizando técnicas espectroanalíticas e termogravimétricas aliadas às ferramentas quimiométricas.

1.3 Objetivos específicos

Capítulo II

- Determinar os macroelementos, microelementos e elementos não essenciais nos diferentes tipos de farinhas funcionais utilizando ICP OES e ICP-MS;
- Realizar uma análise exploratória a partir da análise por componentes principais (PCA) com o intuito de investigar a distribuição das amostras em relação aos elementos determinados.

Capítulo III

- Avaliar diferentes estratégias de transferência dos modelos de calibração (Mínimos Quadrados Parciais com o espectro completo – $PLS_{\text{espectro completo}}$, PLS com os coeficientes de regressão significativos selecionados pelo algoritmo *Jack-Knife* – PLS/JK e Regressão Linear Múltipla com prévia seleção de variáveis pelo Algoritmo das Projeções Sucessivas – MLR/SPA) entre instrumentos NIR portátil e NIR de bancada para predição de proteína bruta e fibras em amostras de farinhas funcionais.

Capítulo IV

- Avaliar o potencial da técnica termogravimétrica associada à quimiometria para classificar as amostras de cafés quanto ao tipo (cafeinado/descafeinado) utilizando a análise discriminante linear (LDA) aliados aos algoritmos de seleção de variáveis (SPA, Algoritmo Genético – GA e *Stepwise* – SW).

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS E ELEMENTOS NÃO ESSENCIAIS EM AMOSTRAS DE FARINHAS FUNCIONAIS UTILIZANDO ICP OES E ICP-MS

2.1 Introdução

Nos últimos anos, o aumento do consumo de alimentos funcionais tem desempenhado um papel fundamental na prática por hábitos saudáveis, devido à crescente preocupação do consumidor com a saúde e a percepção de que uma má alimentação pode acarretar em problemas tais como: obesidade, anemia, diabetes e colesterol, e afetar diretamente a saúde (KÜSTER-BOLUDA; VIDAL-CAPILLA, 2017).

De acordo com a Resolução nº18/99 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um alimento funcional ou com alegações de saúde é definido como "aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (BRASIL, 1999). Estes alimentos podem ser consumidos *in natura* ou submetidos a uma etapa de processamento com o objetivo de intensificar ou criar uma característica específica, como a desidratação para concentrar as fibras e/ou teores de nutrientes. (SIEGRIST et al., 2015).

Os alimentos funcionais podem ser classificados em diversas categorias, de acordo com as suas características, dentre estas pode-se destacar as propriedades antioxidantes, muitas vezes atribuídas aos seus conteúdos de polifenóis, antocianinas, flavonóides e tocoferóis (CHAUHAN; SAXENA; SINGH, 2015). Alguns exemplos são, o peixe (MORALES-MEDINA et al., 2016), a goiaba, a manga, o abacaxi e a casca de maracujá (MARTÍNEZ et al., 2012) e as farinhas de amaranto e chia (CHAUHAN; SAXENA; SINGH, 2015). Além disso, tais alimentos desempenham funções como atividades anti-hipertensiva e antimicrobianas (MORALES-MEDINA et al., 2016; MARTÍNEZ et al., 2012) e no caso da goiaba, da manga, do abacaxi, da casca de maracujá e do figo são valiosas fontes de fibras dietéticas (CALISKAN, 2015). Entre estes exemplos supracitados, as farinhas se destacam por fazer parte da dieta em muitos países devido ao seu custo relativamente baixo, ser uma boa fonte de carboidratos, nutrientes essenciais e fibras que contribuem para a melhoria do sistema digestivo promovendo benefícios para a saúde humana (CHAUHAN; SAXENA; SINGH, 2015; JULIANTI et al., 2017).

A farinha é o produto obtido a partir de uma moagem manual ou instrumental de legumes e/ou grãos (BRASIL, 1978). Alguns exemplos de farinhas consideradas como alimento funcional são encontrados na literatura, tais como: farinha de avelã (TURAN; CAPANOGLU; ALTAY, 2015), farinha de banana verde (MOTA et al., 2015), farinha de batata doce, farinha de milho, farinha de soja (JULIANTI et al., 2017) e farinha de grão de bico (XIAO et al., 2015).

Todos estes alimentos contêm nutrientes essenciais que, quando consumidos em uma dose recomendada, trazem benefícios para a saúde. Por outro lado, a presença de elementos não essenciais é uma preocupação quando a ingestão se dá a longo prazo, uma vez que estes podem acarretar danos ao organismo humano (FOWLER; ALEXANDER; OSKARSSON, 2015; DZIUBANEK et al., 2015).

O monitoramento dos elementos essenciais e não essenciais é de considerável relevância frente à necessidade de assegurar o consumidor que a ingestão de todos os nutrientes está sendo apropriada. Dentre os elementos essenciais, ocorre uma divisão entre macromelementos, que são nutrientes necessários em elevadas concentrações como Na, K, Ca e Mg e micromelementos que são essenciais para a saúde humana em baixas concentrações, tais como Fe, Zn, Mn e Cu. (TEJERA et al., 2013). Porém, outros elementos como Pb, Cd, Hg e As são considerados elementos não essenciais podendo acarretar danos à saúde humana dependendo da concentração e das espécies químicas presentes nos alimentos (TEJERA et al., 2013; ALGÜL; KARA, 2014).

Os limites superiores recomendados para macro e micromelementos em alimentos são estabelecidos por diferentes agências de saúde e segurança alimentar em todo o mundo, como por exemplo, Administração de Alimentos e Drogas (FDA), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (FAO/OMS, 1998; GOMEZ-CAMINERO et al., 2001; FAO/OMS, 2011; ALEXANDER et al., 2010; FDA, 2013). Apesar de alguns elementos estarem em baixas concentrações é muito importante que esses elementos químicos sejam monitorados nos alimentos e, para isso, a escolha da técnica adequada para quantificação é uma etapa importante para garantir resultados confiáveis.

Na literatura, diferentes técnicas analíticas tem sido empregadas para determinar o teor de constituintes inorgânicos em amostras alimentícias, entre as quais podem ser destacadas a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) (YILDIZ et al., 2016), Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GF AAS) (JÚNIOR; DANTAS, 2016), Cromatografia Iônica (HIGUCHI; OHKAWARA, 2015), Voltametria (SHAHBAZI; AHMADI; FAKHARI, 2016), ICP OES e ICP-MS (BARBOSA et al., 2015; CZIPA; ANDRÁSI; KOVÁCS, 2015; WRUSS et al., 2015; VRČEK et al., 2014; ORECCHIO et al., 2014), Espectroscopia de Emissão em Plasma Induzido por Laser (LIBS) e Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF) (PERUCHI et al., 2014). Dentre estas técnicas, a ICP OES e ICP-MS têm sido largamente utilizadas por apresentarem vantagens como baixos limites de detecção e quantificação para a maioria dos elementos, elevada sensibilidade, robustez, rapidez, precisão e por permitir análise multielementar (BARBOSA, 2013).

Neste estudo foram determinados os macroelementos, microelementos e elementos não essenciais nos diversos tipos de farinhas funcionais empregando as técnicas espectroanalíticas ICP OES e ICP-MS.

2.2 Fundamentação Teórica

2.2.1 Farinhas funcionais

Os consumidores têm se deparado com uma grande disponibilidade de farinhas funcionais no mercado. No entanto, é de fundamental importância saber escolher qual comprar e consumir, uma vez que nem todas são tidas como funcionais e, ao contrário do real objetivo, algumas podem não ser indicadas para uma alimentação saudável e também não servir para o problema que se deseja direcionar.

As farinhas oriundas dos alimentos com propriedades funcionais muitas vezes são utilizadas na substituição das farinhas convencionais (trigo, mandioca), por opção de ingestão ou mesmo de doenças, por exemplo no caso dos celíacos. A seguir, será feita uma descrição das farinhas funcionais e, suas fontes, que foram empregadas neste estudos.

As farinhas oriundas de amaranto (*Amaranthus*) são consideradas funcionais por possuírem compostos antioxidantes, como os tocoferóis, flavonoides, tocotrienóis e outros compostos fenólicos. Estas farinhas tem sido utilizadas por humanos por mais de 4.000 anos, e são classificadas dentro da classe *Dicotyledoneae* e na família *Amaranthaceae*, que inclui mais de 70 gêneros (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016; CHAUHAN; SAXENA; SINGH, 2015).

A farinha oriunda da aveia (*Avena sativa L.*) é considerada uma boa fonte de fibra dietética solúvel em β -glucano e ácidos graxo insaturados e contém fitoquímicos bioativos, como vitaminas, ácidos fenólicos e avenantramidas. O β -glucano é eficaz na redução da concentração sérica de colesterol e do nível de glicemia no sangue pós-prandial. Os principais componentes dos grãos de aveia são os carboidratos predominantemente amido (aproximadamente 60 g / 100 g) e fibras solúveis (β -glucano), que variam de 1,8 a 7,5 g / 100 g (SANDHU et al., 2017).

Já o arroz (*Oryza sativa L.*) é um dos principais alimentos básicos consumidos por 70% da população mundial. Após retirada a casca e o farelo, o arroz contém cerca de 90% de amido, 7-8% de proteína e 0,2-0,5% de fibra. Conhecido como "Dhanya", que significa o sustentador

da raça humana, sua importância foi reconhecida há muitos séculos. Sob forma de farinha de arroz é ideal para pessoas com necessidades dietéticas especiais, pois não contém glúten, gordura e colesterol (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016; JAN; GHOROI; SAXENA, 2017).

A banana verde (*Musa spp*) é muito rica em carboidratos indigestíveis, que é composto de celulose, hemiceluloses, lignina, amido, fibra dietética e amido resistente. Quando transformada em farinha, adquire alta quantidade de amido resistente (aproximadamente 40,9-58,5%) e fibra dietética (6,0-15,5%), bem como compostos bioativos como os ácidos fenólicos (SARAWONG et al., 2014). Assim, a produção de farinha de banana verde despertou o interesse da indústria de alimentos devido ao seu alto valor nutricional, além de ser um ingrediente de baixo custo, baixo índice glicêmico e uma alternativa para minimizar os resíduos de banana (ALVES et al., 2016).

A beterraba (*Beta L.*) possui altas concentrações de betalainas, por exemplo betacianinas e betaxantinas que são responsáveis pela intensa cor vermelha. As betalainas além de ser utilizadas como corantes naturais pela indústria alimentar, apresentam benefícios para a saúde humana, especialmente por sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (WRUSS et al., 2015).

A berinjela (*Solanum melongena*) é caracterizada por seu alto teor de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes; é rica em vitaminas B1, B3, B6 e minerais (cálcio, fósforo, ferro e potássio) e se destaca pelo seu conteúdo de flavonóides em cascas com grandes quantidades de antocianina nasunina. Além disso, esta hortaliça atua nas enfermidades do aparelho digestivo, dos rins e bexiga, nas afecções cutâneas e como redutora do colesterol (NIÑO-MEDINA et al., 2017).

Um alto teor de fibras alimentares, principalmente arabinoxilanos, pode ser encontrado na farinha de centeio (*Secale cereale L.*). Estes alimentos são muito importantes para a qualidade da panificação. O centeio quando comparado ao trigo, contém níveis mais elevados de arabinoxilanos e tem menor teor de glúten (DRAKOS et al., 2017). Além de ser rico em magnésio, manganês, fósforo, zinco e selênio, auxiliando assim o sistema imunológico (BEZERRA, 2016).

O consumo de chia (*Salvia hispânica L.*) oferece inúmeros benefícios para a saúde, por seu perfil nutricional contendo ácidos graxos essenciais, proteínas, antioxidantes, minerais e fibras alimentares e outros componentes bioativos, como tocoferóis e compostos fenólicos (VERDÚ; BARAT; GRAU, 2017). Estudos recentes mostram que a ingestão dietética de componentes bioativos como compostos fenólicos de sementes de chia está relacionada a uma

redução no risco de doença cardiovascular, efeito hepatoprotetor e doenças relacionada à obesidade (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017).

O gergelim (*Sesamum indicum*) fornece compostos bioativos, como antioxidantes polifenólicos, sesamina e sesamolina, além de ser rico em fibras (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016). Na busca de um substituto de trigo adequado, foi observado que a farinha de gergelim é muito útil, por apresentar uma melhor qualidade nutricional bem como propriedades funcionais melhoradas e mais econômica quando comparado ao trigo (ZOUARI et al., 2016).

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.), que contém aproximadamente 38-45% de óleo, 28% de fibra dietética e 21% de proteína, vem sendo bastante utilizada por seus componentes funcionais que fornecem benefícios para a saúde, como o ácido α -linolênico, lignanas, fibras alimentares solúveis e insolúveis, ácidos fenólicos, flavonóides, fenilpropanóides e taninos. O uso inclusive da farinha tem corroborado para uma redução do risco de osteopenia e/ou osteoporose, inflamação sistêmica, doença cardiovascular e melhoramento dos efeitos adversos da falta de estrogênio que começa durante a perimenopausa (AGUILAR et al., 2017; KAUR; SINGH; KAUR, 2017).

Considerada uma das frutas mais nutritivas, a maçã (*Malus domestica*) é uma fonte riquíssima de minerais, vitaminas, fibras dietéticas e antioxidantes fitoquímicos, como polifenóis que são principalmente encontrados nas cascas das maçãs. Além destes, os ácidos fenólicos simples, como o ácido gálico e o ácido ferúlico, flavan-3-ol, tais como catequina e epicatequina, e os seus oligômeros, tais como as procianidinas B1 e B2, são também encontrados na casca (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016).

O maracujá (*Passiflora edulis*), tendo como principal característica a alta quantidade de fibras e pectina presente na casca, é muito usado como ingrediente na preparação de farinhas com propriedades funcionais. Além disso, pode ser adicionado aos produtos que exigem um aumento da viscosidade, pois as fibras possuem algumas propriedades comparáveis aos aditivos alimentares que atuam como agentes espessantes ou gelificantes e estabilizadores de emulsões e espumas (COELHO et al., 2017).

A soja (*Glycine max* L.) e seus constituintes isoflavonas foram estudadas extensivamente em relação a muitos aspectos da saúde humana. A hipótese de que as isoflavonas de soja pudessem servir como uma alternativa à terapia de reposição hormonal acarretou em pesquisas sobre sintomas relacionados à menopausa, câncer de mama e osteoporose. As isoflavonas são classificadas como fitoestrógenos, que são definidas como um composto fenólico, não esteróide, estruturalmente semelhante ao estrogênio e que ocorre

naturalmente nas plantas. (COSCUETA et al., 2017; CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016).

O feijão branco (*Phaseolus vulgaris L.*) é amplamente cultivado e consumido no mundo, fornecendo quantidades significativas de proteína, amido, ácidos graxos insaturados, fibra dietética, principalmente fibra solúvel, além de ser excelente fonte de alguns minerais (ferro e zinco) e vitaminas. Quando transformado em farinhas, o consumo do feijão branco é melhorado e as suas propriedades funcionais são principalmente dependentes das proteínas, carboidratos e outros componentes contidos neste alimento (ROMANO et al., 2016).

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma das quatro principais culturas oleaginosas predominantes no mundo, amplamente cultivada nos cinco continentes. Algumas vantagens do farelo de girassol como matéria-prima para consumo humano estão relacionadas ao teor elevado de proteína (40-50 g/100 g), não ser uma cultura geneticamente modificada e ser esporadicamente alergênico. Além disto, possui alto teor de compostos fenólicos (1-4 g/100 g), sendo predominantemente o ácido clorogênico (ALEXANDRINO et al., 2017).

A quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) tem atraído crescente atenção no mundo devido à sua grande adaptabilidade a diferentes condições de crescimento, seus múltiplos usos, e aos valores nutricionais bem equilibrados. Considerado um alimento completo, a quinoa é constituída de 48-69% de amido na farinha, 14-18% de teor de proteína, 4,4-8,8% teor de lipídeos, estando acima do nível médio de cereais, e fibra dietética (7-10%). Além disso, é rica em alguns minerais (potássio), vitaminas (B6 e ácido fólico), bem como compostos bioativos (polifenóis) (LI; ZHU, 2017).

2.2.2 Constituintes inorgânicos nos alimentos

Os nutrientes presentes nos alimentos são responsáveis por fornecer energia necessária à manutenção das funções corporais como funções fisiológicas básicas. Além da reprodução e manutenção do equilíbrio entre as células, também fazem parte de tecidos e estão envolvidos na contração muscular e na transmissão dos impulsos nervosos (KOHLMEIER, 2015).

Um elemento é essencial para o organismo humano quando a ingestão abaixo de um certo limite resulta em uma redução da função fisiológica ou quando o elemento é parte integrante de uma estrutura orgânica desempenhando uma função vital no organismo (OMS, 1996).

De acordo com Underwood (1977) 26 elementos são essenciais ao ser humano. Estes consistem de 11 elementos em maiores concentrações: C, H, O, N, S, Ca, P, K, Na, Cl e Mg; e 15 elementos de menores concentrações: Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Co, Mo, Se, Cr, I, F, Sn, Si, V e As.

Segundo a OMS, os elementos de menores concentrações são classificados em três grupos, em função da sua significância nutricional para os humanos: elementos essenciais: I, Zn, Se, Cu, Mo, Cr, Fe e Co; elementos provavelmente essenciais: Mn, Si, Ni, B, V; elementos potencialmente tóxicos, alguns com possíveis funções essenciais em níveis baixos de concentração: F, Pb, Cd, Hg, As, Al, Li, Sn (OMS, 1996).

O cobre é amplamente distribuído em tecidos biológicos, onde ocorre largamente na forma de complexos orgânicos, muitos dos quais são metaloproteínas. As enzimas formadas pelo cobre são envolvidas em uma variedade de reações metabólicas, tal como utilização de oxigênio durante a respiração celular e a utilização de energia. Sua deficiência causa anemia hipocrômica, neutropenia, hipopigmentação de cabelo e pele, formação óssea anormal com a fragilidade esquelética e osteoporose, além de alterações vasculares, enquanto que quando ingeridos em excesso podem causar náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. As melhores fontes alimentares de cobre incluem fígado, marisco, nozes e sementes (KOHLMEIER, 2015).

O molibdênio desempenha um papel importante na função de defesa imunológica. Está presente nas três principais enzimas do organismo humanos, nomeadas de xantina desidrogenase/oxidase, aldeído oxidase e sulfito oxidase. Baixas concentrações de Mo são necessárias para o metabolismo do sulfito, ácidos nucleicos, aldeídos e taurina. Os efeitos adversos devido à deficiência e excesso deste nutriente são incomuns na saúde da população (KOHLMEIER, 2015). No entanto, OMS (1996) relata um estudo que pela infusão parenteral

de 500 µg de molibdato de amônio (225 µg de molibdênio) aumentou os níveis de ácido úrico no plasma e urina dos pacientes envolvidos.

O cromo é um nutriente essencial que potencializa a ação da insulina e, portanto, influência no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas (OMS, 1996). A baixa ingestão de Cr (III), biologicamente ativo, pode diminuir a resposta celular à insulina e retardar a utilização de gordura armazenada. No entanto, o Cr (VI) pode ser carcinogênico, mesmo em pequenas quantidades, por causa do seu alto potencial oxidativo. Alguns alimentos como nozes, grãos integrais, leveduras e queijos são boas fontes de cromo (KOHLMEIER, 2015).

O ferro, um dos mais importantes elementos para a vida humana, é encontrado em todas as células do corpo humano, fundamental por fazer a proteína da hemoglobina nos eritrócitos, cuja função principal é transportar oxigênio dos pulmões para as células do corpo. A deficiência de ferro pode causar anemia por diminuir a quantidade de hemoglobina no sangue e retardar o crescimento e o desenvolvimento cognitivo de lactentes e crianças (LEAO et al., 2016; KOHLMEIER et al., 2015). O ferro existe em dois estados estáveis de oxidação, o ferroso (Fe^{2+}) e o férrico (Fe^{3+}) que confere a capacidade de combinar ou doar um elétron, significando assim, o envolvimento nas reações de oxidação/redução (redox) tal como na cadeia respiratória mitocondrial. Além disso, pode ser um pró-oxidante e gerar radicais hidroxila através de reações de Haber-Weiss e Fenton (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016; KOHLMEIER, 2015).

Quanto ao elemento sódio, 90% da sua ingestão na dieta é obtido pelo consumo do cloreto de sódio. Atender à necessidade fisiológica do corpo humano com sódio, de modo a manter a pressão osmótica extracelular, e como resultado das perdas obrigatórias através da urina e suor, requer uma regular ingestão de sódio. A alta incidência de algumas doenças como hipertensão e doenças coronárias é consequência da alta ingestão do sódio (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016). Carnes, alimentos em conserva, sal de cozinha e salgadinhos são os alimentos com maiores concentrações deste elemento (KOHLMEIER, 2015).

O potássio é o principal elemento responsável pelo transporte de nutrientes e metabólitos e sua ingestão inadequada leva a um maior risco de arritmia cardíaca. Enquanto há uma elevada concentração desse elemento intracelular responsável por regular a ação de numerosas enzimas, na parte extracelular, a pequena quantidade de potássio é de grande importância fisiológica por ser um determinante crítico da excitabilidade neuromuscular (impulso nervosos e a contração dos músculos) (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016; KOHLMEIER, 2015).

O cálcio, quarto elemento mais abundante do corpo, é nutricionalmente essencial pois desempenha importantes papéis como, fornecer ao esqueleto a rigidez, dureza, resistência a suportar forças intrínsecas (contrações dos músculos) e extrínsecas (gravidade, traumas); além de ativação enzimática; diferenciação celular; resposta imunológica e atividade neuronal, devido a sua interação com numerosas proteínas distribuídas em diferentes compartimentos celulares (PU; CHEN; XUE, 2016). Sua absorção depende fortemente do status da vitamina D, que aumenta a absorção e a retenção do cálcio, enquanto que a ingestão excessiva de fosfato, sódio e proteína de origem animal diminui a absorção e a retenção (KOHLMEIER et al., 2015). De fato, a exposição prolongada à concentrações acima de 2500 mg por dia pode causar eventos gastrointestinais agudos, cálculos renais e doenças cardiovasculares (PU; CHEN; XUE, 2016; KOHLMEIER et al., 2015). Sua deficiência induz ao desenvolvimento da osteoporose e aumento do risco de fraturas. Pode ser encontrado em uma série de alimentos, mas os laticínios são as melhores fontes deste elemento (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016; PU; CHEN; XUE, 2016; KOHLMEIER, 2015).

O fósforo é muitas vezes determinado na forma de fosfato (PO_4^{3-} - principal forma usada do fósforo) e é um ânion constituinte do osso que participa no metabolismo e armazenamento de energia. Sua deficiência provoca osteoporose e aumenta o risco de fratura. A ingestão excessivamente pode causar calcificação dos tecidos extraósseos, incluindo artérias, rins, músculos e tendões (KOHLMEIER, 2015).

O magnésio é essencial para um grande número de reações no organismo humano, incluindo a estabilização de DNA e RNA além de ser um componente do mineral nos ossos. O magnésio tem fundamental importância para a função trifosfato de adenosina, atuando como cofator de mais de 300 enzimas, proteínas estabilizadas e membranas, sendo necessário para síntese do ácido nucléico e interação com algumas células receptoras, como N-metil-D-aspartato. Deficiências deste elemento pode causar desorientação, câimbras, dormência, arritmias cardíacas, entre outros sintomas. No entanto, uma ingestão excessiva pode causar náuseas, diarreia, fraqueza muscular e deficiência mental. Alguns alimentos são ricos em magnésio, como: os grãos integrais, nozes, sementes, espinafre, legumes, batatas e bananas. (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016; KOHLMEIER, 2015).

O manganês é tanto um ativador quanto um constituinte de várias enzimas. Estas enzimas ativadas pelo manganês são numerosas e incluem hidrolases, quinases, descarboxilases e transferases, mas a maioria pode ser ativada por outros metais, um exemplo é o magnésio (OMS, 1996). Uma baixa ingestão de Mn pode causar retardo do crescimento em crianças e diminuição da fertilidade em mulheres. Nenhum efeito de grau tóxico da ingestão de Mn em

alimentos foram relatados. Boas fontes de manganês são chá preto, nozes, grãos, batata doce e espinafre (KOHLMEIER, 2015).

O alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, podendo ser tóxico para os sistemas nervoso central, esquelético e hematopoiético. O Al foi controversamente implicado na doença de Alzheimer, embora isso continue não sendo claramente demonstrado (SATO et al., 2014).

Considerados os principais elementos não essenciais, o mercúrio, cádmio e chumbo, possuem propriedades ofensivas a saúde humana, mesmo em concentrações extremamente baixas. Além disso, afetam o metabolismo de alguns elementos traço essenciais, tais como, Cu, Zn, Fe, Mn e Se, pela competição por ligantes nos sistemas biológicos (FOWLER; ALEXANDER; OSKARSSON, 2015). Apesar das formas iônicas do arsênio ser considerado um elemento tóxico (As^{3+}), a outra forma (As^{5+}) desempenha um papel na metilação do DNA, das histonas ou de ambos (KOHLMEIER, 2015).

Alguns órgãos de fiscalização tais como Administração de Alimentos e Drogas (FDA), ANVISA (BRASIL, 2004) e OMS (1996), recomendam valores de ingestão diários dos constituintes nos alimentos em geral. A **Tabela 2.1** mostra os valores de ingestão diário, preconizado pelo FDA (2013) da ingestão dos constituintes inorgânicos com base em uma ingestão calórica de 2.000 calorias, para adultos e crianças com idade de quatro ou mais.

Tabela 2.1 - Valores diários de ingestão dos constituintes inorgânicos.

COMPONENTE ALIMENTAR	VALOR DIÁRIO
Potássio	3.500 mg
Sódio	2.400mg
Cálcio	1.000 mg
Fósforo	1.000 mg
Magnésio	400 mg
Ferro	18 mg
Zinco	15 mg
Cobre	2 mg
Manganês	2 mg
Iodo	150 µg
Cromo	120 µg
Molibdênio	75 µg
Selênio	70 µg

Fonte: U. S. FDA – Food and Drug Administration/2013

Estes constituintes podem abranger uma ampla faixa de concentração, sendo denominados de constituintes majoritários aqueles que estão presentes na faixa de peso relativo entre 1% e 100%. Já os que se encontram na faixa de 0,01% (100 mg L^{-1}) a 1% são geralmente denominados de constituintes minoritários. Além destes, há os constituintes traços que são aqueles presentes em quantidades entre 100 mg L^{-1} e $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, e por fim, aqueles existentes em quantidades menores que $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, constituintes ultratraço (SKOOG et al., 2006).

A determinação destes constituintes pode ser realizada por algumas técnicas espectroanalíticas que necessitam que a amostra esteja em forma de solução. Para isso é necessário a realização da etapa de preparo de amostra, que requer primeiro o conhecimento prévio da natureza da amostra, qual ou quais analitos pretende-se determinar e qual a técnica será empregada.

2.2.3 Preparo de amostra

A preparação de amostra é considerada uma etapa crítica durante todo o procedimento de análise química porque ela envolve mais consumo de tempo e esforço. O preparo de amostra consiste em submeter a amostra a um tratamento adequado com a finalidade de obter progresso nas próximas etapas. Informações sobre a amostra, o planejamento e a amostragem são etapas prévias cruciais para um bom êxito no procedimento de preparo de amostras (KRUG, 2008).

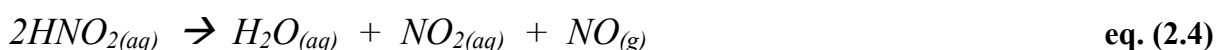
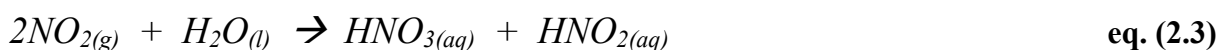
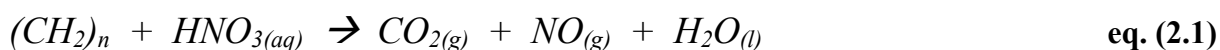
Na literatura, alguns procedimentos de preparo de amostras são mais usuais no que diz respeito a determinação de constituintes inorgânicos em alimentos, como: técnica de redução em cinzas ou oxidação; digestão via úmida em sistemas abertos ou fechados, com aquecimento em placas ou bloco de aquecimento; digestão assistida por radiação micro-ondas; extração ultrassônica; preparação de amostra por suspensão (FERREIRA et al., 2015; KORN et al., 2008; KRUG, 2008).

A digestão assistida por radiação micro-ondas é bastante utilizada e atrativa para pequenas quantidades de amostras. O aquecimento de um material por radiação micro-ondas baseia-se na energia eletromagnética transformada em calor através da condução iônica e rotação de dipolo da molécula (MITRA, 2003). Há dois diferentes sistemas desta técnica: sistema de frascos fechados e sistema de micro-ondas aberto focalizado. O sistema de frascos fechados é mais popular em comparação ao de sistema aberto focalizado devido a menor utilização de reagente, menor risco de contaminação e perdas de elementos voláteis. No entanto, o tempo de resfriamento dos frascos é bem maior, não tão seguro e a energia liberada por micro-ondas para as amostras não pode ser controlada como no outro sistema (KORN et al., 2008).

Alguns tipos de ácidos são empregados na decomposição de amostras por radiação micro-ondas e o uso de cada um tem a sua peculiaridade. O ácido nítrico é amplamente utilizado quando se emprega técnicas de espectrometria atômica, pois diferente do ácido sulfúrico e ácido clorídrico, não há nenhuma chance de formar sais insolúveis (MITRA, 2003). O ácido clorídrico não é recomendado quando a análise é realizada por GF AAS e ICP-MS, porque pode haver formação de analitos voláteis e dificuldade para dissociação de cloretos que causam interferências na fase vapor e/ou interferência espectral. Já o ácido sulfúrico é evitado devido à sua alta viscosidade apesar da sua eficiência na decomposição de matrizes orgânicas. Sua presença é particularmente indesejável em técnicas de análise onde a introdução da amostra é por nebulização por exemplo, FAAS, ICP OES, ICP-MS (KORN et al., 2008).

Uma alternativa frente à utilização de ácidos concentrados que vem ganhando destaque é a utilização de ácidos diluídos. No entanto, o emprego de ácidos diluídos, em alguns casos, requer o auxílio de um agente oxidante com intuito de aumentar o poder de oxidação da mistura utilizada na decomposição da amostra. Entre os reagentes oxidantes, o peróxido de hidrogênio é o mais utilizado pois há relatos que aumenta a eficiência da digestão de amostras (DIONÍSIO, 2013; KORN et al., 2008). Este processo favorece as condições de digestão mais brandas, baixos valores de branco analítico, baixa acidez residual, minimiza os riscos de contaminação e perdas do analito por volatilização proporcionando ainda o controle da temperatura e pressão (BIZZI et al., 2011a; ARAÚJO et al., 2002; BIZZI et al., 2015).

O ciclo de regeneração do ácido nítrico se baseia na reação entre o ácido nítrico diluído com o composto orgânico formando NO (**equação 2.1**), que posteriormente, reage com o gás oxigênio presente na fase vapor do frasco de reação, gerando NO₂ (**equação 2.2**). A radiação micro-ondas não é absorvida pela fase vapor, assim regiões mais altas do frasco não são aquecidas, possibilitando assim a condensação de NO₂, que sofre reação de desproporcionamento em meio aquoso gerando HNO₃ e HNO₂ (**equação 2.3**). Assim, o HNO₂ se decompõe em NO (**equação 2.4**), gerando o ciclo de regeneração, até que não exista mais oxigênio no frasco de reação (BIZZI et al., 2015; DIONÍSIO, 2013).



Um preparo de amostra ideal é aquele que oferece segurança, direciona a amostra a análise multielementar; requer baixo volume de reagentes e consequentemente gera menos resíduos (química verde); apresenta baixa acidez residual; baixo conteúdo de sólidos dissolvidos e baixo teor de carbono residual (RCC) (KRUG, 2008).

2.2.4 Técnicas Espectroanalíticas

As técnicas espectroanalíticas são aquelas baseadas em medidas de absorção e emissão de energia, por espécies químicas atômicas ou moleculares, podendo ser divididos em espectrometria de absorção molecular, espectrometria de absorção e emissão atômica, espectrometria de emissão de fluorescência atômica e molecular.

Algumas técnicas se destacam por ser comumente empregadas para determinação dos constituintes inorgânicos presentes nas amostras alimentícias, tais como ICP OES (CZIPA; ANDRÁSI; KOVÁCS, 2015; WRUSS et al., 2015; BARBOSA et al., 2015; SANTOS et al., 2015), ICP-MS (CZIPA; ANDRÁSI; KOVÁCS, 2015; BARBOSA et al., 2015; ORECCHIO et al., 2014; VRČEK et al., 2014; ALGÜL; KARA, 2014), LIBS e Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF) por dispersão de energia (PERUCHI et al., 2014), F AAS (YILDIZ et al., 2016) e GF AAS (JÚNIOR; DANTAS, 2016).

Entre estas, ICP OES e ICP-MS são bastantes empregadas por apresentarem algumas características como: análise multielementar, baixos limites de detecção e alta precisão (BARBOSA, 2013). Um fator em comum entre estas técnicas é a utilização do plasma, que é definido como um gás parcialmente ionizado onde coexistem elétrons livres em movimento, num processo onde ocorre transferência de energia por radiação, condução e aquecimento Joule. O plasma é gerado no final de uma tocha de quartzo, a qual é circundada por uma bobina de indução refrigerada com água, comandada por um gerador de radiofrequência (RF). Permite a determinação de baixas concentrações de elementos que tendem a formar compostos refratários (resistentes à decomposição térmica, por exemplo, óxidos de boro, fósforo, tungstênio, urânio, zircônio e nióbio), elevadas temperaturas (podendo chegar a 10.000 K) além da determinação de não metais (cloretos, brometos, iodetos e enxofre) (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

2.2.4.1 ICP OES

A espectroscopia de emissão atômica baseia-se na atomização e excitação por chama, arco elétrico, centelha elétrica e plasma. Aliada a fontes de plasma, esta técnica é utilizada para

a determinação de grande quantidade de elementos em níveis de concentração inferior a 1 mg L⁻¹ (BOSS; FREDEEN, 1997). Tem se tornado largamente utilizada por oferecer algumas vantagens, como apresentar faixa linear de várias ordens de magnitude, baixos limites de detecção e elevada precisão e exatidão (BARBOSA, 2013; BARBOSA et al., 2015; CZIPA; ANDRÁSI; KOVÁCS, 2015; WRUSS et al., 2015).

No equipamento utilizado neste estudo, as amostras em forma de solução são conduzidas por uma bomba peristáltica através de um nebulizador. No nebulizador, a amostra é transportada para a ponta do mesmo pelo efeito Bernoulli (aspiração). A alta velocidade do gás quebra o líquido em finas gotículas de diversos tamanhos que são selecionados pela câmara de nebulização, eliminando as gotículas maiores. Logo após, o aerossol é conduzido para um plasma de argônio, ocorrendo a atomização e a ionização da amostra e devido à energia térmica absorvida pelos elétrons, atingem um estado excitado. Quando os elétrons voltam ao nível fundamental, a energia é liberada como luz (fótons). Essa luz emitida dos íons no plasma passa pela janela de entrada para o monocromador onde é separado em seus vários comprimentos de onda. Cada elemento tem um próprio espectro de emissão característico. Por meio de uma rede Echelle, um prisma e uma espelho de focagem, esses fótons emitidos em várias frequências são capturados simultaneamente em um detector Dispositivo de Carga Acoplada (CCD) (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009; THERMO FISHER, 2009) (**Figura 2.1**).

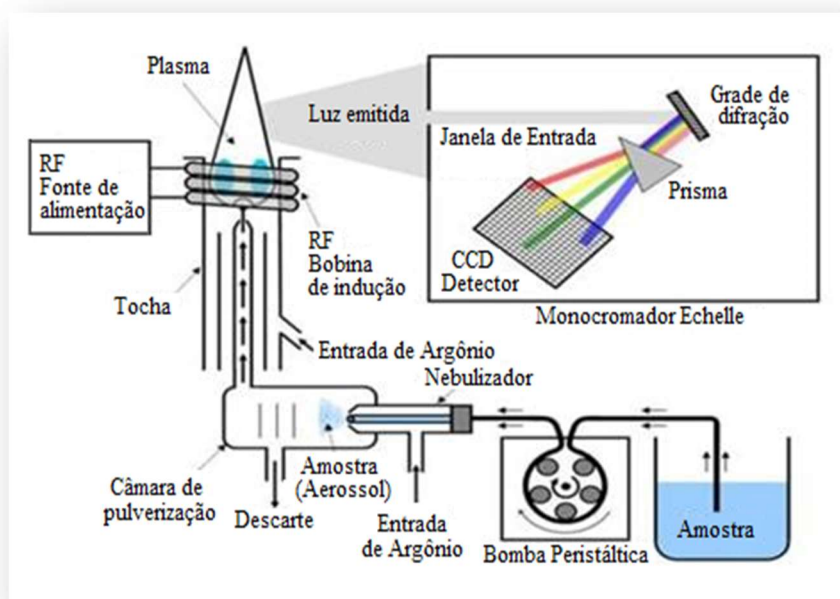


Figura 2.1 - Diagrama típico de um ICP OES. Fonte: Adaptado do <http://www.rohscmet.in/content/icp-oes>.

As condições de operação e o sistema de introdução de amostras empregados devem ser considerados porque podem interferir na magnitude dos efeitos de matriz. Todolí et al. (2002) apresentaram trabalhos que sugeriram algumas formas de correção de efeito de matriz, como seleção de um sistema de introdução de amostras adequado, uso de condições robustas de operação, além do uso de métodos especiais para aquisição e calibração, por exemplo, padrão interno ou adições de padrão (TREVIZAN, 2007).

Por ser uma técnica baseada na emissão de radiação eletromagnética nas regiões UV-VIS por átomos neutros ou íons excitados após excitação eletrônica em um gás a alta temperatura, fornece informações quantitativas e qualitativas sobre as amostras analisadas. Além disso, oferece um número grande de linhas de emissão para a maioria dos elementos permitindo, em alguns casos, minimizar as possíveis interferências espectrais, selecionando outra linha de emissão do analito (BOSS; FREDEEN, 1997).

A potencialização das interferências pode ocorrer devido ao elevado sinal de fundo diante da presença de elevadas concentrações de um determinado elemento em material vegetal, por exemplo o sódio. A fim de minimizar esse efeito, alguns equipamentos permitem a leitura dos elementos em duas configurações: axial e radial.

A configuração axial é a mais sensível e geralmente é indicada para os analitos presentes em menor concentração. Contudo, aumenta as interferências de atomização e ionização e a faixa de resposta linear é menor. Enquanto que a configuração radial aumenta a faixa de trabalho e é preferível para analisar amostras com alto teor de sólidos dissolvidos e outras matrizes complexas, devido a menores níveis de interferências da matriz na região de interesse (OLIVEIRA et al., 2012; THERMO FISHER, 2009).

A técnica torna-se limitada por duas dificuldades: a primeira se refere as condições de operação de compromisso que podem ser usadas para determinar a maioria dos outros elementos não são adequadas para os alcalinos, devido suas energias de ionização. Isto porque existe uma correlação entre o efeito de matriz e o segundo potencial de ionização do elemento, ou seja, elementos com segundo potencial de ionização menor que 15 eV (o primeiro potencial de ionização do Ar corresponde a 15,75 eV) produzem efeitos de matriz mais severos. A segunda dificuldade se encontra nas linhas mais intensas de Li, K, Rb e Cs, que estão localizadas em comprimentos de onda da região do infravermelho próximo, o que leva a problemas de detecção em muitos espectrômetros de plasma que são projetados principalmente para detectar radiação ultravioleta (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Outros problemas relacionados à técnica são as interferências espectrais, que são sobreposição espectral entre linhas emitidas pelos diferentes elementos da amostra (Zn (I)

213,856 e Fe (I) 213,859, Mn (II) 259,373 e Fe (II) 259,373) e efeitos de matriz, que são interferências relacionadas à nebulização, transporte e efeitos energéticos no plasma (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

2.2.4.2 ICP-MS

Desde o início dos anos 80, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tornou-se uma das técnicas mais importantes para a análise elementar permitindo a quantificação dos analitos pela razão massa carga (m/z). Apresenta algumas características como: baixos limites de detecção para a maioria dos elementos, elevada frequência analítica, ampla faixa linear, alto grau de seletividade, precisão e exatidão, e de grande sensibilidade, podendo chegar a detectar em nível de ng L^{-1} (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Após a introdução dos íons gasosos no espectrômetro de massas, os mesmos seguem trajetórias distintas em função das suas massas/carga por consequência da ação dos campos elétricos e magnéticos que irão direcioná-los, promovendo assim a seleção da razão massa/carga que atingirá o detector (TOMAS, 2013).

Esta técnica está susceptível a interferências que são divididas em duas grandes categorias: interferências não espectrais e espectrais. Alguns elementos são afetados por interferências isobáricas, como por exemplo, a medida de $^{75}\text{As}^+$ é fortemente afetada pela presença de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Assim, para reduzir essas interferências algumas estratégias podem ser adotadas como: utilização de plasma frio (baixa potência), seleção de outro isótopo e tecnologia da célula de reação e colisão (DIONÍSIO, 2013). Além disso, em comparação com o ICP OES, a instrumentação dessa técnica é bem mais complexa e dispendiosa.

Em ambas as técnicas (ICP OES e ICP-MS), a introdução das amostras no plasma é na forma de aerossol de solução aquosa. Assim, o plasma induz a amostra a emitir radiação eletromagnética na região UV-VIS e a intensidade da luz emitida é proporcional à concentração desta espécie química de interesse. Na **Figura 2.2** a seguir, é representado o processo de transformação que ocorre no ICP.

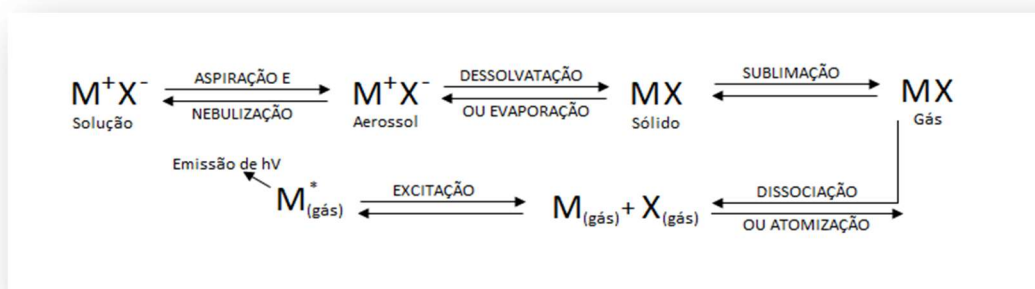


Figura 2.2 - Diagrama representativo do processo de transformação que ocorre no ICP.

O processo de transformação ocorrido, mostrado na **Figura 2.2**, evita a introdução de carga orgânica dentro do equipamento, o que poderia ocasionar a contaminação das lentes iônicas e o entupimento do sistema de introdução da amostra, além da redução de interferências poliatômicas (ICP-MS) e supressão de sinal, afetando o poder de detecção das técnicas (BARBOSA, 2013). Porém pode-se realizar determinações de analitos em amostras orgânicas, fazendo a introdução de oxigênio (AMAI, 2014)

2.3 Determinações de constituintes inorgânicos em alimentos por ICP OES e ICP-MS

Trabalhos envolvendo determinações de constituintes inorgânicos em amostras alimentícias com propriedades funcionais utilizando as técnicas espectroanalíticas tem sido bastante descrito na literatura. Alguns reportam a determinação de constituintes em amostras semelhantes às usadas neste estudo usando as técnicas ICP OES e ICP-MS.

Muller et al. (2017) propuseram um método de preparação de amostras usando apenas H_2O_2 no sistema de câmara de reação única (SRC-UltraWave TM) para digestão de alimentos ricos em carboidratos (mel e farinhas de trigo, milho, mandioca e batata). Em seguida, determinaram Ca, Fe, Mg e Na por ICP OES e As, Ba, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Pb, Sr e Zn por ICP-MS. Como resultado, observaram que entre os digeridos a menor concentração de carbono residual foi conseguida usando 8 mL de H_2O_2 a 30 e 50% ($m\ m^{-1}$), 250 °C e 199 bar. O carbono residual inferior a 250 e 400 $mg\ L^{-1}$ foi obtido para mel e diferentes farinhas (trigo, milho, mandioca e batata), respectivamente. Os limites de detecção obtidos pelo método proposto foram adequados para a análise de controle de qualidade de alimentos analisados e variaram de 0,0001 $\mu g\ g^{-1}$ a 30 $\mu g\ g^{-1}$. Os autores concluíram que o método proposto foi considerado uma excelente análise verde, pois o reagente utilizado (H_2O_2) se decompõe em água e oxigênio.

Zhang et al. (2017) analisaram Be, Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cs, Ba, Pb, Bi, Th, U e elementos das terras raras por ICP OES e ICP-MS em amostras botânicas. Para isto, utilizaram o método de dissolução da cinza com ácido nítrico diluído, e fizeram uso de cinco materiais de referência certificados de plantas para avaliar o desempenho do método desenvolvido. Os valores certificados variaram de 80 e 114% para os elementos analisados e os resultados não mostraram diferença significativa daqueles por digestão com radiação micro-ondas (MW).

Czipa; Andrási; Kovács (2015) determinaram as concentrações dos elementos essenciais e não essenciais em amostras de méis de diferentes regiões geográficas por ICP OES (Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn) e ICP-MS (As, Cd, Cr, Mo, Pb e Se). Para o preparo de amostra, o seguinte procedimento foi realizado: 3 g de mel em 10 mL de HNO_3 (69% v v⁻¹) e a mistura foi mantida em repouso. Após esse tempo de repouso foi realizada uma pré-digestão a 60 °C por 30 min, e após o resfriamento, 3 mL de H_2O_2 (30% m m⁻¹) foi adicionado e a mistura foi aquecida a 120 °C por 90 min. Os autores encontraram concentrações menores dos elementos essenciais analisados quando comparados com a literatura.

Wruss et al. (2015) analisaram as características composicionais de produtos à base de beterraba produzidos na Áustria. Os elementos determinados Mg, Cu, Fe, Ni e Zn por ICP OES e K, Na, Mg, Ca e Cl por cromatografia iônica. O preparo de amostra consistiu em uma diluição 1:10 em 1 mol L⁻¹ de HNO_3 usando ionização em 1.000 W. Quanto a composição mineral, os autores concluíram que grandes variações na concentração de destes elementos foram observadas entre as variedades de beterraba analisados.

Karlsson; Sjöberg; Ogar (2015) realizaram a determinação de Ca, K, Mg e Na, Al, Fe, Mn, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, V e Zn por espectroscopia de emissão atômica com plasma por micro-ondas (MP AES) e ICP-MS em amostras de girassol. O preparo de amostra consistiu em utilizar HNO_3 concentrado e radiação micro-ondas. A fim de comparar os resultados obtidos por MP AES, os autores realizaram a determinação dos analitos por ICP-MS e obtiveram valores próximos sem diferença significativa, ressaltando a importância da utilização de linhas atômicas, minimização da ionização e o uso de padrões internos, possivelmente para resolver interferências espectrais. Contudo, o método não foi eficiente na quantificação de arsênio, cobalto e molibdênio devido às concentrações abaixo do limite de detecção.

Barbosa et al. (2015) desenvolveram um procedimento de decomposição para determinação de elementos essenciais (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V e Zn) e não-essenciais (As, Ba, Cd, Pb e Sr) em amostras a base de soja (extrato de soja, soja transgênica, farinha de

soja integral) por ICP OES e ICP-MS. Os autores propuseram a utilização de ácidos diluídos para o processo de digestão das amostras ($2,1-14,5 \text{ mol L}^{-1}$) aliado ao uso do H_2O_2 para aumentar a eficiência da decomposição das amostras e concluíram que o procedimento desenvolvido foi eficiente para a determinação dos elementos supracitados.

De forma semelhante, Santos et al. (2015) estudaram a homogeneidade da farinha de milho como candidato a material de referência certificado por análises inorgânicas. Para tanto, foram quantificados Ca, K, Mg, P, Zn, Cu, Fe, Mn e Mo por ICP OES, e o preparo de amostra consistiu na utilização 2mL de HNO_3 a 65% (v v^{-1}) a 2 g da amostra e 1 mL de H_2O_2 30% (m m^{-1}) em um bloco digestor com a utilização de um dedo frio. A Análise de Variância (ANOVA) evidenciou que não há diferença significativa entre os frascos investigados com 95% de confiança, e Análise por Componente Principal (PCA) demonstrou a homogeneidade das amostras e a possível utilização como material de referência certificado.

Algül; Kara (2014) avaliaram a concentração de alguns metais em farinhas de milho oriundos da Turquia. Além dos elementos analisados como Pb, Cd, Hg, As, Cu, Zn e Cr, os autores investigaram a presença de aflatoxina total, aflatoxina B1 e ocratoxina A. As amostras foram digeridas em forno com radiação micro-ondas em sistema fechado com a utilização de 5 mL de HNO_3 concentrado ($65\% \text{ v v}^{-1}$), 2 mL de H_2O_2 ($30\% \text{ m m}^{-1}$) com um programa de aquecimento de 43 min. A técnica utilizada foi ICP-MS para a determinação dos metais, enquanto HPLC para os demais compostos. Os autores concluíram que uma forte relação estatística foi observada entre Cr e aflatoxina total e aflatoxina B1, enquanto que ocratoxina A foi relacionado para Cu e Zn usando análise de correlação e PCA.

Vrček et al. (2014) determinaram os constituintes Ca, Mn, Fe, K, Zn, As e Cd por ICP-MS em amostras de farinhas de trigo produzidas de forma convencional e orgânica. O preparo de amostra consistiu na utilização de 500 mg de amostra, 5 mL de HNO_3 ($65\% \text{ v v}^{-1}$), em seguida foram submetidas à radiação micro-ondas. Os resultados mostraram que amostras oriundas da cultura orgânica apresentaram significativamente conteúdos mais baixos de proteínas e baixos níveis de Ca, Mn e Fe em comparação com as amostras obtidas de cultivos convencionais, enquanto que níveis de K, Zn e Mo foram significativamente mais altos em farinhas de trigo orgânicas do que em convencionais. Já As e Cd foram encontrados apenas nas amostras convencionais.

Orecchio et al. (2014) determinaram As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, V e Zn em alimentos sem glúten utilizando ICP-MS. O preparo de amostra consistiu em pesar 200 mg da amostra, 2 mL de HNO_3 ($69\% \text{ v v}^{-1}$) e 1 mL de H_2O_2 ($30\% \text{ m m}^{-1}$). Os autores encontraram elevadas concentrações de As e Mo, 0,088 e 0,47 mg kg^{-1} em amostras de

macarrão de arroz, respectivamente. Enquanto que nas amostras de pães, de diferentes padarias de Palermo, foram encontradas altas concentrações de alguns metais (Cu, Ba, Cd, Pb, Hg, Sr e V).

2.4 Procedimento experimental

2.4.1 Amostras

As amostras de farinha utilizadas nesta etapa do trabalho foram adquiridas em mercados locais de João Pessoa, PB, Brasil. Os experimentos foram realizados com 60 amostras de farinhas funcionais de 20 tipos: amaranto ($n = 2$), arroz ($n = 6$), aveia ($n = 2$), banana verde ($n = 3$), berinjela ($n = 1$), beterraba ($n = 1$), centeio ($n = 1$), chia ($n = 1$), feijão branco ($n = 1$), gergelim ($n = 6$), girassol ($n = 1$), grão de bico ($n = 1$), linhaça ($n = 9$), linhaça dourada ($n = 11$), maçã ($n = 1$), maracujá ($n = 6$), milho ($n = 2$), quinoa ($n = 1$), soja ($n = 3$) e “Seca Barriga” ($n = 1$).

De acordo com os fabricantes, as farinhas de chia, gergelim, girassol, linhaça, linhaça dourada, quinoa e soja são provenientes das suas sementes, enquanto que a farinha de maracujá é produzida a partir das cascas. A farinha “Seca Barriga” é uma mistura de várias farinhas que visam à perda de peso.

2.4.2 Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de alta pureza analítica e água destilada-desionizada (resistividade superior a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Millipore Corp, Bedford, MA, EUA).

As vidrarias e os frascos de polipropileno para armazenamento das amostras foram previamente descontaminados com HNO_3 a 10% v v⁻¹ durante 24 h e lavados com água ultrapura. O ácido nítrico (Synth, Diadema, SP, Brasil) utilizado nos procedimentos de digestão foi previamente purificado utilizando um sistema de sub-destilação (Berghof, BSB-939-IR, Alemanha). Adicionalmente, o H_2O_2 também foi utilizado com concentração de 30% m m⁻¹ (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil). O procedimento de digestão utilizado para as amostras de farinhas analisadas foi semelhante ao descrito no trabalho de Tese de Carla Maíra Bossu, no qual foi realizado a otimização do procedimento de preparo para amostras de forrageiras (BOSSU, 2013).

As soluções para construção da curva analítica foram preparadas por diluição a partir das soluções estoque monoelementar a 1.000 mg L^{-1} (Vetec e Specsol, Jacareí, SP, Brasil) de Ca, K, Mg, P, Fe, Mn, Al, Cu, Na, Mo, Cr, As, Cd e Pb. Assim, as concentrações variaram de $0,01$ a 100 mg L^{-1} ($0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50$ e 100 mg L^{-1}) para o ICP OES e $0,1$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$) para o ICP-MS/MS em $1\% \text{ v v}^{-1}$ de HNO_3 . Já a curva analítica para a determinação de carbono orgânico foi construída utilizando o reagente uréia (Reagen, Quimibras, RJ, Brasil), com concentração variando entre $0,05$ e 1% ($0,05, 0,1, 0,2, 0,5$ e 1) m v^{-1} de C. Todas as curvas analíticas deste trabalho foram preparadas diariamente.

A exatidão do método foi avaliada utilizando material de referência padrão (SRM) 1568a farinha de arroz (NIST, Gaithersburg, MD, EUA).

2.4.3 Instrumentação

Todas as pesagens analíticas foram realizadas em balança APX-200 (Denver Instrument, GmbH, Alemanha). Para aumentar a homogeneidade das amostras, foi utilizado um moinho criogênico (MA775, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com o seguinte ciclo de moagem: 3 min , criogenia primária – 30 s , tempo ligado – 2 min , intervalo da criogenia – 30 s e frequência de 15 Hz .

Um forno de radiação micro-ondas com cavidade (ETHOS 1600, Milestone, Sorisole, Itália) equipado com um rotor de 10 posições e frascos de Teflon (PFA) foi usado para a digestão ácida. Foi utilizado uma massa de 500 mg das amostras de farinhas funcionais, 6 mL de HNO_3 $7,0 \text{ mol L}^{-1}$ e 2 mL de H_2O_2 ($30\% \text{ m m}^{-1}$). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

Os elementos Al, Ca, S, Fe, P, Mg, Mn, K, Na, Zn e C foram determinados por ICP OES no modo axial/radial (iCAP 6000 Series Duo, Thermo Scientific, Cambridge, Reino Unido) equipado com uma câmara de nebulização ciclônica, nebulizador concêntrico e uma tocha de plasma desmontável de quartzo com um tubo injetor central e com diâmetro interno de $2,0 \text{ mm}$.

A determinação dos elementos de menores concentrações e não essenciais Cr, Cu, Mo, As, Cd e Pb foram realizadas usando o ICP-MS/MS (Agilent 8800, Tóquio, Japão) equipado com uma câmara de nebulização Tipo Scott - duplo passo e nebulizador concêntrico.

Os instrumentos utilizados para o procedimento de preparo de amostra, como: balança analítica, moinho criogênico e forno de radiação micro-ondas com cavidade, estão localizados na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos-SP, enquanto que os instrumentos ICP OES e

ICP-MS/MS estão no laboratório do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA) localizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos-SP.

2.4.3.1 Condições operacionais

Na **Tabela 2.2** estão apresentados o programa de aquecimento do forno de micro-ondas. A potência aplicada foi ajustada em 1,1 kW e pressão a 20 bar. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os digeridos foram diluídos com água destilada-desionizada a 50,0 mL.

Tabela 2.2 - Programação de aquecimento do forno de radiação micro-ondas para a digestão das amostras.

ETAPAS	TEMPO (MIN)	TEMPERATURA (°C)
1	12	120
2	10	180
3	15	200
Ventilação	20	-

Nas **Tabelas 2.3** e **2.4** podem ser visualizadas as condições operacionais empregadas no ICP OES e ICP-MS/MS, respectivamente.

Tabela 2.3 - Parâmetros operacionais utilizados no ICP OES.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO OPERACIONAL
Potência de radiofrequência aplicada (kW)	1,15
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	12,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Comprimentos de onda (nm) – modo axial e radial* (ICP OES)	Ca (II) 422,6, K (I) 769,8, Mg (II) 280,2, P (I) 185,9, Fe (II) 240,4, Mn (II) 260,5, Al (I) 396,1 e C 193,0.

*linhas (I) atômica e (II) iônica.

Tabela 2.4 - Parâmetros operacionais utilizadas no ICP-MS/MS.

Parâmetro	Condição operacional
Potência de radiofrequência aplicada (kW)	1,55
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,8
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	1,0
“Makeup gas” (L min ⁻¹)	0,10
Vazão de O ₂ - gás de reação (mL min ⁻¹)	0,75
Isótopos (m/z)	⁶³ Cu ⁺ , ⁹⁶ Mo ⁺ , ⁵³ Cr ⁺ , ⁷⁵ As ⁺ , ¹¹² Cd ⁺ , ²⁰⁷ Pb ⁺

A fim de avaliar a eficiência das digestões, foi determinado RCC através da linha de emissão de 193,0 nm (**Tabela 2.3**) (GOUVEIA et al., 2001).

As condições de funcionamento do plasma e os comprimentos de onda selecionados foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante. Além disso, foram obtidas determinações em outras linhas espectrais a fim de avaliar a presença de interferências espectrais e para ter certeza de que a emissão é característica da espécie em questão: Al 226,9, Al 236,7; Ca 315,8; Ca 396,8; Fe 259,8; Fe 261,1; K 583,1; K 691,1; Mg 285,2; Mg 382,9; Mn 257,6; Mn 259,3; P 178,2; Na 588,9; Na 589,5; Na 818,3 e C 247,8.

O gás oxigênio foi utilizado para promover reações para a determinação de As (⁷⁵As¹⁶O⁺) e Cr (⁵³Cr¹⁶O⁺) em MS/MS (**Tabela 2.4**) para a minimização das interferências. Os outros elementos foram determinados no modo sem a utilização do gás adicional. Também foram avaliados outros isótopos: ⁶⁵Cu⁺, ⁹⁵Mo⁺, ¹¹⁴Cd⁺ e ²⁰⁸Pb⁺. Em ambas as técnicas, as medidas foram realizadas em triplicatas e, para investigar o efeito de memória, foram analisados alguns pontos da curva analítica entre as medidas das amostras.

O LOD foi calculado de acordo com Thomsen (2012) considerando a concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) (**equação 2.5**), a razão sinal analítico/sinal de fundo (SBR) (**equação 2.6**) e desvio padrão relativo (RSD) das 18 medidas das soluções em branco. O LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD. Todos os valores de LOD foram calculados com base nos respectivos valores de BEC para cada comprimento de onda monitorado (**equação 2.7**).

$$SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad \text{eq. (2.5)}$$

$$BEC = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad \text{eq. (2.6)}$$

$$LOD = 3 \times BEC \times RSD_{branco} \quad \text{eq. (2.7)}$$

Em que:

I_{sr} e I_{branco} = intensidades de emissão da solução de referência e do branco analítico;

C_{sr} = concentração da solução de referência multielementar.

O BEC fornece uma medida quantitativa da quantidade de radiação de fundo em uma linha espectral especificada (THOMSEN, 2012). Com o cálculo do BEC é possível visualizar qualquer mudança no espectro de fundo proveniente das alterações nas condições operacionais em comparação ao LOD calculado da maneira convencional (OLIVEIRA et al., 2012). Assim, calcula-se o LOD utilizando o BEC para minimizar a influência do plasma sobre o branco.

Os cálculos de SBR e BEC neste estudo foram realizados utilizando os valores de intensidade e concentração do ponto médio da curva analítica. Os valores de RSD_{branco} são calculados pela razão entre os valores de desvio padrão e a média das intensidades dos brancos.

2.4.4 Análise por componentes principais (PCA)

A PCA foi aplicada a matriz dos dados para análise exploratória dos elementos, redução da dimensionalidade da matriz e observação da existência de possíveis amostras com comportamento diferente das demais de mesmo tipo (ALGÜL; KARA, 2014). Todos os dados foram centrados na média e os pesos iguais das variáveis foram previamente atribuídos (autoescalamento). O pré-tratamento de dados e a PCA foram realizados usando as configurações padrão do *software* The Unscrambler® X.1 (CAMO A/S, Noruega).

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Avaliação do procedimento de digestão das amostras

O mesmo procedimento de digestão foi utilizado para todas as amostras de farinhas funcionais avaliadas e os seus valores de RCC foram determinados para avaliar a eficiência do preparo das amostras (**Figura 2.3**).

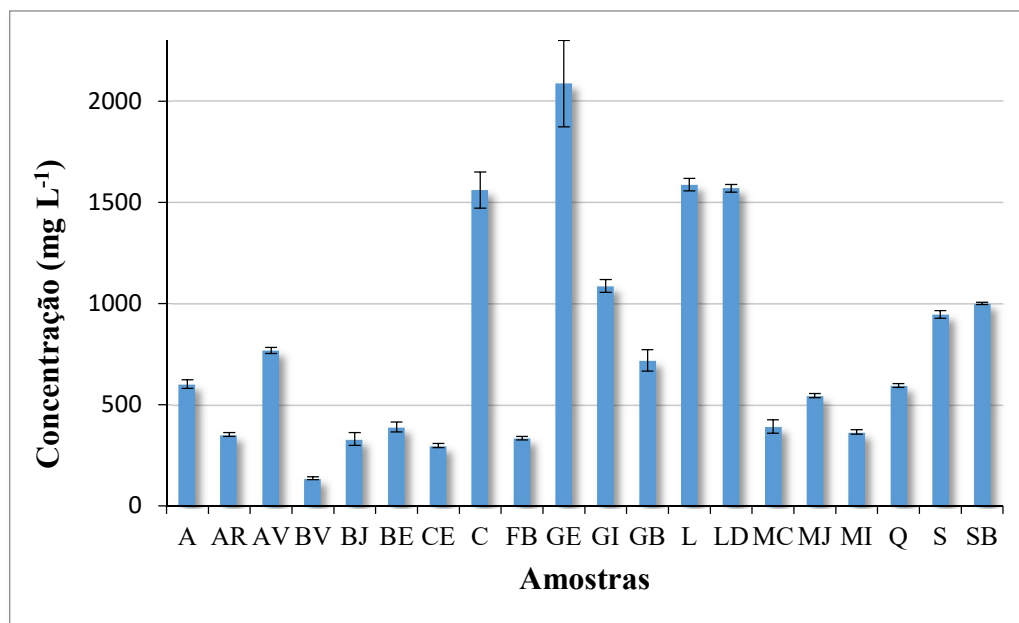


Figura 2.3 - Teor de carbono residual (mg L⁻¹) para amostras de farinhas de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), grão de bico (GB), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB), por ICP OES.

Os resultados dos RCCs foram, na maioria $\leq 2.000 \text{ mg L}^{-1}$, inferindo que o procedimento de digestão foi adequado para posterior determinação do teor de constituintes inorgânicos com técnicas baseadas em ICP (BIZZI et al., 2011b). Os menores valores para RCC foram observados nas digestões de amostras de farinha de banana verde ($136,7 \text{ mg L}^{-1}$). A maioria das digestões das amostras apresentou valor para RCC menor de que 1.000 mg L^{-1} , sendo o valor mais elevado de $2.087,0 \text{ mg L}^{-1}$ obtido para a farinha de sementes de gergelim. As farinhas de chia, linhaça dourada e linhaça mostraram também altos valores de RCC, possivelmente por consequência das suas características oleosas e ricas em fibras.

2.5.2 Exatidão do método de análise

A exatidão do procedimento foi avaliada utilizando o material de referência certificado de farinha de arroz (NIST SEM 1568^a). Na **Tabela 2.5** são apresentados os valores dos resultados certificados e determinados, recuperação, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para Ca, K, Mg, P, Fe, Mn e Al por ICP OES e Cu, Mo, Cr, As, Cd e Pb por ICP-MS/MS.

Tabela 2.5 - Concentrações determinadas e certificadas dos elementos (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$), teste de recuperação, LOD e LOQ para farinha de arroz SEM (NIST 1568^a) por ICP OES e ICP-MS/MS.

ICP OES					
Elementos	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor determinado (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)
Ca	118 $\pm$ 6	118,60 $\pm$ 0,14	101	0,009	0,033
K	1.280 $\pm$ 8	1.322 $\pm$ 7	103	0,002	0,007
Mg	560 $\pm$ 20	477,5 $\pm$ 2,5	85,3	0,003	0,011
P	1.530 $\pm$ 80	1.528,0 $\pm$ 0,1	99,9	0,053	0,176
Fe	7,4 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 0,7	86,4	0,002	0,007
Mn	20,0 $\pm$ 1,6	16,5 $\pm$ 0,1	82,5	0,0001	0,0005
Al	4,4 $\pm$ 1,0	4,2 $\pm$ 0,1	95,5	0,005	0,017

ICP-MS/MS					
Elementos	Valor certificado (mg kg⁻¹)	Valor determinado (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)	LOD (μg kg⁻¹)	LOQ (μg kg⁻¹)
Cu	2,4 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,6	99,9	0,019	0,063
Mo	1,46 $\pm$ 0,08	1,45 $\pm$ 0,02	99,3	0,005	0,017
Cr	-	0,8 $\pm$ 0,1	-	0,028	0,093
As	0,29 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,07	103	0,003	0,009
Cd	0,022 $\pm$ 0,002	0,023 $\pm$ 0,008	103	0,002	0,006
Pb	-	0,060 $\pm$ 0,002	-	0,005	0,018

Os valores determinados estão de acordo com os valores certificados, em que a recuperação variou de 82,5 a 103% no ICP OES e de 99,3 a 103% no ICP-MS/MS. Todos os resultados atendem à legislação atual do FDA dentro dos intervalos de confiança recomendados de 80 a 120% (FDA, 1994).

2.5.3 Avaliação das linhas de emissão e isótopos

Antes de definir quais comprimentos de onda seriam utilizados na determinação das concentrações dos constituintes inorgânicos por ICP OES, alguns comprimentos de onda para cada elemento foram analisados, tanto no plano axial quanto no plano radial, com a finalidade de escolher pelo critério da ausência ou da mínima interferência espectral e com precisão. O mesmo estudo foi realizado para escolha dos isótopos do ICP-MS/MS. Os valores de LOD, LOQ, coeficiente de determinação do modelo linear (R^2) da curva analítica e porcentagem de

recuperação dos analitos em relação aos valores certificados do SRM foram observados e são apresentados na **Tabela 2.6**.

Tabela 2.6 - Parâmetros de LOD (mg kg^{-1}), LOQ (mg kg^{-1}), R^2 e % recuperação das linhas de emissão por ICP OES.

Elementos/ Linhas(nm)	LOD	LOQ	R^2	Rec. (%)	LOD	LOQ	R^2	Rec. (%)
	Axial				Radial			
Ca 315,8	0,005	0,015	0,999	120	0,004	0,014	0,999	58,7
Ca 396,8	0,021	0,071	0,996	85,8	0,018	0,061	1,000	95,7
Ca 422,6	0,009	0,033	0,999	101	0,023	0,075	0,999	81,4
K 583,1	0,457	1,508	0,983	51,2	-	-	-	-
K 691,1	0,360	1,190	0,984	63,7	-	-	-	-
K 769,8	0,001	0,002	0,996	68,3	0,002	0,007	0,999	103
Mg 285,2	0,004	0,015	0,997	85,7	0,004	0,016	1,000	83,2
Mg 382,9	0,001	0,002	0,999	78,9	0,049	0,161	1,000	84,0
Mg 280,2	0,005	0,016	0,998	98,6	0,003	0,011	0,999	85,3
P 185,9	0,050	0,164	0,998	102	0,053	0,176	0,999	99,9
P 178,2	0,011	0,035	0,996	123	0,023	0,075	0,999	118
Fe 259,8	0,002	0,007	1,000	72,9	0,002	0,008	0,999	83,4
Fe 261,1	0,002	0,005	0,999	73,5	0,004	0,013	0,999	88,9
Fe 240,4	0,002	0,007	0,999	86,4	0,03	0,104	0,999	86,7
Mn 257,6	0,0001	0,0005	0,999	78,5	0,0002	0,001	1,000	79,4
Mn 259,3	0,0001	0,0004	0,999	79,5	0,0003	0,001	1,000	79,8
Mn 260,5	0,0001	0,0005	1,000	82,5	0,0003	0,001	1,000	81,9
Al 226,9	0,039	0,128	1,000	85,2	0,024	0,079	1,000	114
Al 236,7	0,056	0,186	0,999	103	0,009	0,031	0,999	87,6
Al 396,1	0,005	0,017	0,999	95,5	0,040	0,133	0,999	106
Na 588,9	0,041	0,136	0,999	68,3	-	-	-	-
Na 589,5	0,022	0,073	0,996	925	0,057	0,187	0,999	468
Na 818,3	0,024	0,080	0,998	860	-	-	-	-
C 247,8	0,0006	0,002	1,000	-	0,001	0,003	0,999	-
C 193,0	0,0002	0,001	0,997	-	0,0002	0,0007	0,999	-

As linhas de emissão para as análises (em negrito) foram selecionadas de acordo com a avaliação dos parâmetros de LOD, LOQ, R^2 e % recuperação apresentados na **Tabela 2.6**.

Para o Ca, a linha do comprimento de onda 422,6 nm no modo axial foi a escolhida por apresentar os melhores valores de R^2 , % recuperação, LOD e LOQ em conjunto, quando comparada as demais linhas para este elemento. Apesar da linha 315,8 nm apresentar valores ainda mais baixos de LOD e LOQ do que a linha supracitada, tanto no modo axial como no

radial, ela não foi escolhida devido aos seus valores de R^2 e % recuperação serem menores do que a linha 422,6 nm.

Para o K, as linhas K 583,1 nm e K 691,1 nm, no modo axial, mostraram valores altos de LOD's e LOD's, e baixos valores de R^2 e % recuperação. Contudo, não foram apresentados os valores dos parâmetros no modo radial para as referidas linhas, devido as curvas analíticas não mostrarem definição linear. Adicionalmente, no modo axial a linha com melhor desempenho foi a 769,8 nm. Todavia, esta linha foi escolhida com a configuração radial devido ao melhor valor de R^2 e principalmente por ser a única em que o valor de % recuperação (103%) está dentro do limite permitido (80-120%) de acordo com FDA, 1994.

Para escolha da linha do Mg 280,2 nm, foi usado como critério o valor de % recuperação por ser bem próximo a 100%, embora os valores de LOD, LOQ e R^2 sejam valores inferiores às demais linhas.

Para o P, a linha 178,2 nm apresentou ótimos valores de LOD e LOQ, em ambos os modos de configuração. No entanto, a linha 185,9 nm, na configuração radial foi a escolhida, pois o conjunto R^2 e % recuperação mostraram valores melhores do que a linha 178,2 nm.

A linha de 261,1 nm, no modo axial, apresentou menores valores de LOD e LOQ. No entanto, a linha 240,4 nm foi escolhida por apresentar um valor maior de % recuperação em comparação a linha 261,1 nm.

A linha mais adequada para o Mn foi a do comprimento de onda 260,5 nm, no modo axial. Isso porque esta linha demonstrou baixos valores de LOD e LOQ, R^2 igual a 1 e maior valor de % recuperação em comparação as outras linhas analisadas.

Ao avaliar as linhas do Al, verificou-se que a linha de 396,1 nm, no modo axial, traz menores valores de LOD e LOQ, com um percentual de 95% de recuperação, bem próximo do ideal.

A atenuação da intensidade de linhas com energia espectral intermediária pode ser atribuída a interferências na formação do aerossol e no sistema de transporte até o plasma, tanto que a razão Mg II / Mg I permanece constante na presença de Na (TREVIZAN, 2007). Além disso, as elevadas concentrações de sódio causam um elevado sinal de fundo, potencializa interferências espectrais e causa dificuldades em medidas realizadas por ICP OES (OLIVEIRA et al., 2012). Assim, possivelmente por isso, nenhuma das linhas analisadas foi satisfatória para a determinação deste elemento para as amostras de farinhas, em ambos os modos de configuração.

Por fim, para a determinação do teor de carbono residual, a linha 193,0 nm no modo radial foi a que apresentou melhor desempenho diante dos parâmetros utilizados. De acordo

com GOUVEIA et al. (2001), a linha de emissão 247,8 nm utilizada no monitoramento de carbono pode ter interferência espectral pela linha iônica de Fe II 247,8 nm, uma vez que essa é duas vezes mais intensa do que a linha atômica do carbono.

De um modo geral, foi esperado que as linhas de emissão com configuração axial mostrassem melhores valores de R^2 e recuperação e menores valores de LOD's e LOQ's. Tal resultado é devido a uma maior razão sinal/ruído e melhor sensibilidade por consequência do menor ruído de fundo. Foi observado que, para alguns elementos, os valores de LOD no modo axial foram 2 a 8 vezes melhores que com a visão radial. No entanto, para o magnésio, potássio, fósforo e carbono residual, as linhas que apresentaram melhor desempenho foram no modo radial (OLIVEIRA et al., 2012).

Na **Tabela 2.7** são apresentados os parâmetros de desempenho que levaram à escolha dos isótopos determinados por ICP-MS/MS.

Tabela 2.7 - Parâmetros de LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$), LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$), R^2 e % recuperação na razão massa/carga dos analitos determinados por ICP-MS/MS.

ISÓTOPOS	LOD	LOQ	R^2	RECUPERAÇÃO (%)
$^{63}\text{Cu}^+$	0,019	0,063	0,999	99,9
$^{65}\text{Cu}^+$	0,024	0,080	0,999	74,4
$^{95}\text{Mo}^+$	0,011	0,037	0,999	99,3
$^{96}\text{Mo}^+$	0,005	0,017	1,000	99,3
$^{112}\text{Cd}^+$	0,002	0,006	0,999	103
$^{114}\text{Cd}^+$	0,003	0,011	0,998	86,1
$^{207}\text{Pb}^+$	0,005	0,018	0,999	-
$^{208}\text{Pb}^+$	0,007	0,025	0,999	-

Como observado na **Tabela 2.7**, os isótopos escolhidos (em negrito), resultaram em menores valores de LOD e LOQ, valores de R^2 bem próximos do ideal e percentuais de recuperação dentro da faixa permitida de 80 a 120%.

2.5.4 Determinação de Ca, K, Mg, P, Fe, Mn e Al em amostras de farinhas por ICP OES

Na **Figura 2.4, 2.5 e 2.6** estão apresentadas as concentrações de cada constituinte inorgânico nas amostras de farinhas funcionais analisadas.

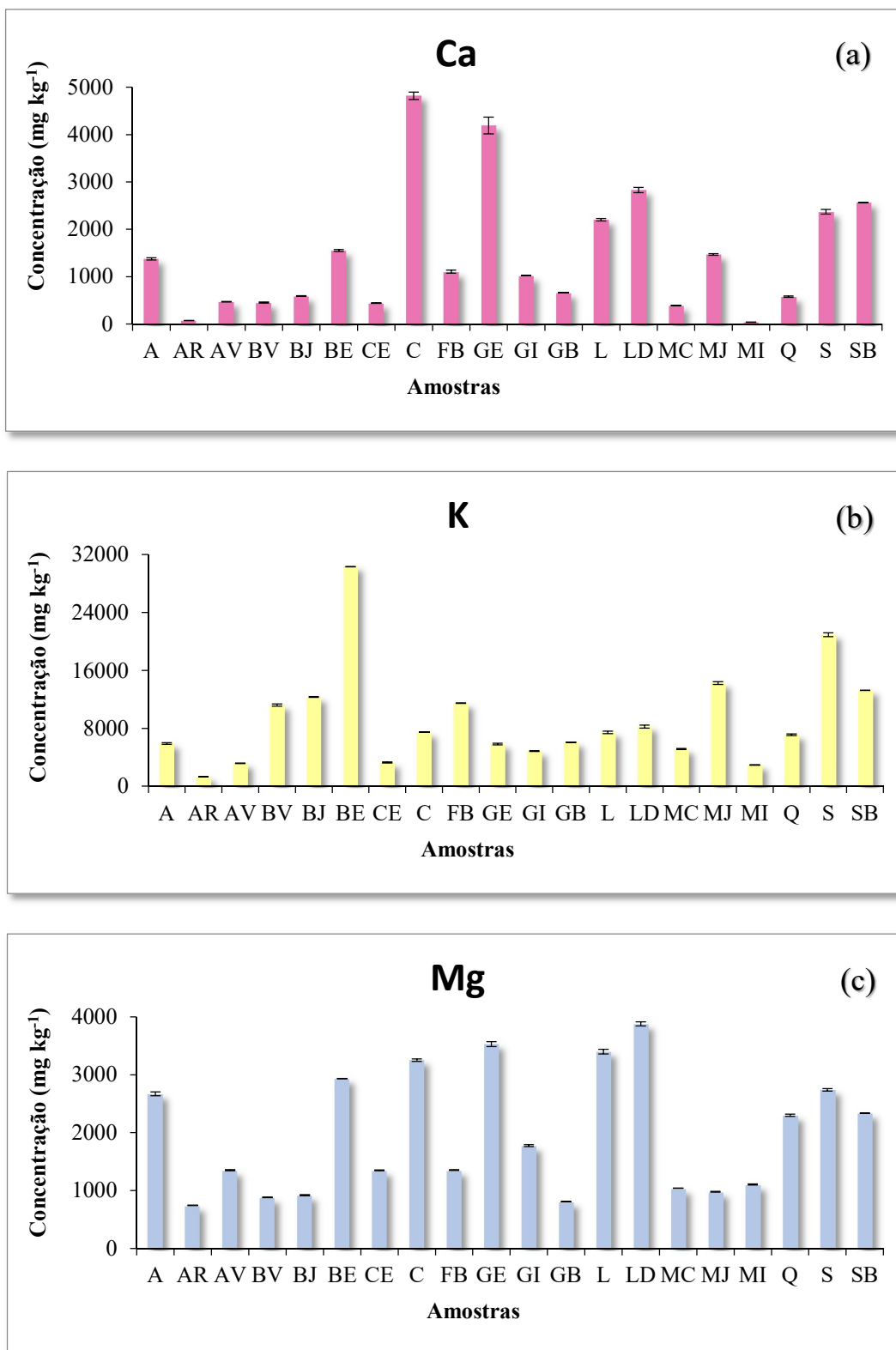


Figura 2.4 - Concentrações de Ca (a), K (b) e Mg (c) (mg kg⁻¹) determinadas por ICP OES para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).

As concentrações médias de cálcio (**Figura 2.4a**) nas amostras das farinhas variaram de 39,4 a 4.817,9 mg kg⁻¹. As farinhas de chia, gergelim, linhaça, linhaça dourada, soja e “Seca Barriga” apresentaram altas concentrações de Ca (acima de 2.000 mg kg⁻¹), sendo a farinha da semente de gergelim, com concentração média de 4.189,6 mg kg⁻¹. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Nzikou et al. (2009) quando analisou sementes de gergelim *in natura* (4.153,8 mg kg⁻¹). As farinhas de arroz e milho analisadas apresentaram baixas concentrações de Ca e uma ampla faixa da concentração de Ca foi observada dentro das classes das farinhas de arroz e gergelim. De acordo com o FDA (2013), o valor recomendado de ingestão de Ca não deve exceder 1 g/dia, com base em uma dieta calórica de 2.000 calorias para adultos ou crianças com idade superior a 4 anos.

A faixa de concentração média de K encontrada (**Figura 2.4b**) variou de 1.259,4 a 30.328,0 mg kg⁻¹ para as diferentes amostras de farinhas, onde a quantidade mínima foi encontrada na farinha de arroz e a quantidade máxima para a farinha de beterraba. Além da farinha de beterraba, as farinhas de berinjela, banana verde, casca de maracujá, soja, feijão branco e “Seca Barriga” também apresentaram valores altos de potássio, variando de 11.199,7 até 30.328,0 mg kg⁻¹. Foi possível observar que para as farinhas de arroz, banana verde, linhaça, linhaça dourada e soja diferentes concentrações de K foram determinadas em cada classe de farinhas. Wruss et al. (2015) determinaram K em variedades de beterraba e encontraram um valor próximo (28.250 mg kg⁻¹) ao valor determinado no presente trabalho (30.328 mg kg⁻¹). O FDA (FDA, 2013) sugere uma ingestão de K de 3.500 mg dia⁻¹ para adultos e crianças até 4 anos e meio de idade.

A faixa de concentração para o Mg (**Figura 2.4c**) variou de 746,4 a 3.878,4 mg kg⁻¹, e as amostras de farinhas de linhaça dourada, gergelim, chia, linhaça, beterraba, amaranto, “Seca Barriga” e quinoa apresentaram as maiores concentrações. Para este elemento, somente as farinhas de arroz e banana verde apresentaram valores discrepantes entre as amostras analisadas para cada tipo. A concentração média de Mg na amostra de farinha de beterraba neste estudo foi ligeiramente superior (2.935,7 mg kg⁻¹) que a concentração média encontrada em amostras de beterraba (2.590 mg kg⁻¹) por Wruss et al. (2015), contudo esta variação pode estar relacionada à composição do solo e às práticas agrícolas. Segundo o FDA (FDA, 2013) recomenda uma ingestão diária de 400 mg dia⁻¹ de Mg. As concentrações médias de P, Fe e Mn estão apresentadas na Figura 2.5(a, b e c).

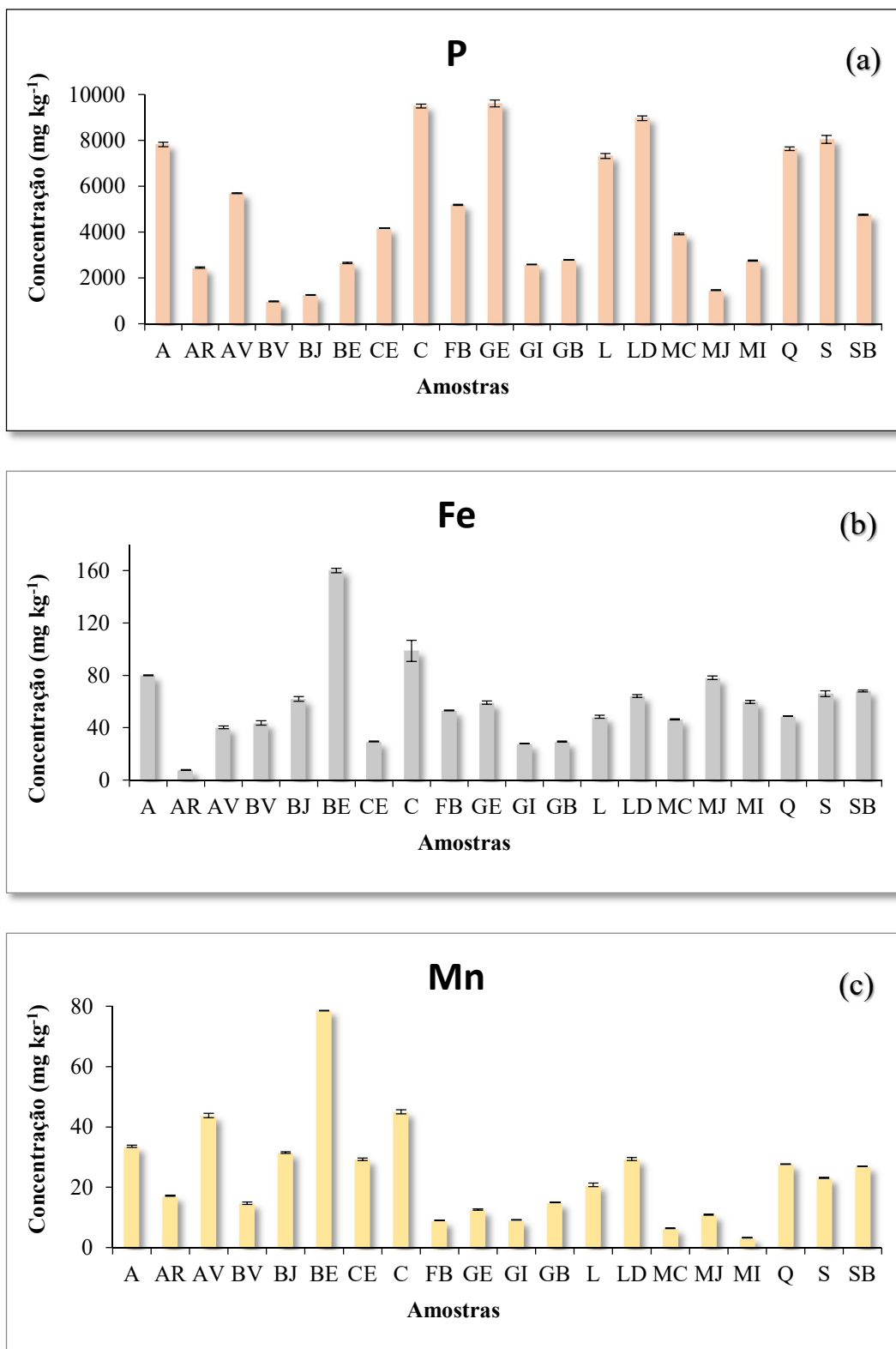


Figura 2.5 - Concentrações de P (a), Fe (b) e Mn (c) (mg kg⁻¹) determinadas por ICP OES para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).

As concentrações médias de P (**Figura 2.5a**) variaram de 974,4 (banana verde) a 9.608,7 mg kg⁻¹ (gergelim). As farinhas de banana verde, beterraba, casca de maracujá, grão de bico, milho, arroz, girassol e berinjela apresentaram baixas concentrações de P, todos os valores abaixo de 2.772,2 mg kg⁻¹. Além disso, as farinhas de linhaça, linhaça dourada, chia, gergelim, quinoa, amaranto e soja apresentaram as maiores concentrações de P, com valores superiores a 7.317,8 mg kg⁻¹. O FDA recomenda uma ingestão de 1.000 mg dia⁻¹ para adultos (FDA, 2013). É importante ressaltar também que amostras de farinhas de arroz, banana verde, gergelim, linhaça, linhaça dourada, maracujá e soja mostraram ter concentrações diversas entre os mesmos tipos. Esta variação pode ocorrer devido aos diferentes tipos e à fertilidade do solo onde a semente foi cultivada. Nzikou et al. (2009) encontraram uma menor concentração de P para sementes de gergelim (6.472,5 mg kg⁻¹) do que os valores encontrados neste estudo (9.608,7 mg kg⁻¹).

Para o ferro (**Figura 2.5b**), as farinhas de arroz e linhaça dourada tiveram a mesma discrepância de concentração entre as amostras de mesmo tipo de farinha, como ocorreu para o fósforo, com a menor concentração (7,7 mg kg⁻¹) para farinha de arroz e a maior concentração (160,1 mg kg⁻¹) para farinha de beterraba. Estudos demonstraram que a concentração média de Fe em sete variedades de beterrabas cultivadas na Áustria foi de 220,6 mg kg⁻¹ (WRUSS et al., 2015), concentração maior se comparado à concentração média de farinha de beterraba encontrada no presente estudo. O FDA (FDA, 2013) recomenda uma ingestão diária de 18 mg para Fe.

As concentrações de Mn (**Figura 2.5c**) variaram de 3,3 a 78,6 mg kg⁻¹, correspondendo as farinhas de milho e beterraba, respectivamente. As farinhas de amaranto, berinjela, linhaça dourada, linhaça, quinoa, centeio, “Seca Barriga”, aveia, chia e soja apresentaram valores intermediários de Mn na faixa de 20,8 a 45,0 mg kg⁻¹, sendo que as farinhas de amaranto, arroz, banana verde e linhaça dourada tiveram uma ampla faixa de concentração deste elemento. Wruss et al. (2015) relataram valores de Mn semelhantes (83,3 mg kg⁻¹) aos encontrados na farinha de beterraba analisada neste trabalho. FDA (2013) recomenda uma ingestão de 2 mg por dia⁻¹ para adultos.

As concentrações de alumínio (**Figura 2.6**) nas digestões variaram de 1,9 a 119,6 mg kg⁻¹, onde foram observadas nas farinhas de milho (9,5 mg kg⁻¹), grão de bico (8,9 mg kg⁻¹) e arroz (1,9 mg kg⁻¹) baixas concentrações de Al, enquanto que as farinhas da casca de maracujá (59,6 mg kg⁻¹), berinjela (67,6 mg kg⁻¹) e beterraba (119,6 mg kg⁻¹) continham os níveis mais elevados deste metal. Adicionalmente, as farinhas de arroz, gergelim, linhaça, linhaça dourada, maracujá e soja apresentaram também uma grande variedade na concentração deste elemento.

Caballero et al. (2016) determinaram alumínio em amostra de arroz e encontraram $3,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de concentração. FAO/OMS (2011) estabeleceu a ingestão semanal tolerável de $2,0 \text{ mg}$ por kg de massa corporal.

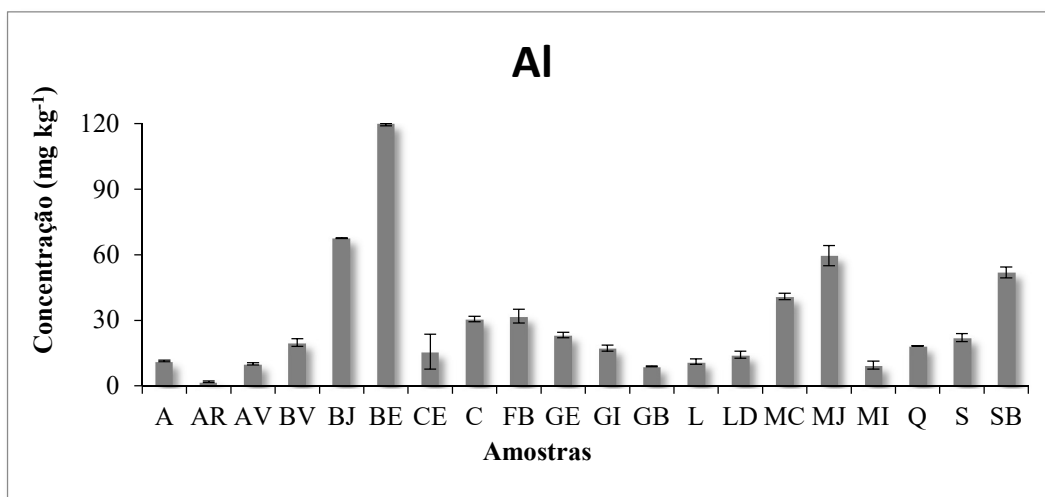


Figura 2.6 - Concentrações de Al (mg kg^{-1}) determinadas por ICP OES para amostras de farinhas funcionais de: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).

De modo geral, para alguns tipos de farinhas, como amaranto, aveia e milho, o teor de macronutrientes e micronutrientes permaneceu dentro da mesma faixa de concentração. No entanto, isso não foi observado para as farinhas de arroz, banana verde, gergelim, linhaça, linhaça dourada, maracujá e soja.

As concentrações de Ca, K, Mg, P, Fe, Mn e Al das amostras digeridas determinadas por ICP OES, em mais detalhes, estão apresentadas na **Tabela 2.8**.

Tabela 2.8 - Faixa das concentrações (mg kg⁻¹) / média ± S.D. de Ca, K, Mg, P, Fe, Mn e Al determinadas em amostras de farinhas por ICP OES, n = 3.

Amostras de Farinhas*	Ca	K	Mg	P	Fe	Mn	Al
Amaranto (n = 2)	1.177,2 – 1.572,8 /1.375,0 ± 23,6	5.317,0 – 6.458,3 /5.887,6 ± 109,5	2.569,0 – 2.772,1 /2.670,5 ± 31,6	7.668,8 – 7.970,6 /7.819 ± 101	67,4 – 92,8 /80,1 ± 0,3	21,0 – 46,2 /33,6 ± 0,4	8,1 – 14,7 /11,4 ± 0,4
Arroz (n = 6)	42,0 – 146,9 /73,9 ± 2,6	625,0 – 2.198,6 /1.259,4 ± 7,9	105,4 – 1.792,4 /746,4 ± 4,6	1.067,8 – 5.429,9 /2.447 ± 25	2,0 – 24,6 /7,7 ± 0,3	7,3 – 48,1 /17,2 ± 0,2	0,1 – 6,1 /1,9 ± 0,4
Aveia (n = 2)	469,6 – 470,8 /470,2 ± 5,8	2.877,9 – 3.432,9 /3.155,4 ± 40	1.298,8 – 1.403,6 /1.351,2 ± 9,8	5.472,3 – 5.924,2 /5.698,2 ± 18	40,4 – 40,3 /40,3 ± 1,1	41,8 – 45,8 /43,8 ± 0,7	6,0 – 14,3 /10,1 ± 0,5
Banana verde (n = 3)	336,4 – 543,4 /452,5 ± 9,7	5.977,5 – 19.621,7 /11.199,7 ± 155,3	583,4 – 1.410,9 /880,3 ± 4,7	545,0 – 1.620,8 /974,4 ± 20,2	25,2 – 62,5 /43,6 ± 1,7	6,0 – 23,6 /14,7 ± 0,4	19,6 – 19,9 /19,8 ± 1,8
Berinjela	590,6 ± 6,0	12.331,5 ± 51,4	921,0 ± 10,5	1.254,3 ± 10,6	61,9 ± 1,8	31,5 ± 0,3	67,6 ± 0,2
Beterraba	1.551,4 ± 19,8	30.328,0 ± 12,8	2.935,7 ± 2,2	2.646,9 ± 28,6	160,1 ± 1,7	78,6 ± 0,1	119,6 ± 0,5
Centeio	442,0 ± 7,8	3.277,0 ± 59,8	1.350,8 ± 8,0	4.163,9 ± 3,1	29,4 ± 0,3	29,3 ± 0,4	15,7 ± 8,0
Chia	4.817,9 ± 76,7	7.449,4 ± 10,7	3.253,2 ± 22,1	9.498,6 ± 84,1	98,7 ± 8,1	45,0 ± 0,7	30,6 ± 1,2
Feijão branco	1.103 ± 32	11.469,0 ± 32,0	1.353,2 ± 7,5	5.184,4 ± 18,4	53,2 ± 0,3	9,0 ± 0,05	31,9 ± 3,1
Gergelim (n = 6)	511,6 – 6.615,0 /4.189,6 ± 176,4	4.812,1 – 6.772,9 /5.834,1 ± 109,9	2.371,2 – 4.129,2 /3.529,3 ± 42,4	5.121,4 – 11.542,7 /9.608,7 ± 146,1	52,0 – 71,7 /59,2 ± 1,3	10,7 – 14,6 /12,6 ± 0,2	1,7 – 48,0 /23,3 ± 1,2
Girassol	1.023,1 ± 1,4	4.855,1 ± 53,4	1.776,6 ± 18,1	2.584,7 ± 8,3	27,7 ± 0,1	9,2 ± 0,1	17,3 ± 1,4
Grão de bico	662,9 ± 0,4	6.060,1 ± 28,2	807,9 ± 0,5	2.772,2 ± 0,7	29,3 ± 0,4	14,9 ± 0,01	8,9 ± 0,2
Linhaça (n = 9)	2.053,3 – 2420,3 /2.201,6 ± 25,3	4.340,9 – 8.188,2 /7.432,1 ± 186,0	3.022,0 – 3.684,6 /3.401,2 ± 40,8	5.325,9 – 8.767,1 /7.317,8 ± 104,9	41,1 – 60,9 /48,3 ± 1,1	16,7 – 25,6 /20,8 ± 0,6	6,4 – 20,3 /11,1 ± 1,2
Linhaça dourada (n = 11)	2.348,3 – 3.813,8 /2.830,1 ± 54,1	5.497,0 – 12.937,0 /8.235,6 ± 206,9	3.199,7 – 4.949,7 /3.878,4 ± 37,5	6.675,4 – 13.609,5 /8.964,3 ± 100,0	41,0 – 110,1 /64,2 ± 1,0	20,5 – 44,9 /29,4 ± 0,5	7,7 – 32,6 /14,3 ± 1,6
Maçã	391,6 ± 3,5	5.134,2 ± 71,4	1.039,5 ± 2,8	3.915 ± 34	46,4 ± 0,4	6,4 ± 0,1	40,9 ± 1,5
Maracujá (n = 6)	1.281,8 – 1.676,8 /1.465,8 ± 16,8	11.591,3 – 16.473,2 /14.238,0 ± 196,8	898,77 – 1.082,8 /977,8 ± 6,4	961,2 – 2.090,6 /1.464,9 ± 21,0	60,3 – 107,6 /78,1 ± 1,4	9,5 – 13,6 /10,9 ± 0,2	39,4 – 111,0 /59,6 ± 4,6
Milho (n = 2)	39,0 – 39,8 /39,4 ± 2,1	2.869,1 – 2.986,2 /2.927,7 ± 40,0	1.101,7 – 1.109,3 /1.105,5 ± 9,2	2.686,3 – 2.817,9 /2.752,1 ± 22,2	56,7 – 62,8 /59,7 ± 1,2	3,2 – 3,3 /3,3 ± 0,1	8,7 – 10,4 /9,5 ± 1,9
Quinoa	579,3 ± 13,9	7.116,5 ± 101,7	2.300,2 ± 19,5	7.635,7 ± 75,4	48,7 ± 0,04	27,7 ± 0,1	18,3 ± 0,1
Soja (n = 3)	1.948,0 – 3.059,9 /2.369,9 ± 50,2	14.230,9 – 27.407,9 /20.924,4 ± 267,3	2.036,3 – 3.733,9 /2.740,2 ± 21,9	5.672,0 – 10.860,2 /8.041,3 ± 174,9	47,9 – 82,0 /66,0 ± 2,2	20,3 – 28,4 /23,1 ± 0,2	16,2 – 31,9 /22,1 ± 1,9
Seca barriga	2.560,6 ± 4,3	13.247,8 ± 16,4	2.337,5 ± 1,7	4.749,3 ± 22,4	68,1 ± 0,8	27,0 ± 0,01	51,9 ± 2,5

*Faixa de concentração refere-se ao grupo de farinha com mais de uma amostra.

2.5.5 Determinação de Cu, Mo, Cr, As, Cd e Pb em amostras de farinhas digeridas por ICP-MS/MS

Nas **Figuras 2.7 e 2.8** estão apresentadas as concentrações dos microelementos e elementos não essenciais analisadas por ICP-MS/MS.

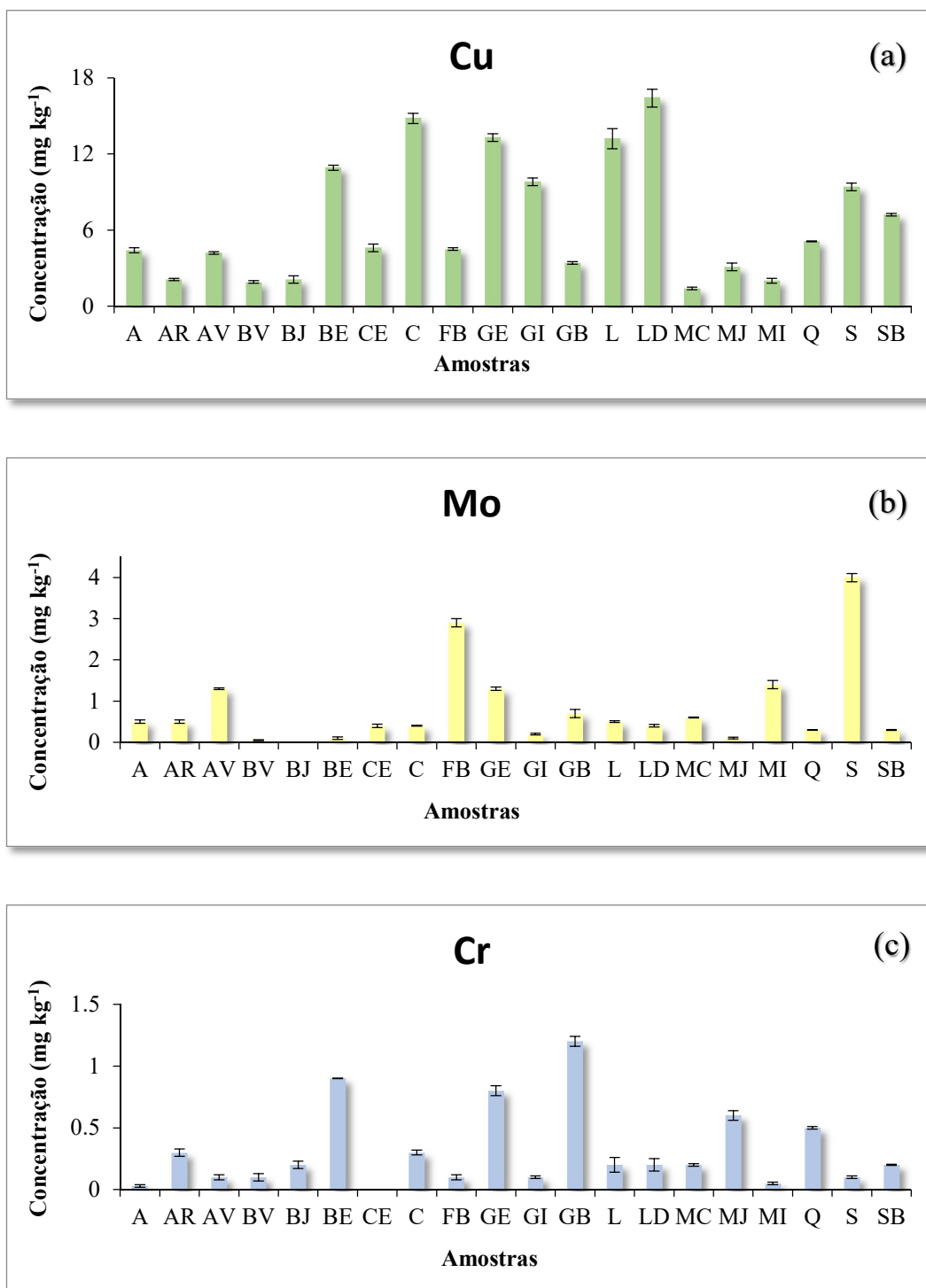


Figura 2.7 - Concentrações de Cu (a), Mo (b) e Cr (c) (mg kg^{-1}) determinadas por ICP-MS/MS para amostras de farinhas funcionais: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).

As concentrações de Cu (**Figura 2.7a**) nas farinhas de beterraba ($10,9 \text{ mg kg}^{-1}$), soja ($9,4 \text{ mg kg}^{-1}$) e girassol ($9,8 \text{ mg kg}^{-1}$), apresentaram valores intermediários de Cu quando comparadas com as concentrações médias das amostras, que variaram de $1,4$ a $16,4 \text{ mg kg}^{-1}$, neste estudo. Além destas, as farinhas de chia, gergelim, linhaça e linhaça dourada mostraram as maiores concentrações deste microelemento e, as farinhas de arroz, banana verde, gergelim e linhaça dourada apresentaram uma maior variação na faixa de concentração, possivelmente por causa do solo. Marthe; Augusti; Costa (2015), quantificaram Cu em linhaça dourada e obtiveram concentrações de $19,8$ a $24,2 \text{ mg kg}^{-1}$, superiores às encontradas no presente estudo ($16,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Para o Cu são recomendados 2 mg para adultos em uma ingestão diária (FDA, 2013),

Para as concentrações de Mo encontradas nas farinhas funcionais (**Figura 2.7b**), com exceção da farinha de berinjela, todas as amostras foram quantificadas e as concentrações variaram entre $0,05$ e $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$. A farinha de feijão branco ($2,9 \text{ mg kg}^{-1}$) e soja ($4,0 \text{ mg kg}^{-1}$) tiveram as maiores concentrações de Mo, enquanto a farinha de banana verde ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) apresentou a menor concentração. Adicionalmente, observou-se uma variação maior na concentração de Mo nas farinhas de gergelim, linhaça dourada, maracujá, soja e arroz. Ojeda et al. (2015) avaliaram Mo para diferentes variedades de feijão e encontraram as seguintes concentrações deste elemento, por exemplo: $2,9 \text{ mg kg}^{-1}$ para feijão preto; $4,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para feijão *mayflower*; $10,9 \text{ mg kg}^{-1}$ de feijão peruano e $6,4 \text{ mg kg}^{-1}$ para feijão carioca. O FDA recomenda uma ingestão diária de $75 \mu\text{g}$ de Mo (FDA, 2013).

As concentrações de cromo variaram de $0,03$ a $1,2 \text{ mg kg}^{-1}$ nas amostras (**Figura 2.7c**), com exceção da farinha de centeio, que foi inferior a LOD (28 ng kg^{-1}). As maiores concentrações de Cr foram observadas para as farinhas de beterraba, gergelim e grão de bico, enquanto que as concentrações menores foram encontradas nas farinhas de amaranto e milho. É importante notar que assim como ocorreu no Mo, as mesmas farinhas, com adição da farinha de milho, também mostraram uma ampla faixa de concentração para este elemento, sugerindo que cada composição da amostra pode estar relacionada ao local onde o alimento foi cultivado. O FDA recomenda uma ingestão de $120 \mu\text{g Cr dia}^{-1}$ (FDA, 2013) e as concentrações encontradas na farinha de grão de bico ($1,2 \text{ mg kg}^{-1}$) foram semelhantes às observadas na casca do grão de bico ($1,090 \text{ mg kg}^{-1}$) por El-Sweify; Metwally; Abdel-Khalik, 2007.

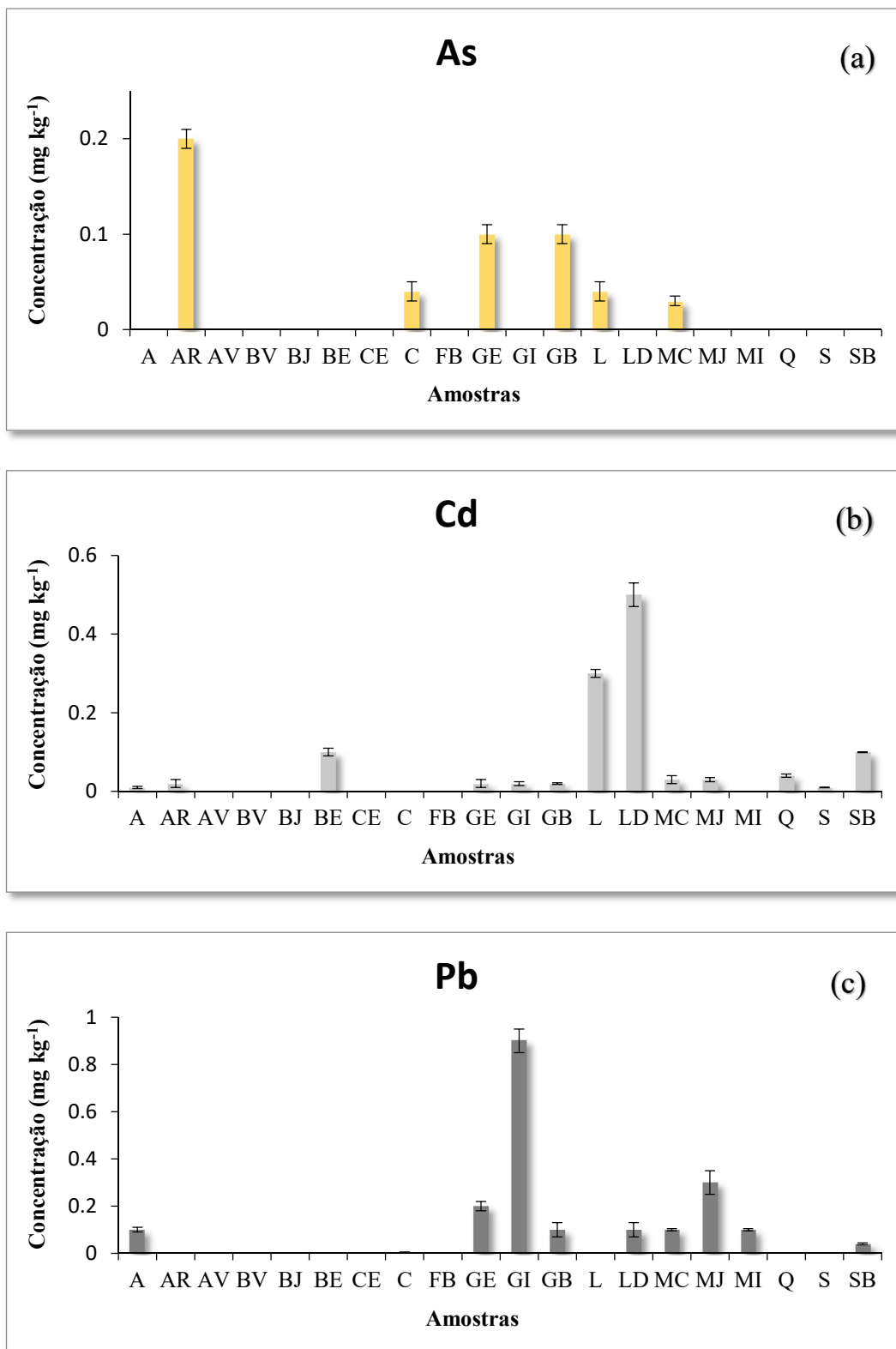


Figura 2.8 - Concentrações de As (a), Cd (b) e Pb (c) (mg kg⁻¹) determinadas por ICP-MS/MS para amostras de farinhas funcionais: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MC), maracujá (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).

As concentrações de As (**Figura 2.8a**) nas farinhas de amaranto, aveia, banana verde, berinjela, beterraba, centeio, feijão branco, girassol, linhaça dourada, maracujá, milho, quinoa, soja e “Seca Barriga” foram inferiores ao LOD (3 ng kg^{-1}). Enquanto que para as outras farinhas, a concentração de As variou de $0,03$ a $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo as farinhas de arroz, grão de bico e de gergelim as que apresentaram maiores concentrações. Foi observado que a concentração deste elemento na farinha de arroz ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) está de acordo com os resultados obtidos ($0,1790 \text{ mg kg}^{-1}$) por Fleming et al. (2013) em amostras de arroz branco. Esta alta concentração é causada devido à natureza da casca de arroz de assumir com facilidade o As em solos encharcados, onde o mesmo é liberado pela atividade anaeróbia microbiana e levando a uma acumulação de pelo menos 10 vezes maior concentração do que no trigo e outros cereais (HUANG; ILGEN; FECHER, 2010). A concentração máxima de As permitida em alimentos e bebidas não deve exceder 20 até $300 \mu\text{g dia}^{-1}$ (GOMEZ-CAMINERO et al., 2001).

As amostras de farinhas de aveia, banana verde, berinjela, centeio, chia, feijão branco e milho apresentaram valores de Cd inferiores a LOD ($<2 \text{ ng kg}^{-1}$) (**Figura 2.8b**). Nas demais farinhas, a concentração de Cd variou de $0,01$ a $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo que as menores concentrações foram observadas nas farinhas de amaranto e soja ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$) e valores elevados nas farinhas de linhaça e linhaça dourada ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$), o que concorda com Lei et al. (2003) que relataram conteúdo de Cd nas farinhas de linhaça de $0,075$ a $2,775 \text{ mg kg}^{-1}$. Assim, a quantidade de Cd, mesmo na farinha de linhaça dourada, não é considerado prejudicial do ponto de vista nutricional (FAO/OMS, 1998). A acumulação de cádmio é maior nas raízes e brotos do que em outras partes da planta. No entanto, a linhaça é um acumulador natural deste elemento, e uma maior concentração deste metal é esperado para ser encontrado nas sementes, mesmo em baixos níveis no solo (LEI et al., 2003). FAO/OMS propôs uma média semanal máxima de Cd de $2,3 \text{ mg kg}^{-1}$ por peso corporal, assumindo um valor padrão de 60 kg .

Para Pb (**Figura 2.8c**), as amostras de farinhas de amaranto, chia, gergelim, girassol, grão de bico, linhaça dourada, maçã, maracujá, milho e “Seca Barriga” foram quantificadas e as concentrações variaram de $0,004$ a $0,9 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo as farinhas oriundas das sementes de girassol e chia as que apresentaram maiores e menores concentrações, respectivamente, em comparação com as demais amostras. Para as farinhas de arroz, aveia, banana verde, berinjela, beterraba, centeio, feijão branco, linhaça, quinoa e soja, as concentrações de Pb foram menores que o LOD ($<5 \text{ ng kg}^{-1}$). De acordo com Alexander et al. (2010), uma ingestão semanal tolerável é de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corporal. Assim, as concentrações encontradas de Pb nas farinhas funcionais analisadas estão dentro do limite tolerável.

As farinhas de linhaça dourada, gergelim e soja apresentaram maior variação na concentração de microelementos e elementos não essenciais. Enquanto que para farinhas de amaranto, milho, linhaça, casca de maracujá e arroz, foram observadas diferenças no intervalo de concentração de Cr.

Na **Tabela 2.9** as concentrações, mais detalhadas, dos microelementos e elementos não essenciais determinados em digeridos de farinhas por ICP-MS/MS são apresentados.

Tabela 2.9 - Faixa das concentrações (mg kg^{-1}) / média $\pm$ S.D. de Cu, Mo, Cr, As, Cd e Pb determinadas em amostras de farinhas por ICP-MS/MS, n = 3.

Amostras de Farinhas**	Cu	Mo	Cr	As	Cd	Pb
Amaranto (n = 2)	3,4 – 5,4 /4,4 $\pm$ 0,2	0,40 – 0,70 /0,50 $\pm$ 0,04	0,02 – 0,03 /0,03 $\pm$ 0,01	< 0,003*	0,003 – 0,02 /0,010 $\pm$ 0,003	0,14 – 0,15 /0,10 $\pm$ 0,01
Arroz (n = 6)	1,3 – 3,0 /2,1 $\pm$ 0,1	0,40 – 0,90 /0,50 $\pm$ 0,04	0,10 – 1,10 /0,30 $\pm$ 0,03	0,10 – 0,30 /0,20 $\pm$ 0,01	0,01 – 0,03 /0,02 $\pm$ 0,01	< 0,005*
Aveia (n = 2)	4,0 – 4,3 /4,2 $\pm$ 0,1	1,40 – 1,20 /1,30 $\pm$ 0,02	0,14 – 0,15 /0,10 $\pm$ 0,02	< 0,003*	< 0,002*	< 0,005*
Banana verde (n = 3)	1,2 – 3,1 /1,9 $\pm$ 0,1	0,04 – 0,05 /0,05 $\pm$ 0,01	0,10 – 0,20 /0,10 $\pm$ 0,03	< 0,003*	< 0,002*	< 0,005*
Berinjela	2,1 $\pm$ 0,3	< 0,005*	0,20 $\pm$ 0,03	< 0,003*	< 0,002*	< 0,005*
Beterraba	10,9 $\pm$ 0,2	0,10 $\pm$ 0,03	0,900 $\pm$ 0,002	< 0,003*	0,10 $\pm$ 0,01	< 0,005*
Centeio	4,6 $\pm$ 0,3	0,40 $\pm$ 0,04	< 0,028*	< 0,003*	< 0,002*	< 0,005*
Chia	14,8 $\pm$ 0,4	0,40 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	< 0,002*	0,004 $\pm$ 0,002
Feijão branco	4,5 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1	0,10 $\pm$ 0,02	< 0,003*	< 0,002*	< 0,005*
Gergelim (n = 6)	7,6 – 17,2 /13,3 $\pm$ 0,3	0,60 – 1,80 /1,30 $\pm$ 0,04	0,20 – 1,90 /0,80 $\pm$ 0,04	0,04 – 0,10 /0,10 $\pm$ 0,01	0,01 – 0,05 /0,02 $\pm$ 0,01	0,10 – 0,30 /0,20 $\pm$ 0,02
Girassol	9,8 $\pm$ 0,3	0,20 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01	< 0,003*	0,020 $\pm$ 0,005	0,90 $\pm$ 0,05
Grão de bico	3,4 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	1,20 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,01	0,020 $\pm$ 0,002	0,10 $\pm$ 0,03
Linhaça (n = 9)	10,5 – 17,4 /13,2 $\pm$ 0,8	0,40 – 0,70 /0,50 $\pm$ 0,02	0,10 – 0,80 /0,20 $\pm$ 0,06	0,03 – 0,05 /0,04 $\pm$ 0,01	0,10 – 0,50 /0,30 $\pm$ 0,01	< 0,005*
Linhaça dourada (n = 11)	9,5 – 26,0 /16,4 $\pm$ 0,7	0,30 – 0,80 /0,40 $\pm$ 0,03	0,03 – 0,50 /0,20 $\pm$ 0,05	< 0,003*	0,10 – 1,40 /0,50 $\pm$ 0,03	0,03 – 0,10 /0,10 $\pm$ 0,03
Maçã	1,4 $\pm$ 0,1	0,60 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,030 $\pm$ 0,005	0,03 $\pm$ 0,01	0,100 $\pm$ 0,005
Maracujá (n = 6)	2,5 – 4,5 /3,1 $\pm$ 0,3	0,05 – 0,20 /0,10 $\pm$ 0,02	0,30 – 0,80 /0,60 $\pm$ 0,04	< 0,003*	0,020 – 0,060 /0,030 $\pm$ 0,005	0,10 – 0,60 /0,30 $\pm$ 0,05
Milho (n = 2)	2,0 – 2,1 /2,0 $\pm$ 0,2	1,3 – 1,5 /1,4 $\pm$ 0,1	0,01 – 0,10 /0,05 $\pm$ 0,01	< 0,003*	< 0,002*	0,080 – 0,110 /0,100 $\pm$ 0,005
Quinoa	5,10 $\pm$ 0,03	0,300 $\pm$ 0,002	0,50 $\pm$ 0,01	< 0,003*	0,040 $\pm$ 0,004	< 0,005*
Soja (n = 3)	7,1 – 10,9 /9,4 $\pm$ 0,3	1,1 – 4,4 /4,0 $\pm$ 0,1	0,03 – 0,10 /0,10 $\pm$ 0,01	< 0,003*	0,007 – 0,010 /0,010 $\pm$ 0,001	< 0,005*
Seca Barriga	7,2 $\pm$ 0,1	0,30 $\pm$ 0,01	0,200 $\pm$ 0,004	< 0,003*	0,100 $\pm$ 0,001	0,040 $\pm$ 0,004

*Valores de LOD em $\mu\text{g kg}^{-1}$ / **Faixa de concentração refere-se ao grupo de farinha com mais de uma amostra.

2.5.6 PCA

Uma abordagem estatística aplicada as 60 amostras de farinhas funcionais e suas réplicas baseadas na determinação de nutrientes e elementos não essenciais por ICP OES e ICP-MS/MS (Ca, K, Mg, P, Fe, Mn, Al, Cu, Mo, As, Cd e Pb) é mostrada na **Figura 2.9** seguir.

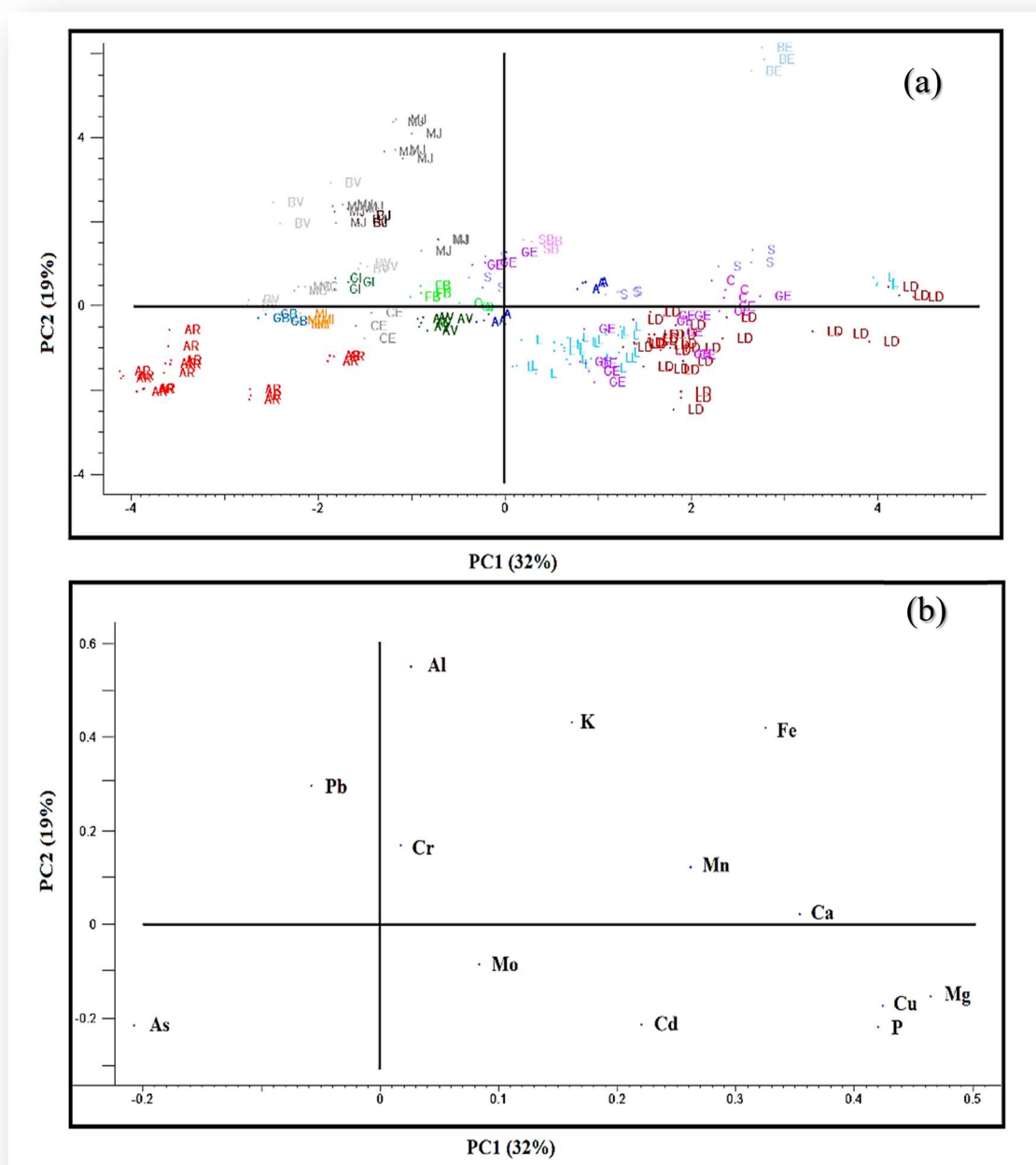


Figura 2.9 - Gráfico da PC2 x PC1 escores (a) e pesos (b) da matriz das amostras de farinhas: amaranto (A), arroz (AR), aveia (AV), banana verde (BV), berinjela (BJ), beterraba (BE), centeio (CE), chia (C), grão de bico (GB), feijão branco (FB), gergelim (GE), girassol (GI), linhaça (L), linhaça dourada (LD), maçã (MJ), milho (MI), quinoa (Q), soja (S) e “Seca Barriga” (SB).

As duas componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 51% da variação total (**Figura 2.9a**), enquanto que as demais PC's (PC3, PC4, PC5 e PC6) explicaram 36%. As variáveis mais significativas ao longo da PC1 (32% de variabilidade dos dados), foram aquelas que apresentam altos pesos positivos, sendo os teores de Fe e Ca, localizados no quadrante superior direito e os teores de Mg, P e Cu, localizados no quadrante inferior direito. Assim, as amostras de farinhas de linhaça, linhaça dourada, chia e gergelim apresentaram as maiores concentrações de Mg, P e Cu. Por outro lado, as amostras de farinhas de arroz se destacaram das demais por apresentarem altas concentrações de arsênio (As), com pesos negativos em PC1 (**Figura 2.9 a**), confirmando a discussão na seção 2.5.4.

A PC2, responsável por 19% da variação total, está relacionada aos teores de Al, K, Cr e Mn, localizado no quadrante superior direito e Pb, localizado no quadrante superior esquerdo, sendo estas variáveis responsáveis pela distribuição dos escores na **Figura 2.9a**. As amostras de farinhas de beterraba e maracujá se destacaram das demais amostras por apresentarem concentrações mais elevadas de Al, K e Cr. Com isto, estas variáveis podem distinguir os grupos de farinhas de linhaça, linhaça dourada, quinoa, gergelim, amaranto, chia e soja.

As demais PC's (PC3 a PC6) apresentaram os perfis das distribuições dos escores semelhantes ao da **Figura 2.9a**.

2.6 Considerações Finais

O procedimento de digestão utilizando o peróxido de hidrogênio combinado com ácido nítrico destilado e diluído assistidos por radiação micro-ondas foi adequado para determinação do teor de constituintes inorgânicos a partir das técnicas de ICP OES e ICP-MS/MS, obtendo-se resultados com valores de RCCs $\leq 2.000 \text{ mg L}^{-1}$.

Uma vez que o consumo de farinhas com propriedades funcionais aumenta cada vez mais, a disponibilidade de métodos que possibilitem a avaliação da concentração dos constituintes inorgânicos presentes nesses alimentos é um quesito importante para garantir ao produto padrões de qualidade. As técnicas ICP OES e ICP-MS/MS utilizadas neste estudo mostraram resultados satisfatórios em função do caráter multielementar, rapidez e baixos valores de LOD e LOQ.

As farinhas analisadas continham altas concentrações dos macroelementos: K, P, Ca e Mg, em ordem decrescente. A mesma tendência foi observada para os microelementos analisados nas amostras de farinhas, em ordem decrescente: Fe, Al, Mn, Cu, Mo e Cr. Deve ser ressaltado que as amostras de sementes de girassol e farinha de chia apresentaram um teor

elevado de Pb. Apesar do fato das concentrações de As, Cd e Pb cumprirem os requisitos legais, quanto a limite de ingestão diária (de acordo com que órgão FDA), são necessários mais estudos para garantir que um consumo a longo prazo destas farinhas funcionais possam causar danos para a saúde humana. Algumas variações significativas foram encontrados nos teores de Ca e K para farinhas preparadas a partir da mesma fonte indicando heterogeneidade entre as farinhas estudadas, como exemplo das farinhas de arroz, banana verde, linhaça dourada e soja. As farinhas de chia, linhaça dourada, linhaça e gergelim apresentaram elevadas concentrações de Ca, Mg, P e Cu. Todas as amostras estavam de acordo com a recomendação de ingestão diária do FDA.

O gráfico de escores de PCA indicou que os elementos Mg, P e Cu, estão relacionados com a maior variância ao longo de PC1 e Al, K Cr e Mn com PC2.

CAPÍTULO III

**TRANSFERÊNCIA DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO ENTRE
INSTRUMENTOS NIR DE BANCADA E PORTÁTIL PARA PREDIÇÃO
DE PROPRIEDADES DE FARINHAS FUNCIONAIS**

3.1 Introdução

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) tem característica vibratória e emprega energia de fótons ($h\nu$) na faixa de energia de $2,65 \times 10^{-19}$ J a $7,96 \times 10^{-20}$ J, ao qual corresponde ao número de onda entre 13.300 e 4.000 cm^{-1} . É uma técnica capaz de fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre muitos componentes presentes na matriz (PASQUINI, 2003). Tem sido amplamente usada por apresentar características importantes como rapidez, não é destrutiva, nem invasiva, com aplicação quase universal (qualquer molécula contendo ligações CH, NH, SH ou OH) e não exige o pré-tratamento das amostras (MAGWAZA et al., 2016; BAGCHI; SHARMA; CHATTOPADHYAY, 2016; PASQUINI, 2003; WILLIAMS; NORRIS, 2001).

As inovações tecnológicas permitiram o desenvolvimento de instrumentos NIR portáteis, que apresentam menor custo e maior facilidade de adaptação a diferentes condições de análise, tornando viável o uso desta técnica em diferentes contextos (SALGUERO-CHAPARRO et al., 2013). Muitos estudos foram realizados usando instrumentos NIR portáteis para avaliação de parâmetros de qualidade de diversas amostras (MARQUES et al., 2016; HENN; SCHWAB; HUCK, 2016; SALGUERO-CHAPARRO et al., 2013; PLANS et al., 2013; SÁNCHEZ; HABA; PÉREZ-MARÍN, 2013; SÁNCHEZ et al., 2011), monitoramento do estágio de maturação (CIRILLI et al., 2016) e identificação de adulteração de alimentos (BASRI et al., 2017). Todavia, complicações relacionadas ao uso dos equipamentos NIR portáteis aparecem quando os modelos de calibração desenvolvidos anteriormente a partir de instrumentos NIR de bancada são incorretamente aplicados aos dados obtidos a partir de instrumentos portáteis (HONORATO, 2007). Nesse caso, previsões inadequadas podem ser obtidas devido às diferenças entre suas respostas instrumentais (FEUDALE et al., 2002). Assim, uma solução seria a transferência de modelos de calibração, que pode ser realizada por uma padronização das respostas espectrais. Essa padronização consiste em uma correção nas diferenças entre as respostas instrumentais dos equipamentos envolvidos, adaptando a função de resposta de um dos instrumentos (PANCHUK et al., 2017; SOARES, 2016; BERGO, 2014; SALGUERO-CHAPARRO et al., 2013; NOORD, 1994).

Vários métodos de transferência de calibração foram relatados na literatura (PANCHUK et al., 2017; SOARES, 2016; SALGUERO-CHAPARRO et al., 2013; HONORATO et al., 2007), entre os quais estão a padronização direta (DS), a padronização direta por partes (PDS) (WANG; VELTKAMP; KOWALSKI, 1991) e padronização reversa (RS) (NOORD, 1994). Nos três casos, os espectros de um conjunto representativo de amostras, conhecidos como

amostras de transferência são registrados nos dois instrumentos para encontrar uma função de ajuste que estima as diferenças entre as respostas instrumentais dos equipamentos envolvidos, que então é usada nos procedimentos de padronização (BOUVERESSE; MASSART, 1996).

No presente estudo, foram avaliadas diferentes estratégias de transferência de calibração entre um instrumento NIR de bancada, que foi considerado como instrumento primário, e um NIR portátil, usado como instrumento secundário, para determinar parâmetros físico químicos em amostras de farinhas de diferentes tipos. Modelos de calibração PLS_{espectro completo}, PLS/JK e MLR/SPA foram construídos para a determinação de proteínas brutas e fibras e as técnicas de padronização DS, RS e PDS foram comparadas e avaliadas no procedimento de transferência de calibração.

3.2 Fundamentação Teórica

3.2.1 Espectroscopia na região do Infravermelho próximo (NIR) e Quimiometria

A espectroscopia do infravermelho próximo envolve transferência de energia entre radiação e a matéria e diferentes ligações químicas absorvem em diferentes comprimentos de onda dependendo dos átomos conectados, das moléculas ao redor e do tipo de vibração que se está ocorrendo (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016).

O equipamento que opera na região do NIR apresenta características como maior razão sinal-ruído, rapidez, não destrutivo, não invasivo, baixo custo comparado a outras técnicas e exigem mínimas preparações de amostras. Além disso, os espectros obtidos na região do NIR caracterizam-se por sobretons e combinações de bandas fundamentais de vibrações moleculares, devido aos vínculos fundamentais envolvendo átomos de hidrogênio (qualquer molécula contendo ligações CH, NH, SH ou OH) (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016; WORKMAN, 2006; PASQUINI, 2003).

Uma complexidade dos espectros NIR é que apresentam bandas largas resultantes da sobreposição de picos individuais, o que dificulta uma interpretação simples. Assim, ferramentas quimiométricas, pode auxiliar na extração de informações presentes nos espectros NIR.

A quimiometria é definida como uma disciplina da química, que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e lógicos para extrair informações significativas de dados experimentais e otimizar processos ou produtos (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Acompanha todas as etapas do processo de medição química,

desde a amostragem até a interpretação dos dados passando pela definição das melhores condições experimentais de coleta e processamento dos dados (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016). Pode ser subdividida em planejamento experimental, reconhecimento de padrões, métodos de inteligência artificial e a calibração multivariada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Na área de planejamento experimental procura-se investigar quais as variáveis que mais influenciam em um determinado sistema, assim como a interação entre elas. Na área de reconhecimento de padrões, pretende-se descobrir agrupamentos de amostras que são semelhantes entre si e, assim, detectar tendências nos dados. Na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas realizadas em amostras, por exemplo, os espectros ou termogramas, com uma propriedade de interesse, como exemplo, propriedades físico-químicas (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; BRERETON, 2003).

3.2.1.1 Técnicas de pré-processamento dos dados

Na modelagem quimiométrica o objetivo do pré-processamento é remover, quando necessário, fenômenos físicos no espectro, que mascaram uma variação de interesse nos dados, a fim de melhorar os modelos que serão desenvolvidos (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

Pré-processamentos com derivação tem por finalidade a correção de problemas de linhas de base e melhorar a definição das bandas que se encontram sobrepostas. Informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda são geralmente enfatizadas com a utilização da primeira ou segunda derivada (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Esse processo tem por desvantagem diminuir a relação sinal/ruído quando há ruídos nos espectros, assim, aplica-se a suavização junto com a derivação, a exemplo, a derivação Savitzky Golay (SAVITZKY; GOLAY, 1964). Neste método, uma janela é selecionada contendo certo número de variáveis. Além disso, um polinômio de baixa ordem é ajustado aos pontos da janela e utilizado para recalcular o ponto central (SOUSA; POPPI, 2012).

Para contornar problemas relacionados ao espalhamento da radiação eletromagnética como falta de homogeneidade, diferenças na granulometria das amostras, rugosidade e opacidade ocasionadas nas medidas de reflectância difusa, a Correção de Espalhamento Multiplicativo (MSC) é uma opção. Este método matemático minimiza a interferência através da correção de linha de base dos espectros de modo que todos apresentam um espalhamento definido como ideal. Em seguida, uma regressão linear é usada para calcular o coeficiente angular e linear do gráfico entre o espectro ideal e o espectro que será corrigido (MARTENS; JENSEN; GELADI, 1983). O espectro corrigido é calculado pela subtração de cada espectro pelo valor do coeficiente linear e divide-se este pelo coeficiente angular. O procedimento

realizado pelo MSC é descrito na **Equação 3.1** (estimativa dos coeficientes de correção) e, em seguida na **Equação 3.2** (correção do espectro original) (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009; SOUSA; POPPI, 2012).

$$x_{ik}(\text{original}) = a_i + b_{ref,i} \cdot x_{ref} + e_{ik} \quad \text{eq. (3.1)}$$

$$x_{ik}(\text{transformado}) = \frac{[x_{ik}(\text{original}) - a_i]}{b_{ref,i}} \quad \text{eq. (3.2)}$$

Em que:

e_{ik} = todos os outros efeitos nos espectros que não foram modelados (matriz residual);

a_i e $b_{ref,i}$ = parâmetros escalares que variam de acordo com a amostra;

x_{ref} = espectro de referência usado para processar todo o conjunto de dados;

x_{ik} (original) e x_{ik} (transformado) = valores de absorvância antes e depois de correção com o MSC em k variáveis.

Similar ao MSC, a Variação Normal Padrão (SNV) corrige espalhamento multiplicativo, porém a correção SNV contorna problemas de espalhamento através da normalização de cada espectro pelo desvio padrão e empregando a média como fatores de correção (COSTA FILHO, 2003; BARNES; DHANOA; LISTER, 1989). O SNV não necessita de um espectro de referência para obtenção dos espectros transformados. Essa correção acontece individualmente para cada espectro da matriz de dados (**Equação 3.3**).

$$x_{ik}(\text{transformado}) = \frac{x_{ik}(\text{original}) - c_0}{c_1} \quad \text{eq. (3.3)}$$

Em que:

c_0 = valor médio do espectro a ser corrigido;

c_1 = desvio padrão do espectro de cada amostra.

3.2.1.2 Técnicas de seleção de variáveis

Algoritmos de seleção de variáveis são muitas vezes necessários devido a algumas variáveis, por não conterem informações de interesse para o parâmetro a ser estimado, devem ser eliminadas antes da construção dos modelos, permitindo construir modelos mais simples e mais fáceis de interpretar.

Alguns algoritmos de seleção de variáveis são conhecidos, como exemplo, o algoritmo genético (GA) (LEARDI, 2001), o stepwise (SW) (FORINA et al, 2007), o algoritmo *Jack-Knife* (JK) (NAES et al., 2002), o algoritmo das projeções sucessivas (SPA) (ARAÚJO et al., 2001) e a regressão por mínimos quadrados parciais por intervalos (*i*PLS). Neste estudo foram utilizados apenas os algoritmos SPA e JK.

O algoritmo SPA, no contexto da calibração multivariada, faz uso de operações simples objetivando a seleção de variáveis, voltado à minimização de problemas de colinearidade do conjunto de dados e reduzindo assim as informações redundantes, quando associado aos modelos MLR. Este objetivo é alcançado com o uso de procedimentos matemáticos, em que as variáveis existentes na matriz de dados são projetadas sucessivamente, gerando cadeias com menor número de variáveis (ARAÚJO et al., 2001).

O SPA funciona utilizando os conjuntos de calibração e validação da matriz (**X**) e dos dados e do parâmetro de interesse (**y**). Matematicamente, o SPA busca desenvolver operações de projeção na matriz de calibração **X**_{cal} ($K_c \times J$), cujas linhas correspondem a K_c amostras de calibração e colunas correspondem a J variáveis espectrais. A partir da coluna **x**₀ (associada à variável inicial da seleção), o SPA determina qual das colunas restantes tem a maior projeção no subespaço S_0 ortogonal a **x**₀. Assim, esta coluna, designada por **x**₁, pode ser considerada como aquela que contém a maior quantidade de informação não incluída em **x**₀. Em seguida, o algoritmo então restringe a análise ao subespaço S_0 , tomando **x**₁ como a nova coluna de referência, e prossegue o mesmo procedimento (CANECA et al., 2006). A cada uma das variáveis J disponível para o procedimento de seleção, o SPA constrói uma cadeia ordenada de K_c variáveis de modo que haja uma mínima colinearidade entre o elemento posterior com o anterior. Dessa forma, a colinearidade entre variáveis é avaliada pela correlação entre os vetores coluna da respectiva matriz de calibração **X**_{cal} (ARAÚJO et al., 2001; SOARES et al., 2013). Mais detalhes deste algoritmo pode ser visto em SOARES et al. (2013).

A fim de escolher o subconjunto de variáveis mais apropriados, modelos de calibração são construídos, e depois comparados em termos da Raiz Quadrada dos Erros Médio para um conjunto de Validação (RMSEV), buscando um menor valor (**Equação 3.4**).

$$RMSEV = \sqrt{\frac{1}{K_V} \sum_{k=1}^{K_V} (y_v^k - \hat{y}_v^k)^2} \quad \text{eq. (3.4)}$$

Em que:

y_v^k e $\hat{y}_v^k$ = valor de referência e o valor previsto, respectivamente, para o parâmetro de interesse na k -ésima amostra de validação;

K_v = número de amostras do conjunto de validação.

O algoritmo JK, proposto por Efrom (1982), é conhecido por teste de incerteza. Usado geralmente para selecionar variáveis quando se utiliza os métodos de regressão PLS. No algoritmo JK, seus erros padrão das estimativas dos coeficientes de regressão obtidos pelos modelos PLS são avaliados a partir de uma série de subconjuntos de dados. A partir daí, pode-se calcular intervalos de confiança para os coeficientes de regressão e avaliar a significância de cada variável utilizada no modelo (NAES et al., 2002). Assim, após a construção dos modelos PLS com validação cruzada completa, a variância associada a cada elemento do vetor de coeficientes de regressão é estimada (**Equação 3.5**).

$$S_j^2 = \sum_{j=1}^j ((b - b_j)g)^2 \quad \text{eq. (3.5)}$$

Em que:

g = fator de escala definido como $g = \sqrt{\left(\frac{n-1}{n}\right)}$;

b = coeficiente para o modelo global com todos os objetos de calibração;

n = número de amostras de calibração.

Depois de estimados os valores de variância, aplica-se um teste t à raiz quadrada de S^2 a 99% de confiança, assim, as variáveis que não passarem no teste, são consideradas como não informativas e terão coeficientes de regressão igual a zero.

Após realizar o pré-processamento dos dados e selecionar as variáveis, modelos de calibração multivariada podem ser gerados.

3.2.1.3 Técnicas multivariadas

Considerada uma técnica multivariada, a análise por componentes principais (PCA) é a base para os diversos métodos de reconhecimento de padrões, calibração multivariada e classificação (PEARSON, 1901). A PCA é utilizada para análise exploratória de dados, além de também ser usada para identificação de amostras anômalas (SOUSA; POPPI, 2012). Tem

por principal objetivo a redução da dimensionalidade dos dados a partir dos componentes principais (PC's). Estas são combinações lineares das variáveis originais, ortogonais entre si e construídas na ordem da maior para a menor variância explicada dos dados. Os conjuntos de dados são assim redimensionados e cada amostra é representada por um ponto no espaço multidimensional, gerando gráficos de cada classe apresentando características semelhantes provenientes das propriedades químicas (NAES et al., 2002). Comumente, as PCs são calculadas de forma sequencial através de um processo iterativo de mínimos quadrados seguido de subtração da contribuição de cada componente. Cada PC é determinada de tal forma que irá explicar a variância residual na matriz de dados $\mathbf{X}$ e o processo pode avançar até que as PCs sejam iguais às variáveis originais em número e representem 100% da variabilidade dos dados (JOLLIFFE, 1986).

3.2.1.3.1 *Calibração multivariada*

A calibração multivariada é provavelmente uma das áreas que tem atraído mais interesse. São exemplos de técnicas de calibração multivariada: a regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), regressão por componentes principal (PCR) e regressão linear múltipla (MLR). Com a calibração multivariada é possível gerar modelos lineares entre uma matriz $\mathbf{X}$ independente (dados espectrais) e uma variável dependente y e estimar a matriz do coeficiente de regressão usando técnicas de ajuste de mínimos quadrados (FERREIRA, 2015; BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

O método PLS, introduzido por Wold (1976), tem sido associado a outros métodos matemáticos e algoritmos, entre eles, o algoritmo mais utilizado para implementá-lo é o dos mínimos quadrados parciais iterativos não lineares (NIPALS).

A principal motivação do método PLS é aproximar o espaço das medidas originais por um de dimensão reduzida, mas com a diferença de que alguma restrição é imposta na decomposição da matriz $\mathbf{X}$ direcionando-a para uma solução cujo objetivo é a propriedade de interesse (FERREIRA, 2015). Consiste numa manipulação matemática de dados com o intuito de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de fatores, comumente conhecidos por variáveis latentes (LIRA, 2010). Estes são definidos de modo a manter um compromisso entre a explicação da variância em $\mathbf{X}$ e a predição da variável dependente, y . Por isso, a informação da propriedade de interesse é incluída no cálculo das variáveis latentes, que são mais eficientes para capturar as informações relevantes para a construção do modelo de calibração (FERREIRA, 2015). Assim, é realizada uma transformação com o intuito que a nova matriz apresente as colunas ordenadas segundo a quantidade de

inovação que elas possuem. A não utilização das colunas colineares não implica em uma perda significativa de informação, já que essas colunas colineares não possuem quantidade significativa de informação relevante (GELADI; KOWALSKI, 1986).

As **Equações 3.6 e 3.7** expressa as duas etapas de construção do modelo de regressão PLS são apresentadas a seguir.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E}_X = \sum \mathbf{t}_k \mathbf{p}'_k + \mathbf{E}_x \quad \text{eq. (3.6)}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{E}_y = \sum \mathbf{u}_k \mathbf{q}'_k + \mathbf{E}_y \quad \text{eq. (3.7)}$$

Com isso, uma relação linear é estabelecida entre os escores de $\mathbf{X}$ e os escores de $\mathbf{Y}$ (**Equação 3.8**).

$$\mathbf{u}_k = \mathbf{b}_k \mathbf{t}_k \quad \text{eq. (3.8)}$$

Em que:

$$\mathbf{b}_k = \frac{\mathbf{u}'_k * \mathbf{t}_k}{\mathbf{t}'_k * \mathbf{t}_k} = \text{vetor dos coeficientes de regressão para } k \text{ fatores.}$$

Inicialmente, os dados são decompostos e filtrados ao fazer a análise dos fatores em $\mathbf{X}$. A matriz de pesos $\mathbf{P}$ forma uma base ortogonal para o espaço-linha de $\mathbf{X}$ e a matriz de escores $\mathbf{T}$ forma uma base ortogonal para o espaço-coluna de $\mathbf{X}$. A matriz de resíduos, $\mathbf{E}$, contém a informação em $\mathbf{X}$ que não foi modelada (FERREIRA, 2015).

Para o modelo PLS, cada variável latente é obtida maximizando a covariância entre os escores $\mathbf{T}$, da matriz $\mathbf{X}$ e y . Um ponto importante é que após a transformação das variáveis em variáveis latentes, não é possível excluir regiões do sinal com baixa relação sinal/ruído, pois todas as variáveis originais contribuem para cada PC. Assim, torna-se necessário, em alguns casos, a aplicação de algoritmos de seleção de variáveis no contexto dos métodos de calibração multivariada. Adicionalmente, o PLS consegue manipular matrizes cujo número de variáveis excede o número de amostras, o que não é possível para o MLR, além disso, é tido como mais eficiente quando se tem problemas de ruídos experimentais, colinearidade e não linearidade.

A MLR é a mais simples das técnicas de calibração. Na MLR, a análise pode ser descrita pela medição de variáveis independentes $\mathbf{X}$ e variável dependente y com o objetivo principal de criar uma relação linear entre elas (**Equação 3.9**) (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; NAES

et al., 2002). O modelo é obtido calculando-se o vetor de regressão $\hat{\mathbf{b}}$ através de mínimos quadrados (**Equação 3.10**).

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad \text{eq. (3.9)}$$

$$\hat{\mathbf{b}} = (\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^T\mathbf{y} \quad \text{eq. (3.10)}$$

Em que:

$\hat{\mathbf{y}}$ = vetor das respostas estimadas pelo modelo;

$\hat{\mathbf{b}}$ = vetor de regressão;

$\mathbf{e}$ = vetor de erros;

$(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}$ = matriz inversa do produto da transposta da matriz X com ela mesma.

Uma vantagem desse método é que não é necessário conhecer as concentrações de todas as espécies espectroscopicamente ativas nas amostras do conjunto de calibração. Os interferentes, as impurezas e os efeitos de linha de base, quando presentes, são tratados. Além disso, prever as propriedades de interesse a partir desse método, pode se conseguir um erro bem menor, na qual se assume que não existe erro na matriz $\mathbf{X}$, do que quando as concentrações são previstas pelo método de referência. No entanto, uma desvantagem do MLR é que o número de variáveis é maior que o número de amostras, o produto $\mathbf{X}^T\mathbf{X}$ não será reversível e informações confiáveis não poderão ser obtidas. Por este motivo, neste estudo foi utilizado o modelo MLR combinado com o algoritmo SPA (FERREIRA, 2015).

3.2.1.4 Transferência de modelos de calibração

Depois de construídos os modelos de calibração, os mesmos podem deixar de ser válidos quando há mudanças na composição química das amostras, desgaste do próprio equipamento de análise ou mesmo mudanças na função de resposta do equipamento. Como solução, novas medidas das amostras são acrescentadas durante a calibração ou mesmo, utilizar as técnicas de planejamento experimental (ADHIHETTY et al., 1991; DESPAGNE; MASSART; CHABOT, 2000). Para que isso ocorra, é necessário identificar as fontes de variação do problema e controlar parâmetros experimentais. Assim, uma solução seria um procedimento de recalibração ou estratégia de transferência de modelos de calibração (HONORATO et al., 2007).

Procedimentos de recalibração são muitas vezes caros e demandam de certo tempo de análise. No entanto, a transferência de modelos de calibração oferece uma alternativa para a extensão da aplicabilidade dos modelos de calibração diante também das complicações de acessibilidade dos equipamentos (FEUDALE et al., 2002). A técnica de transferência comumente utilizada é a padronização das respostas espectrais.

Os métodos de padronização consistem em uma correção nas diferenças entre as respostas instrumentais dos equipamentos envolvidos, adaptando a função de resposta de um dos instrumentos (NOORD, 1994). Para isto, estes métodos necessitam das respostas espectrais de um subconjunto de amostras, denominadas de amostras de transferência, que são medidas em ambos os equipamentos envolvidos. A padronização das respostas é feita por uma transformação linear entre as matrizes dos instrumentos primários ($\mathbf{X}_p$) e secundário ($\mathbf{X}_s$) contendo os espectros das amostras de transferência, n_{trans} (**Equação 3.11**).

$$\mathbf{X}_p = \mathbf{X}_s \mathbf{F} \quad \text{eq. (3.11)}$$

Em que:

$$\mathbf{X}_p = n_{trans} \times q;$$

$$\mathbf{X}_s = n_{trans} \times p;$$

$\mathbf{F}$ = matriz de dimensão $(p \times q)$, sendo q e p o número dos números de onda para os espectros registrados em ambos os instrumentos.

A matriz $\mathbf{F}$ é a matriz de transformação e é usada na padronização do novo espectro $\mathbf{x}_s$ $(1 \times p)$ adquirido no equipamento secundário (**Equação 3.12**).

$$\hat{\mathbf{x}}^a = \mathbf{x}_s \mathbf{F} \quad \text{eq. (3.12)}$$

Em que:

$\hat{\mathbf{x}}^a = (1 \times q)$ estimativa do espectro $\mathbf{x}_p$ no equipamento primário.

A correção pode ser feita por padronização direta (DS), padronização direta por partes (PDS), padronização reversa (RS) e padronização univariada (FEARN, 2001).

A DS foi proposta por Wang; Veltkamp; Kowalski, em 1991 e consiste em relacionar diretamente a resposta medida de uma amostra em um instrumento com a resposta obtida em outro instrumento (NOORD, 1994). Nesta padronização, os espectros do subconjunto de

predição registrados no equipamento secundário serão tornados parecidos com os espectros obtidos pelo equipamento primário (SILVA et al., 2015). Isto é possível a partir das respectivas matrizes das respostas instrumentais obtidas para as amostras de transferência entre os dois instrumentos (**Equação 3.13**).

$$\mathbf{F} = (\mathbf{X}_S)^{-1}\mathbf{X}_P \quad \text{eq. (3.13)}$$

A **Equação 3.14** só é viável se $\mathbf{X}_S$ for inversível, mas como isto não acontece com frequência, pois costumam existir menos amostras que variáveis, $\mathbf{X}_S$ será uma matriz retangular. Assim, $\mathbf{F}$ pode ser calculada utilizando os modelos de regressão multivariada, por exemplo, o PLS (HONORATO et al., 2007). No entanto, quando a informação química é modelada na matriz de transformação, assume que qualquer alteração nos valores dos espectros deve-se a uma alteração em função do instrumento. Todavia, qualquer variação na composição química das amostras também será incorporada no modelo, e assim, a função geral não representará bem os instrumentos (FEUDALE et al., 2002; PANCHUK et al., 2017). Outro inconveniente da DS é em relação ao número de canais. Quando este é muito maior que o número de amostras de transferência pode-se levar a um sobreajuste (*overfitting*) ao estimar a função de ajuste. Para isto, a solução seria estimar essa função de ajuste por meio de uma regressão PLS ou PCR como também, reduzir esses canais envolvidos na regressão, a qual seria a PDS (FEUDALE et al., 2002).

A PDS, também proposta por Wang; Veltkamp; Kowalski, em 1991 tem por base o método DS, contudo a função de ajuste é calculada a partir dos comprimentos de onda localizados em uma janela da matriz do equipamento secundário, ou seja, os espectros das amostras de transferência medidos pelo instrumento primário será relacionado aos espectros de tais amostras localizados em uma janela da matriz obtida pelo instrumento secundário.

No método PDS, as matrizes espectrais das amostras de transferência também se relacionam pela **Equação 3.11**, no entanto, para cada janela calcula-se um vetor de regressão $\mathbf{f}$, por PLS ou PCR (**Equação 3.14**).

$$\mathbf{F} = [\mathbf{f}_1 \ \mathbf{f}_2 \ \dots \ \mathbf{f}_j \ \dots \ \mathbf{f}_q] \quad \text{eq. (3.14)}$$

O método PDS é comumente considerado um método de desempenho superior por ter a capacidade de correção simultânea de diferenças nas intensidades, deslocamentos de

comprimento de onda e ampliação de pico. Contudo, opera com uma janela móvel em torno do comprimento de onda em questão, isto pode ocasionar efeitos de borda quando não há dados suficientes para formar uma janela completa. Com isto, as extremidades dos espectros são removidas ou estimadas por extrapolação (HONORATO et al. 2007).

O método RS (LIMA; BORGES, 2002) é semelhante ao DS utilizando a mesma equação, mas a função de ajuste é calculada em relação aos espectros do instrumento secundário. Assim, ao invés das amostras de predição do instrumento secundário ser padronizadas, neste caso, as amostras de calibração do instrumento primário que serão padronizadas e um novo modelo de calibração é construído (SILVA et al., 2017). Segundo Honorato et al. (2007) é mais flexível, por permitirem identificar e eliminar valores anômalos (*outliers*), selecionar o melhor conjunto de amostras de calibração e de variáveis.

3.3 Espectroscopia NIR, métodos de calibração multivariada e métodos de padronização aplicados ao monitoramento da qualidade de alimentos

Trabalhos envolvendo equipamentos NIR de bancada e portátil, métodos de calibração e a transferência dos métodos de calibração em amostras alimentícias são encontrados na literatura. Alguns trabalhos que usam essa metodologia serão descritos a seguir.

Magwaza et al. (2016) utilizaram a espectroscopia NIR aliada aos métodos de calibração para quantificar teor de proteína em batata doce. Assim, 104 variedades de batata-doce foram adquiridas e as raízes foram analisadas usando o espectrômetro NIR. Modelos de calibração PLS foram construídos e avaliados em relação aos coeficientes de determinação (R^2), desvio preditivo residual (RPD) e a Raiz Quadrada dos Erros Médio de Calibração (RMSEC) e Predição (RMSEP). O modelo de melhor desempenho teve como pré-processamento a segunda derivada Savitzky Golay, janela de 25 pontos e polinômio de segunda ordem e como resultados, alto valor de R^2 (0,98) e valores satisfatórios de RPD (4,0) e RMSEP (0,29). Os autores concluíram que o modelo NIR desenvolvido no estudo permite a quantificar o teor de proteína da batata doce para rastreio rápido de germoplasma em programas de melhoramento com alto rendimento e precisão.

Bagchi; Sharma; Chattopadhyay (2016) comparam os modelos de calibração gerados a partir dos espectros NIR e das análises de proteína dos grãos e teor de amilose em amostras de arroz integral e composições aproximadas (proteína, óleo bruto, umidade, cinza e teor de fibras em %) em farelo de arroz. Para isso, 173 amostras de arroz integral e 86 de farelo de arroz foram analisados e um conjunto de 29 genótipos foi empregado para compor a validação externa

dos modelos de calibração (mPLS - mínimos quadrados parcialmente modificados) construídos. Observaram que o modelo com melhor desempenho apresentou alto coeficiente de determinação e baixo erro padrão (SEC: 0,398-0,531; SECV: 0,423-0,669 e SEP (C): 0.432-0.881) para todos estes constituintes de farelo de arroz. Além disso, os autores observaram também que os valores SECV (1,520) para os modelos com os teores de amilose foram mais baixos em relação aos trabalhos da literatura. No entanto, para o teor de proteína dos grãos em arroz integral, os resultados foram inferiores aos encontrados na literatura. Mesmo assim, os autores concluíram que esse estudo será útil para a utilização efetiva de NIRS em seleção de alto rendimento de amostras de farelo de arroz para a composição aproximada, bem como teor de amilose e teor de proteína dos grãos de quaisquer amostras de arroz de forma não destrutiva.

Mabood et al. (2015) determinaram a quantidade de sacarose em tâmaras crescendo no Sultanato de Oman, através da espectroscopia NIR combinado com a calibração multivariada. Para isso, as amostras foram divididas em dois grupos: um grupo de 48 soluções padrões de sacarose na faixa de concentração de 0,01% a 50% (m v^{-1}), sendo 31 amostras para o conjunto de calibração e 17 para o conjunto de predição, e outro grupo de 54 amostras de tâmaras de 18 diferentes tipos. Modelos de regressão PLS mostraram uma boa capacidade de predição devido aos valores de RMSEP de 1,5%. Além disso, o modelo PLS foi aplicado aos espectros das 54 amostras de tâmara para quantificar o teor de sacarose. Verificou-se que as variedades *Khalas*, *Barnia Nizwi*, *Ajwa Almadina*, *Maan* e *Khunizi* contêm grandes quantidades de sacarose, variando entre 36% a 60%, enquanto que as variedades *Naghal*, *Fardh*, *Nashu* e *Qash Tabaq* contêm quantidades de sacarose inferiores, variando de 3,5% a 8,1%.

Basri et al. (2017) utilizou um equipamento NIR portátil, configurado em dois modos de medida (transflectância e transmitância), para detectar a adulteração (em %) com banha em óleo de palma. Amostras de óleo de palma puras e adulteradas foram classificadas usando um algoritmo de Modelagem independente e flexível por analogia de classes (SIMCA) com precisão do modelo superior a 0,95 relatado para ambos os modos de medidas. Como resultados, os coeficientes de determinação dos modelos PLS e os valores de RMSEC foram de 0,9987 / 0,5931 e 0,9994 / 0,6703 quando se utilizou transflectância e transmitância, respectivamente. Adicionalmente, os valores dos coeficientes de determinação e RMSEC foram significativamente melhores após utilização de um algoritmo de seleção de variáveis, a amostragem ponderada adaptativa acumulada (CARS). Concluíram que, após as análises de classificação e quantificação para distinguir o óleo de palma puro e adulterado, o modo de transmitância produz um melhor modelo de predição em comparação com o modo de transflectância.

Marques et al. (2016) avaliaram o potencial de espectrômetro portátil (MicroNIR) para análise de controle de qualidade rápida e não destrutiva de manga do tipo Tommy Atkins. Os autores fizeram uso de modelos de calibração usando PLS para determinar sólidos solúveis (SS), matéria seca (DM), acidez titulável (TA) e firmeza da polpa (PF). Os coeficientes de determinação e os valores de RMSEP foram respectivamente: 0,92 e 0,55 °Brix para SS, 0,67 e 0,51% para DM, 0,50 e 0,7% de ácido cítrico para TA, 0,72 e 12,2 N para PF. Os resultados mostraram que os modelos construídos permitiram monitorar as alterações físico-químicas em cada fruta durante o amadurecimento e concluíram que há viabilidade por usar o espectrômetro NIR portátil para determinar parâmetros de qualidade neste alimento intacto.

Plans et al. (2013) analisaram o desempenho dos modelos de regressão desenvolvidos por NIR dispersivo, FT-NIR e MIR usando instrumentos de bancada e portáteis para determinação dos principais componentes do endosperma no feijão comum (proteína, amido e amilose). Os espectros NIR e os métodos de referência de 54 genótipos diferentes cultivados em diferentes locais na Catalunha e Astúrias (Espanha) foram correlacionados e o desempenho dos modelos PLS construídos foram testados usando o valor do desvio padrão relativo (RPD). Como resultado, os autores observaram que o sistema de bancada FT-NIR obteve os melhores valores de RPD de 3,7; 3,2 e 2,8 para os níveis de proteína, amido e amilose, respectivamente, já os sistemas NIR e MIR portáteis apresentaram boa previsibilidade com valores RPD de 3,5; 2,9 e 2,6 para os níveis de proteína, amido e amilose, respectivamente. Concluíram que os instrumentos portáteis podem fornecer aos bancos de criadores de plantas e germoplasma um método eficiente para a quantificação de parâmetros de qualidade simples, rápidos e de alto rendimento em feijão comum, além de oferecer versatilidade e robustez, reduzindo o tamanho e o peso dos sistemas de espectroscopia sem comprometer o desempenho e a reprodutibilidade.

Sánchez; Haba; Pérez-Marín (2013) investigaram o desempenho do instrumento NIR portátil em conjunto com as técnicas quimiométricas para determinação de parâmetros de qualidade em tangerinas intactas. Para predição, parâmetros de qualidade externo, como peso, tamanho (diâmetros equatoriais e axiais) e cor (L^* , a^* , b^* , C^* , H^* , Índice de cores), parâmetros físicos internos (firmeza, força máxima de penetração, espessura do pericarpo, peso do suco, conteúdo de suco) e propriedades químicas (teor de sólidos solúveis, pH, acidez titulável, índice de maturidade) durante o período de colheita foram analisados, como meio de estabelecer a data de colheita mais adequada. Os autores observam que os modelos de regressão PLS construídos renderam resultados promissores para medições de qualidade dos parâmetros externos relacionados com a cor (a^* , C^* e Índice de cores) e para todos os parâmetros químicos estudados. Concluíram que esses resultados confirmam que as mudanças nos parâmetros de qualidade de

tangerinas intactas durante o amadurecimento na árvore podem ser medidos de forma não invasiva usando os instrumentos NIR portáteis, tornando-se um passo importante para a colheita seletiva de frutas cítricas.

Panchuk et al. (2017) avaliaram dois estudos de casos envolvendo os métodos de transferência de calibração utilizando DS. O primeiro estudo foi para determinação de cobre, níquel e cobalto em misturas aquosas complexas usando modelos de regressão PLS construídos a partir das análises de fluorescência de raios-X de energia dispersiva e dos espectros UV-Vis. No segundo estudo, os modelos PLS foram usados para quantificação de açúcar entre equipamentos NIR. Os autores analisaram também o número de amostras de transferência e observaram que em ambos os casos, um pequeno número de amostras foram necessários. Concluíram que a abordagem sugerida foi testada com dados simulados e reais e o que mostrou um bom desempenho.

Soares (2016) propôs um novo método de transferência de calibração utilizando um procedimento univariado combinado com a regressão robusta. Esse novo método foi empregado em dois estudos de caso, utilizando a espectrometria NIR correlacionada aos teores de água e óleo em amostras de milho e os parâmetros de massa específica, RON (Pesquisa Número de Octano, do inglês *Research Octane Number*) e teor de naftênicos em gasolina. O autor comparou os resultados adquiridos com os do método PDS e observou que os resultados pelo método proposto foram superiores.

Salguero-Chaparro et al. (2013) avaliaram três algoritmos de padronização, Correção de Inclinação/Bias (SBC), PDS e Transferência por Projeção Ortogonal (TOP) para transferir as matrizes dos dados da qualidade de azeitonas entre um monocromador NIRS off-line e um espectrômetro portátil. Os resultados obtidos mostraram que o uso de TOP produziu os melhores valores dos Erros Padrão de Predição (SEP) para os parâmetros de teores de gordura (1,97%) e acidez livre (2,52%), enquanto o PDS para o teor de umidade (2,24%). Os resultados sugeriram os modelos de calibração foram eficientes para avaliação de qualidade em azeitonas intactas, com base matrizes de espectros transferidos entre os espectrômetros NIR.

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Amostras

Os experimentos foram realizados utilizando 71 amostras de farinhas de 21 diferentes tipos: amaranto ($n = 2$), arroz ($n = 6$), aveia ($n = 2$), banana verde ($n = 3$), berinjela ($n = 1$), beterraba ($n = 1$), centeio ($n = 1$), chia ($n = 1$), feijão branco ($n = 1$), gergelim ($n = 6$), girassol ($n = 1$), grão de bico ($n = 1$), linhaça ($n = 9$), linhaça dourada ($n = 11$), maçã ($n = 1$), mandioca ($n = 11$), maracujá ($n = 6$), milho ($n = 2$), quinoa ($n = 1$), soja ($n = 3$) e “Seca Barriga” ($n = 1$).

As amostras foram peneiradas com uma malha de tamanho de partículas de 0,841 mm (20 mesh) antes de realizar as análises. Todas as amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais na cidade de João Pessoa, PB, Brasil.

3.4.2 Análises físico-químicas

O teor de proteína bruta foi determinado usando o método Kjeldahl (AOAC, 1995). Para a etapa de decomposição, 0,1 g de cada amostra e 0,75 g da mistura de catalisador (Na_2SO_4 e $\text{CuSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) foram pesados, e 3 mL de H_2SO_4 concentrado foi adicionado a cada amostra. A digestão foi realizada em um bloco de aquecimento (007 MP, Tecnal, Brasil) e o programa de aquecimento consistiu em aquecer até 400 °C. Com esse processo, as amostras digeridas foram esfriadas até a temperatura ambiente, e 30 mL de água ultrapura foi adicionado a cada uma das amostras. Em seguida, os recipientes contendo as amostras foram acoplados no instrumento e realizou-se a etapa de destilação com 25 mL de NaOH (40% m v^{-1}). As amostras destiladas foram coletadas em um frasco contendo 10 mL de H_3BO_3 (1% m v^{-1}), 6 mL de vermelho de metila (0,1% m v^{-1}) e 15 mL de verde de bromocresol (0,1% m v^{-1}). Em seguida, as amostras foram tituladas com H_2SO_4 0,025 mol L^{-1} . Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrogênio total (**equação 3.15**) e multiplicados por um fator de correção 6,25 (alimentos em geral) para expressar a quantidade de proteína bruta contida na amostra de farinha (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

$$\frac{(V_a - V_b) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100}{P_1} = \text{NT} \quad \text{eq. (3.15)}$$

Em que:

NT = teor de nitrogênio total na amostra (%);

Va = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (ml);

Vb = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (ml);

F = fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹;

P1 = massa da amostra (g).

O teor de fibras foi determinado usando o método de detergente ácido da técnica *Filter Bag Ankom*[®]. Para isso, aproximadamente 0,5 g de cada amostra foi medida e embalada em sacos selados TNT (material à base de polipropileno). Os sacos contendo as amostras foram arrumados em bandejas e colocadas em um analisador de fibra. Logo após, foram aquecidos durante 60 minutos numa solução detergente ácida e encharcados três vezes em água destilada em ebulição durante 10 minutos cada. Os sacos foram enxaguados com acetona e colocados na estufa a 105 °C por 4 h. Depois de esfriar por 2 h no dessecador, os sacos foram pesados em balança analítica (ANKOM, 2017). A concentração de fibras foi calculada conforme a **equação 3.12**.

$$\text{FDA (\%)} = \frac{((C - B) \times 100)}{A} \quad \text{eq. (3.12)}$$

Em que:

A = massa da amostra (g);

B = massa do saquinho vazio (g);

C = massa total (g).

As determinações de proteína bruta e fibras foram realizadas na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos- SP.

3.4.3 Instrumentação e aquisição dos espectros

O espectrofotômetro Spectrum 400 FT-IR / FT-NIR (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), escolhido como equipamento primário, equipado com acessório de reflectância difusa (NIRA) foi utilizado para obtenção dos espectros NIR na faixa de 10.000-4.000 cm⁻¹. Todos os espectros foram registrados com uma média de 32 varreduras e resolução espectral de 2 cm⁻¹.

O instrumento dito como secundário utilizado neste trabalho foi um espectrômetro portátil MicroNIR 1700 (JDSU Corporation, Milpitas, CA, EUA) equipado com um elemento de filtro de variável linear (LVF) e uma matriz de detectores InGaAs de 128 pixels (InkAAs de 128 pixels). A faixa operacional do MicroNIR é de 11.013,22 a 6.078,91 cm^{-1} com resolução espectral $<1,25\%$ do comprimento de onda central (1% típico).

Para ambos os instrumentos, os espectros de fundo foram obtidos usando o Spectralon® padrão e a temperatura ambiente foi controlada em 23 ± 1 °C ao longo do procedimento de aquisição espectral. Esses instrumentos estão localizados no Laboratório de Combustíveis (LAC) da Universidade Federal do Pernambuco em Recife- PE.

3.4.4 Processamento quimiométrico e *softwares*

A matriz do instrumento de bancada possuía inicialmente 3.001 variáveis com faixa de 10.000-4.000 cm^{-1} , mas uma seleção manual dessa faixa foi realizada a fim de corresponder à faixa do instrumento portátil que apresentava os espectros na faixa de 9.990,98-6.078,91 cm^{-1} , perfazendo um total de 105 variáveis. Assim, a matriz do NIR de bancada resultou na faixa de 9.992,0-6.078,0 cm^{-1} e um total de 1.958 variáveis. Com o objetivo de deixá-las com mesmo número de variáveis, foi utilizado o algoritmo *boxcar*, desenvolvido em laboratório.

Foram avaliadas diferentes estratégias de pré-processamento: SNV, MSC, suavização e a primeira derivada de Savitzky-Golay, com polinômio de segunda ordem (7, 13, 15 e 21 pontos de janela).

O conjunto de amostras foi dividido em subconjuntos de calibração (proteína bruta: 40; fibra: 37) e predição (proteína bruta: 20; fibra: 20) aplicando o algoritmo SPXY (partição do conjunto de amostras com base nas distâncias da junção x-y) (GALVÃO et al., 2005).

As amostras de calibração foram utilizadas nos procedimentos de modelagem incluindo seleção de variáveis usando o SPA para MLR (GALVÃO et al., 2007) e determinação de fatores (variáveis latentes) usando o PLS_{espectro completo} e o modelo PLS/JK. As amostras de predição foram empregadas na avaliação final para a comparação dos modelos obtidos. As performances dos modelos de calibração foram avaliadas de acordo com os valores de RMSEP. A detecção e eliminação das amostras anômalas (*outliers*) foram realizadas com os gráficos dos escores e resíduos *versus leverage*.

O algoritmo Kennard-Stone (KS) (KENNARD; STONE, 1969) foi usado para selecionar subconjuntos de amostras de transferência do conjunto de calibração medidos nos

instrumentos utilizados. Diferentes números de amostras de transferência (8, 10, 12, 16 e 20) foram investigados.

Para cada modelo de calibração desenvolvido, foi realizado um teste F, com um nível de confiança de 95%, para avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores do RMSEP.

Os valores de F foram calculados a partir da razão entre os quadrados dos maiores e menores valores de RMSEP (BHANDARE et al., 1993; KUZMANOVSKI; ALEKSOVSKA, 2003; SKOOG et al., 2013) como mostrado na **Equação 3.13** a seguir:

$$F(n1, n2) = \frac{RMSEP1^2}{RMSEP2^2} \quad \text{eq. (3.13)}$$

Em que:

$n1$ e $n2$ são os números de amostras de predição;

RMSEP1 e RMSEP2 são as raízes dos erros quadrados médios superiores e inferiores, respectivamente.

Essa razão foi comparada com o valor do F crítico (0,95, n, n) para $n = 20$. Portanto, $F(0,95, n, n) = F(0,95, 20, 20) = 2,1242$.

Adicionalmente, os modelos também foram avaliados em relação aos Erros Relativos da Predição (REP), que foram calculados de acordo com Olivieri (2015). Uma modelagem satisfatória é quando o valor de REP apresenta $\leq 9\%$, sendo este aceitável ou próximo ao ideal (5%).

Os procedimentos de pré-processamento de dados espectrais, PLS e PLS/JK, foram realizados utilizando o Unscrambler® X.1 (CAMO S.A., Noruega). Os algoritmos SPXY, KS e MLR/SPA foram codificados em Matlab® versão 6.5 (Mathworks, EUA), usando as interfaces gráficas SPA-GUI disponíveis publicamente em <http://www.ele.ita.br/~kawakami/spa/>.

3.5 Resultados e discussão

3.5.1 Análises físico-químicas

Os teores de proteína bruta e fibras nas farinhas funcionais são apresentados na **Tabela**

3.1.

Tabela 3.1 - Teor de proteína bruta e fibras (%) em amostras de farinhas (média $\pm$ S.D., n= 2).

Amostras de Farinhas	Proteína bruta (média $\pm$ SD)	Faixa de concentração *	Fibras (média $\pm$ SD)	Faixa de concentração *
Amaranto	14,4 $\pm$ 1,6	13,3 – 15,6	6,7 $\pm$ 0,2	6,5 – 6,8
Arroz	7,0 $\pm$ 0,2	6,8 – 7,4	2,3 $\pm$ 1,5	1,3 – 5,3
Aveia	13,4 $\pm$ 0,5	13,0 – 13,7	3,2 $\pm$ 0,2	3,1 – 3,3
Banana verde	3,4 $\pm$ 2,1	2,1 – 5,8	7,9 $\pm$ 1,0	7,0 – 9,0
Berinjela	2,5 $\pm$ 0,2	-	5,2 $\pm$ 0,3	-
Beterraba	11,4 $\pm$ 0,04	-	14,1 $\pm$ 0,7	-
Centeio	13,6 $\pm$ 0,05	-	3,9 $\pm$ 0,2	-
Chia	21,2 $\pm$ 0,03	-	31,1 $\pm$ 0,6	-
Feijão branco	12,5 $\pm$ 0,01	-	6,3 $\pm$ 0,2	-
Gergelim	19,4 $\pm$ 5,6	10,8 – 26,4	26,1 $\pm$ 6,7	19,3 – 35,8
Girassol	7,1 $\pm$ 0,01	-	21,0 $\pm$ 1,0	-
Grão de bico	11,3 $\pm$ 0,1	-	3,0 $\pm$ 0,1	-
Linhaça	18,6 $\pm$ 6,6	2,1 – 25,5	37,6 $\pm$ 7,6	25,3 – 44,3
Linhaça dourada	22,3 $\pm$ 3,5	18,5 – 28,8	36,1 $\pm$ 7,1	24,8 – 43,4
Maça	7,5 $\pm$ 0,01	-	7,9 $\pm$ 1,9	-
Mandioca	1,46 $\pm$ 0,8	0,7 – 3,6	4,0 $\pm$ 2,0	1,1 – 8,4
Maracujá	7,3 $\pm$ 1,2	5,1 – 8,7	31,9 $\pm$ 6,7	21,8 – 37,3
Milho	7,2 $\pm$ 1,5	6,0 – 8,5	11,4 $\pm$ 2,1	9,9 – 12,9
Quinoa	13,6 $\pm$ 0,3	-	6,0 $\pm$ 0,6	-
Soja	35,8 $\pm$ 13	23,6 – 49,1	13,0 $\pm$ 0,7	12,5 – 13,9
“Seca Barriga”	11,8 $\pm$ 0,1	-	21,8 $\pm$ 0,3	-

*Faixa de concentração refere-se ao grupo de farinha com mais de uma amostra.

Como pode ser observado, o teor de proteína bruta nas amostras variou de 1,46 a 35,8%. A farinha de soja apresentou o maior teor de proteína (35,8%), seguido pela farinha de chia (21,2%), linhaça de dourada (22,3%), linhaça (18,6%) e gergelim (19,4%), enquanto que nas farinhas de banana verde (3,40%), berinjela (2,50%) e mandioca (1,46%), baixos teores de proteína bruta são encontrados.

A legislação brasileira regulamenta o teor de proteína na farinha de trigo que não deve apresentar valor inferior a 7% na matéria seca (BRASIL, 1996). Além disso, um mínimo de 1,5

% de proteína é necessário em farinhas de mandioca (DIAS; LEONEL, 2006). Como não há legislação específica para farinhas funcionais, as amostras foram avaliadas com base na legislação para farinha de mandioca e verificou-se que todas as amostras atendem ao mínimo recomendado, com exceção de algumas amostras de mandioca que o teor de proteína bruta foi abaixo do valor mínimo recomendado.

O teor de fibras variou de 2,30 a 37,6%, sendo as farinhas de chia, a linhaça dourada, linhaça, casca de maracujá, gergelim, semente de girassol e “Seca Barriga” as que apresentaram os maiores teores em torno de 29,4%. Em comparação a estas farinhas, as farinhas de arroz e aveia apresentaram baixas concentrações de fibras. Uma possível explicação da farinha de maracujá ter alta concentração de fibras é devido a muita pectina na casca.

É importante ressaltar que, com exceção da farinha de casca de maracujá, as farinhas que apresentam o maior conteúdo de fibra são oriundas de sementes. Para sementes, a farinha deverá ter um teor de extrato etéreo baixo, ou seja, sem óleo deslipídada.

3.5.2 Espectros NIR

Nas **Figura 3.1a e 3.1b** estão apresentados os espectros sem pré-processamento na região do NIR registrados na faixa de 9.990,98 a 6.078,91 cm^{-1} para o espectrômetro portátil e 10.000 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} para o espectrômetro de bancada, respectivamente.

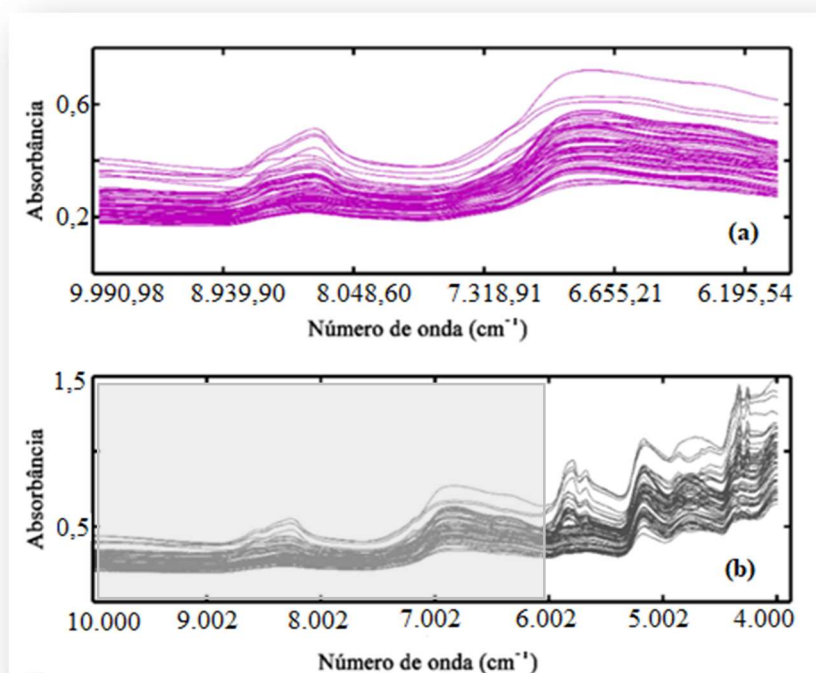


Figura 3.1 - Espectros NIR das amostras de farinhas: (a) NIR portátil e (b) NIR de bancada.

Como pode ser observado, embora os espectros obtidos pelos instrumentos apresentem diferenças de intensidade e mudança de comprimento de onda, ambos os espectros mostram as bandas características de proteínas na faixa entre $6.600\text{--}6.900\text{ cm}^{-1}$; gorduras em 7.000 cm^{-1} e $8.200\text{--}8.900\text{ cm}^{-1}$ e umidade a 7.100 cm^{-1} (WORKMAN; WEYER, 2007; WORKMAN, 2006; XIAOBO et al., 2010). Para melhor visualização das similaridades dos perfis espectrais obtidos em ambos os equipamentos, foi destacada na **Figura 3.1b** a área correspondente.

A combinação e o primeiro sobretom de estiramento da ligação N-H aparecem em torno de 6.670 cm^{-1} . A absorção em 7.100 cm^{-1} é proveniente do 1º sobretom de estiramento da ligação O-H e à combinação das bandas vibracionais dos modos de estiramento e deformação angular de ligações O-H das moléculas de água, como também dos carboidratos. A absorção em torno de 6.711 cm^{-1} é o segundo sobretom O-H polimérico associado com fibras. Finalmente, em 6.200 cm^{-1} existe uma faixa frágil do alongamento da combinação ArCH, característica dos óleos (WORKMAN; WEYER, 2007; WORKMAN, 2006; XIAOBO et al., 2010).

Na **Figura 3.2**, é possível observar que em algumas regiões do espectro NIR, há diferenças entre as absorbâncias médias (destacadas em cinza) para os tipos de farinhas (cinza – farinhas de girassol, soja, chia, linhaça, linhaça dourada e gergelim, azul – demais farinhas).

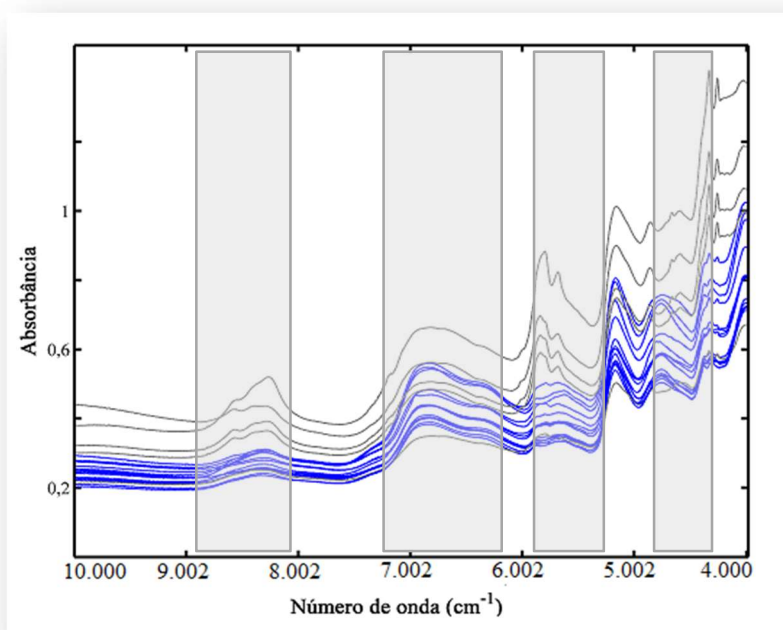


Figura 3.2 - Espectros NIR de bancada das médias das classes de farinhas funcionais.

Esta diferença entre as farinhas funcionais é associada às bandas características das gorduras (4.830 cm^{-1} e $8.200\text{--}8.900\text{ cm}^{-1}$) e proteínas ($4.854\text{--}4.878\text{ cm}^{-1}$ e $6.600\text{--}6.900\text{ cm}^{-1}$). Além destas regiões, outras bandas características de carboidratos são observadas, como amido e açúcares em 4.500 cm^{-1} e umidade 5.135 cm^{-1} , que não foram usadas na diferenciação entre as farinhas pois não entraram na faixa de trabalho (WORKMAN; WEYER, 2007; WORKMAN, 2006).

3.5.3 Detecção de amostras anômalas

Uma vez obtidos os dados espectrais, efetuou-se uma análise exploratória com a PCA, para um primeiro exame dos padrões de distribuição das amostras (**Figura 3.3**).

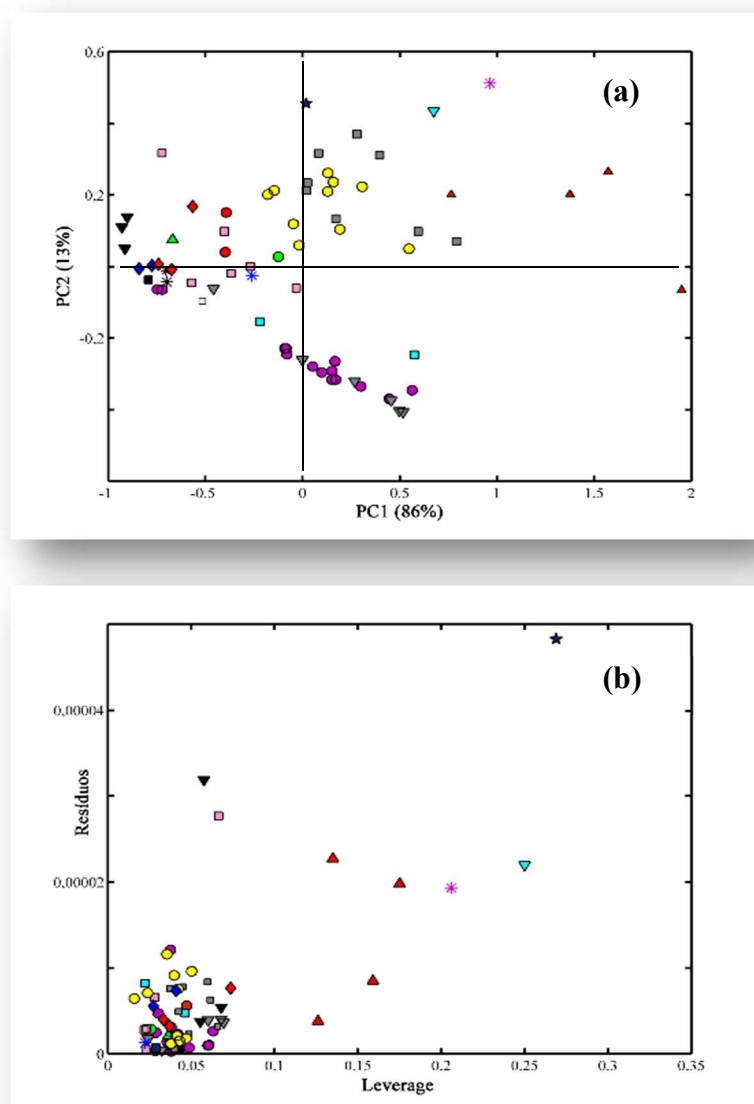


Figura 3.3 - Gráfico dos escores (PC2 x PC1) dos espectros do instrumento NIR portátil (a); *leverage* x resíduos dos espectros (b) da matriz das amostras de farinhas: amaranto (), arroz (), aveia (), banana verde (), berinjela (), beterraba (), centeio (), chia (), feijão branco (), gergelim (), girassol (), grão de bico (), linhaça (), linhaça dourada (), maçã (), mandioca (), maracujá (), milho (), quinoa (), soja () e “Seca Barriga” ().

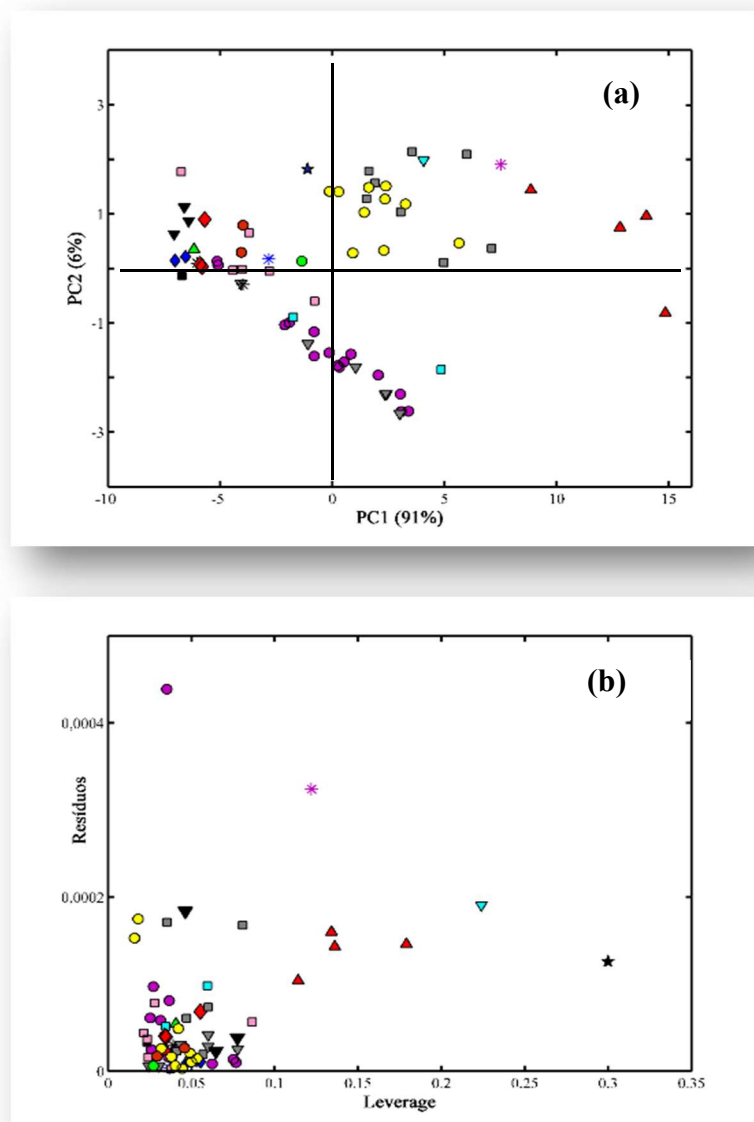


Figura 3.4 - Gráfico dos escores (PC2 x PC1) dos espectros do instrumento NIR de bancada (a); *leverage* x resíduos dos espectros (b) da matriz das amostras de farinhas: amaranto (), arroz (), aveia (), banana verde (), berinjela (), beterraba (), centeio (), chia (), feijão branco (), gergelim (), girassol (), grão de bico (), linhaça (), linhaça dourada (), maçã (), mandioca (), maracujá (), milho (), quinoa (), soja () e “Seca Barriga” ().

Nas **Figuras 3.3a** e **3.4a** são mostrados os gráficos dos escores da PCA realizada a partir dos espectros do NIR portátil e bancada, respectivamente. É possível observar, ao longo da PC2, uma discriminação das farinhas de arroz, amaranto e mandioca em relação às farinhas de

linhaça, linhaça dourada, chia, beterraba, girassol e gergelim. Já ao longo da PC1, as farinhas de soja, milho, berinjela, maçã, banana verde, aveia, quinoa, centeio, grão de bico, maracujá destacam-se das demais que foram discriminadas ao longo da PC2. Nos espectros NIR de bancada (**Figura 3.4a**), a PC1 descreve 91% da variação dos dados e a PC2 descreve 6%. Por outro lado, para os espectros NIR portátil (**Figura 3.3a**), a PC1 descreve 86% e PC2 13 %. Por essa razão, é possível visualizar que os escores das amostras estão mais próximos para o NIR de bancada. Além disso, tanto nos escores para o NIR de bancada quanto para o NIR portátil, a farinha “Seca Barriga”, que é uma mistura de farinhas, manteve-se no centro do gráfico.

Nas **Figuras 3.3b** e **3.4b** verifica-se a existência de amostras anômalas. É possível observar que no gráfico de influência (resíduo x *leverage*) para os espectros das amostras a partir do NIR de bancada (**Figuras 3.4b**), as farinhas de girassol e beterraba apresentaram altos valores de resíduos enquanto as farinhas de chia e uma das farinhas de mandioca apresentaram alto valor de *leverage*. Na **Figura 3.3b** observa-se que além das farinhas de chia e girassol, quatro das farinhas de gergelim, apresentam alto valor de *leverage*, e uma amostra de cada das farinhas de maracujá e soja apresentaram alto valor de resíduo. Assim, essas amostras que se destacaram das demais, foram consideradas anômalas e descartadas em ambas as matrizes, perfazendo um total de 60 amostras.

3.5.4 Pré-processamento dos dados

A matriz do instrumento de bancada possuía inicialmente 3.001 variáveis (dito na seção 3.4.4), mas uma seleção manual dessa faixa foi realizada a fim de corresponder à faixa do instrumento portátil que apresentava os espectros na faixa de 9.990,98-6.078,91 cm^{-1} , perfazendo um total de 105 variáveis. Assim, o estudo dos pré-processamentos para essa matriz NIR de bancada foi utilizando a faixa de 9.992,0-6.078,0 cm^{-1} (1.958 variáveis).

Diferentes pré-processamentos foram realizados, como mostrado na **Tabela 3.2** e **3.3** para os espectros obtidos tanto com o NIR portátil como com o NIR de bancada, respectivamente. Nas tabelas estão apresentados os valores de RMSEP e R^2 dos modelos PLS_{espectro completo}, PLS/JK e MLR/SPA.

Tabela 3.2 - Valores de R^2 e $RMSEP^S_S$ (nº de PC's ou variáveis selecionadas) das amostras de farinhas a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR portátil.

Proteína bruta (0,69 – 28,8 % m m⁻¹)*			
Pré-processamentos	Modelos	R²	RMSEP
MSC	PLS _{espectro completo}	0,96	1,62 (8)
	PLS/JK	0,96	1,57 (7)
	MLR/SPA	0,95	1,77 (8)
SNV	PLS _{espectro completo}	0,95	1,76 (9)
	PLS/JK	0,96	1,56 (5)
	MLR/SPA	0,95	1,85 (7)
SNV + S.G 13 pontos	PLS _{espectro completo}	0,81	2,91 (8)
	PLS/JK	0,92	1,89 (10)
	MLR/SPA	0,90	2,16 (5)
Fibras (1,10 – 44,3 % m m⁻¹)*			
MSC	PLS _{espectro completo}	0,92	3,22 (6)
	PLS/JK	0,90	3,73 (5)
	MLR/SPA	0,94	2,77 (7)
SNV	PLS _{espectro completo}	0,93	3,13 (5)
	PLS/JK	0,88	4,05 (3)
	MLR/SPA	0,95	2,64 (7)
SNV + S.G 13 pontos	PLS _{espectro completo}	0,92	3,27 (5)
	PLS/JK	0,81	5,05 (3)
	MLR/SPA	0,93	3,06 (9)

* Faixa de concentração das amostras.

De acordo com o teste F realizado com os valores de RMSEP da tabela 3.2, foi possível observar que não há diferença estatisticamente significativa, com 95% de confiança, entre todos os modelos desenvolvidos a partir das matrizes NIR portátil, tanto para o pré-processamento SNV e MSC. Além disso, os modelos construídos a partir desses pré-processamentos (SNV e MSC) apresentaram valores satisfatórios de R^2 (próximo a 1) e RMSEP.

Notação:

RMSEP^P_P – RMSEP dos espectros das amostras de predição obtidos no equipamento primário previstos no modelo primário;

RMSEP^S_S – RMSEP dos espectros das amostras de predição obtidos no equipamento secundário previstos no modelo secundário;

RMSEP^S_P – RMSEP dos espectros das amostras de predição obtidos no equipamento secundário previstos no modelo primário antes da padronização;

RMSEP^S_{P-DS} – RMSEP dos espectros das amostras de predição padronizados obtidos no equipamento secundário preditos no modelo primário;

RMSEP^S_{P-RS} – RMSEP dos espectros das amostras de predição obtidos no equipamento secundário preditos no modelo primário padronizado;

RMSEP^P_{P-RS} – RMSEP dos espectros das amostras de predição obtidos no equipamento primário preditos no modelo primário padronizado.

Tabela 3.3 - Valores R^2 e RMSEP^P_P (nº de PC's ou variáveis selecionadas) das amostras de farinhas a partir de diferentes pré-processamentos na matriz de dados NIR de bancada.

Proteína bruta (0,69 – 28,8 % m m⁻¹)*			
Pré-processamentos	Modelos	R²	RMSEP
MSC	PLS _{espectro completo}	0,896	2,48 (6)
	PLS/JK	0,874	3,57 (2)
	MLR/SPA	0,930	2,03 (7)
SNV	PLS _{espectro completo}	0,963	1,47 (10)
	PLS/JK	0,967	1,41 (6)
	MLR/SPA	0,955	1,63 (9)
SNV + S,G 13 pontos	PLS _{espectro completo}	0,893	2,38 (5)
	PLS/JK	0,854	2,78 (3)
	MLR/SPA	0,852	2,81 (8)
Fibras (1,10 – 44,3 % m m⁻¹)*			
MSC	PLS _{espectro completo}	0,975	1,85 (7)
	PLS/JK	0,935	2,18 (6)
	MLR/SPA	0,940	2,11 (5)
SNV	PLS _{espectro completo}	0,880	2,97 (4)
	PLS/JK	0,951	2,61 (4)
	MLR/SPA	0,918	2,45 (5)
SNV + S.G 13 pontos	PLS _{espectro completo}	0,892	2,82 (5)
	PLS/JK	0,894	2,80 (4)
	MLR/SPA	0,917	3,39 (6)

* Faixa de concentração das amostras.

Na **Tabela 3.3** para a matriz contendo o parâmetro proteína bruta, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o pré-processamento SNV, enquanto para fibra o pré-processamento que melhor se adequou foi o MSC. Assim, ao observar os valores de RMSEP e R^2 , nas duas tabelas (**Tabela 3.2** e **3.3**), decidimos por utilizar o pré-processamento SNV para a matriz com parâmetro da proteína bruta e MSC para a matriz com o parâmetro de fibras. Adicionalmente, é importante mencionar que para as amostras de farinha de mandioca os modelos construídos não foram satisfatórios, já que apresentaram valores de RMSEP que

variaram entre 1,41 e 3,39 (seja proteína bruta ou fibra, **Tabelas 3.2 e 3.3**), o que mostra erros relativamente altos quando comparados a faixa de concentração determinada, neste estudo, para as farinhas de mandioca (0,7 – 8,4) apresentados na Tabela 3.1.

3.5.5 Transferência de calibração

Na **Figura 3.5**, é apresentado os espectros médios NIR das amostras de farinha obtidos utilizando os instrumentos primário e secundário antes e depois da padronização a partir dos métodos de padronização DS (**Figura 3.5a**) e RS (**Figura 3.5b**).

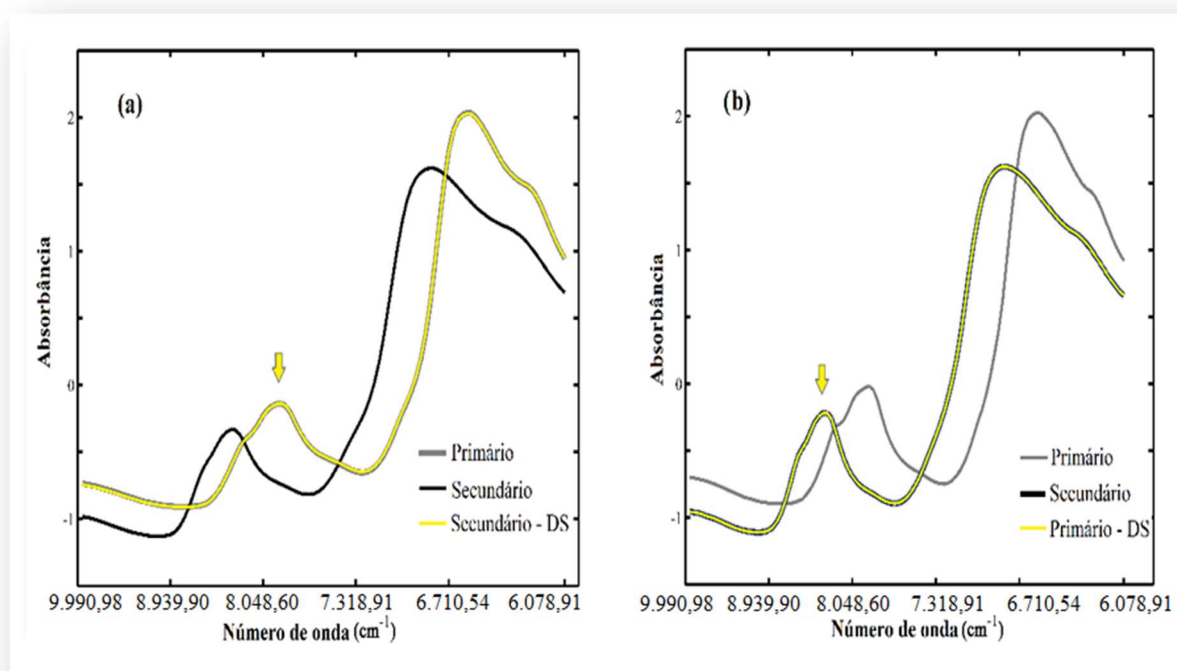


Figura 3.5 - Espectros médios NIR das amostras de farinha obtidos utilizando os instrumentos primários e secundários antes e depois da padronização pelos métodos DS (a) e RS (b), para 20 amostras de transferência.

É possível notar na **Figura 3.5a** que os espectros do conjunto de predição padronizados usando a técnica DS apresentam um padrão similar ao instrumento de bancada primário. Além disso, na **Figura 3.5b** pode-se observar que os resultados da padronização RS dão ao espectro de calibração transformado um perfil semelhante ao registrado no equipamento secundário. Isso demonstra que, tanto na padronização direta quanto reversa, a intensidade da banda e os problemas de deslocamento foram corrigidos.

É importante mencionar que os espectros do equipamento primário antes do procedimento de corte da faixa de trabalho pelo algoritmo *boxcar* não apresentaram um deslocamento da banda tão significativo em comparação aos espectros do equipamento secundário, mostrados na **Figura 3.5**. O procedimento DS pode ser aplicado sem que seja necessária uma redução na matriz de dados para igualar o número de variáveis em ambas as matrizes. Todavia, para o procedimento RS talvez seja, de fato, necessário devido as extrapolações que necessitariam serem realizadas. De qualquer forma, neste trabalho, o algoritmo *boxcar* foi realizado para redução das matrizes de dados em ambos procedimentos e foi eficiente na correção dos maiores desvios de bandas.

Nas **Figuras 3.6 e 3.7** estão apresentados os números de amostras de transferência em função dos valores de RMSEP utilizando os procedimentos DS e RS, para os parâmetros de proteína bruta e fibras, respectivamente.

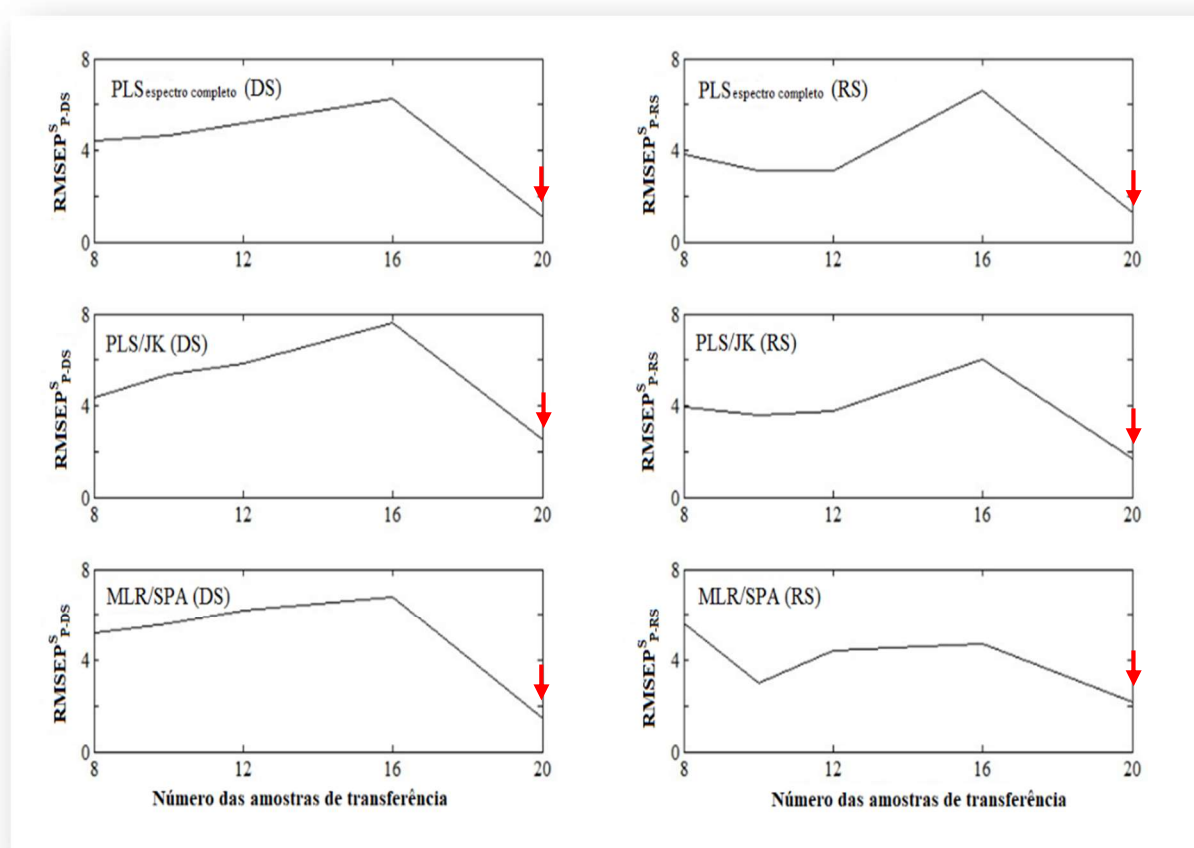


Figura 3.6 - RMSEP em função do número de amostras de transferência após procedimentos DS e RS, para o parâmetro da proteína bruta.

É possível observar na **Figura 3.6** uma diminuição nos valores de $RMSEP_{P-DS}$ e $RMSEP_{P-RS}$ quando o número de amostras de transferência aumenta, mais especificamente

quando 20 amostras de transferência são usadas com os métodos DS e RS. Um teste F, com 95% de confiança foi realizado entre os valores de RMSEP para os diferentes números de amostras de transferência. Os resultados apresentaram que há diferença significativa entre os valores de RMSEP obtido pela DS, indicando que 20 amostras de transferência são realmente necessárias. Entretanto, para os modelos construídos utilizando a RS, o teste F realizado com os valores de RMSEP entre os diferentes números de amostras de transferência analisados mostrou que apenas para o modelo MLR/SPA, com 10 amostras de transferência não havia diferença significativa do menor valor de RMSEP para 20 amostras. Já para os modelos PLS_{espectro completo} e PLS/JK, houve diferença significativa entre os valores de RMSEP. Assim, para o modelo MLR/SPA, o número de amostras de transferência pode ser reduzido de 20 para 10.

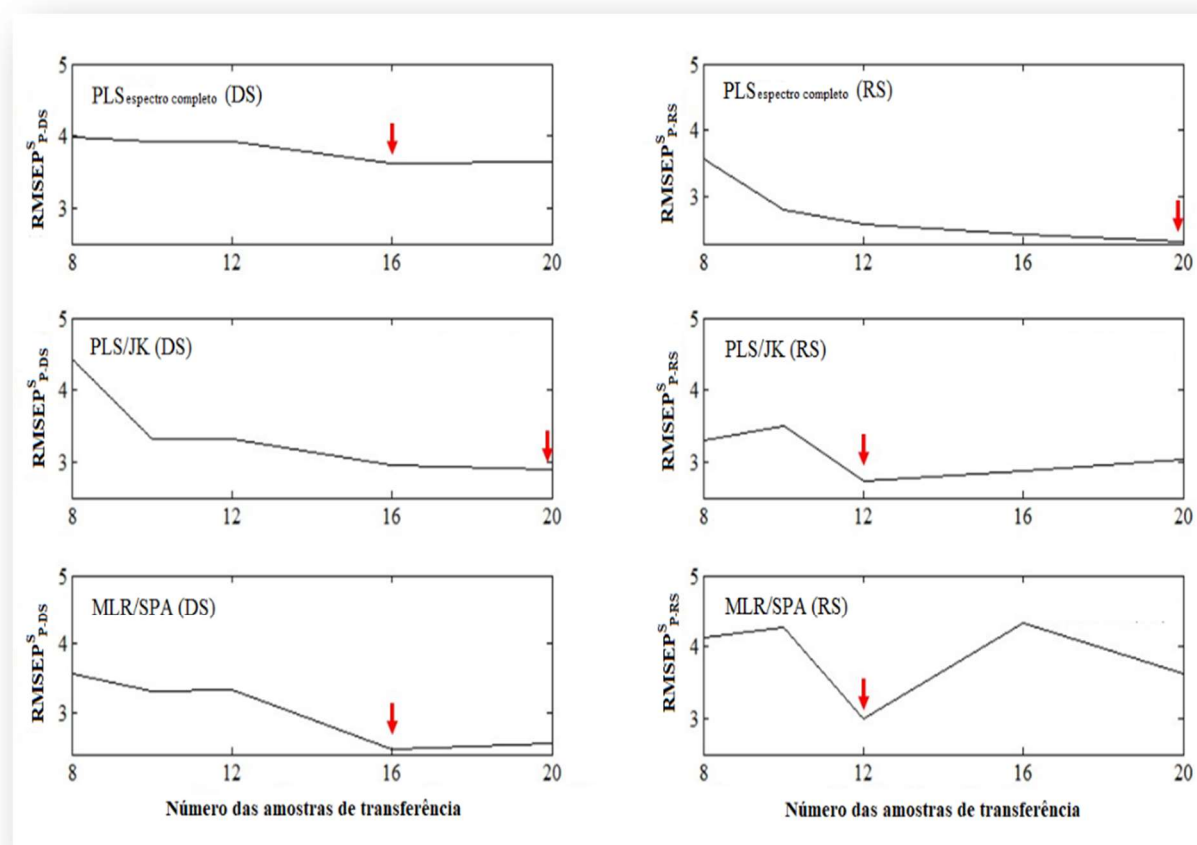


Figura 3.7 – RMSEP em função do número de amostras de transferência após procedimentos DS e RS, para o parâmetro fibra.

Na **Figura 3.7**, os valores de RMSEP variam para cada modelo, independentemente do número de amostras de transferência empregadas.

Os valores de $RMSEP_{P-DS/RS}^S$ tendem a diminuir com um número crescente de amostras de transferência. O modelo para a determinação de proteína bruta requereu um maior número

de amostras de transferência (20 amostras) nos três modelos analisados usando DS e RS. Para fibras (**Figura 3.7**), o número de amostras de transferência em alguns modelos, como PLS/JK-DS e PLS_{espectro completo}-RS também necessitaram de 20 amostras de transferência, enquanto que para os outros modelos um número menor de amostras de transferência foi satisfatório, variando entre 8 a 16 amostras. Adicionalmente, assim como para o parâmetro proteína, também foi investigado, a partir de um teste F com 95% de confiança, se havia diferença significativa entre o menor valor de RMSEP e os demais valores provenientes dos diferentes números de amostras de transferência para cada modelo. Assim, foi verificado que, para os modelos construídos a partir da DS, os modelos MLR/SPA e PLS_{espectro completo} não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes números de amostras, indicando que 8 amostras de transferência são satisfatórios. Enquanto que para o modelo PLS/JK, até 10 amostras não apresentaram diferenças significativas entre o menor valor de RMSEP (2,89). Em relação aos valores de RMSEP dos modelos após RS, os modelos MLR/SPA e PLS/JK não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes números de amostras de transferência, indicando também que com 8 amostras de transferência seria um valor viável. No entanto, para o modelo PLS_{espectro completo}, até 10 amostras de transferência não apresentou diferenças significativas.

Na **Figura 3.8**, é apresentado a variação percentual de cada propriedade coberto pelas amostras de transferência.

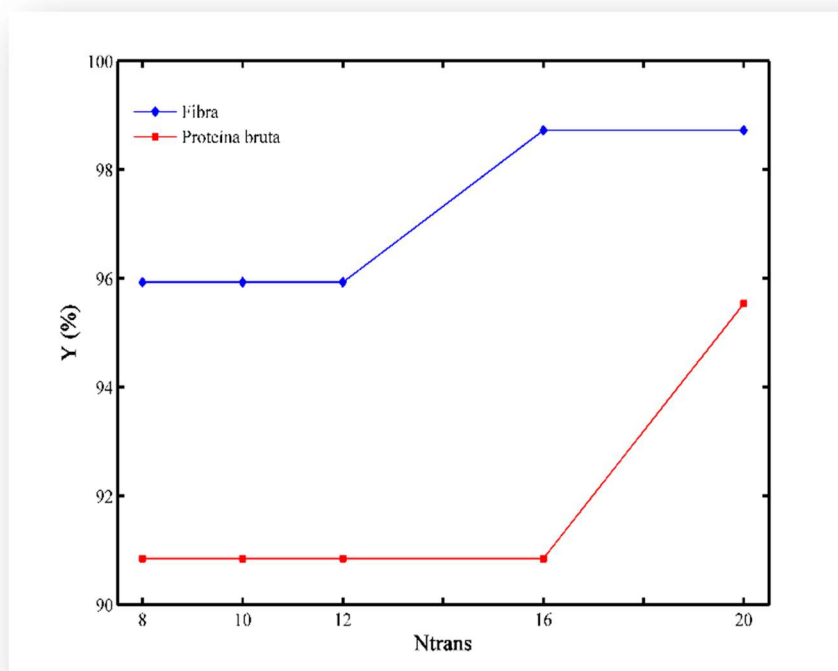


Figura 3.8 - Variação (%) dos valores de Y no conjunto de calibração das amostras de transferência, Ntrans, para cada propriedade.

A variação % de Y é a razão entre o intervalo das propriedades Y para as amostras de transferência (Ftrans.amos) e o intervalo das propriedades Y para as amostras de calibração (Fcal.amos), multiplicado por 100. O intervalo é a subtração do valor mais alto pelo menor valor.

Uma maior variação percentual do parâmetro de proteína bruta, em torno de 95%, foi alcançada com 20 amostras de transferência, enquanto que com menos amostras (8, 10, 12 e 16), cerca de 91% da variação foi atingida. No entanto, para fibras, 96% da variação percentual foi coberto com 8, 10 e 12 amostras de transferência e 99% da variação a partir de 16 amostras de transferência.

Os resultados obtidos pelo procedimento de transferência de calibração usando métodos DS e RS estão resumidos na **Tabela 3.4**. É importante ressaltar que os resultados obtidos ($RMSEP^S_S$ e $RMSEP^S_P$) para ambas as propriedades apresentam os mesmos valores em DS e RS, uma vez que correspondem aos mesmos subconjuntos em ambos os instrumentos.

Tabela 3.4 - Valores de RMSEP obtidos com os modelos $PLS_{\text{espectro completo}}$, PLS/JK e MLR/SPA antes e depois das técnicas DS e RS para determinação de proteína bruta e fibra. O número de fatores PLS e variáveis MLR são indicados em parênteses. A faixa de calibração para os dois parâmetros são encontrados nos colchetes.

PARÂMETROS	Proteína bruta [0,69–28,80 % m m ⁻¹]			Fibra [1,1 – 44,3 % m m ⁻¹]		
	$PLS_{\text{espectro completo}}$	PLS/JK	MLR/SPA	$PLS_{\text{espectro completo}}$	PLS/JK	MLR/SP A
$RMSEP^P_P$	1,35 (10)	1,83 (9)	1,57 (12)	3,36 (4)	3,13 (1)	2,31 (5)
$RMSEP^S_S$	1,29 (10)*	1,78 (6)	1,59 (12)	2,72 (5)	3,01 (4)	3,39 (7)
$RMSEP^S_P$	24,2 (10)	82,5 (9)	13,9 (12)	111 (4)	54,5 (1)	6,33 (5)
DS						
$RMSEP^S_{P-DS}$	1,10 (10) ^a	2,53 (9) ^a	1,45 (12) ^a	3,62 (4) ^b	2,89 (1) ^a	2,48 (5) ^b
RS						
$RMSEP^S_{P-RS}$	1,27 (10) ^a	1,69 (7) ^a	2,16 (12) ^a	2,34 (5) ^a	2,74 (1) ^c	3,00 (5) ^c

^a 20 amostras de transferência / ^b 16 amostras de transferência / ^c 12 amostras de transferência.

* Número entre parênteses: PC's e variáveis selecionadas (MLR/SPA).

Como pode ser visto na **Tabela 3.4**, os resultados obtidos para ambos os instrumentos indicam desempenhos satisfatórios em todos os modelos avaliados. No entanto, quando as amostras de predição medidas no instrumento secundário foram testadas em modelos desenvolvidos com o instrumento primário, os valores de RMSEP foram aumentados, e logo após os procedimentos de padronização, os valores de RMSEP reduziram substancialmente. Isso demonstra a necessidade de aplicação de estratégias de transferência de calibração. Quando os espectros das amostras de predição foram padronizados, os valores de RMSEP encontrados

se mostraram adequados para os três modelos de calibração. Para DS, os melhores resultados para proteína bruta e fibras foram alcançados pelo $PLS_{\text{espectro completo}}$ (REP de 3,9%) e MLR/SPA (REP de 5,7%), respectivamente. De fato, um teste F, a nível de 95% de confiança não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os valores de $RMSEP_{P-DS}^S$ obtidos pelos modelos $PLS_{\text{espectro completo}}$ e MLR/SPA. Quando estes resultados para a proteína bruta foram comparados com o modelo PLS/JK, os valores obtidos pelo $RMSEP_{P-DS}^S$ foram estatisticamente diferentes. Por outro lado, para a fibra, os valores de $RMSEP_{P-DS}^S$ entre os modelos foram estatisticamente similares, com o maior valor obtido pelo modelo $PLS_{\text{espectro completo}}$.

O $PLS_{\text{espectro completo}}$ promoveu o menor valor numérico de $RMSEP_{P-RS}^S$ na determinação de proteína bruta e fibra, com valor de REP equivalendo a 4,5% e 5,4%, respectivamente. O teste F com 95% de confiança, foi aplicado e mostrou que ambos os modelos ($PLS_{\text{espectro completo}}$ e PLS/JK) apresentaram resultados similares. Para o parâmetro fibra, o modelo $PLS_{\text{espectro completo}}$ apresentou o mais baixo valor de RMSEP utilizando a RS, embora não seja estatisticamente diferente dos demais modelos.

O teste F também foi aplicado para verificar diferenças entre os resultados DS e RS para cada parâmetro. Para isto, os menores valores de RMSEP dos parâmetros de proteína bruta e fibras foram analisados ($RMSEP_{P-RS}^S - 1,27 / RMSEP_{P-DS}^S - 1,10$ e $RMSEP_{P-DS}^S - 2,48 / RMSEP_{P-RS}^S - 2,34$), respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os modelos desenvolvidos com DS e RS. Portanto, ambas as estratégias de padronização podem ser utilizadas para a determinação da proteína bruta e fibra.

As **Figuras 3.9 e 3.10** mostram os gráficos dos valores preditos *versus* referência obtidos para os modelos aplicados ao subconjunto de predição para parâmetros de proteína bruta e fibras, respectivamente.

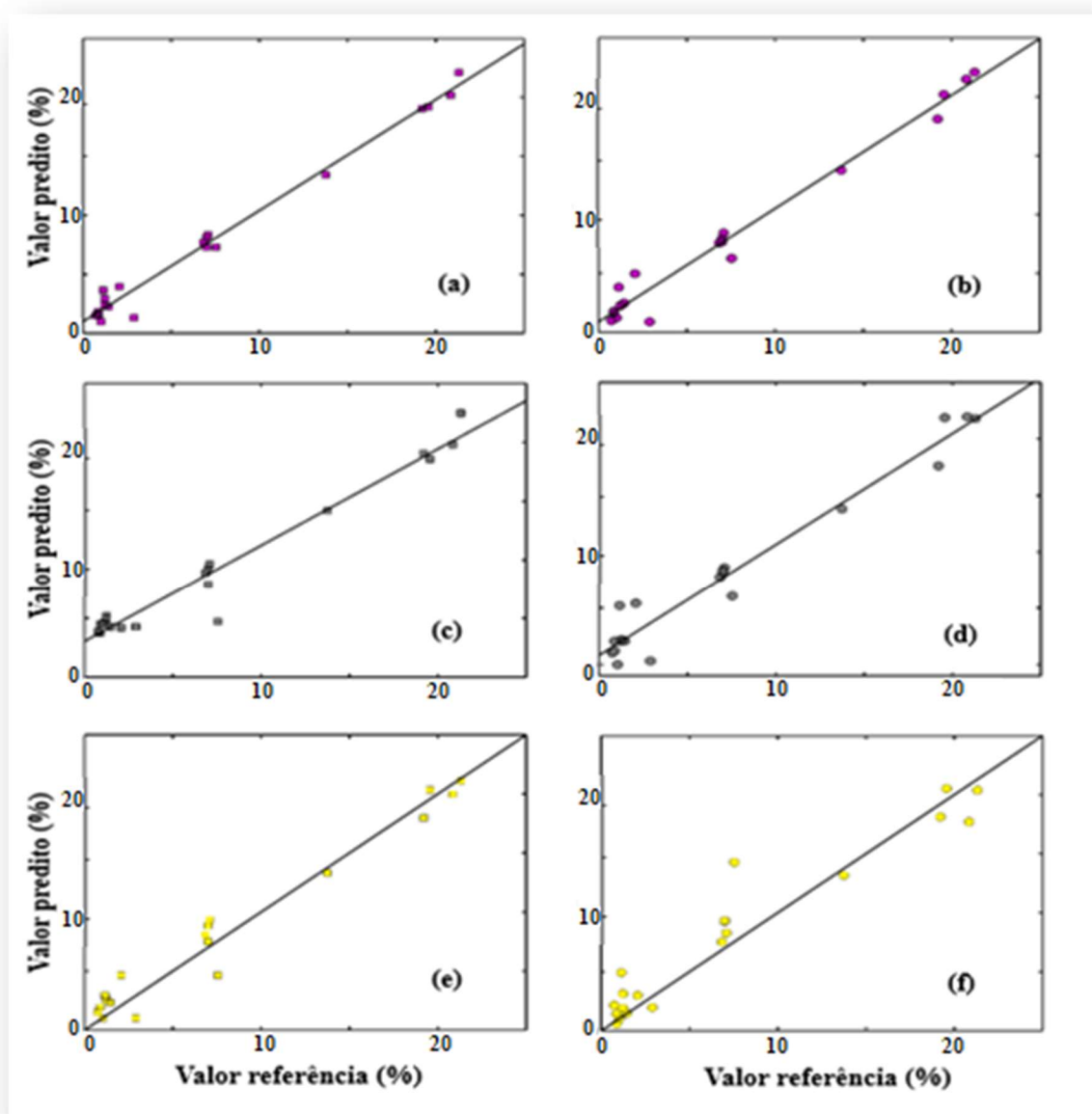


Figura 3.9 - Gráfico dos valores preditos $\times$ referência dos subconjuntos de predição dos modelos pelos métodos DS e RS, para o parâmetro proteína bruta. $PLS_{\text{espectro completo}} - DS$ (a), $PLS_{\text{espectro completo}} - RS$ (b), $PLS/JK - DS$ (c), $PLS/JK - RS$ (d), $MLR/SPA - DS$ (e) e $MLR/SPA - RS$ (f).

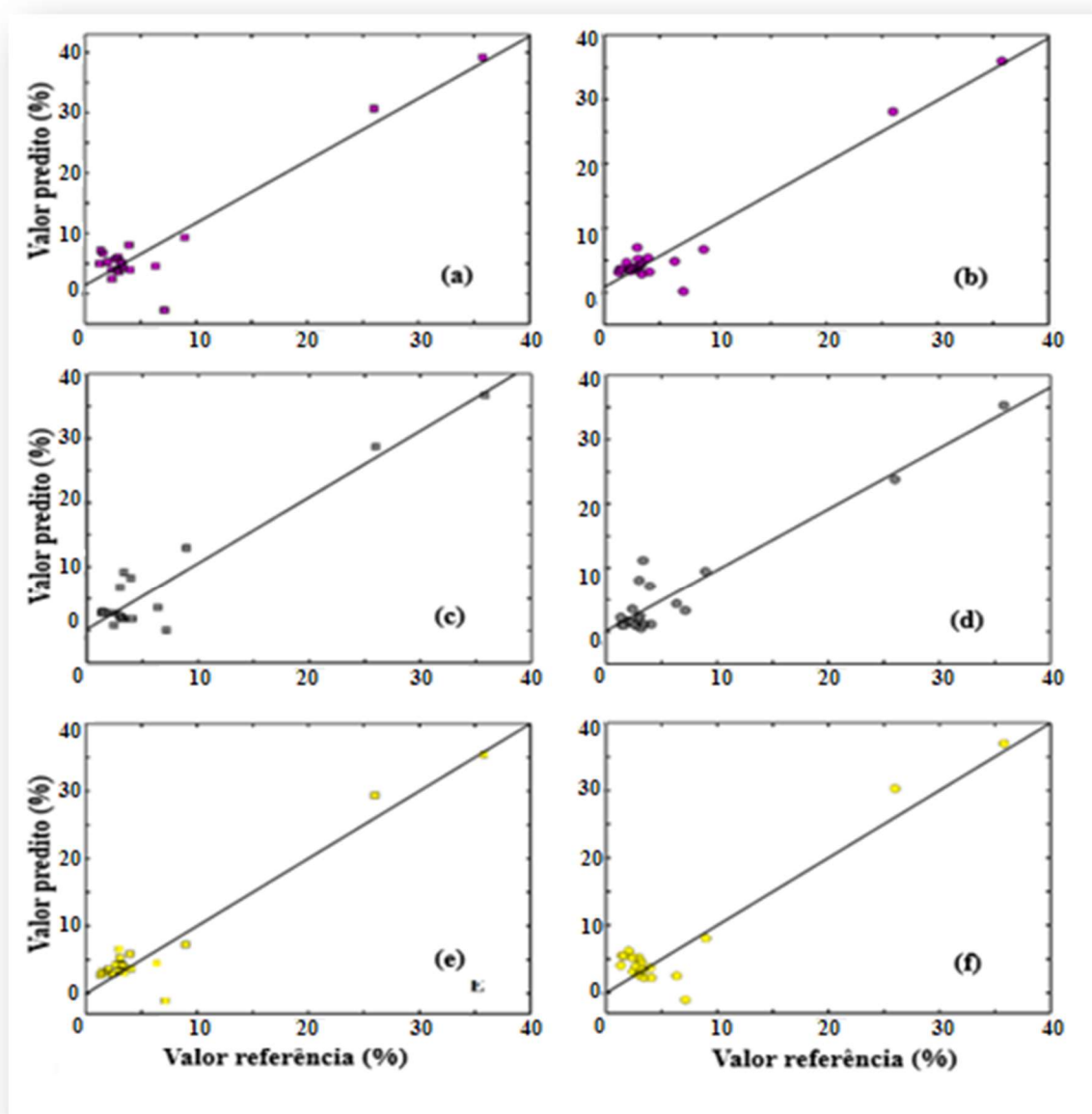


Figure 3.10 - Gráfico dos valores preditos $\times$ referência dos subconjuntos de predição do modelos pelos métodos DS e RS, para o parâmetro fibras. PLS_{espectro completo} – DS (a), PLS_{espectro completo} – RS (b), PLS/JK – DS (c), PLS/JK – RS (d), MLR/SPA – DS (e) e MLR/SPA – RS (f).

Os gráficos mostrados nas **Figura 3.9** e **Figura 3.10** corroboram com os resultados apresentados na **Tabelas 3.4**. Para o parâmetro da proteína bruta, quando o DS é empregado, os modelos PLS_{espectro completo} (**Fig. 3.9a**) e MLR/SPA (**Fig. 3.9e**) apresentam desempenho de predição satisfatório e mostra todas as amostras distribuídas ao longo da linha da bissetriz, indicando a ausência de erros sistemáticos nos dados. Quando RS é avaliado, os modelos PLS_{espectro completo} (**Fig. 3.9b**) e PLS/JK (**Fig. 3.9d**) apresentam predições com amostras bem distribuídas ao longo da bissetriz, quando comparadas às preditas pelos modelos MLR/SPA

(Fig. 3.9). Para o parâmetro de fibras (Fig. 3.10), o procedimento RS apresentou a melhor performance preditiva com o modelo PLS_{espectro completo} (Fig. 3.10b).

As variáveis selecionadas por SPA (Fig. 3.11), para o parâmetro de fibra em DS, estão localizadas em torno de 6711 cm^{-1} , o que pode ser atribuído à presença do segundo sobretom O-H polimérico associado às fibras ou resíduo de óleo vegetal nas oleaginosas. Enquanto que o RS, nenhuma variável foi selecionada nesta região, o que pode ter causado um aumento no valor RMSEP. Para o parâmetro da proteína em DS, as variáveis foram selecionadas na região entre 6600 e 6900 cm^{-1} , atribuídas à banda característica da proteína. Como resultado, um valor intermediário de RMSEP para o modelo MLR/SPA foi obtido. No RS, apenas uma variável foi selecionada nesta região, o que pode ter causado um aumento no valor de RMSEP (Figura 3.11).

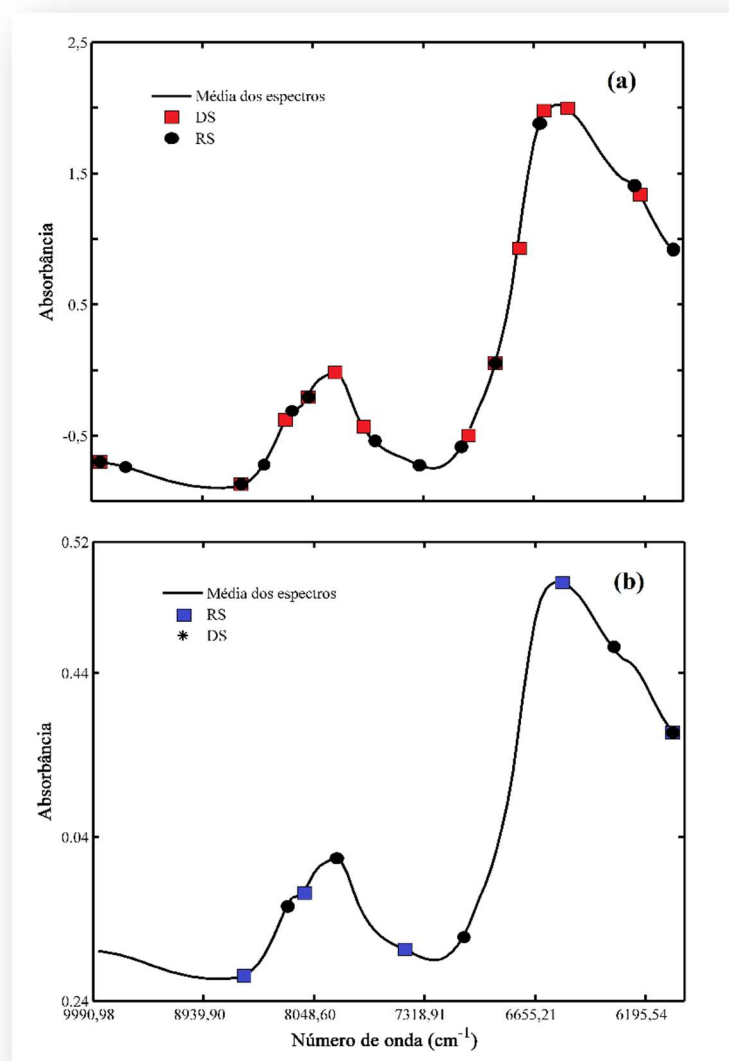


Figura 3.11 - Representação das variáveis selecionadas pelo algoritmo SPA para os parâmetros de proteína bruta (a) e fibra (b).

Um terceiro método de padronização, o PDS, também foi avaliado para a transferência dos modelos de calibração e os resultados estão apresentados na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5 - Valores de $RMSEP_{P-PDS}^S$ para os modelos analisados usando diferentes janelas e 20 amostras de transferência por PDS.

Proteína bruta [0,69 – 28,8 % m m⁻¹]						
Modelos	Janelas					
	3	5	7	9	11	13
PLS _{espectro completo}	5,84 (10)	4,88 (10)	5,02 (10)	5,18 (10)	5,39 (10)	8,47 (10)
PLS/JK	29,0 (9)	24,5 (9)	17,0 (9)	15,8 (9)	8,41 (9)	10,2 (9)
SPA/MLR	15,5 (12)	12,8 (12)	13,2 (12)	14,8 (12)	14,6 (12)	8,59 (12)
Fibra [1,10 – 44,3 % m m⁻¹]						
Modelos	Janelas					
	3	5	7	9	11	13
PLS _{espectro completo}	11,0 (4)	8,37 (4)	7,46 (4)	6,35 (4)	4,05 (4)	3,84 (4)
PLS/JK	3,71 (1)	3,45 (1)	3,28 (1)	3,11 (1)	3,12 (1)	3,15 (1)
SPA/MLR	24,5 (5)	22,4 (5)	22,4 (5)	17,0 (5)	18,2 (5)	10,9 (5)

É possível observar na **Tabela 3.5** que para a propriedade de proteína bruta, o modelo PLS_{espectro completo} foi o que apresentou os menores valores de $RMSEP_{P-PDS}^S$, mais especificamente utilizando uma janela de 5 pontos. Contudo, levando-se em conta a faixa de concentração das amostras de calibração (0,69–28,8), esse valor de $RMSEP_{P-PDS}^S$ (4,88) apresentou um alto valor de REP (17,3%). Já para fibras, o modelo PLS/JK mostrou o melhor desempenho quando comparado aos outros modelos analisados, com um menor valor $RMSEP_{P-PDS}^S$ utilizando janela de 7 pontos e um REP de 7,2%. Apesar de não possuir um valor de REP tão alto quanto para o parâmetro proteína bruta, de uma forma geral, o método PDS apresentou altos valores de $RMSEP_{P-PDS}^S$, quando comparado aos valores de $RMSEP_{P-DS}^S$ e $RMSEP_{P-RS}^S$ (**Tabela 3.4**). Assim, os resultados obtidos pelo método PDS não foram satisfatórios, possivelmente devido ao corte na matriz, e apenas os resultados utilizando os métodos DS e RS devem ser indicados para determinação dos parâmetros de qualidade.

3.6 Considerações Finais

As farinhas de chia, linhaça, linhaça dourada e gergelim apresentaram altos teores de proteína bruta e fibras. Além disso, foi observado que, com exceção da farinha de casca de maracujá, as demais farinhas oriundas de sementes também apresentam altos teores de fibras.

Os resultados mostraram a importância da análise exploratória dos dados, detecção das amostras anômalas, bem como da investigação do pré-processamento adequado para as matrizes como sendo uma etapa prévia para a construção dos diferentes modelos de calibração multivariadas. Os modelos mostraram-se como uma alternativa simples e rápida na quantificação dos parâmetros de proteína bruta e fibra em farinhas funcionais analisadas com uma redução de custo, tempo e não geração de resíduos, indicando uma alternativa promissora.

Para a determinação da proteína bruta, os valores de RMSEP mais baixos foram encontrados após a padronização direta usando o modelo do PLS_{espectro completo}. Na determinação da fibra, os valores RMSEP mais baixos foram obtidos após a padronização inversa, novamente usando o modelo de espectro PLS_{espectro completo}, embora o teste F não tenha indicado diferença estatisticamente significativa entre os valores de RMSEP obtidos com os outros modelos. O teste F (no nível de confiança de 95%) entre os valores RMSEP mais baixos dos modelos desenvolvidos com técnicas DS e RS não mostrou diferença estatisticamente significativa. Portanto, ambas as estratégias de padronização podem ser usadas para a determinação da fibra e da proteína bruta.

Os modelos de calibração usando o DS e RS podem ser uma alternativa quando ocorrem mudanças na constituição química e/ou física das amostras, mudanças no ambiente do equipamento, mudanças por envelhecimento do equipamento ou mesmo, pela necessidade de aquisição das informações instrumentais em outro equipamento.

CAPÍTULO IV

CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE CAFÉS USANDO A TERMOGRAVIMETRIA E ANÁLISE DISCRIMINANTE LINEAR

4.1 Introdução

O café, considerada uma das bebidas mais consumidas no mundo, tem atraído cada vez mais o interesse no âmbito da pesquisa por ser um composto rico em bioativos, como por exemplo, os polifenóis, que exercem diferentes efeitos fisiológicos, entre eles as atividades antioxidantes. Além destes compostos, o café contém em sua composição os diterpenos cafestol e o kahweol, a cafeína e os ácidos clorogênicos (CHEN et al., 2017; SHARIF et al., 2017; DZIKI et al., 2015). Os diterpenos apresentam efeitos potencialmente hiperlipemiantes, especialmente sobre o colesterol plasmático, enquanto que a cafeína, molécula psicoativa, é a substância do café mais estreitamente relacionada com a pressão arterial, e tem sido objeto de estudo, devido aos seus efeitos sobre a saúde humana (CHEN et al., 2017; TOLEDO et al., 2017; LIMA et al., 2010). Adicionalmente, o café possui funções antimutagênico que previnem a transformação de células malignas, acarretando uma diminuição no risco de desenvolver doenças como câncer colorretal, câncer de fígado, renal e pancreático (SHARIF et al., 2017).

O efeito do café sobre a saúde humana tem sido alvo de pesquisas na literatura. Há estudos que mostram que o consumo de café em doses elevadas de cafeína pode provocar alguns efeitos tóxicos, como arritmia, hipopotassemia hiperglicemia, vômitos e convulsões (PREEDY, 2015).

O impacto do café na saúde também pode depender da forma como o café é preparado, por exemplo, cafeinado, descafeinado, torrado, filtrado, entre outros (SHARIF et al., 2017). Isso porque durante a torrefação, há uma destruição progressiva e transformação dos ácidos clorogênicos com perda de 8% a 10% por cada perda de 1% da matéria seca (DZIKI et al., 2015).

Mudanças químicas ou físicas na estrutura da amostra, quando aquecidos, podem acontecer se o calor térmico for menor ou maior que as energias das ligações que formam sua estrutura. Por isso, torna-se importante avaliar e observar as mudanças térmicas em determinados compostos, bem como, os limites de temperatura aos quais podem ser submetidos sem que se comprometam as suas propriedades (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

Uma técnica de análise térmica que vem sendo utilizada para o controle de qualidade de alimentos é a análise termogravimétrica (TGA). Durante a medida usando a TGA ocorre a mudança da massa da amostra em função da programação de temperatura (BROWN, 2001). Na análise utilizam-se pequenas quantidades de amostra (até 20 miligramas), não necessita de nenhum pré-tratamento nas amostras, não há geração de resíduos, não se faz uso de reagentes e quando comparada a outras técnicas analíticas, é de baixo custo.

As interações físico-químicas que ocorrem entre os componentes de uma amostra e sobreposição de alguns eventos térmicos nos perfis termogravimétricos gerados pela perda das massas podem dificultar a elucidação visual das informações (OTERO et al., 2011). Nesse sentido, o uso da quimiometria pode ser uma ferramenta útil para tratar dados de TGA quando a determinação direta do componente desejado não é possível devido às interações entre os componentes da matriz analisada.

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial da técnica termogravimétrica associada à quimiometria para classificar amostras de cafés em relação ao tipo (cafeinado / descafeinado). Para esse propósito, foram desenvolvidos modelos multivariados baseados em análise discriminante linear (LDA) com seleção de variáveis pelos algoritmos SPA, Algoritmo Genético (GA) e *Stepwise* (SW).

4.2 Fundamentação Teórica

4.2.1 Cafés

O café, tradicionalmente produzido a partir dos grãos torrados do fruto do cafeeiro, cuja produção global é de aproximadamente 500 bilhões de copos por ano, é considerado uma das bebidas mais consumidas do mundo. Nos últimos anos, o café tem atraído ainda mais a atenção devido ao seu impacto na saúde (SHARIF et al., 2017; DZIKI et al., 2015; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). No Brasil, o café foi cultivado no estado do Pará por volta de 1727, mas devido às condições climáticas do país, o cultivo foi largamente difundido por outros estados, como Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, entre outros. Inicialmente, a produção era voltada para o mercado interno, mas pouco tempo depois, o Brasil passou a ser um dos maiores produtores mundiais (ABIC, 2017).

O impacto do café na saúde também pode depender da forma como o café é produzido, por exemplo, cafeinado, descafeinado, torrado, filtrado, a mudança no método de colheita, processamento, armazenamento e, sobretudo, da composição química dos grãos. Tanto a presença quanto a concentração de alguns compostos no café contribuem significativamente para o aroma e sabor característicos da bebida (ABIC, 2017; SHARIF et al., 2017; DZIKI et al., 2015).

O café tem provocado muitas opiniões divergentes na literatura, pois possui funções antimutagênico que previnem a transformação de células malignas, acarretando uma diminuição no risco de desenvolver doenças como câncer colorretal, câncer de fígado, renal e

pancreático. No entanto, contrariando os efeitos positivos dos antimutagênicos, o café contém glioxal, metilglioxal, etilglioxal, acetol dentre outros agentes cancerígenos (SHARIF et al., 2017).

O consumo de café mostrou influências nas funções de vários sistemas corporais, dentre estes, o sistema imunológico (SHARIF et al., 2017). A cafeína atua de forma anti-inflamatória em múltiplos componentes do sistema imunológico (**Figura 4.1**).

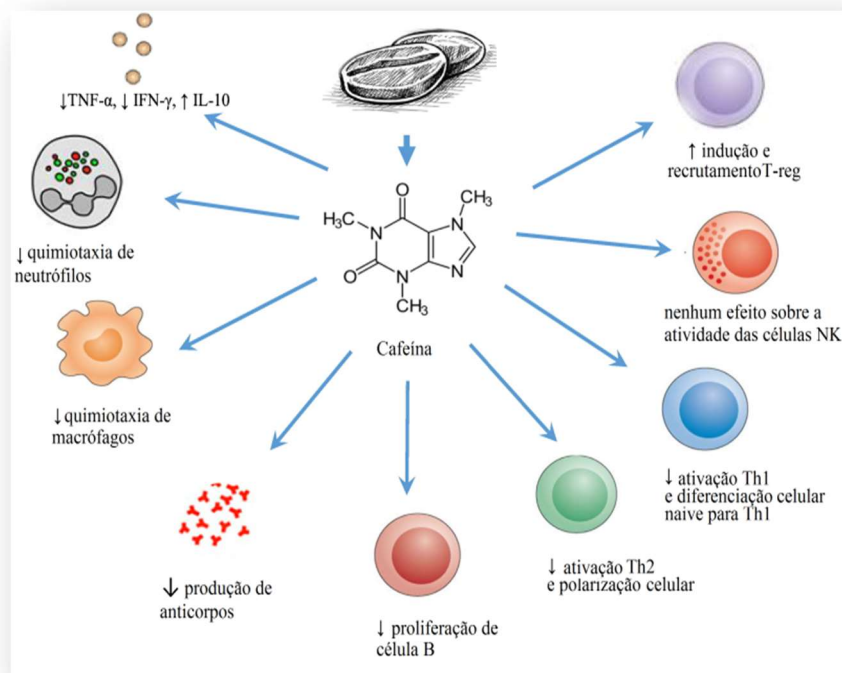


Figura 4.1 - Efeitos da cafeína no sistema imunológico. Fonte: Adaptado de SHARIF et al., 2017.

Há diversos estudos que mostram que consumir doses elevadas de cafeína podem provocar alguns efeitos tóxicos, como arritmia, hipopotassemia, hiperglicemia, vômitos e convulsões (PREEDY, 2015). Além disso, a cafeína pode também provocar efeitos adversos com relação à qualidade do sono (LAFUENTE-LAFUENTE et al., 2008) e aumento da pressão sanguínea (PREEDY, 2015), entre outros. Dessa forma, os cafés descafeinados podem ser uma opção conveniente, principalmente para consumidores que apresentam alta sensibilidade à cafeína.

O aumento da temperatura e da pressão parcial de oxigênio pode acelerar a degradação do café, causando uma redução substancial de sua qualidade. Os procedimentos de inspeção do

estado de conservação torna-se necessário, não apenas para contornar os danos causados à saúde dos consumidores, mas também para desencorajar o comércio de produtos falsificados (GONZÁLEZ et al., 2001).

O controle de qualidade, classificação, quantificação e autentificação de amostras de cafés têm sido realizados empregando técnicas instrumentais, tais como a, Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massa (GCMS) (AGRESTI et al., 2008), espectrometria NIR (SHAN et al., 2014), imagem digital (SOUTO et al., 2015), espectroscopia UV-Vis (DANKOWSKA; DOMAGALA; KOWALEWSKI, 2017) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (GONZÁLEZ et al., 2001). As técnicas supracitadas mostraram-se eficientes para este fim. Todavia, a análise termogravimétrica pode ser uma boa alternativa para também classificar e quantificar parâmetros de qualidade em amostras de cafés. Esta técnica que tem sido bastante reportada na literatura será destacada no item a seguir.

4.2.2 Análise termogravimétrica

A análise térmica pode ser definida como um “grupo de técnicas nas quais se acompanham as variações em uma propriedade física de uma amostra e/ou de seus produtos de reação, enquanto a mesma é submetida a uma programação de temperatura” (DENARI; CAVALHEIRO, 2012). Esta técnica foi pela primeira vez utilizada por P. Tutchot, em 1907, no levantamento das curvas de decomposição térmicas de piritas, e em 1912, G. Urbain e C. Boulanger construíram uma balança dotada de compensação eletromagnética para acompanhar a eflorescência de sais hidratados. Com isso, um pesquisador japonês Katora Honda, em 1915, criou a termobalança (IONASHIRO, 2004).

Na análise térmica é possível obter informações específicas a partir de uma propriedade física, por exemplo, a análise termogravimétrica investiga a decomposição, a estabilidade térmica, a desidratação e a oxidação pela perda de massa, a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) estuda a capacidade de calor, a mudança de fase e as reações a partir do acompanhamento de entalpia da amostra e, a Análise Térmica Diferencial (DTA) que também investiga as mudanças de fase e reações, sendo que esta investigação é a partir da mudança na temperatura das amostras (DENARI; CAVALHEIRO, 2012). Essas técnicas apresentam como vantagens a necessidade de uma pequena quantidade de amostra nas análises, dispensam a etapa de preparo de amostra, além da sua ampla aplicabilidade (RIBEIRO, 2014; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

Entre as técnicas de Análise Térmica, a análise termogravimétrica (TGA) é a mais utilizada, a qual acompanha a variação da propriedade de massa, enquanto a amostra é submetida a um aquecimento (PEREIRA et al., 2009). As análises são normalmente contínuas e muitas vezes, a razão de aquecimento é linear com o tempo. A sua instrumentação consiste na medição da massa da amostra em função da temperatura utilizando a termobalança, também conhecida como um analisador termogravimétrico (BROWN, 2001).

Alguns fatores podem influenciar as curvas da TGA, podendo ser tanto fatores instrumentais ou mesmo fatores ligados a característica da própria amostra. Dentre os fatores instrumentais, podem ser destacados a razão de aquecimento do forno, a atmosfera do forno, a geometria do suporte de amostra e do forno e a sensibilidade da balança. Já em relação às amostras, podem ser devido à sua natureza e sua quantidade, à solubilidade dos gases envolvidos, ao tamanho de partículas e ao calor de reação, à compactação da amostra e à condutividade térmica (DENARI; CAVALHEIRO, 2012; IONASHIRO, 2004).

É importante destacar que o procedimento realizado através das análises termogravimétricas requer alguns cuidados, por exemplo, impulsão do ar sobre o cadinho e seu suporte, a localização do sensor de temperatura (devendo estar o mais próximo possível da amostra), a calibração do sensor e as correntes de convecção e turbulência do forno (dependem do tamanho e forma do cadinho). Estes fatores podem interferir nas curvas geradas da TGA (IONASHIRO, 2004), causando resultados indesejáveis ou insatisfatórios.

Os resultados das curvas de variação de massa por temperatura são geralmente conhecidos como termograma, curva termólise e curva pirólise. Essas curvas apresentam informações sobre a estabilidade térmica, composição de algum composto intermediário que pode ter sido formado, ou mesma a composição de resíduos (RIBEIRO, 2014). Contudo, essas informações, muitas vezes podem ser mascaradas pela sobreposição de alguns eventos térmicos ou mesmo por interações físico-químicas que ocorrem entre os componentes da amostra (OTERO et al., 2011). Além disso, geram uma matriz com uma grande quantidade de valores massa/temperatura. Assim, o uso de ferramentas quimiométricas pode, muitas vezes, facilitar a elucidação dos dados mostrados nos termogramas.

4.2.3 Quimiométricas

4.2.3.1 Técnicas de reconhecimento de padrão

As técnicas de reconhecimento de padrões (RP) tornaram-se uma excelente ferramenta na caracterização e identificação de similaridades e diferenças entre classes de amostras em

diferentes conjuntos de dados e na avaliação da qualidade e composição dos alimentos. É dividida em reconhecimento de padrões não-supervisionados, por exemplo, a PCA (já discutida no capítulo III) e a Análise por Agrupamentos Hierárquico (HCA), e em reconhecimento de padrões supervisionados, incluindo as técnicas Análise Discriminante Linear (LDA), SIMCA e K-Ésimos Vizinhos mais Próximos (KNN) (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998, CONNEL; JAIN, 2001).

As técnicas de reconhecimento de padrões não-supervisionados têm por finalidade realizar uma análise exploratória nos dados, avaliando a existência de agrupamento entre as classes das amostras em estudo sem que seja necessário o conhecimento de suas identidades. (CORREIA; FERREIRA, 2007). As técnicas de reconhecimento de padrões supervisionadas diferem essencialmente na estrutura das regras de classificação que são adotadas, sendo neste caso, a necessidade de uma variável de categoria, que faz a identificação das amostras usadas na construção dos modelos para que sejam utilizadas na classificação de amostras desconhecidas (subconjunto de teste).

Entre as técnicas de reconhecimento de padrões supervisionadas, a LDA é um método de análise discriminante baseada no mesmo princípio de projeções das amostras, como PCA, em uma base n -dimensional para determinar uma base vetorial que melhor discrimine as classes das amostras. A LDA foi introduzida por Fisher, que aplicou a técnica no estudo do conjunto de dados Iris pra três grupos (FISHER, 1936). Ele propôs transformar as observações amostrais, por meio de combinações lineares dessas variáveis em observações univariadas, de tal forma que as variáveis a serem transformadas se apresentassem o mais separado possível.

Na LDA as variáveis independentes são preditoras e as variáveis dependentes são as classes das amostras. Normalmente, múltiplas variáveis são incluídas na análise para ver quais as que contribuem para a discriminação entre as classes das amostras. É dividida em duas etapas, sendo que na primeira é realizado um teste da importância das funções discriminantes, e na segunda é feito a classificação dos dados (CORTIVO, 2015). No primeiro passo haverá as matrizes de covariância entre as classes e dentro das classes, sendo estas comparadas por meio do teste F para determinar se existem ou não diferenças significativas entre grupos. Se existe tal diferença, prossegue-se com a construção das combinações lineares para classificação, ou seja, emprega limites de decisão linear (funções discriminantes) que maximizam a razão entre as classes e minimizam a dispersão dentro de cada classe (FISHER, 1936).

O desenvolvimento de modelos LDA conta com uma etapa prévia para seleção de amostras que irá compor os subconjuntos de treinamento, validação e teste. Para tanto, um algoritmo de seleção de amostras, o Kennard-Stone (KS) comumente utilizado, destina-se a

cobrir o espaço multidimensional de forma uniforme, maximizando as distâncias euclidianas entre os vetores de resposta instrumental ($\mathbf{X}$) das amostras selecionadas (KENNARD; STONE, 1969; BOUVERESSE; MASSART, 1996). No entanto, quando o LDA é comparado aos outros métodos de RP supervisionados apresenta uma desvantagem por ser apropriado apenas para conjuntos de dados de pequenas dimensões. Além disso, a capacidade de generalização de modelos LDA pode ser comprometida por problemas de colinearidade. Com isso, o uso da LDA, para fins de classificação, necessita de procedimentos de redução de dimensionalidade e/ou seleção de variáveis (BRERETON, 2003). Dessa forma, algoritmos de seleção de variáveis, como SPA, SW e GA foram utilizados neste estudo.

4.2.3.2 Técnicas de seleção de variáveis

O algoritmo das projeções sucessivas (SPA) foi uma das técnicas de seleção de variáveis utilizadas neste trabalho e foi anteriormente discutida no capítulo III no âmbito da calibração. Entretanto, o SPA voltado para solucionar problemas de classificação foi descrito no trabalho de PONTES et al. (2005). O SPA, na primeira etapa do funcionamento é realizado da mesma maneira quando utilizado para calibração, sendo que a diferença está no procedimento que envolve a centralização da média, ou seja no SPA/MLR, os dados de calibração estão centrados na média global do conjunto, enquanto que no SPA aplicado ao LDA, os dados de treinamento estão centrados na média de cada classe. Na Fase 2, os subconjuntos de variáveis candidatas são avaliados de acordo com uma função de custo (**equação 4.1**) relacionada ao risco médio de classificação incorreta ao longo do subconjunto de validação. Assim, a cadeia gerada que apresentar a menor função de custo será selecionada, resultando em uma melhor separação das amostras de acordo com suas classes verdadeiras. A função de custo J_{cost} é definida como o valor médio de g_n sobre as amostras de treinamento ($n = 1, 2, \dots, N_{trein}$) (SOARES, 2016).

$$J_{cost} = \frac{1}{N_{trein}} \sum_{n=1}^{N_{trein}} g_n \quad \text{eq. (4.1)}$$

Em que:

$$g_n = \frac{MD_n^2[\mathbf{x}_{trein,n}, \bar{\mathbf{x}}(I_n)]}{\min_{I_j \neq I_n} MD_n^2[\mathbf{x}_{trein,n}, \bar{\mathbf{x}}(I_j)]} = \text{risco de uma classificação incorreta das amostras};$$

N_{trein} = número de amostras de treinamento.

O $MD^2[\mathbf{x}_{\text{trein},n}, \bar{\mathbf{x}}(I_n)]$ é o quadrado da distância de Mahalanobis (DE MAESSCHALCK; JOUAN-RIMBAUD; MASSART, 2000) entre a n -ésima amostra de treinamento $\mathbf{x}_{\text{trein},n}$ (de índice de classe I_n) e a média $\bar{\mathbf{x}}(I_n)$ $n \times I$ da classe verdadeira (ambos vetores linhas) calculadas sobre o conjunto de treinamento. O subscrito $-n$ em MD^2_{-n} indica que a média da classe $\bar{\mathbf{x}}(I_1)$, $\bar{\mathbf{x}}(I_2)$, ..., $\bar{\mathbf{x}}(I_C)$ e a matriz covariância conjunta são calculadas sem usar $\mathbf{x}_{\text{trein},n}$ (SOARES, 2016). Depois que as variáveis foram selecionadas, a classificação de uma nova amostra, $\mathbf{x}_{\text{nova}}$, pode ser realizada calculando a distância de Mahalanobis de $\mathbf{x}_{\text{nova}}$ em relação ao vetor médio de cada classe. A nova amostra é então atribuída à classe para a qual a distância Mahalanobis é a menor.

O algoritmo SW é outra alternativa dentre os algoritmos de seleção de variáveis que visa discriminar e investigar individualmente cada uma destas. De tal forma que cada variável é adicionada e excluída do modelo de acordo com o método de validação cruzada *leave-one-out* (CANECA et al., 2006). Calcula-se então o fator de discriminação D_i de uma variável $\mathbf{x}_i$ baseando em medida de dispersão dentro da classe (SW_i) e entre as classes para a variável $\mathbf{x}_i$ (SB_i), mostrado na **Equação 4.2** (FORINA et al, 2007). Nessa técnica são testados diferentes valores de limiar (*threshold*) e esses valores são comparados baseados nos erros do conjunto de validação.

$$D_i = \frac{SB_i}{SW_i} \quad \text{eq. (4.2)}$$

Calcula-se a dispersão SW_i (DUDA; HART; STORK, 2001) definida a partir da **Equação 4.3**, e a dispersão entre as classes SB_i , a partir da **Equação 4.4**.

$$SW_i = \sum_{j=1}^C s_{ij} \quad \text{eq. (4.3)}$$

$$SB_i = \sum_{j=1}^C n_j [m_{ij} - m_i]^2 \quad \text{eq. (4.4)}$$

Em que:

$s_{ij} = \sum [x_i^k - m_{ij}]^2$ = dispersão de $\mathbf{x}_i$ na classe j ; sendo x_i^k o valor de $\mathbf{x}_i$ na k -ésima amostra e m_{ij} o valor médio de $\mathbf{x}_i$ na classe j ;

m_i = média de $\mathbf{x}_i$ para todos os objetos do conjunto de treinamento;

C = número de classes.

As variáveis que apresentarem uma alta correlação com a variável recém-selecionada serão descartadas a fim de evitar problemas de colinearidade. Após todas as variáveis serem avaliadas, o conjunto que apresentar um menor erro de validação cruzada será o mostrado ao analista e o cálculo se encerrará (PONTES, 2009).

O GA, diferentemente dos outros algoritmos supracitados, é um algoritmo de natureza estocástica. Proposto por John H. Holland, é baseado na teoria da evolução de Charles Darwin, na qual as espécies evoluem pelo princípio da seleção natural e sobrevivência do mais apto (LEARDI, 2001). Nesse algoritmo, quando se deseja fazer a seleção de variável, cada amostra (indivíduo) é representada por uma estrutura de variáveis codificadas de forma binária de maneira análoga aos cromossomos biológicos, sendo cada variável representada como um gene (GALVÃO; ARAÚJO 2009). Genes que tem valor 1 indicam que a variável será incluída na fase de validação, enquanto genes com valor 0 indicam que as variáveis não serão avaliadas. O GA necessita de valores: populações de indivíduos e gerações, sendo esses indivíduos combinados entre si (*crossover*), gerando “filhos” que podem sofrer ou não mutação. A mutação é utilizada para incluir variáveis que não estão presentes nos modelos da população inicial (pais) (HIBBERT, 1993). Assim, o GA utiliza um gerador aleatório para criar uma população inicial de cromossomos e essas populações evoluem através de sucessivas gerações até se encontrar uma solução ótima (SOARES, 2016). A melhor solução é conseguida a partir da avaliação de aptidão, que é o parâmetro que indicará a habilidade de um indivíduo sobreviver. A aptidão de cada indivíduo foi tomada como o inverso do RMSEV (Equação 3.4 do Capítulo III), calculado usando as variáveis codificadas no cromossomo (CANECA et al., 2006). Quanto maior for a aptidão de um indivíduo, melhor a resposta e consequentemente menor o erro.

4.3 Análise termogravimétrica e quimiometria

Inúmeros trabalhos envolvendo análise termogravimétrica para determinação e investigação de propriedades específicas em diversas amostras tem sido encontrados na literatura. Todavia, estudos que associam a análise termogravimétrica e quimiometria são limitados. A seguir, alguns trabalhos são reportados.

Chen et al. (2017) investigaram as características de co-combustão de misturas de lamas de esgotos (SS) e borras de café (CG) usando análise termogravimétrica acoplada à modelagem de redes neurais artificiais (ANN). No estudo, os autores analisaram três diferentes taxas de aquecimento (10, 20 e 30 °C min⁻¹) com faixa de temperatura variando de temperatura ambiente a 1.000 °C e fluxo de 50 mL min⁻¹ sob atmosfera de ar. Foi observado ainda que os modelos

ANN apresentaram precisão satisfatória entre dados experimentais e previstos. Os resultados da co-combustão mostraram que as interações entre SS e CG afetaram positivamente o processo de combustão e a extensão do impacto variou com a região de temperatura. Houve interação entre SS e CG, e os impactos foram, principalmente, positivos. Os pesquisadores observaram ainda que após a adição de CG nas misturas, a taxa de perda de massa e a reatividade de SS foram aumentadas enquanto a carbonização foi reduzida. A associação entre os modelos de ANN e dados experimentais verificou sua capacidade de prever com precisão o comportamento de co-combustão, desde que seja conhecida a taxa de aquecimento, proporção de mistura e temperatura.

Risoluti et al. (2016) utilizaram a análise termogravimétrica associada à ferramentas quimiométricas para detecção de β -talassemia. Para isso, amostras de sangue de pacientes saudáveis e com β -talassemia, doença genética da hemoglobina caracterizada pela ausência ou redução da síntese da cadeia da β -globina, foram analisadas e assim, os perfis termogravimétricos gerados foram avaliados a partir da PCA. Avaliando-se sua correlação com os parâmetros hematológicos. Observaram então que o sangue dos pacientes com β -talassemia foram claramente distintos dos indivíduos saudáveis como resultado da PCA em relação a diferentes quantidades de água e fração corpuscular. Além disso, os autores avaliaram o modelo preditivo com base na Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para o diagnóstico de β -talassemia. Como resultado, o PLS-DA permitiu a discriminação de pacientes anêmicos e indivíduos saudáveis e foi capaz de detectar a β -talassemia. Concluíram que a TGA aliado as ferramentas quimiométricas utilizadas são capazes de prever síndromes d β -talassemia usando alguns microlitros de sangue sem qualquer pré-tratamento e de rápido análise.

Rambo et al. (2015) analisaram o comportamento térmico de biomassas lignocelulósicas de dez diferentes tipos de biomassas de amostras (caroço de açaí, casca de café, serragem de eucalipto, casca de arroz, casca de soja, casca de coco, capim elefante, bambu, engaço e pseudocaule de banana) utilizando a termogravimetria. Utilizaram a PCA para avaliação dos termogramas com perfis semelhantes. Assim, biomassas de capim, café, engaço de banana e açaí com comportamentos semelhantes apresentaram maior degradação térmica atribuída à decomposição da hemicelulose, enquanto que para a decomposição da celulose as amostras de arroz, serragem e soja. Observaram que todas as dez amostras de biomassa exibem tendência semelhante de perda de peso associada à decomposição da lignina.

Francisco-Fernández et al. (2012) utilizaram as curvas termogravimétricas de 49 amostras de madeira para classificação de 7 espécies predeterminadas. Para tanto, diferentes

modelos de classificação, como a LDA, kNN, Redes Neurais (NN), Análise Bayesiana (NBC) e Máquinas de Vetores de Suporte (SVM) foram construídos. Além disso, desenvolveram uma PCA para uma análise prévia dos dados. Os autores observaram que o método clássico de LDA mostrou o melhor desempenho por apresentar as maiores probabilidade de classificação correta.

Khanmohammadi et al. (2012) determinaram simultaneamente paracetamol e fosfato de codeína em comprimidos usando a análise termogravimétrica e quimiometria. Para isto, o conjunto de calibração foi preparado como uma mistura ternária (paracetamol, fosfato de codeína e amido de milho) sendo analisada por termogravimetria dinâmica à taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio. Os modelos PLS e o PLS acoplado ao SPA foram utilizados para análise dos dados e o seu desempenho foi avaliado com base nos valores de RMSE. Assim, após comparar os métodos quimiométricos utilizados, o PLS/SPA apresentou melhores resultados em relação ao PLS devido à seleção de variáveis na calibração, proporcionando maior confiabilidade. Além disso, os resultados validados em comparação com o método oficial de HPLC demonstraram exatidão e precisão.

Otero et al. (2011) determinaram ácido ascórbico em formulações farmacêuticas utilizando a análise termogravimétrica e ferramentas quimiométricas. Os autores avaliaram o modelo MLR/SPA comparando-o com outros dois modelos de calibração multivariada, MLR com temperaturas selecionadas por GA e PLS usando toda a faixa de temperatura. Observaram que o MLR/SPA apresentou as melhores previsões, de acordo com a concentração esperada de ácido acético (correlação de 0,991 e RMSE de $0,8\% \text{ m m}^{-1}$ na faixa de 61,3-74,9% m m^{-1}). Além disso, um teste *t* pareado com nível de confiança de 95% foi aplicado e não foram encontradas diferenças significativas entre as previsões MLR/SPA e os valores obtidos por uma técnica de titulação iodimétrica clássica. Concluíram então que a associação da termogravimetria e a quimiometria pode ser uma alternativa ao método clássico para a análise de ácido ascórbico.

Pereira, Schnitzler e Filho (2005) estudaram e caracterizaram amostras de cafés *in natura* e cafés processados utilizando a análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Observaram grande semelhança entre as curvas TG, DTG e DSC entre os cafés *in natura* e torrado. Eles associaram tal semelhança ao fato que quando processados industrialmente (torrefação), na temperatura entre 150 a 200 $^{\circ}\text{C}$, ainda não sofreram uma efetiva decomposição mas sim perda de água e poucos produtos voláteis e reações químicas que provocam o escurecimento. Além disso, observaram que as curvas do café solúvel não têm semelhança às daquelas das demais amostras possivelmente porque este passa por um processo relativamente complexo e com tratamento térmico.

4.4 Procedimento experimental

4.4.1 Amostras

Trinta e oito amostras de cafés (marcas e lotes diferentes) foram analisadas, sendo 24 amostras do tipo cafeinado e 14 amostras do tipo descafeinado. Todas as amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de João Pessoa, PB, Brasil.

4.4.2 Instrumentação e aquisição dos termogramas

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando um equipamento de análise térmica TGA 50 (Shimadzu, Tóquio, Japão), localizado no Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias (Geratec) na Universidade Estadual do Piauí, Teresina-PI. Uma massa entre 2-3 mg foi pesada em cadinho de platina. A razão de aquecimento foi de 10 °C min⁻¹ numa faixa de temperatura de 30 a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹. Além disto, é importante ressaltar que uma etapa prévia de calibração do equipamento foi realizada com o padrão de índio metálico (pontos de fusão: 156,6 °C), e pureza de 99,99%, para garantir a precisão das análises. As mesmas condições operacionais foram seguidas para todas as amostras analisadas.

4.4.3 Processamento quimiométrico e *softwares*

Uma normalização e suavização Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem e janela com 21 pontos nas curvas termogravimétricas foram aplicados aos termogramas, para remoção de artefatos físicos. Além disso, um valor de referência para a temperatura foi utilizado como ponto de partida (30 °C) para a apresentação dos perfis termogravimétricos em cada amostra.

Uma análise exploratória utilizando PCA foi realizada a fim de observar a existência de agrupamentos naturais. O gráfico dos escores também foi observado com o intuito de auxiliar na detecção e eliminação de amostras anômalas, como realizado de forma semelhante no Capítulo III.

O algoritmo Kennard-Stone (KS) (KENNARD & STONE, 1969) foi empregado para divisão das amostras em subconjuntos de treinamento (cafeinado: 15; descafeinado: 8) e teste (cafeinado: 8; descafeinado: 5).

No desenvolvimento dos modelos de classificação LDA, três algoritmos de seleção de variáveis foram testados, o SPA, GA e SW. O SPA-LDA foi avaliado com base no risco médio de uma classificação incorreta realizado pelas variáveis selecionadas no modelo LDA. O algoritmo GA-LDA foi executado para 100 gerações com 200 cromossomos em cada geração, cruzamento e mutação com probabilidades de 60% e 10%, respectivamente, e essa rotina foi repetida até encontrar a melhor solução para a predição, devido à sua natureza estocástica (CANECA et al., 2006). Já para o modelo SW-LDA, valores limites de coeficientes de correlação (*threshold*) foram testados (0,95, 0,90, 0,70, 0,50, 0,30) para decidir quais as variáveis selecionadas foram mais relevantes para o modelo construídos e posterior uma classificação satisfatória (CANECA et al., 2006).

Os modelos foram avaliados de acordo com os parâmetros de desempenho de exatidão (**equação 4.2**) e especificidade (**equação 4.3**) que mede a habilidade do modelo para rejeitar amostras de outras classes e sensibilidade (**equação 4.4**) que mede a habilidade do modelo para reconhecer amostras pertencentes às suas classes (OLIVERI; DOWNEY, 2012).

$$\text{Exatidão} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad \text{eq. (4.2)}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad \text{eq. (4.3)}$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad \text{eq. (4.4)}$$

Em que:

VP (verdadeiros positivos) = número de amostras pertencentes a uma classe e corretamente classificadas nela;

VN (verdadeiros negativos) = número de amostras que não pertencem à classe e não foram classificadas nela;

FP (falsos positivos) = números de amostras que não pertencem à classe e foram incorretamente classificadas nela;

FN (falsos negativos) = número de amostras que pertencem à classe e foram incorretamente classificadas como não pertencentes à ela.

Esses parâmetros foram calculados a partir de uma matriz de confusão, que apresentam os erros de classificação resultantes da aplicação dos modelos desenvolvidos.

O pré-processamento dos dados e a PCA foram realizados utilizando o programa The Unscrambler® X.1 (CAMO S.A., Noruega). Os algoritmos KS, SPA/LDA, GA/LDA e SW/LDA foram executados em ambiente do Matlab® versão 6.5 (Mathworks, EUA).

4.5 Resultados e discussão

4.5.1 Termogramas dos cafês

Na **Figura 4.2** são apresentados os termogramas originais (sem pré-processamento) das 38 amostras de cafês na faixa de temperatura de 30 a 600 °C. As cores azul e vermelho representam as amostras cafeinadas e descafeinadas, respectivamente.

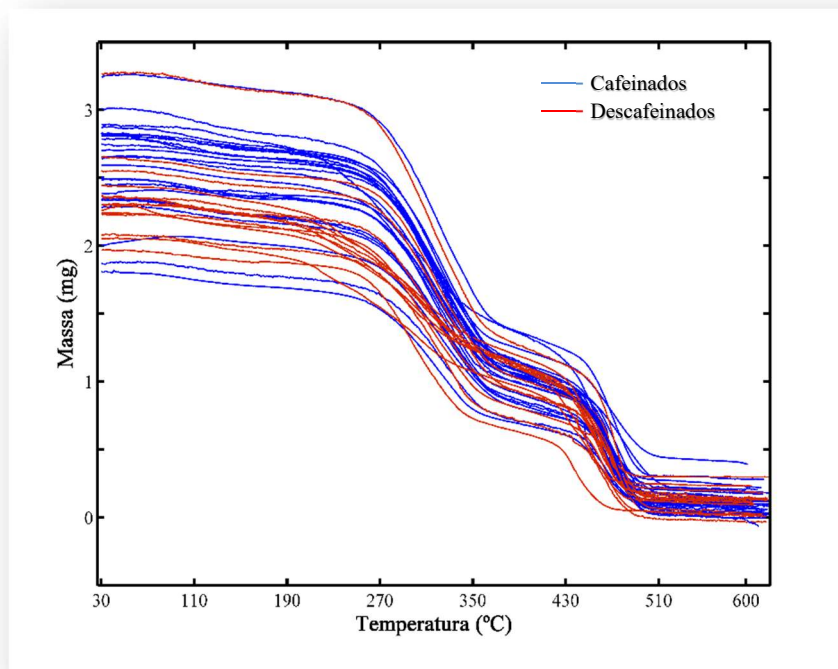


Figura 4.2 - Termogramas sem pré-processamento das 38 amostras de cafês.

O processo de degradação térmica das amostras envolveu três fases. A primeira fase, caracterizada por uma perda sutil de massa ($> 5\%$), ocorreu até a temperatura de aproximadamente 120°C, relacionada à perda de umidade. A segunda fase de decomposição ocorreu na faixa de 190 a 350 °C, caracterizada como a principal zona de desvolatilização devido à degradação oxidativa de hemicelulose e celulose. A terceira fase ocorre na faixa de temperatura 430 a 500 °C, em que a degradação térmica é relacionada com a decomposição de lignina e a combustão de carvão. Existe ainda um comportamento distinto que aparece

aproximadamente em 448 °C devido o maior teor de lignina do CG que se degrada ao longo de uma ampla faixa de temperatura de 160 a 900 °C (CHEN et al., 2017).

Observa-se também que, para algumas amostras, os perfis dos termogramas foram semelhantes ao longo de toda a faixa de temperatura. No entanto, para algumas amostras do tipo descafeinado (termograma vermelho), entre a faixa de temperatura 200 a 310 °C, esses perfis apresentaram diferenças. Isso pode ser atribuído à liberação de compostos voláteis contidos nos cafés cafeinados (termogramas azul) que queima mais intensamente (SIMÕES et al., 2014).

4.5.2 Pré-processamento dos termogramas

Após essa primeira análise dos dados, verificou-se a necessidade de realizar uma etapa de normalização nos termogramas a fim de convertê-los em percentagem de massa nas amostras e assim padronizá-los, facilitando as análises posteriores. Ademais, um valor de referência para a temperatura foi utilizado como ponto de partida (30 °C) também utilizado para uma padronização nas variáveis, neste caso as temperaturas, que divergiam entre as amostras. Além disso, um procedimento de suavização tornou-se necessário para correção de possíveis instabilidades na balança do instrumento ou mesmo instabilidade na rede elétrica. Para isto, a suavização Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela com 21 pontos, foi utilizado.

Na **Figura 4.3** são apresentados os termogramas dos cafés após o pré-processamento de normalização e suavização Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela com 21 pontos.

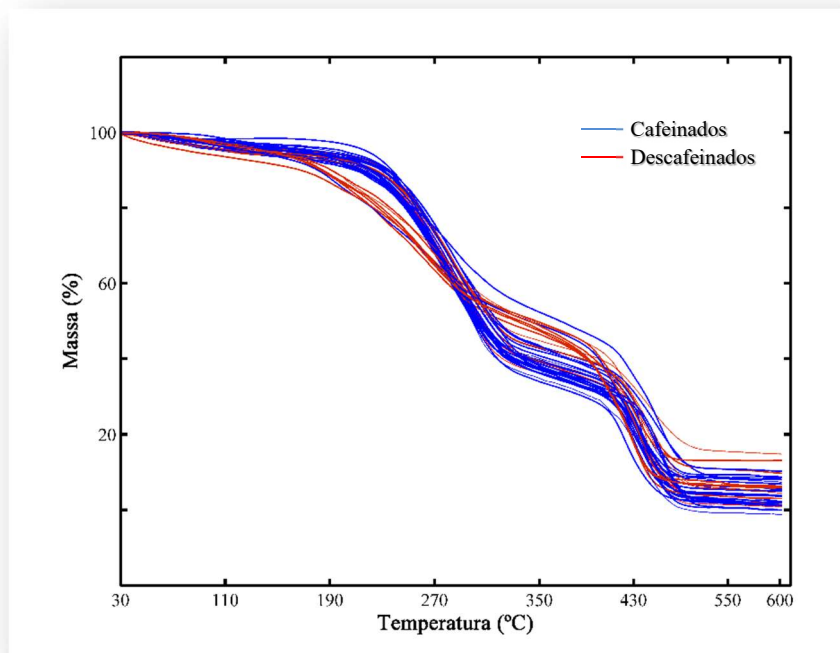


Figura 4.3 - Termogramas após pré-processamento de normalização e suavização S.G para as 38 amostras de cafés.

Observa-se que, após os procedimentos de pré-processamento dos dados, houve a discriminação das amostras, na faixa de temperatura de 200 e 310 °C, de cafés solúveis dos torrados ao invés de cafeinados e descafeinados. Esta faixa é responsável por uma perda de massa em torno de 40%, evidenciando que, para as amostras de cafés solúveis, a pirólise (desvolatilização) é mais acentuada possivelmente devido ao procedimento que foram submetidas na sua produção. O mesmo comportamento acontece na faixa de temperatura de 300 a 400 °C. Neste caso, nessa faixa de temperatura de 300 a 400 °C, a perda de massa foi menor, aproximadamente 10%, e as amostras de cafés cafeinados apresentaram uma diminuição acentuada nas temperaturas de decomposição. Adicionalmente, foi observado que tal comportamento não ocorreu na faixa onde a temperatura na qual a reação de decomposição se completa (400 a 450 °C), não há separação dos tipos (cafeinados e descafeinados) e nem entre os solúveis e os torrados.

4.5.3 PCA

Na **Figura 4.4** são apresentados os escores (PC2 x PC1) obtidos pela PCA aplicada aos termogramas para todas as amostras de cafés após pré-processamento dos dados. PC1 e PC2 explicam 60% e 28% da variância dos dados, respectivamente.

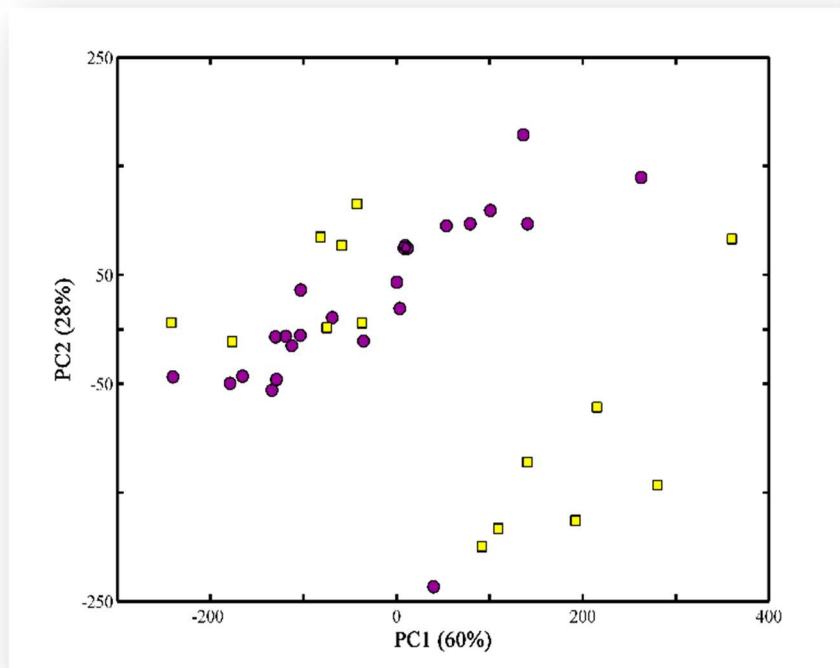


Figura 4.4 - Gráfico dos escores PC2 x PC1, para as 38 amostras de cafés (●: cafeinado e ■: descafeinado).

Na **Figura 4.4**, é possível observar o gráfico dos escores que confirma a divisão das amostras de cafés quanto ao tipo solúvel e torrado ao longo da PC2. No entanto, ao longo da PC1, é possível visualizar que há uma dispersão substancial e sobreposição dos tipos de cafés cafeinados e descafeinados. Portanto, procedimentos de seleção de variáveis espectrais são necessárias a fim de obter uma melhor discriminação entre as classes. Na 3ª e 4ª PC não houve formação de agrupamentos entre as amostras de cafés cafeinados e descafeinados.

Além do gráfico dos escores obtidos pela PCA, o gráfico de influência (*leverage* x resíduos) (**Figura 4.5**) também foi avaliado na etapa de detecção de amostras anômalas que é requerida antes da construção dos modelos de classificação das amostras de cafés.

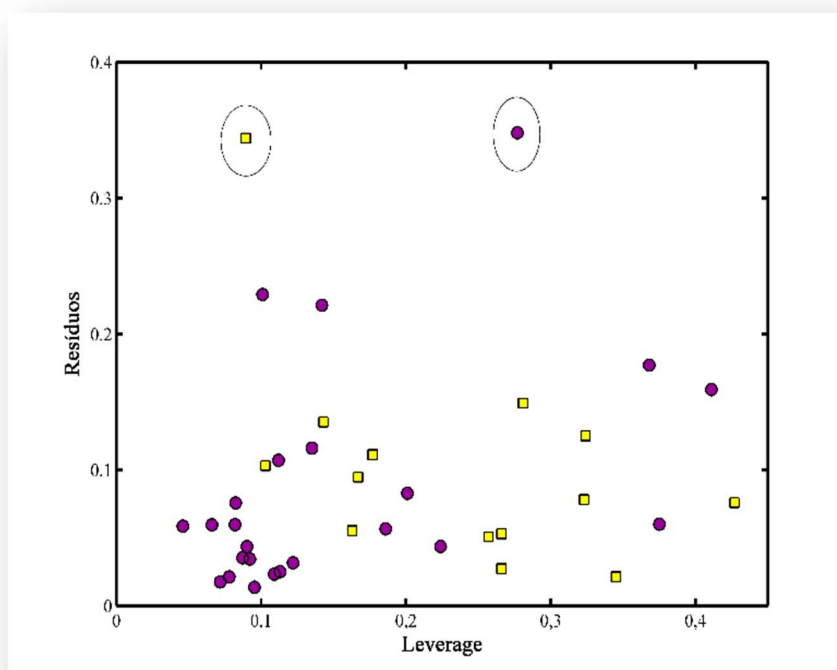


Figura 4.5 - Gráfico de influência (*leverage* x resíduos) dos termogramas das amostras de cafés (●: cafeinado e ■: descafeinado).

Na **Figura 4.5** é possível notar que duas amostras (destacadas) apresentaram altos valores de resíduos em comparação com as demais amostras. Assim, essas amostras foram retiradas do conjunto dos dados, perfazendo um total de 36 amostras.

4.5.4 Modelos de classificação

Na **Tabela 4.1** é apresentado a matriz de confusão obtida a partir da classificação dos modelos SPA/LDA, GA/LDA e SW/LDA para os subconjuntos de teste e na **Tabela 4.2** é mostrada a validação dos modelos em termos de exatidão e dos valores de sensibilidade e especificidade obtidos para os subconjuntos de teste. Nesta tabela, o valor de N representa o número de amostras em cada conjunto.

Tabela 4.1 - Matriz de confusão dos resultados dos modelos SPA/LDA, GA/LDA e SW/LDA para o conjunto de teste das amostras de cafés (1) cafeinado e (2) descafeinado.

SUBCONJUNTO DE TESTE		SPA/LDA (9)		GA/LDA (10)		SW/LDA (9)*	
N	Índice de classe verdadeiro	Índice de classe previsto					
		1	2	1	2	1	2
8	1	7	1	8	-	8	-
5	2	-	5	-	5	1	4

*0,95

Na matriz de confusão apresentada na **Tabela 4.1**, verifica-se que no modelo SPA/LDA apenas uma amostra de teste da classe dos cafés cafeinados foi classificada incorretamente. De forma similar, no modelo SW/LDA, uma amostra de café foi também classificada na classe errada, mas nesse caso, uma amostra de café descafeinado foi classificada na classe de café cafeinado.

Tabela 4.2 - Parâmetros de desempenho dos resultados dos modelos SPA/LDA, GA/LDA e SW/LDA para o conjunto de teste das amostras de cafés (1) cafeinado e (2) descafeinado.

PARÂMETROS	SPA/LDA		GA/LDA		SW/LDA		
	Classes	1	2	1	2	1	2
Exatidão (%)		92,3		100,0		92,3	
Especificidade		1,000	0,875	1,000	1,000	0,800	1,000
Sensibilidade		0,875	1,000	1,000	1,000	1,000	0,800

Na **Tabela 4.2**, observa-se que o melhor percentual de exatidão para a classificação dos cafés foi obtido com o GA/LDA, que classificou corretamente 100% das amostras de treinamento e teste, e selecionando dez variáveis. O SPA/LDA e SW/LDA obtiveram uma exatidão de 92,3% de exatidão e ambos selecionaram nove variáveis. Em relação aos valores de especificidade e sensibilidade, os três modelos mostraram resultados satisfatórios, sendo o GA/LDA com o melhor desempenho.

Obtidos os modelos, as variáveis selecionadas pelo SPA, GA e SW estão apresentadas na **Figura 4.6a**, **4.6b** e **4.6c**, respectivamente.

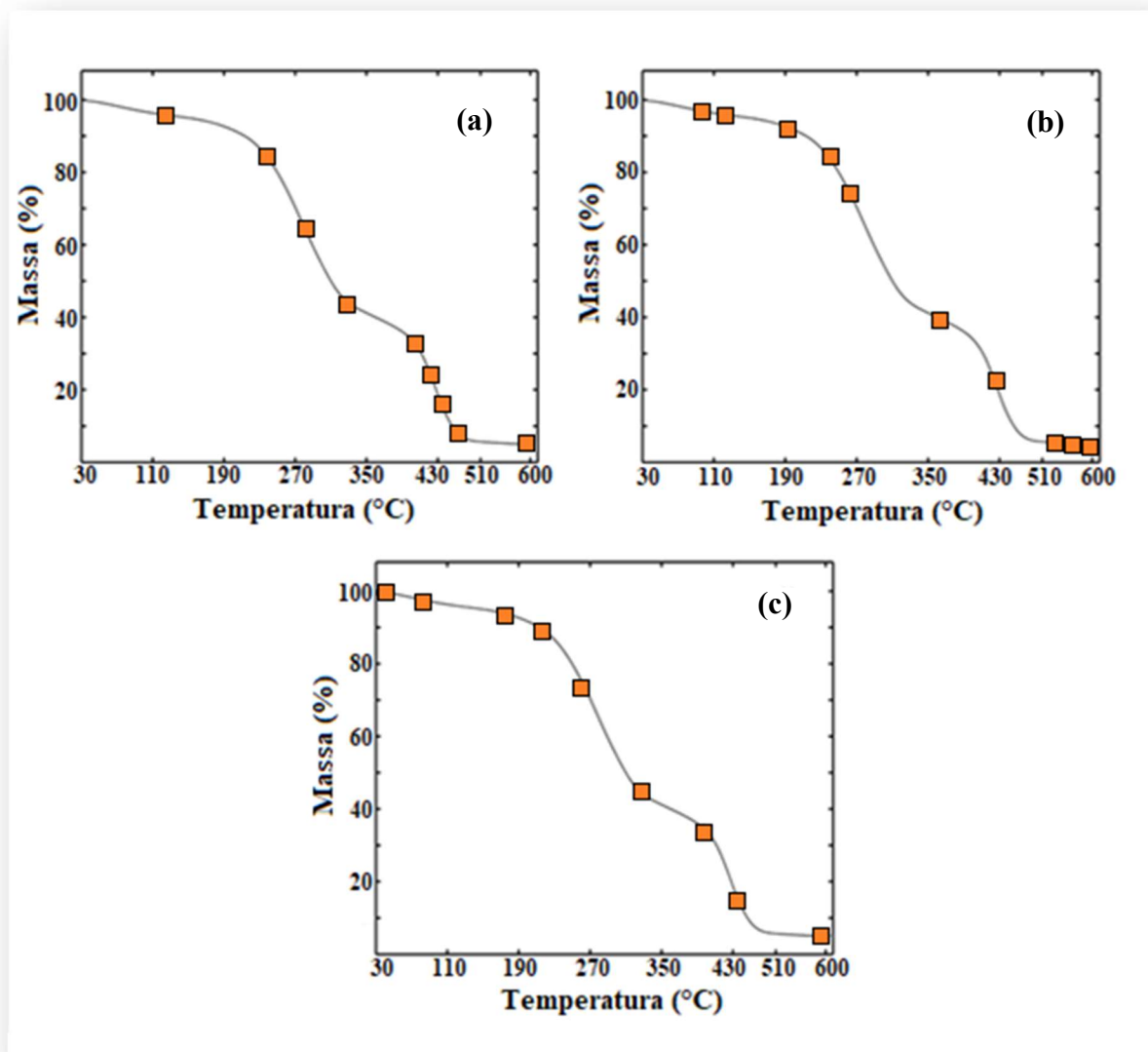


Figura 4.6 - Representação das variáveis selecionadas pelo algoritmo SPA (a), GA (b) e SW (c) para as amostras de cafés.

Como pode ser observado na **Figura 4.7**, apenas uma variável foi selecionada em torno de 300 °C pelos algoritmos SW (**Figura 4.7c**) e GA (**Figura 4.7b**), enquanto o SPA (**Figura 4.7a**) e GA selecionaram 4 variáveis em comum em torno das temperaturas 160 °C, 270 °C, 470 °C e 590 °C. Além destas, o SPA também selecionou três variáveis em comum com o SW, nas temperaturas 350 °C, 440 °C e 480 °C. No entanto, apesar de algumas variáveis terem sido selecionadas em comum, o algoritmo GA, que selecionou 10 variáveis no total, obteve a melhor performance preditiva, possivelmente por ter selecionado uma variável na faixa de temperatura 430 °C, que corresponde ao início da terceira fase de decomposição térmica relacionada a decomposição de lignina.

O desempenho dos modelos LDA obtidos com as variáveis selecionadas pode ser confirmado e visualizado através do gráfico dos escores da função discriminante (DF) dos modelos SPA/LDA, GA-LDA e SW/LDA, mostrados nas **Figuras 4.7 (a), (b) e (c)**, respectivamente.

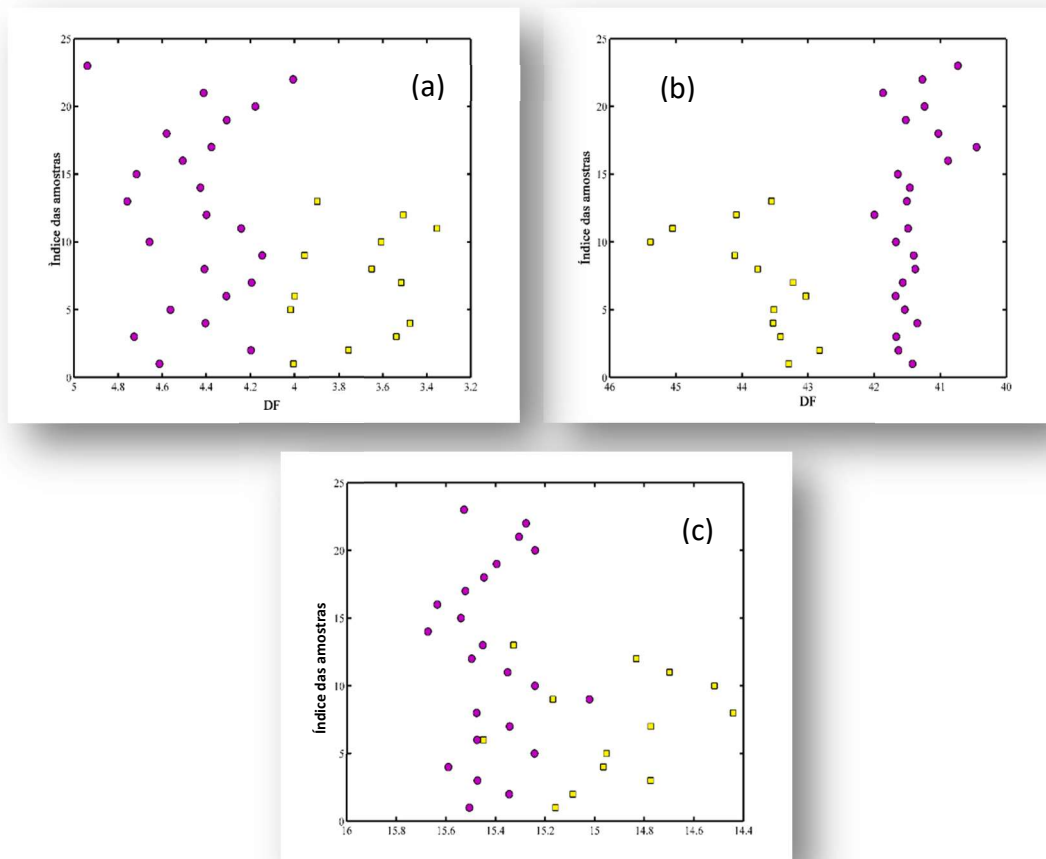


Figura 4.7 - Gráfico dos escores de índice das amostras x DF1 para os modelos SPA/LDA (a), GA/LDA (b) e SW/LDA (c), considerando 36 amostras de cafés (●: cafeinado e ■: descafeinado).

Na **Figura 4.7a** são apresentados os escores calculados da DF do modelo SPA/LDA. É possível notar que as classes das amostras de cafés estão mais próximas uma da outra, quando comparado aos escores ao longo da DF do modelo GA/LDA (**Figura 4.7b**). Além disso, essa DF também separou a classe dos cafés descafeinados, no modelo SPA/LDA, quanto ao tipo solúvel e torrado. Na **Figura 4.7b**, apresenta os escores ao longo da DF obtidos pelo modelo GA/LDA, foi possível notar uma melhor separação das classes de café, e um maior agrupamento dentro de cada classe. Já na **Figura 4.7c**, ao longo da DF uma sobreposição entre as classes das amostras de cafés é visualizada, onde duas amostras de cafés da classe

descafeinado são classificadas como cafés cafeinados, e uma amostra de café cafeinado é classificada como café descafeinado, perfazendo um total de 3 erros, sendo 2 para o conjunto de treinamento.

4.6 Considerações Finais

Dentro dos métodos de classificação e seleção de variáveis avaliados, a classificação de cafés com respeito ao tipo foi satisfatória para os três modelos SPA/LDA, GA/LDA e SPA/LDA, com altos valores de exatidão, sensibilidade e especificidade. Contudo, o modelo GA/LDA apresentou o melhor desempenho, sem registro de erro de classificação associado.

A seleção do número de variáveis pode ser a chave para uma discriminação correta das amostras. Além disso, os resultados mostraram ainda a importância de uma análise prévia dos dados para verificação de amostras anômalas.

Estes resultados indicam que a metodologia adotada mostrou ser uma alternativa promissora para o controle de qualidade deste alimento utilizando a análise termogravimétrica aliada a ferramentas quimiométricas.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5.1 Conclusões gerais

Nesta tese, foram desenvolvidos métodos analíticos para avaliar a qualidade de amostras alimentícias com propriedades funcionais de farinhas de diferentes tipos e de cafês.

No tocante ao estudo voltado à concentração dos constituintes presentes nas amostras de farinhas funcionais, as técnicas ICP OES e ICP-MS utilizadas mostraram resultados satisfatórios, devido ao caráter multielementar, rapidez nas análises e baixos valores de LOD e LOQ. Como etapa prévia para tais determinações, os procedimentos realizados para a digestão das amostras utilizando peróxido de hidrogênio combinado com ácido nítrico destilado e diluído assistidos por radiação micro-ondas mostrou-se adequado, com valores de RCCs $\leq 2.000 \text{ mg L}^{-1}$. As concentrações dos macronutrientes, micronutrientes e elementos não essenciais nas amostras analisadas atenderam à legislação vigente, sendo que as farinhas analisadas continham altas concentrações dos macroelementos: K, P, Ca e Mg, em ordem decrescente. A mesma tendência foi observada para os microelementos analisados nas amostras de farinhas, em ordem decrescente: Fe, Al, Mn, Cu, Mo e Cr. Além disso, foi possível observar que com gráfico de escores de PCA indicou que os elementos Mg, P e Cu, estão relacionados com a maior variância ao longo de PC1 e Al, K Cr e Mn com PC2. Já as variáveis Mo, Cu e As, apresentaram baixa influencia ao longo da PC2, e Cd em ambas as PC's. Assim, uma vez que o consumo de farinhas funcionais aumenta cada vez mais, a disponibilidade de métodos que possibilitem a avaliação da concentração dos constituintes inorgânicos presentes nesses alimentos é um quesito importante para garantir ao produto determinados padrões de qualidade.

Para o estudo das técnicas de transferência dos modelos de calibração entre equipamentos NIR de bancada e portátil, os resultados mostraram uma diminuição significativa nos erros de predição quando um modelo desenvolvido pelos espectros obtidos no equipamento primário foi aplicado aos espectros de predição obtidos no equipamento secundário, tanto pelo procedimento DS como RS. Os valores de RMSEP mais baixos foram encontrados após a DS usando o modelo do PLS_{espectro completo}, para a determinação da proteína bruta, enquanto que na determinação da fibra, os valores RMSEP mais baixos foram obtidos após a RS, também usando o modelo de espectro PLS_{espectro completo}. Tais modelos mostraram ser simples, rápidos, não gerar resíduos e redução de custo, proporcionando a quantificação de proteína bruta e fibras nas farinhas funcionais analisadas.

Por fim, os métodos desenvolvidos a partir da análise termogravimétrica e ferramentas quimiométricas mostraram ser simples, sem necessidade de preparo de amostras, sem geração de resíduos, além de serem de fácil implementação e de baixo custo operacional para a

identificação das classes de cafés cafeinados e descafeinados. Assim, modelos de classificação, com prévia seleção de variáveis, SPA/LDA, GA/LDA e SPA/LDA, apresentaram resultados satisfatórios na discriminação das classes dos cafés analisados, com altos valores de exatidão, sensibilidade e especificidade. Contudo, o modelo GA/LDA apresentou o melhor desempenho, sem registro de erro de classificação associado as amostras de treinamento e teste. A seleção de variáveis pode ser a fator para uma discriminação correta das amostras. Além disto, estes resultados indicam que a metodologia adotada mostrou ser uma alternativa eficaz para monitorar a qualidade de cafés.

5.2 Perspectivas

- ✓ Desenvolver modelos de classificação para amostras de cafés quanto ao tipo vencido e não vencido usando a técnica termogravimétrica.

REFERÊNCIAS

ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 30 de agosto de 2017.

ADHIHETTY, I. S. et al. Achieving transferable multivariate spectral calibration models: Demonstration with infrared spectra of thin-film dielectrics on silicon. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2329-2338, 1991 *apud* HONORATO, F. A. et al. Transferência de calibração em métodos multivariados. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1301-1312, 2007.

AGRESTI, P. D. C. M. et al. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 787-796, 2008.

AGUILAR, C. M. et al. Comparative effects of brown and golden flaxseeds on body composition, inflammation and bone remodelling biomarkers in perimenopausal overweight women. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 166-175, 2017.

ALAMAR, P. D. et al. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics. **Food Research International**, v. 85, p. 209-214, 2016.

ALEXANDER, J. et al. **Scientific Opinion on Lead in Food**, European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), **The Journal EFSA**, v. 8, p. 1570, 2010.

ALEXANDRINO, T. D. et al. Fractioning of the sunflower flour components: Physical, chemical and nutritional evaluation of the fractions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 84, p. 426-432, 2017.

ALGÜL, I.; KARA, D. Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey. **Food Chemistry**, v. 157, p. 70-76, 2014.

ALVES, L. A. A. S. et al. Production of healthier bologna type sausages using pork skin and green banana flour as a fat replacers. **Meat Science**, v. 121, p. 73-78, 2016.

AMAI, R. S. **Desenvolvimento de procedimentos para determinação de enxofre em diesel, biodiesel e óleo lubrificante usando ICP OES e ICP-MS**. 2014. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

AHMED, H. M. et al. Reduction – Carburization of the Oxides of Ni and W Towards the Synthesis of Ni-W-C Carbides. **Materials Science Forum**, v. 636-637, p. 952-962, 2010.

ANKOM Technology, **Operator's Manual: Ankom200 Fiber Analyzer**. Disponível em: <<http://agron-www.agron.iastate.edu/cpandp/SOPs/Equipment/Ankom%20A200.pdf>>. Acesso em: 16 de julho de 2017.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists – **Official Methods of Analysis**, Print book, Washington, DC, 16ª edição, 1995.

ARAÚJO, G. C. L. et al. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 2121-2132, 2002.

ARAÚJO, M. C. U. et al. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopy multicomponent analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 57, p. 65-73, 2001.

BAGCHI, T. B.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, K. Development of NIRS models to predict protein and amylose content rice and proximate compositions of rice bran. **Food Chemistry**, v. 191, p. 21-27, 2016.

BARBOSA, J. T. P. et al. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. **Food Chemistry**, v. 175, p. 212-217, 2015.

BARBOSA, I. S. **Distribuição de elementos essenciais e não essenciais em moluscos bivalves e sedimentos da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J. Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 43, n. 5, p. 772-777, 1989.

BASRI, K. N. et al. Classification and quantification of palm oil adulteration via portable NIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 335-342, 2017.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics a practical guide**. New York: John Wiley Y Sons, 1998.

BEZERRA, K. **Benefícios da farinha de centeio para o organismo**. Disponível em: <<https://www.remedio-caseiro.com/beneficios-da-farinha-de-centeio-para-o-organismo/>>. Acesso em: 25 de julho de 2017.

BHANDARE, P. Y. et al. Multivariate Determination of Glucose in Whole Blood Using Partial Least-Squares and Artificial Neural Networks Based on Mid-Infrared Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 47, n. 8, p. 1214-1221, 1993.

BIZZI, C. A. et al. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1324-1328, 2015.

BIZZI, C. A. et al. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 193-196, 2011a.

BIZZI, C. A. et al. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 394-398, 2011b.

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**, 2ª Edição, U.S.A, Perkin Elmer, 1997.

BOSSU, C. M. **Produção e caracterização de material de referência de forrageira para nutrientes e contaminantes inorgânicos**. 2013. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

BOTELHO, B. G. **Desenvolvimento e validação de métodos para análise direta de alimentos usando ferramentas quimiométricas, espectroscopia no infravermelho e imagens digitais**. 2014. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BOUVERESSE, E.; MASSART, D. L. Standardisation of nearinfrared spectrometric instruments: A review. **Vibrational Spectroscopy**, v. 11, n. 1, p. 3-15, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – **RDC nº 80, de 13 de dezembro de 2004** – Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 16 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – **RDC nº 18, de 30 de abril de 1999** – Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0OQ%2C%2C>>. Acesso em: 16 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999.** Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 3 de maio de 1999

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 354, de 18 de julho de 1996** – Norma Técnica referente a Farinha de Trigo, Brasília, DF, 1996. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/354_96.htm>. Acesso em: 16 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução CNNPA nº 12, de 1978.** Normas Técnicas Especiais, São Paulo, SP, 1978.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.** University of Bristol, UK, 2003.

BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist? **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 185-194, 2003.

BROWN, M. E. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications.** 2ª Edição, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001.

CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRA, F. **Encyclopedia of Food and Health.** V. 1: A-Che. Elsevier, 2016.

CALISKAN, O. **Mediterranean Figs (*Ficus carica* L.): Functional Food Properties.** Department of Horticulture, Mustafa Kemal University, Antakya-Hatay, Turkey. Chapter 56, p. 629-637, 2015.

CANECA, A. R. et al. Assessment of infrared spectroscopy and multivariate techniques for monitoring the service condition of diesel-engine lubricating oils. **Talanta**, v. 70, n. 2, p. 344-352, 2006.

CHAUHAN, A.; SAXENA, D.; SINGH, S. Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus spp.*) flour. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 939-945, 2015.

CHEN, J. et al. Investigation of co-combustion characteristics of sewage sludge and coffee grounds mixtures using thermogravimetric analysis coupled to artificial neural networks modeling. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 234-245, 2017.

CIRILLI, M. et al. On-field monitoring of fruit ripening evolution and quality parameters in olive mutants using a portable NIR-AOTF device. **Food Chemistry**, v. 199, p. 96-104, 2016.

COELHO, E. M. et al. Passion fruit peel flour – Technological properties and application in food products. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 158-164, 2017.

CONNEL, S. D.; JAIN, A. K. Template-based online character recognition. **Pattern Recognition**, v. 34, p. 1-14, 2001.

CORTIVO, Z. D. **Análise discriminante linear de *fisher* combinada com algoritmo *k*-segmentos**. 2015. Tese (Doutorado em Métodos Numéricos em Engenharia). Pós graduação em Métodos Numéricos em Engenharia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

COSCUETA, E. R. et al. Continuous method to determine the trypsin inhibitor activity in soybean flour. **Food Chemistry**, v. 214, p. 156-161, 2017.

COSTA FILHO, P. A. **Estudo comparativo de técnicas de inteligência artificial e métodos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo**. 2003. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, UNICAMP, Campinas.

CZIPA, N.; ANDRÁSI, D.; KOVÁCS, B. Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. **Food Chemistry**, v. 175, p. 536-542, 2015.

DANKOWSKA, A.; DOMAGALA, A.; KOWALEWSKI, W. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies. **Talanta**, 2017. DOI: 10.1016 / j.talanta.2017.05.036.

DE MAESSCHALCK, R.; JOUAN-RIMBAUD, D.; MASSART, D. L. The Mahalanobis distance. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 50, n. 1, p. 1-18, 2000.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. Material de apoio técnico, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DESPAGNE, F.; MASSART, D. L.; CHABOT, P. Development of a robust calibration model for nonlinear in-line process data. **Analytical Chemistry**, v.72, n. 7, p. 1657-1665, 2000 *apud*

HONORATO, F. A. et al. Transferência de calibração em métodos multivariados. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1301-1312, 2007.

DIONÍSIO, A. G. G. **Avaliação de Técnicas com Plasma Acoplado Indutivamente para determinação de constituintes inorgânicos no ciclo produtivo do frango de corte e iodo em sal de cozinha**. 2013. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

DRAKOS, A. et al. Influence of jet milling and particle size on the composition, physicochemical and mechanical properties of barley and rye flours. **Food Chemistry**, v. 215, p. 326-332, 2017.

DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. **Pattern Classification**, New York, John Wiley, 2001.

DZIKI, D. et al. Ground green coffee beans as a functional food supplement – Preliminary study. **LTW – Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 691-699, 2015.

DZIUBANEK, G. et al. Contamination of food crops grown on soils with elevated heavy metals content. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 183-189, 2015.

EL-SWEIFY, F.H.; METWALLY, E.; ABDEL-KHALIK, H. Simultaneous multi-element analysis of some edible pulses using neutron activation analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 491-496, 2007.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, p. 488-495, 2012.

LAFUENTE-LAFUENTE, C. et al. Effects of an evening single cup of coffee on the quality of sleep in caffeine-sensitive patients: a randomised cross-over trial. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 60, 2008.

FAO/WHO. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations **Evaluation of certain food additives and contaminants**. Technical Report Serie n. 966, p. 7-17, 2011.

FAO/WHO. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**, second ed., Bangkok, 1998.

FDA. Guidance for Industry: **A Food Labeling Guide** (14. Appendix F: Calculate the Percent Daily Value for the Appropriate Nutrients), 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm064928.htm>>. Acesso em: 16 de julho de 2017.

FDA. Food and Drug Administration, **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods**, 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409>>. Acesso em: 16 de julho de 2017.

FEARN, T. Standardization and calibration transfer for near infrared instruments: a review. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 9, p. 229-244, 2001.

FRANCISCO-FERNÁNDEZ, M. et al. A comprehensive classification of wood from thermogravimetric curves. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 118, p. 159-172, 2012.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. Editora Unicamp, Edição 1, 2015.

FERREIRA, S. L. C. et al. Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices - A review. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 227-236, 2015.

FERREIRA, M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 12-15, 1999.

FEUDALE, R. N. et al. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 64, p. 181-192, 2002.

FLEMING, D. E. B. et al. Portable x-ray fluorescence for assessing trace elements in rice and rice products: Comparison with inductively coupled plasma-mass spectrometry, **Applied Radiation and Isotopes**, v. 104, p. 217-223, 2015.

FORINA, M. et al. Stepwise orthogonization of predictors in classification and regression techniques: An “old” technique revisited. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 87, p. 252-261, 2007

FORINA, M.; LANTERI, S.; CASALE, M. Multivariate calibration: Review. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 61-93, 2007.

FOWLER, B. A.; ALEXANDER, J.; OSKARSSON, A. **Chapter 6 - Toxic Metals in Food**. Handbook on the Toxicology of Metals. Fourth Edition, 1(General Considerations), p. 123-140, 2015.

GALVÃO, R. K. H. et al. A method for calibration and validation subset partitioning. **Talanta**, v. 67, n. 4, p. 736-740, 2005.

GALVÃO, R. K. H. et al. Cross-validation for the selection of spectral variables using the successive projections algorithm. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1580-1584, 2007.

GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U. 3.05 - Variable Selection. In: WALCZAK, S. D. B. T. (Ed.). **Comprehensive Chemometrics**. Oxford: Elsevier, 2009. p. 233-283. ISBN 978-0-444-52701-1.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

GOMEZ-CAMINERO, A. et al. **Arsenic and arsenic compounds**, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Environmental Health Criteria 224, second ed., Geneva, 2001.

GOMES-CARAVACA, A. M.; MAGGIO, R. M.; CERRETANI, L. Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 913, p. 1-21, 2016.

GONZÁLEZ, A. G. et al. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. **Food Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 93-101, 2001.

GOUVEIA, S. T. et al. Determination of residual carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configuration. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, n. 2, p. 269-275, 2001.

HENN, R.; SCHWAB, A.; HUCK, C. W. Evaluation of benchtop versus portable near-infrared spectroscopic method combined with multivariate approaches for the fast and simultaneous quantitative analysis of main sugars in syrup formulations. **Food Control**, v. 68, p. 97-104, 2016.

HIGUCHI, K.; OHKAWARA, Y. Determination of Potassium, Magnesium and Calcium Ions in Lettuce by Ion Chromatography. **BUNSEKI KAGAKU**, v. 64, n. 5, p. 337-340, 2015.

HIBBERT, D. B. Genetic Algorithms in Chemistry. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 19, p. 277-293, 1993.

HONORATO, F. A. et al. Transferência de calibração em métodos multivariados. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1301-1312, 2007.

HUANG, H. et al. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n.3, p. 303-313, 2008.

HUANG, J. H.; ILGEN, G.; FECHER, P. Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains†. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n.6 p. 800-802, 2010.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo, 2008. Disponível em: < http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 16 de julho de 2017.

JAN, S.; GHOROI, C.; SAXENA, D. C. Efeito do tamanho da partícula, forma e rugosidade da superfície nas propriedades em massa e cisalhamento da farinha de arroz. **Journal of Cereal Science**, v. 76, p. 215-221, 2017.

JOLLIFFE, I. T. **Principal Component Analysis**. New York: Springer-Verlag, 1986.

JULIANTI, E. et al. Functional and rheological properties of composite flour from sweet potato, maize, soybean and xanthan gum. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 2, p. 171-177, 2017.

JÚNIOR, J. B. P.; DANTAS, G. F. D. Evaluation of inorganic elements in cat's claw teas using ICP OES and GF AAS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 331-337, 2016.

KAUR, M.; SINGH, V.; KAUR, R. Effect of partial replacement of wheat flour with varying levels of flaxseed flour on physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of cookies. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 9, p. 14-20, 2017.

KARLSSON, S.; SJÖBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*). **Talanta**, v. 135, p. 124-132, 2015.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

KHANMOHAMMADI, K. et al. Simultaneous determination of paracetamol and codeine phosphate in tablets by TGA and chemometrics. **Thermochimica Acta**, v. 530, p. 128-132, 2012.

KOHLMEIER, M. **Nutrient Metabolism – Structures, Functions, and Genes**, Elsevier, Segunda Edição, 2015.

KORN, M. G. A. et al. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods - A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 67-92, 2008.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Primeira Edição. Piracicaba, 2008.

KÜSTER-BOLUDA, I.; VIDAL-CAPILLA, I. Consumer attitudes in the election of functional foods. **Spanish Journal of Marketing - ESIC**, <https://doi.org/10.1016/j.sjme.2017.05.002>, 2017.

KUZMANOVSKI, I.; ALEKSOVSKA, S. Optimization of artificial neural networks for prediction of the unit cell parameters in orthorhombic perovskites. Comparison with multiple linear regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 67, n. 2, p. 167-174, 2003.

LEARDI, R. Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: a review. **Journal of Chemometrics**, v. 15, p. 559-569, 2001.

LEI, B. et al. Distribution of Cadmium-Binding Components in Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 814-821, 2003.

LEAO, D. J. et al. Simultaneous determination of cadmium, iron and tin in canned foods using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 153, p. 45-50, 2016.

LI, G; ZHU, F. Physicochemical properties of quinoa flour as affected by starch interactions. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1560-1568, 2017.

LIMA F. S. G.; BORGES, L. E. P. Evaluation of standardisation methods of near infrared calibration models. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 10, n.4, p. 269-278, 2002.

LIRA, L. F. B. **Desenvolvimento de métodos analíticos para monitoramento de qualidade do Biodiesel e suas misturas**. 2010. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal do Pernambuco, Recife.

LOGANATHAN, S. et al. Chapter 4 - Thermogravimetric analysis for characterization of nanomaterials, **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization, A volume in Micro and Nano Technologies**, 2017.

MABOOD, F. et al. Determination of sucrose in date fruits (*Phoenix dactylifera* L.) growing in the Sultanate of Oman by NIR spectroscopy and multivariate calibration. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 170-174, 2015.

MACDIARMID, J. I. et al. "It was na education in portion size". Experience of eating a healthy diet and barriers to long term dietary change. **Appetite**, v. 71, p. 411-419, 2013.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais**, São Paulo, 2002.

MAGWAZA, L. S. et al. Development of NIRS models for rapid quantification of protein content in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) LAM. **LWT – Food Science and Technology**, v. 72, p. 63-70, 2016.

MARTHE, D. B.; AUGUSTI, R.; COSTA, L. M. Influence of the Lipid Phase Removal on the Quantification of Cu, Fe and Zn Bound to Proteins from Golden Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 8, p. 1718-1724, 2015.

MARQUES, E. J. N. et al. Rapid and non-destructive determination of quality parameters in the 'Tommy Atkins' mango using a novel handheld near infrared spectrometer. **Food Chemistry**, v. 197, Part B, p. 1207-1214, 2016.

MARTENS, H.; JENSEN, S. A.; GELADI, P. **Multivariate linearity transformations for near infrared reflectance spectroscopy**, in: O.H.J. Christie (Editor), Proc. Nordic Symp. Applied Statistics, Stokkland Forlag, Stavanger, Norway, p. 205–234, 1983.

MARTÍNEZ, R. et al. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1520-1526, 2012.

MASSART, D. L et al. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Data Handling in Science and Technology, v. 20A. Elsevier, Amsterdam, 1997.

MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**, Editor J. D. Winefordner, v. 162, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.

MORALES-MEDINA, R. et al. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. **Food Chemistry**, v. 194, n. 1, p. 1208-1216, 2015.

MOTA, R. V. et al. Composition and Functional Properties of Banana Flour from Different Varieties. **Starch – Biosynthesis, Nutrition, Biomedical**, v. 52, n. 2–3, p. 63-68, 2000.

MULLER, E. I. et al. Green microwave-assisted wet digestion method of carbohydrate-rich foods with hydrogen peroxide using single reaction chamber and further elemental determination using ICP-OES and ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 257-261, 2017.

NAES, T. et al. A user-friendly guide to Multivariate Calibration on Classification, Chichester-UK, NIR Publications, 2002.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

NIÑO-MEDINA, G. et al. Structure and content of phenolics in eggplant (*Solanum melongena*) - a review. **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 161-169, 2017.

NOORD O. E. Multivariate calibration standardization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 25, p. 85-97, 1994.

NZIKOU, J. M. et al. Chemical composition on the seeds and oil of sesame (*Sesamum indicum* L.) grown in Congo-Brazzaville. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.1, n. 1, p. 6-11, 2009.

OHKI, A. et al. A simple method of the recovery of selenium from food samples for the determination by ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 693-698, 2016.

OJEDA, A. G. et al. Molybdenum and Copper in Four Varieties of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): New Data of Potential Utility in Designing Healthy Diet for Diabetic Patients. **Biological Trace Element Research**, v. 163, n. 1-2, p. 244-254, 2015.

- OLIVEIRA, A. A. et al. Avaliação de ICP OES com configuração axial ou radial para determinação de iodo em sal de cozinha. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1299-1305, 2012.
- OLIVEIRA-ALVES, S. C. et al. Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. **Food Chemistry**, v. 232, p. 295-305, 2017.
- OLIVERI, P.; DOWNEY, G. Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.35, p. 74-86, 2012.
- OLIVIERI, A. C. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 8, p. 10-22, 2015.
- ORECCHIO, S. et al. Determination of trace elements in gluten-free food for celiac people by ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 163-172, 2014.
- OTERO, R. L. S. et al. Thermogravimetric determination of l-ascorbic acid in non-effervescent formulations using multiple linear regression with temperature selection by the successive projections algorithm. **Thermochimica Acta**, v. 526, n. 1-2, p. 200-204, 2011.
- PAN, W.-H. et al. Vegetable, fruit, and phytonutrient consumption patterns in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, In press, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.015>, 2017.
- PANCHUK, V. et al. Calibration transfer between different analytical methods. **Talanta**, v. 170, p. 457-463, 2017.
- PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.
- PEARSON, K. 'On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space', *Philosophical Magazine* 2:, v. 2, p. 559-572, 1901.
- PEREIRA, J. G. et al. Termogravimetria: um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio em cascas de ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1661-1666, 2009.
- PEREIRA, C. A.; SCHNITZLER, E.; FILHO, M. A. S. Estudo termoanalítico (TG, DTG, e DSC) dos cafés *in natura* e processados. **Ciências Exatas e da Terra**, v.11, n. 1, p. 61-66, 2005.

PERUCHI, L. C. et al. Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 100, p. 129-136, 2014.

PLANS, M. et al. Characterization of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by infrared spectroscopy: Comparison of MIR, FT-NIR and dispersive NIR using portable and benchtop instruments. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1643-1651, 2013.

PONTES, M. J. C. **Algoritmo das Projeções Sucessivas para Seleção de Variáveis Espectrais em Problemas de Classificação**. 2009. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PONTES, M. J. C. et al. The successive projections algorithm for spectral variable selection in classification problems. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, n. 1-2, p. 11-18, 2005.

PREEDY, V. R. Coffee in health and disease prevention. Copyright© **Elsevier Inc**, 2015.

PROENÇA, R. P. C. Alimentação e globalização: algumas reflexões. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 4, p. 43-47, 2010.

PU, F.; CHEN, N.; XUE, S. Calcium intake, calcium homeostasis and health. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n.1, p. 8-16, 2016.

RAMBO, M. K. D. et al. Estudo de análise termogravimétrica de diferentes biomassas lignocelulósicas utilizando a análise por componentes principais. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 862-868, 2015.

RIBEIRO, M. P. **Avaliação do petróleo por termogravimetria para simulação de curva PEV, fator de caracterização e resíduo de carbono**. 2014. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia do Petróleo). Departamento de Ciência e Engenharia do Petróleo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

RINNAN, A.; BERG, F. van den; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

RISOLUTI, R. et al. Thermogravimetric analysis coupled with chemometrics as a powerful predictive tool for β -thalassemia screening. **Talanta**, v. 159, p. 425-432, 2016.

ROMANO, A. et al., Impact of transglutaminase treatment on properties and *in vitro* digestibility of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. **Food Research International**, v. 88, Part B, p. 239-246, 2016.

SALGUERO-CHAPARRO, L. et al. Calibration transfer of intact olive NIR spectra between a pre-dispersive instrument and a portable spectrometer, **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 96, p. 202-208, 2013.

SÁNCHEZ, M.-T. et al. Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 2, p. 130-135, 2011.

SÁNCHEZ, M.-T.; HABA, M.-J. D.; PÉREZ-MARÍN, D. Internal and external quality assessment of mandarins on-tree and at harvest using a portable NIR spectrophotometer. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 92, p. 66-74, 2013.

SANDHU, K. S. et al. Effect of toasting on physical, functional and antioxidant properties of flour from oat (*Avena sativa* L.) cultivars. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n. 2, p. 197-203, 2017.

SARAWONG, C. et al. Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. **Food Chemistry**, v. 143, p. 33-39, 2014.

SATO, K. et al. Estimation of daily aluminum intake in Japan based on food consumption inspection results: impact of food additives. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 389-397, 2014.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964.

SHAHBAZI, Y.; AHMADI, F.; FAKHARI, F. Voltammetric determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in milk and dairy products collected from Iran: An emphasis on permissible limits and risk assessment of exposure to heavy metals. **Food Chemistry**, v. 192, n. 1, p. 1060-1067, 2016.

SHAN, J. et al. Chlorogenic acid (CGA) determination in roasted coffee beans by Near Infrared (NIR) spectroscopy. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 7, n. 4, p. 139-142, 2014.

SHARIF, K. et al. Coffee and autoimmunity: More than a mere hot beverage! **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 7, p. 712-721, 2017.

SIEGRIST, M. et al. Worlds apart. Consumer acceptance of functional foods and beverages in Germany and China. **Appetite**, v. 92, n. 1, p. 87-93, 2015.

SILVA, N. C. et al. Standardization from a benchtop to a handheld NIR spectrometer using mathematically mixed NIR spectra to determine fuel quality parameters. **Analytica Chimica Acta**, v. 954, p. 32-42, 2017.

SILVA, N. C. et al. Classification of Brazilian and foreign gasolines adulterated with alcohol using infrared spectroscopy. **Forensic Science Internacional**, v. 253, p. 33-42, 2015.

SIMÕES, J. et al. Thermal stability of spent coffee ground polysaccharides: galactomannans and arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 256-264, 2014.

SOARES, S. F. C. **Um novo método para transferência de modelos de calibração NIR e uma nova estratégia para classificação de sementes de algodão usando imagem hiperespectral NIR**. 2016. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SOARES, S. F. C. et al. The successive projections algorithm. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 84-98, 2013.

SOUTO, U. T. C. P. et al. Screening for Coffee Adulteration Using Digital Images and SPALDA. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 6, p. 1515-1521, 2015.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. 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. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of Analytical Chemistry**, Cengage Learning, 9ª Edição, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**, Tradução da 6ª Edição, editora Bookman, Porto Alegre, 2009.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, São Paulo, 2006.

TEJERA, R. L. et al. Metals in wheat flour; comparative study and safety control. **Nutricion Hospitalaria**, v. 28, n. 2, p. 506-513, 2013.

TEÓFILO, R. F., **Métodos Quimiométricos: Uma Visão Geral – Conceitos básicos de quimiometria**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

THERMO SCIENTIFIC. **Thermo Scientific iCAP 6000 Series ICP: A Dramatically Different Approach to ICP Optical Design**, Technical Note: 40985, 2009.

THOMSEN, V. Spectral background radiation and the “background equivalent concentration” in elemental spectrochemistry. **Spectroscopy**, v. 27, p. 1-7, 2012.

TODOLÍ, J. L.; GRAS, L.; HERNANDIS, V.; MORA, J. Elemental matrix effects in ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, n. 2, p.142-169, 2002.

TOLEDO, P. R. A. B.; MELO, M. M. R.; PEZZA, H. R.; TOCI, A. T.; PEZZA, L.; SILVA, C. M. Discriminant analysis for unveiling the origin of roasted coffee samples: A tool for quality control of coffee related products, **Food Control**, 73, 164-174, 2017.

TOMAS, R. **Practical Guide to ICP-MS**, Scientific Solutions Gaithersburg, Maryland, U.S. A., 2013.

TORREZAN, R. **Qualidade**, 2017. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid3s5b602wyiv80z4s473ozptfmu.html>. Acesso em 16 de julho de 2016.

TREVIZAN, L. C. **Avaliação das condições operacionais de espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial**. 2007. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

TURAN, D.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. Investigating the effect of roasting on functional properties of defatted hazelnut flour by response surface methodology (RSM). **LTW – Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 758-765, 2015.

UNDERWOOD, E. J. **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**. Department of Animal Science and Production, University of Western Australia. Quarta Edição, 1977.

VERDÚ, S.; BARAT, J. M.; GRAU, R. Improving bread-making processing phases of fibre-rich formulas using chia (*Salvia hispanica*) seed flour. **LWT – Food Science and Technology**, v. 84, p. 419-425, 2017.

VRČEK, I. V. et al. A comparison of the nutritional value and food safety of organically and conventionally produced wheat flours. **Food Chemistry**, v. 143, p. 522-529, 2014.

XIAO, Y. et al. Effect of solid-state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 on physicochemical and functional properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, p. 1317-1324, 2015.

XIAOBO, Z. et al. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 667, n. 1-2, p. 14-32, 2010.

WANG, Y.; VELTKAMP, D. J.; KOWALSKI, B. R. Multivariate instrument standardization. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 2750-2756, 1991.

OMS – Organização Mundial da Saúde - World Health Organization. **Healthy diet. Fact sheet N° 394**, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/>>. Acesso em: 16 de julho de 2016.

WILLIAMS, P. C.; NORRIS, K. **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn., 2ª Edição, 2001.

WOLD, S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models. **Pattern Recognition**, v. 8, n. 3, p. 127-139, 1976.

WORKMAN, J. J.; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**, CRC Press, New York, 2007.

WORKMAN Jr, J. J.; BURNS, D. A.; CIURCZAK E.W. **Handbook of Near-Infrared Analysis**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.

WORKMAN, J. J. Interpretive Spectroscopy for Near Infrared. **Applied Spectroscopy**, 1996, v. 31, n. 3, p. 251-320, 2006.

WRUSS, J. et al. Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 46-55, 2015.

YILDIZ, E. et al. A new chelating reagent and application for coprecipitation of some metals in food samples by FAAS. **Food Chemistry**, v. 194, p. 143-148, 2016.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico químicos para análise de alimentos**, coord., IAL Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, edição IV, primeira edição digital, 2008.

ZHANG, N. et al. Multielemental analysis of botanical samples by ICP-OES and ICP-MS with focused infrared lightwave ashing for sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 68-77, 2017.

ZOUARI, R. et al. Cookies from composite wheat–sesame peels flours: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. **Food Chemistry**, v. 194, p. 758-769, 2016.

APÊNDICES



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

Determination of inorganic constituents and physicochemical characterization of functional flour samples



Anna Luiza B. Brito^a, Aline F. Oliveira^{b,c}, Ana Rita A. Nogueira^b, Amália G.G. Pessoa^d, Liliana F.B.L. Pontes^{a,*}

^a Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^b Embrapa Pecuária Sudeste, P.O. Box 339, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^c Group of Applied Instrumental Analysis, Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, P.O. Box 676, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

^d Group of Research in Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, P.O. Box 40170-115, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2016

Received in revised form 21 January 2017

Accepted 21 January 2017

Available online 25 January 2017

Keywords:

Functional flour

Spectroanalytical techniques

Principal component analysis

Macro and micronutrients

ABSTRACT

The increased consumption of foods with functional properties without the health surveillance agency approval of the label has led to public concern, becoming necessary to monitor the quality of this product type to ensure the benefit of its consumption. In this work 60 functional flours of 20 different types were evaluated using spectroanalytical techniques to determine macronutrients, micronutrients, and non-essential elements. Additionally, analysis of crude protein determination was performed. Greater concentrations of macronutrients ($K > P > Ca > Mg$) ranging from 746.4 up to 30,328 $mg\ kg^{-1}$ were observed. Micronutrients (in descending order for Fe, Al, Mn, Cu, Mo, and Cr) concentrations ranged from 0.03 up to 160.1 $mg\ kg^{-1}$. Otherwise, the non-essential elements, As, Cd, and Pb detected in some of the evaluated flours met legal requirements. Principal Component Analysis (PCA) was applied to evaluate the significance of the variables (elements).

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, the pursue for a better quality of life has led to an increase in the consumption of fruits and vegetables due to their essential nutrients, fibers, and other constituents present in this food-type [1]. These foods can be eaten *in natura* or submitted to a processing step aiming to intensify or create a specific characteristic, such as dehydration to concentrate fibers and/or nutrient content, to increase shelf life. These processed foods consumed for health purposes are named “functional foods,” and are commercialized with the appeal of being healthier. For this reason, they tend to be more expensive than similar products without these characteristics [2]. According to the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA), a functional food or a food claimed to be healthy, is “the food or ingredient which, besides the basic nutritive functions when consumed as part of the daily diet, has metabolic or physiological effects, or health benefits, provided that they are consumed under medical supervision” [3].

Different functional foods are found in many categories. Among these foods, guava, mango, pineapple, and passion fruit peel are known for their antioxidant properties, antimicrobial activities, and for being valuable sources of dietetic fiber [4]. Another functional food is amaranth flour, known for its antioxidant activity, attributed to its

content of polyphenols, anthocyanins, flavonoids, and tocopherols [5]. Flour is part of the diet in many countries due to its relatively low price, the source of carbohydrates, essential nutrients, and fibers, promoting benefits to human health [5]. Flour is the product obtained from a manual or instrumental milling of vegetables and/or grains [6]. All these foods contain essential nutrients that, when consumed in a recommended dose, benefit the digestive system. On the other hand, the presence of non-essential elements is a concern when taken over a long term.

Micronutrients, such as Fe, Zn, Mn, and Cu, are essential for human health in low concentrations, while macronutrients, such as Na, K, Ca, and Mg, are required in higher concentrations [7]. The other elements such as Pb, Cd, Hg, and As are considered non-essential elements and can cause severe injury to human health depending on the concentration and bioavailable chemical species [8,9]. The upper limits recommended for macro, and micronutrients in foods have been established by different health and food safety agencies worldwide [10–14]. Another critical analysis in foods is the determination of crude protein, which is present in food packaging and can be used as parameters to evaluate “healthy” food. Higher protein content and lower caloric value is considered ideal for a balanced diet.

We present the evaluation of different types of functional flours by analyzing the physicochemical parameter crude protein using the classical procedure, and inorganic constituents determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Using present

* Corresponding author at: Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Química, Laboratório de Combustíveis e Materiais, 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil.

E-mail address: liliana.lira@quimica.ufpb.br (L.F.B.L. Pontes).



Cite this: DOI: 10.1039/c7ay00391a

Calibration transfer of flour NIR spectra between benchtop and portable instruments

Anna Luiza Bizerra Brito,^a Ada Vivianny Pereira Santos,^a Karla Danielle Tavares Melo Milanez,^a Márcio José Coelho Pontes^a and Liliana Fátima Bezerra Lira Pontes^{a,b}

This work reports on the use of different strategies of calibration transfer to determine crude protein and fiber properties in samples of functional flours analyzed with benchtop (primary) and portable (secondary) NIR instruments. For this purpose, methods of direct standardization (DS) and reverse standardization (RS) were used on a different number of transfer samples. Calibration models based on the following regression strategies were evaluated: partial least squares using a full spectrum (PLS_{full spectrum}); PLS with significant regression coefficients selected by the Jack-Knife algorithm (PLS/JK) and multiple linear regression (MLR) with previous selection of variables by the successive projection algorithm (MLR/SPA). The performance of calibration models was assessed according to Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) values obtained in a prediction subset measured on a secondary instrument before and after standardization procedures. Before standardization, all the calibration models presented high RMSEP values for the prediction samples measured on the secondary instrument to determine both crude protein and fibers. After the direct standardization, a considerable decrease of the RMSEP values was observed in the PLS_{full spectrum} and MLR/SPA calibration models developed for crude protein determination. For fiber determination, the lowest RMSEP value was obtained using the PLS_{full spectrum} model with RS, although no statistically significant difference was found between the RMSEP values obtained for PLS/JK and MLR/SPA models.

Received 14th February 2017
Accepted 26th April 2017

DOI: 10.1039/c7ay00391a

rsc.li/methods

Introduction

Near infrared (NIR) spectroscopy has been successfully applied in the evaluation of quality parameters in food matrices.¹ NIR spectroscopy is able to provide qualitative and quantitative information on many components present in the matrix. In addition, it is a fast and non-destructive technique and does not require pretreatment of the samples.²

Technological innovations have enabled the development of portable NIR instruments, which present lower cost and greater ease of adaptation to different analytical conditions, making it easier to use this technique in many contexts.³ Many studies have been carried out using portable NIR instruments for the evaluation of quality parameters,^{3–8} maturation stage monitoring⁹ and identification of adulteration in many types of foods.¹⁰

Complications related to the use of portable NIR equipment appear when calibration models previously developed from benchtop NIR instruments are incorrectly applied to data

obtained from portable instruments. Inadequate predictions can be obtained due to the differences between their instrumental responses.¹¹ In these cases, a solution is the transfer of calibration models, which can be performed by a standardization of the spectral responses. This standardization consists of a correction in the differences between the instrumental responses of the equipment involved by adapting the response function of one of the instruments.¹²

Several methods of calibration model transfer have been reported in the literature,¹³ among which are direct standardization (DS)¹⁴ and reverse standardization (RS).¹² In both cases, spectra of a representative sample set, known as *transfer samples*, are recorded in the two instruments to find an adjustment function that estimates the differences between the instrumental responses of the equipment involved, and thus uses it in the standardization procedures.¹⁵ In the DS method, this adjustment function is used to standardize the response of a secondary instrument to match the response of a primary instrument, for which the model was developed.¹² For this, the spectra containing all the wavelengths obtained from the secondary instrument are related to each wavelength of the spectra obtained from the primary instrument.¹⁶ In RS, the adjustment function is used to standardize the calibration set of the primary instrument. This standardized set is used in the development of a calibration

^aDepartment of Chemistry, Federal University of Paraíba, 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

^bUniversidade Federal da Paraíba, Departamento de Química, Laboratório de Combustíveis e Materiais, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil. E-mail: liliana.lira@quimica.ufpb.br; Fax: +55 83 3216 7441; Tel: +55 83 3216 7441