



HAL
open science

Détermination des paramètres de qualité du fruit de la passion (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) par spectroscopie moyen et proche infrarouge et analyses statistiques multivariées

Gabrieli Alves De Alves de Oliveira Oliveira

► To cite this version:

Gabrieli Alves De Alves de Oliveira Oliveira. Détermination des paramètres de qualité du fruit de la passion (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) par spectroscopie moyen et proche infrarouge et analyses statistiques multivariées. Sciences de la Terre. Université d'Avignon; Universidade federal do Paraná (Brésil), 2014. Français. NNT : 2014AVIG0659 . tel-01124360

HAL Id: tel-01124360

<https://theses.hal.science/tel-01124360>

Submitted on 29 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELI ALVES DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DO MARACUJÁ
(*Passiflora edulis f. Flavicarpa*) POR ESPECTROSCOPIA MID E NIR E
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

CURITIBA

2014

GABRIELI ALVES DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DO MARACUJÁ
(*Passiflora edulis f. Flavicarpa*) POR ESPECTROSCOPIA MID E NIR E
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Tese apresentada ao curso de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos,
Setor de Tecnologia, Universidade Federal
do Paraná, e à Ecole Doctoral Sciences des
Procédés, Science des Aliments de
l'Université d'Avignon et Pays de Vaucluse
como requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Engenharia de Alimentos
e Docteur en Science Agronomiques.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda de
Castilhos

Coorientadora: Profa. Dra. Catherine Marie-
Geneviève Claire Renard

CURITIBA

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial à minha mãe

MARIA RIBEIRO DA SILVA, quem me fez chegar até aqui e também...

...Para as pessoas que quando olho para trás sinto saudades...

...Para aquelas pessoas que me deram uma força quando eu estava “quase cansada”...

...Para aquelas pessoas, que não tem medo de lutar e enfrentar os obstáculos...

... e principalmente as pessoas que acreditam que a educação pode mudar o futuro de muitos, até mesmo de um país...

Nossa vida é um caminho cheio de surpresas e incertezas, as quais ninguém é capaz de prever, por isso mais importante do que se tem na vida é quem temos na vida. Todas as pessoas importantes que fizeram e fazem a diferença na minha vida, dedico !!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao **Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos** da Universidade Federal do Paraná; pela disponibilização de recursos físicos, humanos e financeiros para a realização deste trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa durante todo o período. Gostaria de direcionar esse agradecimento à professora Dra. **Agnes**, pelo apoio todas as vezes que precisei, e pela oportunidade cedida para o doutorado sanduíche.

À **Université d'Avignon et Pays de Vaucluse**; à UMR-408 do Institute National de Recherche Agronomique-Avignon. Merci beaucoup pour m'accepter pour six mois, il fait une grand différence dans ma formation professionnelle et personnelle. Un remercie spécial à **Catherine Renard** et **Sylvie Bureau** pour l'accueil et les enseignements.

À minha querida orientadora professora **Fernanda de Castilhos**, que contribuiu significativamente para a minha formação e me ensinou o que é ser uma pesquisadora. Pela paciência, conselhos e amizade nesses quatro anos. Quero um dia poder ser uma boa orientadora e professora como você.

Ao professor **Patrício Zamora** por me apresentar a “calibração multivariada”, pelo auxílio e atenção todas as vezes que precisei.

À minha parceira de trabalho **Milene**, que esteve sempre ao meu lado. Obrigada pela dedicação nos dias árduos de laboratório, pela companhia nos almoços e principalmente, pelas confidências e conversas que me faziam tão bem.

A todos os amigos PPGEAL, em especial a **Fabiane, Cátia, Ana Mery e Valesca** pela alegria, pelas boas conversas, pela companhia durante os quatro anos. Ao **Eriel** pelos momentos de descontração, risadas e apoio no laboratório.

Des amis em France, **Cecile, Noemi, Faten** et **Mingzhi** vous avons été ma famille pour six mois, Je vais toujours vous garde dans mon coeur.

Aos laboratórios e funcionários que colaboraram com esta pesquisa, em especial ao Laboratório de Anatomia e Identificação da Madeira (**Professora Dra. Silvana**),

LACAUT - Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (**Dra. Lílian Cocco**), CEPPA - Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (**Professora Dra. Maria Lúcia Masson**). Ao laboratório de Securite e Qualité des Aliments (**Caroline Garcia, David Page et Marielle**), Laboratório de Química Analítica e Alimentos (**Marcelo**) e ao **Paulo** (Secretário do Programa em Engenharia de Alimentos).

A toda minha **família**, por compreender minha ausência, e pela força em todos os momentos. A minha **mãe**, que sempre foi meu grande exemplo, que me deu asas para poder ir para o mundo e ao mesmo tempo raízes para poder voltar sempre que quisesse. A minha irmã (**Gracieli**), que sempre me fez ver que eu poderia mais. Ao meu querido noivo, (**Rodrigo**), que foi meu companheiro até mesmo quando estávamos separados por um oceano, que me apoiou em todas as decisões, e também pelas muitas madrugadas correndo comigo, para que eu conseguisse os “benditos maracujás”. A **Juliana e Dane**, amigas-irmãs de uma vida inteira, que torceram, vibraram e me alegraram sempre que precisei. Aos meus **avós**, que mesmo na simplicidade e sem entender muito, torceram por mim. A **tia Lica**, que na sua turbulência do dia a dia, ainda conseguiu me auxiliar em muitos conflitos. Ao **tio Fio**, exemplo de dedicação, que plantou em mim a vontade de lutar por algo melhor, e a **tia Joselia**, primeira pessoa que me deu a chance de continuar os estudos.

À **Deus**, que permanece ao meu lado em todos os momentos, que me mostra sempre o melhor caminho e principalmente que me permitiu alcançar mais essa vitória.

“MUITO OBRIGADA”

RESUMO

A variedade de clima e solo do Brasil garante uma produção de frutos bastante diversificada durante todas as estações do ano. Dessa forma o país vem ganhando destaque na área de fruticultura. O maracujá é um fruto que se destacou nos últimos anos dentro e fora do país, devido ao aumento no consumo do fruto in natura e dos produtos derivados da polpa. Para o melhor aproveitamento dos frutos, é necessário conhecer os principais parâmetros de qualidade. Como os frutos são produtos altamente perecíveis e que continuam o metabolismo após a colheita, o estabelecimento de metodologias que possibilitem um controle rápido e eficiente é imprescindível para qualificá-los de maneira mais adequada, seja para a exportação, industrialização ou consumo in natura. As metodologias convencionais empregadas para determinar os parâmetros de qualidade dos frutos são fundamentais para a previsão de possíveis rendimentos para os processos industriais e também no estabelecimento do valor comercial do fruto, porém, são onerosas, demoradas e principalmente destrutivas. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi verificar a eficiência da aplicação da espectroscopia na região do infravermelho médio e próximo acoplada a calibração multivariada para determinar os parâmetros de qualidade em frutos de maracujá intacto, da polpa in natura e da polpa liofilizada. Os parâmetros de qualidade analisados foram os açúcares simples, SSC, AT, ácidos orgânicos, vitamina C e carotenóides. Os resultados demonstraram baixas correlações entre os valores das análises de referência e os valores encontrados pelos modelos PLS para determinar as concentrações dos parâmetros de qualidade do fruto intacto. Os modelos multivariados desenvolvidos para determinar os parâmetros de qualidade da polpa in natura apresentaram bons resultados de previsões para determinar a concentração de glicose, frutose, sacarose, SSC e AT utilizando a região do infravermelho médio. A região em NIR apresentou maior dificuldade de previsão devido à maior absorção de bandas de água nessa região. Por outro lado, os modelos multivariados desenvolvidos para prever os parâmetros de qualidade da polpa liofilizada apresentaram excelentes resultados principalmente na região em MID para a glicose ($R^2_v = 0,938$), a frutose ($R^2_v = 0,907$), a sacarose ($R^2_v = 0,921$) e ácido cítrico ($R^2_v = 0,918$). Os resultados para ácido málico e carotenóides foram insatisfatórios para as duas regiões utilizadas neste estudo, devido à baixa concentração. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que: i) há uma maior dificuldade de correlacionar constituintes em baixas concentrações; ii) a intensidade de luz que atravessa a casca do fruto diminui significativamente com a profundidade, portanto, a casca demonstrou ser um obstáculo a utilização desta técnica e iii) a interferência da água na identificação de grupos e bandas específicas foi expressiva para o maracujá, devido ao seu alto teor de umidade. Os resultados revelaram ainda que a região do infravermelho médio foi mais adequada para prever a concentração dos parâmetros de qualidade em comparação com a região em NIR. Com base também nos resultados obtidos, o uso da polpa in natura com a espectroscopia na região do MID mostrou-se como a mais adequada para a determinação dos parâmetros de qualidade do maracujá, pois boas correlações puderam ser obtidas sem a etapa de liofilização da polpa.

Palavras-chave: espectroscopia, calibração multivariada, maracujá

ABSTRACT

Climate and soil variety of Brazil ensures a diversified fruit production during all seasons. Thus the country is gaining prominence in the orcharding field. Passion fruit is a fruit that stood out in recent years internally and out of the country due to the increased consumption of fresh fruit and products derived from the pulp. For the best use of this fruit, it is necessary to determine its main quality parameters. Since passion fruits are highly perishable products and their metabolism proceeds even after harvest, to establish methodologies that allow fast and efficient control becomes essential to qualify them in a more adequate way, either for export, processing or fresh consumption. Traditional methodologies employed to determine fruit quality parameters have been fundamental to prediction of potential yields in industrial processes and also to establish commercial value of the fruit, however, they are expensive, time consuming and destructive. Therefore, the aim of this study was to assess the efficiency of mid and near infrared spectroscopy coupled to multivariate calibration to determine quality parameters of the intact passion fruit, as well as fresh and lyophilized pulps. Quality parameters analyzed were simple sugars, SSC, AT, organic acids, vitamin C and carotenoids. Results showed low correlations between reference analyses values and predicted values to determine the quality parameters concentrations in intact fruit. Multivariate models developed to quality parameters of in nature pulp showed good prediction results to determine the concentration of glucose, fructose, sucrose, AT, and SSC using mid-infrared. NIR region showed higher prediction difficulty due to the higher water absorption bands in this region. on the other hand, multivariate models developed to predict quality parameters of the lyophilized pulp presented excellent results especially in the MID region for glucose ($R^2_v = 0,938$), fructose ($R^2_v = 0,907$), sucrose ($R^2_v = 0,921$) and citric acid ($R^2_v = 0,918$). The results for malic acid and carotenoids contents were unsatisfactory in the two regions used in this study due to the low concentration of these compounds. From the results obtained in this study, it could be verified that: i) there is greater difficulty to correlate constituents at low concentrations, ii) light intensity through the fruit decreases significantly with skin depth, so thick skin has showed to be a barrier for using this technique and iii) water interference in identifying groups and specific bands was significant for passion fruit, due to its high moisture content. The results also revealed that the mid-infrared region was most suitable for predicting the concentration of quality parameters, in comparison with NIR region. Based also on the results obtained, the use of fresh pulp with MID spectroscopy seemed to be the most suitable choice for quality parameters determination of the passion fruit, since good correlations could be obtained without pulp lyophilization step.

Keywords: spectroscopy, multivariate calibration, passion fruit

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - MORFOLOGIA DO MARACUJÁ AMARELO.....	7
FIGURA 2.2 - COMPONENTES BÁSICOS DE UM EQUIPAMENTO QUE OPERANA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	17
FIGURA 2.3 – ESQUEMA DE UM SISTEMA DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR) COM MÚLTIPLAS REFLEXÕES.....	20
FIGURA 2.4 - REPRESENTAÇÃO DA REFLECTÂNCIA DIFUSA	21
FIGURA 2.5 – SOBRETONS E COMBINAÇÕES BANDA EM NIR	15
FIGURA 2.6 – ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS AÇÚCARES SIMPLES E ÁCIDOS ORGANICOS ENCONTRADOS EM POLPA DE MARACUJÁ.....	16
FIGURA 2.7 – GRÁFICO TRIDIMENSIONAL ILUSTRANDO OS EIXOS DAS COMPONENTES PRINCIPAIS.....	28
FIGURA 3.1 – ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) DOS FRUTOS DE MARACUJÁ INTACTOS SEM TRATAMENTO PRÉVIO: (A) 60 FRUTOS COLHIDOS EM 2011 E (B) 90 FRUTOS SENDO 30 FRUTOS COLHIDOS EM 2011, 30 FRUTOS COLHIDOS EM 2012 E 30 FRUTOS COLHIDOS EM 2013	48
FIGURA 3.2 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DAS 60 AMOSTRAS DE CASCA DE MARACUJÁ COM DIFERENTES PROCESSAMENTOS DE DADOS: DCM (a) E MSC (b)	49
FIGURA 3.3 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DAS 90 AMOSTRAS DE CASCA DE MARACUJÁ EM DIFERENTES ANOS DE COLHEITA (2011, 2012 E 2013) APLICANDO OS PROCESSAMENTOS DE DADOS: DCM (a) E MSC (b).....	50
FIGURA 3.4 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA E EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS DURANTE A CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS.....	53
FIGURA 3.5 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS COM (a) 9 VLS E (b) 5 VLS.....	54
FIGURA 3.6 - RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES TOTAIS.....	55
FIGURA 3.7 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS ANÔMALAS COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DO MODELO PLS PARA DETERMINAÇÃO DOS CAROTENÓIDES TOTAIS.....	55

FIGURA 3.8 – VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 15 AMOSTRAS DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO CAROTENOIDES TOTAIS.....	56
FIGURA 4.1 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) REALIZADA SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: a) CURVA DE CORRELAÇÃO, b) PC MAPA DAS AMOSTRAS.	69
FIGURA 4.2 – MÉDIA DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DE AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ: (a) MID NO INTERVALO DE 800 a 4000 cm-1, (b) NIR NO INTERVALO DE 1000 A 2500 nm.....	70
FIGURA 4.3 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ EM MID: (a) 50 ESPECTROS (b) 130 ESPECTROS USANDO PRÉ-PROCESSAMENTO MSC.....	72
FIGURA 4.4 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ EM MID: (a) 50 ESPECTROS (b) 130 ESPECTROS USANDO PRÉ-PROCESSAMENTO MSC E (c) 130 ESPECTROS APLICANDO A CORREÇÃO DE LINHA BASE.	73
FIGURA 4.5 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b).....	74
FIGURA 4.6 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b).....	75
FIGURA 4.7 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DA AMOSTRA 1 COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DOS MODELOS PARA A DETERMINAÇÃO GLUCOSE EM NIR	76
FIGURA 4.8 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 12 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE.....	78
FIGURA 4.9 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE EM MID (a) E NIR (b)	79
FIGURA 4.10 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b)	79
FIGURA 4.11 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b)	80

FIGURA 4.12 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS ANÔMALAS COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DOS MODELOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FRUTOSE EM MID (a) e NIR (b)	81
FIGURA 4.13 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 12 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE	82
FIGURA 4.14 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE EM MID (a) E NIR (b)	83
FIGURA 4.15 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b)	84
FIGURA 4.16 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b).....	84
FIGURA 4.17 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DA AMOSTRA 4 COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DO MODELO PARA A DETERMINAÇÃO DE SACAROSE EM NIR.....	85
FIGURA 4.18 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 12 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE	86
FIGURA 4.19 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE EM MID (a) E NIR (b)	87
FIGURA 4.20 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO EM MID	88
FIGURA 4.21 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO MID	89
FIGURA 4.22 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE SSC EM MID	90
FIGURA 4.23 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA O MODELO PLS DESENVOLVIDO PARA DETERMINAR SSC EM MID	91

FIGURA 4.24 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO EM NIR	91
FIGURA 4.25 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO EM NIR.....	92
FIGURA 4.26 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 32 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE SSC EM NIR.....	93
FIGURA 4.27 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA O MODELO PLS DESENVOLVIDO PARA DETERMINAR SSC EM NIR.....	94
FIGURA 4.28 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AT NA REGIÃO EM MID.....	95
FIGURA 4.29 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AT NA REGIÃO EM MID	96
FIGURA 4.30 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 32 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE AT EM MID	97
FIGURA 4.31 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA O MODELO PLS DESENVOLVIDO PARA DETERMINAR AT EM MID	98
FIGURA 4.32 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 32 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE AT EM NIR	99
FIGURA 5.1 – PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES EM POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ	108
FIGURA 5.2. – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) REALIZADA SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: a) CURVA DE CORRELAÇÃO, b) PC MAPA DAS AMOSTRAS.	111
FIGURA 5.3 – MÉDIA DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DE AMOSTRAS DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: (a) MID NO INTERVALO DE 4000 A 600 cm-1, (B) NIR NO INTERVALO DE 700 A 2500 nm.....	113
FIGURA 5.4. – INTENSIDADE DE ABSORÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ PARA OS ESPECTROS EM (a) MID E (b) NIR: GLUCOSE (1), FRUTOSE (2), SACAROSE (3), AÇUCARES TOTAIS (4), ÁCIDO MÁLICO (5), ÁCIDO CÍTRICO (6), ÁCIDOS TOTAIS (7), B-CAR	114

- FIGURA 5.5 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: ESPECTROS MID (A) E NIR (B) USANDO O PRÉ-PROCESSAMENTO DCM.116
- FIGURA 5.6 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b).117
- FIGURA 5.7 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b).....118
- FIGURA 5.8 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS ANÔMALAS COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DOS MODELOS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE EM (a) MID e (b) NIR.119
- FIGURA 5.9 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 14 AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE..... 121
- FIGURA 5.10 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b)..... 122
- FIGURA 5.11 – RESÍDUOS DE Student vs leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b) 123
- FIGURA 5.12 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 14 AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE 124
- FIGURA 5.13 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b).... 125
- FIGURA 5.14 – RESÍDUOS DE Student vs leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b)..... 126
- FIGURA 5.15 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE ... 127
- FIGURA 5.16 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DE

CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b)	128
FIGURA 5.17 – RESÍDUOS DE Student vs leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO NA REGIÃO EM MID (a) E EM NIR (b).....	129
FIGURA 5.18 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 14 AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	130
FIGURA 5.19 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS PARA A GLUCOSE EM MID (a) E NIR (b), FRUTOSE EM MID (c) E NIR (d), SACAROSE EM MID (e) E NIR (f) E ÁCIDO CÍTRICO EM MID (g) E NIR (h).....	134

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO.....	11
TABELA 2.2 – FREQUÊNCIA DE GRUPOS FUNCIONAIS ORGÂNICOS.....	13
TABELA 3.1 – PERFIL DOS FRUTOS DE MARACUJÁ AVALIADOS NESTE ESTUDO.....	39
TABELA 3.2. PARÂMETROS DE QUALIDADE DO MARACUJÁ INTACTO: NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS (n), INTERVALO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO (δ) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV).....	46
TABELA 3.3 – NÚMERO DE AMOSTRAS (n), INTERVALO, DOS GRUPOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO EXTERNA DOS FRUTOS DE MARACUJÁ INTACTOS.....	50
TABELA 3.4 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA O CONTEÚDO DE CAROTENÓIDES, CLOROFILA, AT, E SSC EM CASCA E POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR.....	51
TABELA 3.5 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA.....	58
TABELA 4.1 – PARAMETROS DE QUALIDADE DA POLPA DE MARACUJÁ IN NATURA: NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS (n), INTERVALO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO (δ) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV).....	67
TABELA 4.2 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA OS AÇÚCARES (mg.mL ⁻¹ de polpa) EM POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR.....	74
TABELA 4.3 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA.....	77
TABELA 4.4 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE SSC.....	88
TABELA 4.5 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE AT ...	95
TABELA 5.1 – REATIVOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES ..	104
TABELA 5.2 - SOLUÇÕES PADRÃO DE D-GLUCOSE, D-FRUTOSE E SACAROSE	104
TABELA 5.3 – REATIVOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE ÁCID ORGÂNICOS.....	106
TABELA 5.4 - SOLUÇÕES PADRÃO DE ÁCIDOS CÍTRICO E MÁLICO	106

TABELA 5.5 – PARÂMETROS DE QUALIDADE (mg.g-1 MS) DA POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: INTERVALO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO (δ) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV)	109
TABELA 5.6 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA OS AÇÚCARES (mg.g-1 MS) EM POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR.....	116
TABELA 5.7 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA	120
TABELA 5.8 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA OS ÁCIDOS ORGÂNICOS (mg.g-1 MS) EM POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR.....	127
TABELA 5.9 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC – Association of Oficial Analytical Chemists

AT – Acidez titulável

ATR - Attenuated Total Reflection

BNDS – Banco Nacional de desenvolvimento

CG – Cromatografia a gás

DCM – Dados centrados na Média

DCFI - 2-6diclorofenol – indofenol

DRIFTS - Difufuse Reflection Infrared Fourier Trasform Spectroscopy

DTGS – Deuterated Tri Glycine Sulfate

ER – Erro médio relativo percentual

FAO – Food and Agriculture Organization

FAR - Far Infrared

FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FT - Fourier Transform

HPLC – High pressure liquid chromatography.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e de Estatística

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutos

MID – Middle Infrared

MLR – Multiple linear regression

MS – Massa seca

MSC – Multiple scatter correction

NIPALS – Nonlinear iterative partial least square

NIR – Near Infrared

PCA – Principal Component Analysis

PCR – Principal Component Regression

PLS – Partial Least Square.

PLSR – Partial Least Squares Regression

RMSEC – Root Mean Square Error Calibration

RMSECV – Root Mean Square Error Cross-Validation

RMSEP – Root Mean Square Error Prediction

SNV – Standard normal variate

SSC – Solid soluble content

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

UV/VIS – Ultravioleta/visível

VL – Variáveis Latentes

VIS – Visível

LISTA DE SIMBOLOS

a^* - Tonalidade verde-vermelha

A – Absorbância

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ – Coeficiente de absorção do éter de petróleo

b – percurso óptico (espectroscopia) ou Coeficientes de regressão (modelagem)

b^* - Tonalidade azul-amarela

C – concentração

C_a – Teor de clorofila a

C_b – Teor de clorofila b

$C_{\text{citríco}}$ – Concentração do ácido cítrico

$C_{\text{málico}}$ - Concentração do ácido málico

C_v – Coeficiente de variação

C_{total} – Teor de clorofila total

E ou F – Erro residual

C_{glu} – Concentração de glucose

C_{fru} – Concentração de frutose

$C_{\text{glu-total}}$ - Valor da concentração de glucose total (antes e depois da inversão da sacarose)

D – Fator de diluição

ha – hectares

I - Intensidade de energia transmitida através da amostra

I_0 – Intensidade de luz incidente

K – Coeficiente de absorção

L^* - Luminosidade

m – Massa da amostra

M – Mol

P – Matriz de *loadings* (modelagem).

Q – Matriz de *loadings* (modelagem).

R – Reflectância

R_α – Reflectância difusa

R_c^2 – Coeficiente de regressão linear da etapa de calibração

R_{cv}^2 – Coeficiente de regressão linear da etapa de validação cruzada

R_v^2 – Coeficiente de regressão linear da etapa de validação externa

S – Coeficiente de dispersão

T – Transmitância (espectroscopia) ou matriz de scores (modelagem)

u_i – Coeficientes linear da reta

U – Matriz de scores (modelagem)

V – Volume do balão ou volume de água

v_i – Coeficiente angular da reta

X – Variáveis independentes

\bar{x}_i – Valor médio correspondente a i-ésima coluna.

Y – Variáveis dependentes

y_i – Valor de referência para i-ésima amostra

y'_i – Valor previsto pelo modelo para i-ésima amostra

μL – microlitro

μm – micrômetro, unidade de comprimento de onda

δ – Desvio padrão

ϵ – Coeficiente de absorvidade

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Fruticultura no Brasil.....	4
2.2. Maracujá.....	5
2.2.1. Panorama econômico do fruto.....	5
2.2.2. Parâmetros de qualidade.....	6
2.3. Espectroscopia no Infravermelho	9
2.3.1. Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (MID).....	12
2.3.2. Instrumentos para espectroscopia no infravermelho	16
2.3.3. Métodos de análise da amostra.....	18
2.4. Calibração multivariada	22
2.4.1. Pré-processamento dos dados espectroscópicos	25
2.4.2. Análise de Componente Principal (PCA)	27
2.4.3. Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR).....	29
2.4.4. Avaliação dos modelos de calibração.....	32
2.5. Aplicações da espectroscopia MID e NIR em frutos.....	33
2.6. Considerações finais sobre a revisão da literatura	36
CAPÍTULO 3 – Parâmetros de Qualidade do Fruto de Maracujá Intacto	37
3.1. Introdução	37
3.2. Materiais e Métodos	38
3.2.1. Seleção e preparação dos frutos de maracujá	38
3.2.2. Obtenção dos espectros na região em NIR.....	39
3.2.3. Determinação da cor do fruto	40
3.2.4. Determinação da firmeza do fruto intacto.....	40
3.2.5. Determinação de carotenoides totais da casca do fruto.....	40

3.2.6.	Determinação de clorofila da casca do fruto.....	41
3.2.7.	Determinação do conteúdo de sólidos solúveis (SSC) da polpa <i>in natura</i> 42	
3.2.8.	Determinação de acidez titulável (AT) da polpa <i>in natura</i>	42
3.2.9.	Desenvolvimento dos modelos multivariados	43
3.3.	Resultados e discussões	45
3.3.1.	Caracterização das amostras de maracujá	45
3.3.2.	Caracterização dos espectros NIR	47
3.3.3.	Análise de Componente Principal.....	48
3.3.4.	Modelos de calibração	50
3.4.	Conclusão	59
CAPÍTULO 4 – Parâmetros de qualidade da polpa <i>in natura</i> de maracujá		61
4.1.	INTRODUÇÃO	61
4.2.	Materiais e Métodos	62
4.2.1.	Seleção e preparação dos frutos de maracujá	62
4.2.2.	Aquisição dos espectros na região de MID e NIR	62
4.2.3.	Determinação da Vitamina C.....	63
4.2.4.	Determinação de açúcares simples.....	64
4.2.5.	Determinação do conteúdo de sólidos solúveis (SSC)	65
4.2.6.	Determinação do pH.....	65
4.2.7.	Determinação de acidez titulável (AT)	65
4.2.8.	Desenvolvimento do modelo	65
4.3.	Resultados.....	65
4.3.1.	Caracterização das amostras de maracujá	65
4.3.2.	Caracterização dos espectros em MID e NIR.....	69
4.3.3.	Quantificação de açúcares individuais.....	73
4.3.4.	Quantificação de conteúdo de sólidos solúveis	87
4.3.5.	Quantificação de acidez titulável	94

4.4. Conclusões.....	99
CAPÍTULO 5 – Parâmetros de Qualidade da Polpa Liofilizada.....	101
5.1. Introdução	101
5.2. Materiais e Métodos	101
5.2.1. Seleção e preparação dos frutos de maracujá	101
5.2.2. Aquisição dos espectros na região de MID e NIR	102
5.2.3. Determinação de açúcares simples.....	103
5.2.4. Determinação de ácidos orgânicos.....	105
5.2.5. Determinação de carotenóides.....	107
5.2.6. Desenvolvimento dos modelos.....	109
5.3. Resultados.....	109
5.3.1. Caracterização das amostras de maracujá	109
5.3.2. Caracterização dos espectros em MID e em NIR.....	112
5.3.3. Quantificação de açúcares individuais.....	116
5.3.4. Quantificação de ácidos orgânicos	127
5.3.5. Quantificação de β -caroteno.....	131
5.3.6. Coeficientes de regressão dos espectros em MID e em NIR para os diferentes parâmetros	132
5.4. Conclusão	135
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICES.....	151

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O Brasil é um país privilegiado por sua variedade de clima e solo, garantindo uma produção de frutos bastante diversificado durante todas as estações do ano. Destaca-se alcançando o terceiro lugar em produção mundial de frutos (40 milhões de toneladas ao ano), mas participa com apenas 2% do comércio global do setor, o que significa ainda uma baixa exportação (IBRAF, 2013). Esses valores demonstram a grande importância de estudos relacionados à fruticultura.

Dentro da grande variedade de frutos produzidos em nosso país, o maracujá se destaca, sendo o Brasil o maior produtor mundial deste fruto (IBGE, 2012). O maracujá é um fruto de composição rica: acidez de 2,9 a 5,0%, sólidos solúveis de 12,5 a 18,0%, açúcares totais de 8,3 a 11,6%, açúcares redutores de 5,0 a 9,2%, ácido ascórbico de 7,0 a 20,0 mg.100g⁻¹ e aroma exótico (EMBRAPA 2012). Dessa forma, seu consumo tanto *in natura* como para industrialização (sucos, geléias entre outros) teve aumento de 59% no último ano (IBRAF, 2012). O fruto conquistou espaço no mercado interno e também nas exportações. A grande produção é extremamente atrativa do ponto de vista econômico. Entretanto, fatores como a perecibilidade dos frutos *in natura*, sazonalidade, técnicas inadequadas de colheita e pós-colheita contribuem com perdas estimadas em 50% de sua produção.

As mudanças nos hábitos das pessoas que buscam por uma alimentação mais saudável, com frutos frescos, de alta qualidade nutricional e também sensorial (aroma, sabor e aparência) se traduz em uma maior exigência dos consumidores. Conseqüentemente, para que possam ser aceitos no mercado e principalmente para exportações, o nível de qualidade dos frutos é cada vez mais exigido. Técnicas adequadas para colheita e pós colheita de frutos tornam-se indispensáveis tanto para produtores que desejam exportar quanto para as indústrias (produção de sucos e derivados de frutos), que buscam produtos naturais com qualidade, os quais diferenciam o produto final e aumentam o rendimento.

Dessa forma, estudos vêm sendo desenvolvidos para determinar os parâmetros de qualidade dos frutos e dimensioná-lo de forma adequada para qualquer que seja o destino (consumo *in natura* dentro do país, exportação ou industrialização). O amadurecimento dos frutos é um processo complexo, geneticamente programado, que envolve drásticas mudanças na cor, textura, sabor e aroma (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004). Tais mudanças dão origem aos

parâmetros de qualidade, os quais são apreciados nos frutos e são responsáveis por sua aceitação. Além disso, os parâmetros de qualidade também agregam valor tanto ao fruto destinado ao consumo direto (*in natura*) como aos destinados à industrialização.

Os parâmetros de qualidade são caracterizados com base nas propriedades físicas, tamanho, cor, firmeza, aparência da superfície, como também nas propriedades físico-químicas, açúcares, ácidos, sólidos solúveis, acidez titulável, vitamina C entre outras (BUREAU *et al.*, 2009). A avaliação da qualidade dos frutos é uma questão importante, porém, as metodologias convencionais utilizadas necessitam de extração prévia dos analitos de interesse e por consequência, uma extensiva preparação da amostra, utilização de grande quantidade de reagentes, vidrarias e equipamentos, o que as torna trabalhosas e onerosas. Por isso, buscam-se alternativas instrumentais que as tornem mais práticas e rápidas. Nesse contexto, a espectroscopia na região do infravermelho torna-se uma interessante alternativa. Nos últimos anos, esta metodologia tem sido utilizada cada vez mais para o controle de qualidade em produtos alimentícios e agrícolas, para avaliação dos mais diferentes parâmetros de qualidade, como a quantidade de açúcares totais, individuais, amido, sólidos solúveis, ácidos orgânicos, acidez entre outros.

A espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta com alto potencial analítico, pois fornece o perfil completo da composição de uma amostra em poucos segundos, apresenta alta sensibilidade, é de fácil implementação e baixo custo. Outro fator importante é que se trata de um método não destrutivo e não poluente ao operador e ao meio ambiente. Porém, devido à complexidade dos espectros, tais como sobreposição de sinais e a não linearidade entre a intensidade do sinal e a concentração das espécies químicas associadas, torna-se necessária a utilização de métodos quimiométricos (calibração multivariada), que auxiliam na identificação e quantificação dos componentes individuais a partir desta resposta instrumental complexa (FERRARINI, 2004; TOZETTO, 2005).

OBJETIVOS

A partir das necessidades de análises rápidas dos parâmetros de qualidade, que auxiliem na triagem de frutos (exportação, consumo direto ou industrialização)

para maior aproveitamento dos mesmos e diminuição nas perdas internas, os objetivos desse trabalho foram:

- a) Investigar o uso da espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FTIR) para determinação de parâmetros de qualidade de frutos de maracujá intactos;
- b) Investigar a utilização das técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo e médio com transformada de Fourier (FTIR) na determinação de parâmetros de qualidade da polpa *in natura* e polpa liofilizada dos frutos de maracujá;
- c) Construir modelos de calibração multivariada empregando o método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) para cada parâmetro de qualidade avaliado;
- d) Avaliar as espectroscopias em NIR e em MID como ferramentas para a determinação de parâmetros de qualidade do maracujá.

CAPITULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, é apresentada uma breve revisão bibliográfica abordando de forma sucinta a situação econômica da fruticultura no país, bem como os principais parâmetros relacionados à qualidade do maracujá. Em seguida será apresentado um embasamento teórico sobre a espectroscopia em MID e NIR, calibração multivariada e a utilização dessas ferramentas nos últimos anos aplicada à área alimentícia principalmente em frutos.

2.1. Fruticultura no Brasil

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutos, com 42,6 milhões de toneladas produzidas e um total de 340 milhões de toneladas colhidas em todo o território, anualmente. Apesar deste lugar de destaque, o país está no 12º lugar nas exportações de frutos. Deste volume total de produção, acredita-se que as perdas no mercado interno possam chegar a 40%. Contribuem para estas perdas, o mau uso das técnicas de manejo do solo e da planta, falta de estrutura de armazenamento, logística, embalagens inadequadas e a própria desinformação do produtor em relação ao amadurecimento do fruto (BNDES, 2012).

Pela diversidade de climas e solos, o Brasil apresenta condições ecológicas para produzir frutos de ótima qualidade e com uma variedade de espécies que passam pelos frutos tropicais, subtropicais, e temperados em período integral de tempo. Esse quadro favorável aumenta o volume de frutos frescos e industrializados que são exportados (aproximadamente 760 kg em 2010), como acontece como a pêra, ameixa, uva, maçã (IBRAF, 2011).

O aumento do consumo de frutos “*in natura*” e de sucos naturais é uma tendência mundial que pode ser aproveitada pelo Brasil como forma de incentivar o aumento da produção e a qualidade dos frutos. A citricultura brasileira é a maior do mundo e o Brasil é o maior exportador de sucos concentrados (BNDES, 2012).

O mercado internacional é altamente competitivo e exige ofertas em qualidade e quantidade. Existem espaços para colocação de frutos “*in natura*”, particularmente na entre safra do hemisfério norte, com espécies de clima tropical, como melão, abacaxi, banana, manga, mamão, e de clima temperado, como uva,

maçã, figo, morango, entre outras. Dos grandes mercados, 90% estão localizadas no hemisfério norte e esta condição precisa ser melhor explorada.

O Brasil tem conseguido aumentar e diversificar a oferta de frutos produzidos em clima semi-árido durante quase todo ano, como é o caso das videiras, que estão produzindo mais de duas safras por ano, e os maracujazeiros que produzem durante todo o ano (EMBRAPA, 2013). Estas fruteiras fornecem frutos de boa qualidade, com alto rendimento por área, em épocas em que os preços no mercado internacional são mais atrativos. Neste contexto, devem se buscar técnicas adequadas para avaliação dos parâmetros de qualidade dos frutos para que os mesmos possam ser aproveitados da melhor maneira.

2.2. Maracujá

2.2.1. Panorama econômico do fruto

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, sendo que, no ano de 2009, a produção brasileira foi de 713 mil toneladas (IBGE, 2012). A produção nacional de maracujá estende-se por todos os estados brasileiros. A região Nordeste é a maior produtora, seguida das regiões Sudeste, Norte e Sul (IBGE, 2012; DURIGAN, 1998; SOUZA, 2002).

A área plantada com maracujá amarelo no Brasil vem se mantendo ao redor de 35 mil hectares (ha) com destaque para a região Nordeste, principalmente os Estados da Bahia e de Sergipe, com cerca de 10 mil e 4 mil ha, respectivamente. A região Sudeste aparece como a segunda região produtora do país com 10 mil ha, sendo 3,1 mil em São Paulo, 2,6 mil em Minas Gerais e 2,3 mil no Espírito Santo. A produção brasileira é da ordem de 500 mil toneladas anuais. O cultivo do maracujazeiro em escala comercial teve início no começo da década de 70, com o maracujá azedo (amarelo). Atualmente, o agronegócio do maracujá no Brasil gera R\$ 500 milhões, emprega 250.000 pessoas e pode gerar de 5 a 6 empregos diretos e indiretos por hectare durante 2 anos, com apenas R\$ 12 mil de investimentos (JORNAL DA UNICAMP, 2013).

De acordo com as condições climáticas da região, podem-se ter duas ou mais safras de frutos por ano. O período de colheita é bastante longo na maioria das regiões brasileiras, sendo maior nas regiões com calor e umidade suficientes para

um prolongado período de frutificação e menor naquelas sujeitas a frio mais intenso ou a um período de seca maior. A época da colheita tem início a partir do fim de dezembro e se estende até junho-julho do ano seguinte, podendo, eventualmente, ir até agosto (CARVALHO, 1974). O pico da safra ocorre de fevereiro a abril.

O maracujá está incluído na categoria comercial de frutos tropicais secundários, cujo mercado aumentou rapidamente nos últimos anos, juntamente com a lichia, o durião, o rambutão e a goiaba (FAO, 2006). Estima-se que mais de 60% da produção brasileira de maracujá azedo seja destinada ao consumo in natura e o restante seja destinado às indústrias de processamento, sendo suco o principal produto.

A exportação de maracujá ainda é incipiente. Tem ocorrido em pequena escala, sob as formas de fruta fresca, e, principalmente, suco concentrado. Os principais destinos são os países europeus. A participação do fruto fresco no total das exportações de maracujá do Brasil tem-se restringido a 1,5%, porque o mercado interno absorve quase a totalidade da produção. Os sucos concentrados representam a maior parcela da exportação, sendo atualmente comercializado mais intensamente com Holanda, Estados Unidos, Porto Rico, Japão e Alemanha, os quais importam 76% do suco concentrado produzido no Brasil (MELETTI, 2011).

2.2.2. Parâmetros de qualidade

O gênero *Passiflora* possui um grande número de espécies, mais de 400, sendo cerca de 120 nativas do Brasil (BERNACCI, 2003). Apesar disso, os cultivos comerciais do País baseiam-se numa única espécie, o maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis*), que representa mais de 95% dos pomares, devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco (MELETTI e BRÜCKNER, 2001).

O maracujá é um fruto carnoso, do tipo baga, com epicarpo (casca) às vezes lignificado, mesocarpo com espessura que varia de 0,5 a 4,0 cm, endocarpo (polpa) e sementes com arilo carnoso (Figura 2.1). O tamanho e o formato dos frutos são diferenciados conforme a espécie (SILVA e SÃO JOSÉ, 1994). O maracujá amarelo ou azedo possui diâmetro de 4,9 a 7,8 cm, comprimento de 5,4 a 10,4 cm e peso do fruto entre 52,5 e 153,4 g. O rendimento em suco das espécies citadas acima varia de 30 a 40% em relação ao peso do fruto.

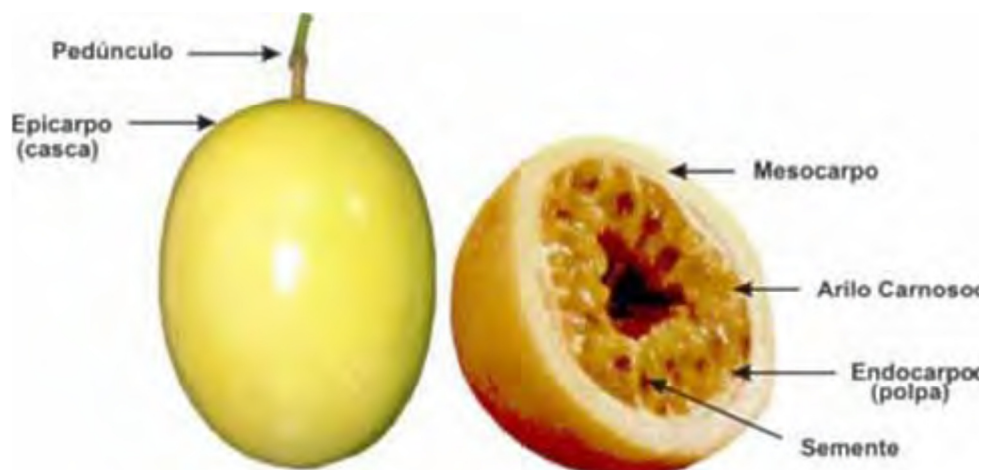


FIGURA 2.1 - MORFOLOGIA DO MARACUJÁ AMARELO

FONTE: PEDRO (2009)

Os frutos apresentam fases fisiológicas distintas, sendo elas a formação, o crescimento, a maturação e a senescência. O amadurecimento ocorre no fim da maturação, é a fase em que os frutos são transformados em produtos atrativos e aptos para o consumo, sendo um processo normal e irreversível (RYALL e LIPTON, 1979). É nessa fase que os parâmetros de qualidade atinge seu máximo.

O início do amadurecimento é frequentemente associado com mudanças de cor, degradação de polissacarídeos e ácidos orgânicos, alterações na textura, síntese de compostos voláteis e fenólicos. Estes eventos podem ser percebidos por análises físicas, químicas, bioquímicas ou sensoriais (ADAMS-PHILLIPS *et al.*, 2004).

A mudança de cor da casca é uma das mais evidentes, e muitas vezes é o critério mais importante utilizado pelo consumidor no momento da compra, sendo também usada pelo produtor como indicador de colheita, já que essas mudanças de cor estão muitas vezes relacionadas com as alterações físico-químicas que acompanham o aumento dos parâmetros de qualidade (GAMARRA ROJAS e MEDINA, 1996; SALOMÃO, 2002).

A cor da casca é o parâmetro de qualidade mais facilmente observado (SHIOMI *et al.*, 1996). No entanto, deve-se ter cuidado com frutos que receberam maior incidência de raios solares, pois apresentam coloração mais intensa que os demais, podendo resultar em uma falsa indicação do estágio de maturação (JIMÉNEZ *et al.*, 2011). As alterações na cor da casca do maracujá durante o

amadurecimento, passando do verde ao amarelo, estão relacionadas à degradação da clorofila, resultado da ação de enzimas específicas, e à manifestação dos pigmentos carotenóides (SEYMOUR *et al.*, 1993). Além da presença dos pigmentos, a casca do maracujá é constituída principalmente de fibras, carboidratos e minerais (UCHOA *et al.*, 2008; KLIEMANN, 2006; CÓRDOVA *et al.*, 2005, LEORO, 2007).

A diminuição da firmeza em frutos é um parâmetro de qualidade de extrema importância do ponto de vista econômico, já que afeta a distribuição e exportação do fruto (BRAZ *et al.*, 2008). A determinação da firmeza é uma forma prática de se avaliar o estágio de maturação do fruto. A redução da firmeza da casca ou da polpa é função da perda da integridade da parede celular. A degradação das moléculas poliméricas constituintes da parede celular, como celulose, hemicelulose e pectina, por enzimas sintetizadas durante o amadurecimento, geram rompimentos levando ao amolecimento (TRUCKER, 1993; JACKMAN e STANLEY, 1995).

Em relação aos parâmetros de qualidade internos dos frutos, o sabor e o aroma (flavor) recebem maior atenção. O flavor corresponde à percepção da combinação entre doçura, acidez e adstringência em conjunto com a percepção do aroma. São parâmetros de difícil avaliação devido ao grande número de compostos químicos que os compõe. Os principais compostos químicos responsáveis pelo sabor dos frutos são os açúcares e os ácidos orgânicos.

Uma forma de medir, indireta e objetivamente, a doçura em frutos, é através do conteúdo de sólidos solúveis (SSC). Estes sólidos solúveis são os compostos hidrossolúveis presentes nos frutos, como açúcares, vitaminas, ácidos, aminoácidos e algumas pectinas. Este teor geralmente aumenta durante o amadurecimento. Jiménez *et al.*, (2011), observaram um aumento no conteúdo de sólidos solúveis em frutos de maracujá (*Passiflora edulis Sims. F. edulis*) em diferentes estádios de amadurecimento: imaturo (13,5°Brix), maturação média (15,8°Brix) e completamente maduro (17,4°Brix).

De acordo com Silva e Durigan (2000), os açúcares são os principais componentes dos sólidos solúveis totais do suco de maracujá. O acúmulo de açúcares (glicose, frutose e sacarose), os quais são responsáveis pelo sabor doce em maracujás e em diversos frutos, atingem a concentração máxima no final da maturação, conferindo excelência à qualidade do produto (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Machado *et al.*, (2003) encontraram porcentagens de açúcares redutores de 3,6%, não-redutores de 7,5% e açúcares totais por volta de 11%.

Coello *et al.*, (2010) encontraram resultados de 4,9% de açúcares redutores e 9,6% de açúcares redutores totais. Ambos realizaram os estudos com frutos maduros. Esta diferença pode ser atribuída a variedade do maracujá utilizado, época e local de cultivo, tipo de irrigação e tratamento do solo e clima da região.

A acidez titulável é também um parâmetro relacionado ao sabor do fruto, e que em muitos casos, como no maracujá, é uma característica marcante. Brody (1996) expõe que a acidez titulável de um fruto é dada pelos ácidos orgânicos, cujo teor tende a diminuir durante o processo de maturação, devido à oxidação dos mesmos no ciclo dos ácidos tricarbóxicos em decorrência da respiração. Chitarra e Chitarra (2005) ressaltam ainda que estas reações também são fundamentais para a síntese de compostos fenólicos, lipídios e compostos voláteis. A acidez titulável da polpa de *in natura* de frutos de maracujá é de aproximadamente 4% e pH entre 2.7 e 3.1 (COELLO *et al.*, 2010; JIMÉNEZ *et al.*, 2011; PEDRO, 2009). A acidez ocorre devido principalmente à presença de ácido cítrico (90%) seguido do ácido málico (CANTERI, 2010). A polpa ácida e aromática do maracujá amarelo é apreciada pela indústria, pois permite maior flexibilidade na adição de açúcar no preparo de bebidas prontas. (SOUZA e SANDI, 2001).

Segundo a tabela brasileira de composição de alimentos (TACO, 2006), o teor de proteínas, lipídios e cinzas é, respectivamente, igual a 2,0, 2,1 e 0,8%. O teor de ácido ascórbico no suco da fruta, um dos principais indicadores do seu valor nutritivo, é muito variável segundo o estágio de desenvolvimento, amadurecimento, temperatura de armazenamento e fatores climáticos. O teor de ácido ascórbico encontrado por Cereda *et al.*, (1984) foi de 27,87 mg.100 g⁻¹.

Já foram identificados 73 compostos voláteis no suco de maracujá-amarelo. Os principais são ésteres, 95% do total, que atuam na formação do aroma, como exemplo, o butirato de etila e o hexanoato de etila, sendo este último responsável pelo aroma adocicado do fruto e indica frescor (SALUNKHE e DESAI, 1984; NARAIN e BORA, 1992).

2.3. Espectroscopia no Infravermelho

A origem da espectroscopia no infravermelho é datada do início do século XIX, com o trabalho pioneiro do músico e astrônomo alemão Frederick Willian Herschel. O interesse pela astronomia despertou a curiosidade de Herschel em

relação às propriedades físicas da radiação eletromagnética na região do visível. A partir dos experimentos realizados pelo pesquisador, descobriu-se a radiação infravermelha e também se demonstrou que existem formas de luz que não podem ser observadas pelo olho humano (BURNS e CIURCZAK, 2007). Sequências de trabalhos foram desenvolvidos utilizando faixas espectrais no infravermelho próximo, médio e distante, posteriormente a descoberta de Herschel.

De um modo geral, a radiação no infravermelho de frequência na faixa de 10.000 a 100 cm^{-1} , quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular. A radiação infravermelha não é suficientemente energética para causar transições eletrônicas e a absorção desta radiação está muito restrita a espécies moleculares que possuem diferenças de energia pequenas entre vários estados vibracionais e rotacionais. Para absorver radiação infravermelha a molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. Apenas nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos (VALDERRAMA, 2005).

O momento dipolar é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre os dois centros de carga. Quando uma molécula que possui essa variação do momento dipolar vibra, uma variação regular em seu momento de dipolo ocorre e surge um campo que pode interagir com o campo elétrico associado à radiação. Se a frequência da radiação coincidir exatamente com a frequência vibracional natural da molécula, ocorre uma transferência de energia efetiva e resulta em uma variação da amplitude da vibração molecular e a consequência é a absorção de radiação. Do mesmo modo, a rotação de moléculas assimétricas em torno dos seus centros de massa resulta em uma variação periódica do dipolo que pode interagir com a radiação. Nenhuma variação efetiva no momento de dipolo ocorre durante a vibração ou rotação de uma molécula homonuclear como O_2 , N_2 ou Cl_2 e, conseqüentemente, essas substâncias não podem absorver no infravermelho (COATES, 1999; SKOOG HOLLER e NIEMAN, 2002).

O processo é quantizado e o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas porque a cada mudança de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de energia rotacional (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Faz-se necessário salientar que a frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força

das ligações e da geometria dos átomos (CÔCCO, 2008). Em uma molécula, as posições relativas dos átomos não estão fixas, variando continuamente em consequência dos tipos de vibrações e rotações em torno das ligações da molécula. Para uma molécula diatômica ou triatômica simples é possível definir o número e a natureza de tais vibrações e relacioná-las às energias de absorção. Entretanto, para moléculas constituídas de muitos átomos possuindo um grande número de centros de vibração, como também para moléculas apresentando interações entre vários centros, é muito difícil definir o número e a natureza das vibrações envolvidas e relacioná-las à suas respectivas energias de absorção (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

As vibrações são divididas em duas categorias: estiramentos e deformações angulares. Uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, enquanto que as deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações podendo acontecer de forma simétrica ou assimétrica e no plano ou fora do plano da molécula. Além desses tipos de vibração, interações ou acoplamentos de vibrações podem ocorrer se as vibrações envolverem ligações de um mesmo átomo central e o resultado disso é uma variação nas características das vibrações envolvidas (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Para a região da espectroscopia vibracional correspondente ao infravermelho próximo, os sinais observados são essencialmente devido a sobre tom e bandas de combinação de estiramentos e deformações angulares de transições fundamentais de ligações X-H, em que X representa átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono, grupos aromáticos e também grupos funcionais importantes como os C-O, grupos carbonila, C-N, C-C, entre outros que sofrem estiramento (WORKMAN, 1996).

Do ponto de vista da aplicação como dos instrumentos empregados, o espectro infravermelho é dividido em infravermelho próximo (NIR – do inglês, Near Infrared), médio (MID – do inglês, Middle Infrared) e distante (FAR – do inglês, Far Infrared). A Tabela 2.1 apresenta os limites aproximados para cada região.

TABELA 2.1 – REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO

Região	Intervalo de número de onda (cm^{-1})	Região em comprimento de onda (nm)
--------	---	---------------------------------------

Próximo (NIR)	12000 – 4000	800 - 2500
Médio (MID)	4000 – 200	2500 – 5000
Distante (FAR)	200 – 10	5000 - 100000

FONTE: SKOOG HOLLER e NIEMAN, (2002)

O emprego da espectroscopia no infravermelho para determinação de componentes de alimentos está quase que exclusivamente relacionada à região no infravermelho próximo e médio.

Na região no infravermelho próximo as principais aplicações encontram-se na análise quantitativa e qualitativa de materiais industriais e agrícolas e no controle de processos. A espectroscopia NIR, além de fornecer os resultados de maneira mais rápida, é um método não destrutivo, assim como não gera subprodutos tóxicos e apresenta simplicidade na preparação de amostras, sendo que a maior desvantagem da técnica é, provavelmente, a baixa sensibilidade dos constituintes em menores concentrações (BURNS e CIURCZAK, 2007; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A região no infravermelho médio é provavelmente onde se encontra a maioria das pesquisas desenvolvidas e o maior número de aplicações. Esta região começou a ser utilizada no final dos anos 50 para a análise qualitativa de compostos orgânicos devido à grande quantidade de informação que pode ser utilizada para a caracterização funcional de compostos orgânicos.

Para as regiões do infravermelho, em geral, é possível realizar medidas e amostras em todos os estados e formas como, gases, líquidos, sólidos, sistemas binários e terciários como as amostras semi-sólidas, pastas, géis e outras (COATES, 1999).

2.3.1. Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (MID)

Existem diferenças básicas no comportamento da emissão de luz nas diferentes regiões do infravermelho. O infravermelho médio (MID) fornece informações essenciais a partir de frequências de vibrações moleculares, enquanto o infravermelho próximo (NIR) contém informações de combinações de tons e sobretons (SHIROMA e RODRIGUEZ-SAONA, 2009).

2.3.1.1. MID

A região MID é a região do infravermelho situada entre 4.000 e 200 cm^{-1} . Nessa região é onde provavelmente se encontra a maioria das pesquisas desenvolvidas e o maior número de aplicações. A maior parte dos estudos consiste na identificação de compostos orgânicos, pois nessa região ocorrem essencialmente transições fundamentais e existe uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital (1.200 a 700 cm^{-1}), onde pequenas diferenças na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção (COATES, 1999; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

As bandas de absorção na região MID são intensas. O espectro resultante é muito rico em informação acerca da estrutura química do composto (CHRISTIAN, 1994). A Tabela 2.2 apresenta um resumo de frequências de absorção das moléculas orgânicas no infravermelho médio, onde estão registradas as frequências características de certos grupos.

Estas frequências características podem variar devido a vibrações associadas com um ou ambos átomos que constituem a molécula. Entretanto, tais efeitos de interação geralmente são mínimos, sendo assim, um intervalo de frequência pode ser atribuído, no qual é altamente provável que o máximo de absorção de um grupo funcional seja encontrado.

TABELA 2.2 – FREQUÊNCIA DE GRUPOS FUNCIONAIS ORGÂNICOS

Ligação	Tipo de composto	Intervalo de frequência (cm^{-1})	Intensidade
C-H	Alcanos	2850-2970	Forte
		1340-1470	Forte
C-H	Alquenos	3010-3095	Média
C-H	Alquinos	675-995	Forte
		3300	Forte
C-H	Anéis aromáticos	3010-3100	Média
		690-1000	Forte
O-H	Álcoois e fenóis monoméricos	3590-3650	Variável
	Álcoois e fenóis com ligações de H	3200-3600	Variável
	Ácidos carboxílicos monoméricos	3500-3650	Média

	Ácidos carboxílicos com ligação de H	2500-2700	Larga
N-H	Aminas, amidas	3300-3500	Média
C=C	Alquenos	1610-1680	Variável
C=C	Anéis aromáticos	1500-1600	Variável
C≡C	Alquinos	2100-2260	Variável
C-N	Aminas, amidas	1180-1360	Forte
C≡N	Nitrilas	2210-2280	Forte
C-O	Álcoois, éteres, ácidos carboxílicos	1050-1300	Forte
C=O	Aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1690-1760	Forte
NO ₂	Nitro compostos	1500-1570	Forte
		1300-1370	Forte

FONTE: SKOOG HOLLER e NIEMAN, (2002)

2.3.1.2. NIR

Pelo fato das bandas serem de combinações e sobretons, a absorção do infravermelho próximo é 10 a 100 vezes menos intensa que o infravermelho médio. Além disso, existem combinações e forte sobreposição das bandas, fazendo com os espectros no NIR sejam de difícil interpretação. A difusão de luz na faixa NIR é maior, fatores como a estrutura física do produto e a presença de água na amostra podem influenciar na aquisição dos espectros (WILLIAMS e NORRIS, 1987). Todos esses fatores tornam os espectros NIR muito mais sobrecarregados e, como consequência, as bandas são menos específicas que as bandas na faixa MID (BELLON-MAUREL e MCBRATNEY, 2011). A principal vantagem da espectroscopia NIR em relação a espectroscopia MID é a aquisição de espectros sem preparo das amostras, ideal para acompanhamento de frutos intactos.

Os sobretons e bandas de combinação são as características mais importantes na espectroscopia NIR, sendo que devido à armonicidade são observadas a ocorrência e as propriedades espectrais (frequência, intensidade) das bandas de absorção. As ligações químicas formadas por átomos de hidrogênio ou átomos mais leves são as que apresentam maior anarmonicidade. O diagrama apresentado na Figura 2.2 contém as correlações entre a absorção dos grupos funcionais e o comprimento de onda que são observados na região NIR (CHAGAS, 2006). É importante notar que as posições das bandas representadas na mesma

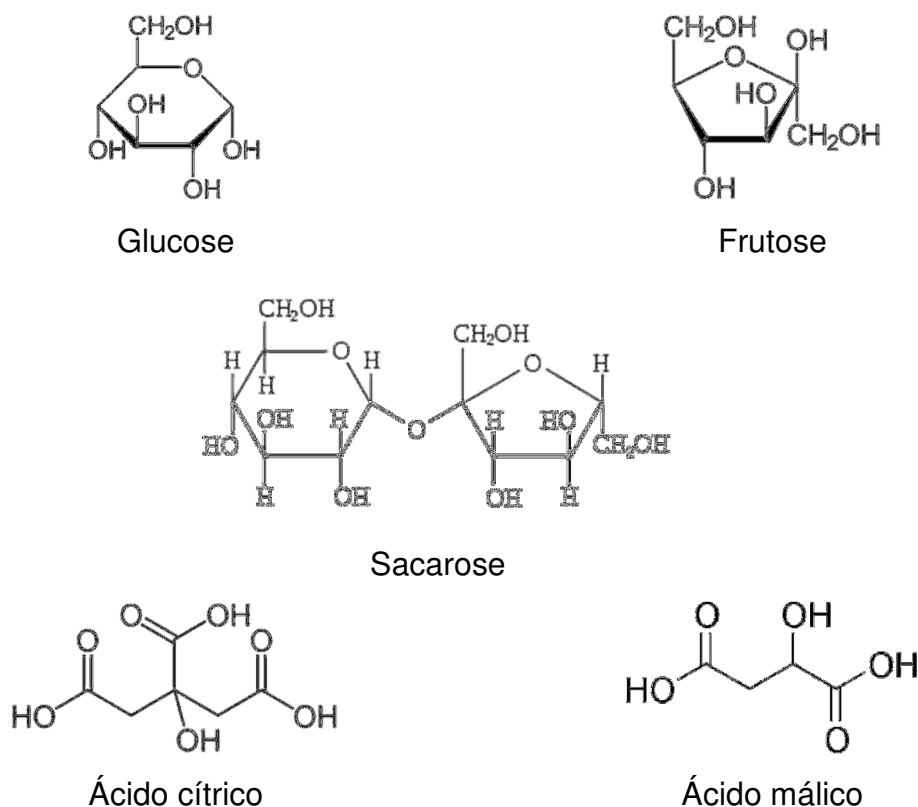


FIGURA 2.3 – ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS AÇÚCARES SIMPLES E ÁCIDOS ORGANICOS ENCONTRADOS EM POLPA DE MARACUJÁ

Estes agrupamentos podem ser observados em várias frequências (MID) ou comprimentos de onda (NIR). Notoriamente, as regiões de maior intensidade relatadas nos espectros MID adquiridos de polpas de frutos foram no intervalo entre 1500 a 900 cm^{-1} (BUREAU *et al.*, 2009; SCIBISZ *et al.*, 2011). Essa região é dominada por grupos de estiramentos C-C e C-O (PAWAN, BIRCH, e GREEN, 1973), sendo que estes grupos fazem parte da estrutura química dos açúcares e ácidos orgânicos.

Em relação aos espectros dos frutos adquiridos na região NIR, as maiores intensidades são reportadas entre 2200 a 1400 nm (GOMEZ *et al.*, 2006; LIU e YING, 2005; CAYUELA e WEILAND, 2010). A região de 1660 - 1760 nm é relacionada com primeiro sobreton C-H de vibração de estiramento de grupos CH_3 e CH_2 , as quais podem ser relacionadas às características bandas de açúcar e ácidos orgânicos (IÑÓN *et al.*, 2005; LEÓN *et al.*, 2005).

2.3.2. Instrumentos para espectroscopia no infravermelho

Atualmente os principais instrumentos empregados para medidas no infravermelho são os espectrofotômetros com transformada de Fourier (FT). O uso de instrumentos com transformadas de Fourier apresentam diversas vantagens. A primeira relaciona-se ao aproveitar a energia radiante pois, os instrumentos com FT possuem poucos elementos ópticos e não possuem fendas que atenuem a radiação. Em consequência, a potência radiante que atinge o detector é muito maior do que nos instrumentos dispersivos e a razão sinal/ruído observada é muito maior. Uma segunda vantagem está relacionada à alta resolução e na reprodutibilidade do comprimento de onda, os quais permitem a análise de espectros complexos. Por fim, uma terceira vantagem surge porque todos os elementos da fonte atingem o detector simultaneamente, ou seja, é possível obter os dados de todo o espectro em menos de 1 segundo.

No espectrofotômetro FT, a codificação é obtida dividindo-se a fonte de radiação em dois feixes cujos caminhos ópticos podem ser variados periodicamente para fornecer padrões de interferência. A transformada de Fourier é, então, usada para o processamento de dados. A Figura 2.4 apresenta um esquema básico dos componentes principais de um equipamento de infravermelho:

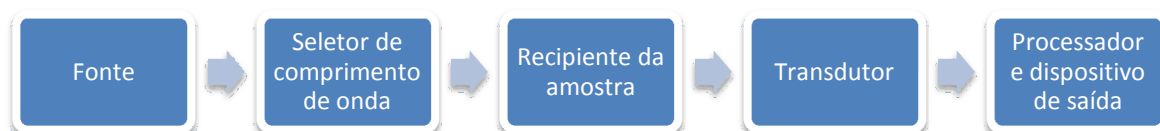


FIGURA 2.4 – COMPONENTES BÁSICOS DE UM EQUIPAMENTO QUE OPERA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

FONTE: VALDERRAMA (2005)

As fontes de infravermelho consistem em um sólido inerte. A fonte de luz mais comum é a radiação térmica, produzida por um filamento incandescente, normalmente lâmpadas de tungstênio ou quartzo/halogêneo, para a região NIR e barras de carbono-silício (globars), para a região MID. São vários os exemplos de fontes para a região do infravermelho que encontram aplicações de acordo com o interesse específico ou a região NIR/MID/FAR (COATES, 1999; SKOOG, HOLLER e

NIEMAN, 2002). O modo como a luz é espectralmente modulada define o princípio óptico do equipamento. Este pode ser dispersivo ou interferométrico.

De acordo com as vantagens citadas acima, atualmente os espectrofotômetros são interferométricos. O princípio deste tipo de equipamento consiste na separação temporal da radiação, impondo diferentes tempos de chegada da radiação ao detector. Um interferômetro divide a luz em dois feixes. Um feixe reflete de um espelho fixo e o outro feixe de um espelho móvel. Os dois feixes são então recombinados depois de espalhados espacialmente resultando num interferograma que é uma variação sinusoidal da intensidade da luz, cuja frequência é função do comprimento de onda. Quando o sinal do interferograma interage com a amostra, as frequências específicas de energia são absorvidas pela amostra a par da excitação vibracional do grupo funcional das moléculas. O interferograma detectado não pode ser diretamente interpretado. O espectro é reconstruído por aplicação da transformada de Fourier (FT), obtendo-se a representação da absorbância (ou transmitância) em função do número de onda (COATES, 1999).

A seleção de comprimento de onda, que originam os espectros interferométricos é o que diferencia um equipamento de infravermelho dos equipamentos utilizados nas regiões do ultravioleta e do visível (COATES, 1999; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). Os recipientes para a amostra variam de acordo com a região NIR/MID/FAR e com o estado físico da amostra (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Os transdutores para o infravermelho são de três tipos gerais: transdutores térmicos; transdutores piroelétricos; transdutor fotocondutor. Esses tipos de transdutores são encontrados em instrumentos com transformada de Fourier e têm como principal objetivo absorver a radiação e transmitir ao detector (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

2.3.3. Métodos de análise da amostra

Dependendo da amostra, o espectro pode ser medido em modo de transmitância ou de reflectância. A radiação, ao incidir numa amostra, pode ser absorvida, transmitida ou refletida.

A lei de Lambert-Beer relaciona a quantidade de radiação absorvida pela amostra com a concentração das espécies absorventes nesta. Esta relação linear

permite o uso de medições de absorvância para previsão de concentrações. A lei de Lambert-Beer é assim dada por (Equação 2.1),

$$A = \epsilon bC \quad (2.1)$$

Onde A é a absorvância, ϵ o coeficiente de absorvidade (para um dado comprimento de onda), b o percurso óptico e C a concentração.

A transmitância (T) mede o decréscimo na intensidade da radiação, em função do número de onda, quando esta passa através da amostra e é absorvida. A amostra deve então ser minimamente transparente à radiação e é colocada entre a fonte e o detector. Assim, há que ter em conta a preparação da amostra, nomeadamente a sua concentração, homogeneidade, e o tamanho das partículas nela presentes. É o método indicado para líquidos, dado que nestes o efeito da reflexão seja desprezável. A transmitância pode ser descrita como a razão entre a intensidade de energia transmitida através da amostra (I) e a intensidade de luz incidente (I_0), conforme a Equação 2.2:

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-A} \quad (2.2)$$

sendo A é a absorvância.

Por outro lado, os métodos de reflectância (R) podem ser usados em amostras que são difíceis de analisar por métodos de transmitância. Os métodos de reflectância podem ser divididos em duas categorias: a reflectância interna, que envolve uma célula de reflectância total atenuada em contato com a amostra, e a reflectância externa que envolve um feixe de infravermelhos refletido diretamente da superfície da amostra. Na reflectância externa, a radiação, quando incide na amostra, pode ser refletida sob a forma de reflectância especular ou difusa. A reflectância é fortemente afetada pelas características físicas da amostra, tais como a granulometria e o grau de homogeneidade, assim como a forma e características superficiais das partículas, que influenciam de forma sistemática o espectro em toda a sua gama de comprimentos de onda (OSBORNE, JORDAN e KÜNNEMEYER, 1997).

2.3.3.1. Reflectância Total Atenuada (ATR)

Muitas substâncias podem ser caracterizadas, identificadas e quantificadas mediante a espectroscopia no infravermelho. A ATR é uma técnica extremamente robusta e segura para estudos quantitativos envolvendo líquidos. Um acessório de reflexão total atenuada opera medindo as mudanças que ocorrem em um feixe de infravermelho que sofre reflexão interna total, ao entrar em contato com a amostra. O feixe de infravermelho é direcionado para um cristal opticamente denso com alto índice de refração, em certo ângulo. Essa reflectância interna cria uma onda evanescente que se estende para além da superfície do cristal no interior da amostra mantida em contato com o cristal. Tal onda evanescente sobressai apenas poucos microns (0,5 a 5 μm) além da superfície cristalina e no interior da amostra. Em regiões do espectro de infravermelho onde a amostra absorve energia, a onda evanescente será atenuada ou alterada. A energia atenuada de cada onda evanescente retorna para o feixe de infravermelho, que então sai pela extremidade oposta do cristal e atinge o detector do espectrômetro, gerando o espectro de infravermelho. Dos vários cristais empregados na ATR destacam-se o seleneto de zinco, o germânio e o diamante. Nas unidades de ATR horizontais, o número de reflexões da radiação infravermelha em cada superfície do cristal está usualmente entre cinco e dez, dependendo do comprimento e da espessura do cristal e do ângulo de incidência. A técnica de reflectância total atenuada tem em anos recentes, revolucionado análises de amostras líquidas e sólidas porque combate os aspectos mais desafiadores da análise em infravermelho, nomeadamente a preparação de amostras e a reprodutibilidade espectral (STUARD, 2004). Na Figura 2.5 apresenta-se uma visão simplificada da técnica de amostragem por ATR.

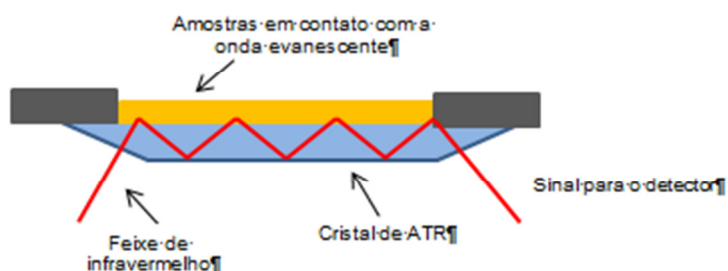


FIGURA 2.5 – ESQUEMA DE UM SISTEMA DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR) COM MÚLTIPLAS REFLEXÕES

FONTE: adaptado de STUART (2004)

2.3.3.2. Reflectância Difusa

Considerando-se a reflectância difusa, a energia que penetra em uma partícula ou em um aglomerado de partículas é refletida em todas as direções. A reflectância difusa mede a razão entre a intensidade da luz refletida a partir da amostra, ou seja, a porção de radiação que penetra na superfície da amostra e não é absorvida, mas refletida, e a intensidade da luz incidente. A técnica reflectância difusa, conhecida como DRIFTS (*Difuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), a qual é aplicada principalmente para superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (moído). O mecanismo de funcionamento da energia radiante ocorre com a penetração do feixe de luz e interação com as substâncias da amostra e, após absorção parcial e múltiplos espalhamentos, esta energia retorna à superfície (Figura 2.6). É importante salientar que a energia em reflectância difusa é atenuada após entrar em contato diversas vezes com as partículas da amostra, fornecendo muitas informações analíticas (CORDEIRO, 2006).

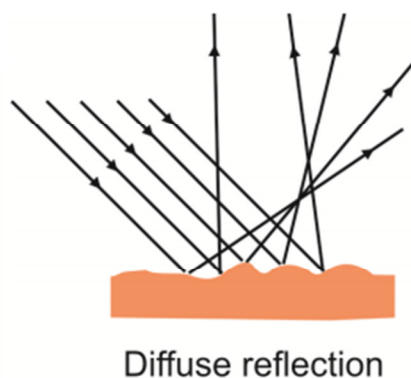


FIGURA 2.6 – REPRESENTAÇÃO DA REFLECTÂNCIA DIFUSA

FONTE: KHOSHESAB (2012)

O acessório DRIFTS é projetado para eliminar a radiação refletida especularmente. Outro aspecto relevante é a diferenciação entre o espectro da luz difusa e o espectro de transmissão comum (feito com pastilhas de KBr). Embora a luz difusa forneça um espectro similar ao de transmissão comum, o caminho óptico

da luz pode ser variável, enquanto que o espectro de transmissão ele é constante para todo o comprimento de onda, o que torna as intensidades relativas das bandas diferentes (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Dessa forma na espectroscopia de reflectância difusa, não há uma relação linear entre a intensidade da luz refletida (intensidade da banda) e a concentração da amostra, em contraste com a espectroscopia de transmissão tradicional, na qual a intensidade da banda é diretamente proporcional à concentração. Portanto, as análises quantitativas por DRIFTS são bastante complicadas. A equação empírica de Kubelka-Munk (Equação 2.3) relaciona a intensidade da radiação refletida com a concentração que pode ser utilizado para a avaliação quantitativa. A equação de Kubelka-Munk é definida como (FERRÃO, 2001):

$$f(R\alpha) = \frac{(1-R\alpha)^2}{2R\alpha} \quad (2.3)$$

Onde $R\alpha$ é a reflectância difusa

De acordo com a teoria, $f(R\alpha)$ está relacionado com o coeficiente de absorção (K) e com o coeficiente de dispersão (S), expressos conforme a Equação 2.4.

$$f(R\alpha) = \frac{K}{S} \quad (2.4)$$

Aplicando a função de Kubelka-Munk, produz-se um espectro de reflectância (espectro corrigido), que se assemelha a espectros de transmissão. Além disso, o espectro corrigido demonstra relação linear entre a intensidade da banda e a concentração da amostra (KHOSHESAB, 2012).

O efeito do tamanho da partícula causa deslocamento de linha base e torna-se profundamente pronunciado em comprimentos de onda com grande absorção pelas amostras. Assim, por exemplo, em duas amostras de mesma composição, mas diferentes granulometrias haverá maior reflectância difusa nas partículas menores (MESSERCHMIDT, 1999).

2.4. Calibração multivariada

A calibração multivariada foi desenvolvida na década de 70 e foi usada primeiramente na região do infravermelho próximo, onde até então era difícil designar bandas para componentes particulares.

Com o desenvolvimento de técnicas adequadas mais rápidas e seletivas, os avanços computacionais, principalmente na área da programação e interfaceamento de instrumentos aos computadores, tornou-se possível obter um grande número de variáveis de uma única amostra, produzindo assim uma enorme quantidade de informações.

Um exemplo notável é a intensidade de absorção em vários comprimentos de onda que rotineiramente é registrada em um único espectro. A posse desta grande quantidade de dados associada à utilização de ferramentas químiométricas possibilita extrair informações relevantes mesmo a partir de dados químicos de natureza multivariada. A quimiometria por sua vez, pode ser definida como uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar e/ou selecionar experimentos de forma otimizada, a fim de fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (FERREIRA *et al.*, 1999).

De maneira geral, o procedimento da análise química é realizado primeiramente com a aplicação de alguns tratamentos químicos que são utilizados com o objetivo de transformar a amostra, levando-a a um estado químico compatível com a técnica analítica disponível. Posteriormente, modelos de calibração são desenvolvidos para obtenção de uma função de regressão que permita prever a quantidade de espécie de interesse, a partir do parâmetro químico medido. Embora o método de calibração univariado seja o mais empregado, esta metodologia subutiliza os dados. A utilização de apenas um parâmetro dificulta, e às vezes até impossibilita a determinação de um constituinte ou constituintes em amostras cujos componentes apresentam interferências espectrais. A calibração multivariada, por sua vez, permite a determinação de um componente de interesse em matrizes complexas ou a análise de multicomponentes em sistemas mais simples, onde há severa interferência espectral (TOZETTO, 2005).

A calibração pode ser definida como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente (BRERETON, 2000).

Dois etapas são importantes na calibração multivariada: a construção do modelo (calibração) e a verificação de sua validade, ou seja, se o modelo construído

é ou não realístico (previsão ou validação). Na etapa de calibração, são obtidas, uma matriz com as respostas instrumentais (variáveis independentes – **X**) e uma matriz com os resultados das concentrações (variáveis dependentes – **Y**), normalmente obtidos pelos métodos convencionais de análise. Os dados assim organizados constituem o conjunto de calibração. Diante disto, cria-se um modelo matemático adequado que possa melhor reproduzir **Y** a partir dos dados de **X**. O modelo construído será, então, utilizado na fase de previsão para estimar as concentrações dos constituintes de novas amostras, a partir de suas respostas instrumentais (variáveis independentes). Os dados utilizados nesta fase formam o conjunto de validação.

De maneira a exemplificar, a calibração em análise multivariada é realizada com “*n*” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida em “*p*” valores de comprimento de onda diferentes formando uma matriz **X** com “*n*” linhas e “*p*” colunas. Uma matriz **Y** com os valores de concentração também deve ser formada contendo “*n*” linhas, correspondente às diferentes amostras, e “*q*” colunas, indicando o número de diferentes analitos presentes nas amostras. Um modelo de calibração, na verdade, é uma função matemática que relaciona dois grupos de variáveis, uma delas denominada dependente (**Y**) e a outra denominada independente (**X**):

$$\mathbf{Y} = f(\mathbf{X}) = \mathbf{Xb}$$

Esta etapa representa a calibração e, por isso, o conjunto de dados empregado para essa finalidade é chamado de conjunto de calibração. Os parâmetros do modelo estão no vetor de coeficientes de regressão **b** com “*p*” linhas e “*q*” colunas e é determinado matematicamente a partir dos dados experimentais (HELLAND, 1998; MARTENS e NAES, 1996). A partir de então, concentrações de constituintes de variáveis independentes obtidas, de um outro conjunto de amostras, são previstos pelo modelo de calibração calculado. Dessa forma, permitirá a avaliação sobre o desempenho do modelo de calibração proposto (MARTENS e NAES, 1996).

Uma diversidade de métodos de regressão vem sendo utilizado em química analítica para a construção de modelos de calibração multivariada, dentre esses os mais empregados tem sido a regressão linear múltipla (MLR), regressão por

componentes principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR), que são métodos para ajuste linear entre as variáveis. Tem-se verificado que a maioria dos métodos de calibração multivariada empregados em espectroscopia, utiliza ajuste linear entre as variáveis.

2.4.1. Pré-processamento dos dados espectroscópicos

Os espectros adquiridos no infravermelho podem apresentar problemas de deformação da linha de base, variações no caminho óptico, ruídos, entre outros. Dessa forma, os pré-processamentos são aplicados para melhorar a eficiência dos modelos multivariados. Os pré-processamentos são aplicados antes da fase de calibração. Existem vários procedimentos matemáticos relatados na literatura como por exemplo: dados centrados na média, correção multiplicativa de sinal (MSC), alisamento, cálculo da derivada e outros (MARTENS e NAES, 1996). Os principais pré-processamentos aplicados para desenvolvimento de modelos multivariados para determinação de parâmetros de qualidade de frutos são apresentados na sequência:

a) Dados centrados na média (DCM): essa técnica garante que todos os resultados sejam interpretados em termos de variação em torno da média. Isto é feito, obtendo-se um o valor médio \bar{x}_i e, em seguida, subtrai-se este valor de cada variável dessa mesma coluna. Desta forma, ocorre a mudança do sistema de coordenadas para o centro dos dados. Esta operação geralmente reduz a dimensão do modelo (THOMAS, 1994). A Equação 2.5 é utilizada para centrar os dados na média (OZAKI *et al.*, 2007).

$$x_{(i,k)} = x_{(i,k)} - \bar{x}_i \quad (2.5)$$

Onde \bar{x}_i é o valor médio correspondente a i -ésima coluna.

b) Correção multiplicativa de sinal (MSC): quando a aquisição dos espectros faz-se por técnicas de reflexão, alguns fenômenos não desejados podem ocorrer, como por exemplo, o espalhamento da luz, provocado pela não homogeneidade da amostra, principalmente pelas diferenças de granulometria, geometria, empacotamento e orientação das partículas. Também costumam acompanhar os sinais analíticos, obtidos por técnicas instrumentais, ruídos das mais

diversas origens (MORGANO, 2005). A presença destes ruídos pode dificultar a interpretação, bem como a modelagem das propriedades associadas aos sinais espectrais, sendo recomendada sua eliminação ou minimização. A técnica de MSC é um método poderoso para corrigir variações (OZAKI *et al.*, 2007). A interferência relativa ao espalhamento de luz é minimizada com base no espalhamento médio de todos os espectros formadores na matriz de dados. Para tanto, é inicialmente calculado o espectro médio x_i , fazendo-se a média das absorbâncias para todas as amostras da matriz de dados \mathbf{X} , para cada uma das colunas (referente a cada um dos comprimentos de onda do espectro). Calcula-se o coeficiente de regressão, através do método de regressão linear para cada um dos espectros originais em relação ao espectro médio em cada um dos comprimentos de onda, o que resulta na equação da reta apresentada pela expressão abaixo (Equação 2.6).

$$x_i = u_i 1 + v_i \cdot x_{m\u00e9dio} \quad (2.6)$$

Finalmente utilizam-se os coeficientes linear (u_i) e angular (v_i) da reta para corrigir cada um dos espectros originais, conforme a relação (Equação 2.7).

$$x_{corrigido} = \frac{(x_i - u_i 1)}{v_i} \quad (2.7)$$

c) Derivatização: neste pré-processamento, faz-se a compensação do aumento da linha de base e melhora-se a separação de sinais não totalmente sobrepostos (ombros), realçando-os. Para este cálculo é utilizado o algoritmo de Savitzky-Golay, que calcula uma média móvel e os dados são estimados pela função polinomial de primeiro grau. Deve-se ter cuidado ao aplicar este tipo de transformação, pois além dos sinais espectrais, os ruídos também se tornam acentuados e, desta forma é muito comum empregar o alisamento junto com a primeira derivada.

d) Alisamento ou *Smooth*: tem a finalidade de reduzir os ruídos espectrais, através da utilização do algoritmo de Savitzky-Golay. Nesta aproximação, o mínimo quadrado do valor de um dado ponto é calculado e ponderado em combinação do mesmo, mais m pontos em cada lado. Isto corresponde a um movimento ($2m+1$ pontos) no ajuste por mínimos quadrados através dos dados

(GORRY, 1990). Essa técnica utiliza uma janela móvel que ao invés de tirar a média dos pontos, usa-se o ajuste polinomial. O efeito suavizante torna-se mais significativo quando o tamanho da janela aumenta, porém as distorções dos sinais originais tornam-se mais sérias. Portanto, a escolha do tamanho de janela para o filtro de Savitzky-Golay é muito importante (STUART, 2004).

e) Normalização: é realizada dividindo-se cada intensidade espectral pela raiz quadrada da soma dos quadrados de todas as intensidades do espectro correspondente, calculada através da Equação 2.8 (MORGANO, 2005).

$$x_{ij} = x_{ij} / (\sum x_{ij}^2)^{1/2} \quad (2.8)$$

Este processo é o mesmo que multiplicar cada elemento no vetor linha por uma constante b (Equação 2.9)

$$b = 1 / (\sum x_{ij}^2)^{1/2} \quad (2.9)$$

2.4.2. Análise de Componente Principal (PCA)

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é a análise por componentes principais (PCA – Principal Component Analysis) que consiste numa transformação da matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de “fatores”. Constrói-se um novo sistema de eixos (denominados rotineiramente de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (Figura 2.7). Estas novas variáveis são obtidas em ordem decrescente de quantidade de informação estatística que descrevem, ou seja, a primeira componente principal aponta a direção de maior variação dos dados, a segunda, que é ortogonal à primeira, aponta a outra direção que descreve a maior variação restante dos dados e assim por diante (BEEBE *et al.*, 1998; SHARAF *et al.*, 1986). É importante sempre destacar as duas grandes premissas da PCA, ou seja, a redução de variáveis, sem perder informação relevante (FERREIRA *et al.*, 1999).

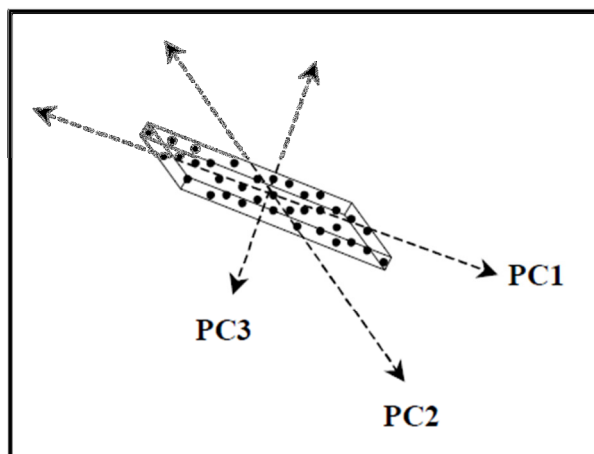


FIGURA 2.7 – GRÁFICO TRIDIMENSIONAL ILUSTRANDO OS EIXOS DAS COMPONENTES PRINCIPAIS

FONTE: TOZETTO (2005)

Em termos analíticos instrumentais, esta redução do espaço dimensional, conseguido através da seleção de poucas componentes principais, possibilita remover o ruído instrumental (ou variações aleatórias), bem como as informações redundantes fornecidas por variáveis altamente correlacionadas (colinearidade) (TOZETTO, 2005).

A aplicação da PCA propicia a obtenção de duas novas informações, extremamente úteis: os escores e os pesos (*loadings*). Os scores são novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais. Como cada componente principal é construída pela combinação linear das variáveis originais, os *loadings* são os coeficientes desta combinação, ou seja, trata-se do peso que cada variável original contribui para a obtenção do novo sistema de eixos (FERREIRA *et al.*, 1999).

Objetivos adicionais de usos da PCA nos desenvolvimentos dos modelos multivariados são: classificação de grupos específicos e detecção de amostras diferenciadas. Esta metodologia tem recebido grande atenção devido à rapidez da análise e baixo custo, propiciando resultados positivos e demonstrando seu potencial para o controle de qualidade.

A espectroscopia de infravermelho em conjunto com a técnica PCA tem sido amplamente empregada para análises em frutos e reportados na literatura. Egidio *et al.*, (2009) verificaram a evolução da vida de prateleira de abacaxis usando a

espectroscopia MID e NIR e a técnica PCA. A análise de componente principal permitiu separar as amostras “novas” das amostras “velhas” armazenadas em diferentes temperaturas, demonstrando o potencial desta metodologia para identificar amostras que apresentam composição diferenciada, devido ao tempo de estocagem (mesmo sendo da mesma origem).

A qualidade pós-colheita de maçãs de diferentes origens (Bélgica, África do Sul, França e Itália) foi avaliada através da espectroscopia NIR com análise de PCA, a qual demonstrou-se eficiente em separar os frutos das distintas localidades (BOBELYN *et al.*, 2010).

Camps e Christen (2009) utilizaram a espectroscopia NIR para avaliar a qualidade de frutos de damasco com três diferentes variedades (Bergarouge, Harostar e Kioto). A metodologia PCA, foi aplicada para discriminar as amostras. A PC1 foi responsável por classificar as amostras de acordo com cada variedade, já a PC2 separou os frutos coloridos dos não coloridos com um erro de aproximadamente 14%.

Os espectros MID de frutos de damasco de oito diferentes cultivares (Moniquei; Goldrich; Bergeron; Iranien; Badami; Ravicille; Ravilonge A4034A) foram analisados através da metodologia PCA para verificar a composição de ácidos orgânicos e açúcares. Com a análise da PC1 e PC2 observou-se uma relação da composição de ácidos orgânicos e açúcares com a maturação. A PC1 separou os cultivares com maior quantidade de açúcar (lado direito ou lado positivo da PC) e cultivares com maior quantidade de ácidos (lado esquerdo ou lado negativo da PC). Demonstrando mais uma vez a eficácia da técnica PCA para classificação de grupos específicos.

2.4.3. Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR)

O método de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) é um método de análise multivariado quantitativo considerado eficiente principalmente por lidar com ruídos experimentais, colinearidade e não linearidade (FERREIRA *et al.*, 1999).

PLSR é um exemplo de método de calibração indireto, pois não exige que os espectros individuais dos constituintes de interesse, nem dos interferentes, sejam conhecidos previamente. Entretanto, requer análise de uma série de amostras de calibração (conjunto de calibração), cuja composição seja conhecida (COATES,

1999). Essa calibração deve levar em conta todos os fenômenos físicos e químicos que possam afetar os espectros das amostras cujas concentrações deverão ser previstas (conjunto de validação).

No modelo PLSR as informações espectrais (matriz \mathbf{X}) e as informações das concentrações (matriz \mathbf{Y}) são usadas ao mesmo tempo correlacionando-as a fim de se obter uma relação linear na fase de calibração.

A regressão dos mínimos quadrados parciais (PLSR) para a construção do modelo, retira informações do conjunto de dados da matriz espectral (matriz \mathbf{X}) para correlacioná-la com as informações retiradas do conjunto de dados de referência (matriz \mathbf{Y}). Portanto, o método decompõe as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} em uma soma de produtos de dois vetores (scores, \mathbf{T} e \mathbf{U} e *loadings* \mathbf{P} e \mathbf{Q}) para cada um deles representando uma componente principal. Existem vários algoritmos matemáticos para calcular esta decomposição, sendo que o mais utilizado é conhecido por NIPALS (GELADI e KOWALSKI, 1986). O modelo resultante para as decomposições estão apresentados nas Equações 2.10 e 2.11.

$$X = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (2.10)$$

$$Y = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad (2.11)$$

Os elementos das matrizes \mathbf{T} e \mathbf{U} são os scores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} respectivamente, e os elementos P e Q são os pesos ou *loadings*. As matrizes \mathbf{E} e \mathbf{F} correspondem aos erros, ou seja o quanto o modelo construído não consegue explicar os dados originais.

Por meio das combinações lineares dos dados espectroscópicos (matriz \mathbf{X}) e dos dados de referência (matriz \mathbf{Y}), se obtém o número de variáveis latentes (VL) necessários para correlacionar os espectros e as concentrações. É usado para construção do modelo de calibração um número de variáveis latentes que proporcione o menor erro possível de previsão, ou seja, que as diferenças entre os valores de referência e os valores previstos sejam os menores.

A seleção do número de VL a serem incluídas no modelo de regressão criado é um ponto muito importante. Deve-se sempre selecionar um número de variáveis latentes suficientes que permita modelar o sistema de forma a não ser super ajustado e também não deve modelar ruídos. Um modelo com maior número de

variáveis latentes é mais ajustado, porém pode estar modelando informações irrelevantes (ruídos). Já um número muito baixo de VL pode deixar informações importantes de fora. O número ideal de VL é aquele que permite o desenvolvimento de um modelo com boa capacidade de previsão para amostras externas. Um dos métodos mais usados para a escolha do número de variáveis latentes é a validação cruzada (MARTENS e NAES, 1996) particularmente uma rotina denominada *Leave-one-out*. Neste procedimento, deixa-se uma mostra de fora, de uma série de n amostras, $n-1$ amostras são usadas na calibração e é feita a previsão da concentração da amostra que não foi usada para o desenvolvimento do modelo de calibração. O processo é repetido até que todas as amostras tenham sido excluídas uma vez. Compara-se a concentração de cada amostra prevista pelo modelo com o valor de referência e determina-se o erro de validação cruzada "RMSECV" (Raiz Quadrada da Soma dos erros da Validação Cruzada). O número mais adequado de VL será o correspondente ao menor valor de RMSECV (MARTENS e NAES, 1996; KOWALSKI, 1991).

A detecção de "*outliers*" é tão importante quanto a determinação do número de componentes principais que serão empregadas no modelo. Ao verificar a qualidade do conjunto de calibração, deve-se assegurar de que as amostras formam um conjunto homogêneo, removendo-se aquelas amostras que são solitárias. Para a detecção de "*outliers*", usam-se duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de *Student*. A *leverage* é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de *leverage* pequeno indica que a amostra em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração. Por outro lado, se as medidas experimentais de uma amostra são diferentes das outras do conjunto de calibração, ela provavelmente terá uma alta influência no modelo, que pode ser negativa. Em geral, estas amostras solitárias estão visíveis no gráfico de *scores*. A *leverage* pode ser interpretada geometricamente como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados e é calculada segundo a Equação 2.12 (FERREIRA *et al.*, 1999).

$$leverage = \frac{3VL}{n} \quad (2.12)$$

Os resíduos das concentrações também devem ser analisados. Amostras mal modeladas têm resíduos altos. Para obter a influência de cada amostra em

particular, temos o resíduo de *Student*, o qual indica se a amostra está dentro de uma distribuição normal com um nível de confiança de 95%, assumindo que os valores de limite de $\pm 2,5$ (FERREIRA *et al.*, 1999).

2.4.4. Avaliação dos modelos de calibração

Os modelos de calibração são avaliados através dos erros RMSEC (Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Calibração) e RMSECV (Raiz Quadrada da Soma dos erros da Validação Cruzada). Além desses parâmetros de erros, que auxiliam na escolha dos modelos de calibração, a análise dos valores dos coeficientes de regressão (R^2), entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais, permite avaliar a capacidade de previsão dos modelos multivariados. A equação para obtenção de RMSEC, RMSECV e RMSEP pode ser visualizada na Equação 2.13.

$$RMSEC, RMSECV \text{ ou } RMSEP = \sqrt{(\sum_{i=1}^n (y' - y)^2 / n)^{1/2}} \quad (2.13)$$

Onde n representa o número de amostras do conjunto de calibração e/ou do conjunto de validação, y_i é o valor de referência e y'_i é o valor previsto pelo modelo para i -ésima amostra. Nesses casos as unidades dos erros são referentes às unidades da análise em questão.

Após a escolha do melhor modelo de calibração, sua capacidade de previsão pode ser averiguada aplicando-o para determinar a concentração da composição de uma série de amostras de referência (validação externa), de composição diferente das amostras que faziam parte com do conjunto de calibração (não participaram do desenvolvimento do modelo). Essas amostras de validação externa devem ser representativas (MARTENS e NAES, 1996).

A partir dessa etapa o modelo de calibração multivariado é avaliado através do erro de previsão (RMSEP) e/ou erro médio relativo percentual (ER%), entre os valores calculados pelo modelo e os valores das análises de referência (Equação 2.14). O erro da etapa de validação externa, expressa a exatidão que pode ser esperada para amostras de composição desconhecida (HAALAND, 1990).

$$ER(\%) = \frac{\sum(y_i - y'_i)}{y_i} 100 \quad (2.14)$$

Coeficiente de regressão linear (R^2_v) da etapa de validação externa exibido pelo gráfico de valor experimental (obtidos pelos métodos de referencia) em função do valor previsto (calculado pelo modelo de regressão) é também avaliado, é um parâmetro muito importante e de fácil interpretação. Quanto mais próximo de 1 melhor o ajuste ou habilidade de previsão do modelo de regressão (MORGANO, 2005).

De fato, quanto maior o valor dos coeficientes de regressão e quanto menor os valores dos erros das etapas de calibração e validação externa, melhores são os resultados obtidos pelos modelos.

2.5. Aplicações da espectroscopia MID e NIR em frutos

As técnicas MID e NIR tem provado ser uma poderosa ferramenta analítica para determinar diversos compostos, substâncias, ou quantificar constituintes em produtos alimentícios (MCGOVERIN *et al.*, 2010) e na fruticultura esta ferramenta vem sendo utilizada em inúmeras as aplicações.

Clark *et al.*, (2003) colheram abacates (*Hass*) em diferentes estádios de crescimento e determinaram a quantidade de matéria seca dos frutos através de espectrofotômetro Vis/NIR nos modos de refletância e interactância. O melhor resultado para a etapa de validação externa (60 frutos) foi utilizando o modo de interactancia, a qual apresentou um valor de coeficiente de regressão de 0,88 com um erro de predição de 1,3% de matéria seca, para tanto utilizou 12 Variáveis latentes para desenvolver o modelo de calibração. Os autores relataram que pequenas características espectrais eram necessárias para melhorar a previsão.

Louw e Thern (2010) avaliaram os parâmetros de qualidade de três cultivares de ameixa (Pioneer, Laetitia e Angelenodo) Sul da África. Oitenta frutos foram coletados semanalmente por um período de sete semanas, iniciando na terceira semana antes da data de colheita comercial. As medidas em espectrofotômetro NIR-FT modo reflectância, foram realizadas nos frutos inteiros em dois lados opostos. Para os sólidos solúveis totais (SST) um valor de R^2 de 0,959 e um RMSEP de 0,52°Brix foi encontrado utilizando a faixa espectral de 1800 – 800 nm, 10 VLs e o

pré-processamento MSC. A acidez titulável (AT) apresentou um R^2 de 0,785 e um RMSEP de 0,16% ácido málico foi encontrado, utilizando a faixa espectral de 1800 – 1600 nm, 11 VLs e o pré-processamento SNV (*standard normal variate*). Para a relação de SST/AT foi aplicado também o pré-processamento SNV na faixa espectral de 1300 a 1100 nm utilizando 11 variáveis latentes e valores de $R^2= 0,896$ e RMSEP=1,4 foram relatados.

Davey *et al.*, (2009) determinaram o conteúdo de carotenóides em 66 amostras de bananas liofilizadas através da relação entre a análise de referência determinada em HPLC e dados espectroscópicos adquiridos em Vis/NIR em modo reflectância difusa. Para β -caroteno, o carotenóide em maior quantidade (144,8 nmol.g⁻¹ de matéria seca), foi encontrado um valor de coeficiente de regressão para a etapa de validação cruzada de 0,89 com um valor de RMSECV de 16,16 nmol.g⁻¹ de matéria seca. Quando o modelo foi aplicado para prever as amostras da validação externa (17 amostras) um aumento no valor do coeficiente de regressão (R^2 da validação externa = 0,92 e RMSEP = 17,07 nmol.g⁻¹ de matéria seca) foi observado.

Scibisz *et al* (2011) utilizaram 340 frutos de tomates, distribuídos em 39 diferentes cultivares, para verificar a eficácia da espectroscopia MID na determinação de parâmetros de qualidade. Os espectros MID das polpas dos tomates foram coletados em espectrofotômetro equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR). Os seguintes resultados foram obtidos na etapa de validação externa: matéria seca ($R^2 = 0,93$ e RMSEP = 3,7% faixa espectral = 1600 a 920 cm⁻¹), sólidos solúveis ($R^2 = 0,97$ e RMSEP = 3,3%; faixa espectral = 1600 a 920 cm⁻¹), glucose ($R^2 = 0,95$ e RMSEP = 5,4%; faixa espectral = 1800 a 1000 cm⁻¹), frutose ($R^2 = 0,91$ e RMSEP = 6,9%; faixa espectral = 1200 a 920 cm⁻¹), acidez total ($R^2 = 0,94$ e RMSEP = 5,5%; faixa espectral = 1800 a 1200 cm⁻¹), ácido cítrico ($R^2 = 0,92$ e RMSEP = 8,2%), ácido málico ($R^2 = 0,77$ e RMSEP = 36,9%; faixa espectral = 1600 a 1200 cm⁻¹).

Cinco diferentes cultivares de frutos de palmeiras do Irã (Estamiran, Kabkab, Mazafati, Piarom e Degletnour) e um cultivar da Tunísia (Zahedi) foram estudados por Tavakolian *et al.*, (2013). Os autores selecionaram 100 amostras de cada cultivar. Espectros de cada amostra foram adquiridos em espectrofotômetro NIR no modo reflectância difusa e em seguida foram realizadas as análises de referência (peso seco, firmeza e conteúdo de sólidos solúveis). Os resultados foram

satisfatórios sendo que para o peso seco foi obtido valores para a etapa de validação externa de $R^2 = 0,928$ com $RMSEP = 2.07\%$ utilizando a faixa espectral de 1100 – 2200 nm. Para a firmeza valores de $R^2 = 0,792$ com $RMSEP = 1.03$ Newton foram encontrados empregando o intervalo de comprimento de onda de 1300 a 2300 nm e para o conteúdo de sólidos solúveis a região espectral foi semelhante a utilizada para o peso seco e os valores encontrados foram de $R^2 = 0,93$ com $RMSEP = 2.18^\circ\text{Brix}$.

Oliveira *et al.*, (2014) avaliaram a eficiência da espectroscopia NIR para determinar o conteúdo de sólidos solúveis e a acidez titulável em três frutos com características distintas: maracujá (casca grossa), tomate (estrutura interna heterogênea) e damasco (casca fina e estrutura interna homogênea). Foram utilizados neste estudo 61 frutos de maracujá (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*), em dois estádios de maturação (verde-amarelo e amarelo), adquiridos no sul do Brasil. Para o tomate, um total de 150 frutos do cultivar 'Levovil', em cinco estádios de maturação (verde, verde-laranja, laranja-verde, laranja, vermelho) foram colhidos no sul da França, onde também foram adquiridos os 116 frutos de damasco de três cultivares, denominados 'Bergeron', 'Iranien' e 'A4034', em duas fases diferentes de maturação: amarelo (imaturos) e laranja (maduro). Os resultados revelaram baixas correlações para ambos os parâmetros de qualidade, AT e SSC, para o maracujá ($R^2 = 0,49$ e $0,63$, respectivamente) e o tomate ($R^2 = 0,51$ e $0,52$, respectivamente) e boa correlação para o damasco ($R^2 = 0,95$ e $0,93$, respectivamente). Os baixos valores de correlação para o maracujá foram atribuídos a baixa penetração da radiação infravermelha, devido a pele grossa do fruto. Para os tomates, as características internas (heterogeneidade) e altos teores de água conduziu a fraca correlação. Por outro lado, para o damasco, que é um fruto com a pele fina e polpa homogênea, boas previsão foram observadas.

Nota-se que cada trabalho considera características específicas para avaliação dos modelos. Alguns autores optaram por um maior número de VLS (CLARK *et al.*, 2003), outros apresentam o erro de predição em forma de RMSEP, o qual representa o erro em unidades das análises, sendo que o erro relativo em porcentagem facilitaria a interpretação dos dados (LOUW e THERN, 2010; TAVAKOLIAN *et al.*, 2013), observou-se ainda que em outros estudos, foram utilizadas faixas espectrais relativamente menores (SCIBISZ *et al.*, 2011). De maneira particular, cada trabalho apresentou os dados obtidos pelos modelos,

demonstrando que existem varias maneiras de expor os resultados, entretanto, é importante que se tenha sempre em mente os critérios de avaliação.

2.6. Considerações finais sobre a revisão da literatura

A revisão de literatura permitiu observar alguns pontos importantes, tais como:

a) A necessidade de práticas de determinação de parâmetros de qualidade em frutos, sendo que dessa forma, pode-se dimensionar de maneira adequada e eficiente os frutos para as diversas aplicações, seja industrialização, exportação e/ou comercialização, obtendo-se um melhor aproveitamento e rendimento dos mesmos;

b) A aplicação da espectroscopia na região do infravermelho médio e próximo e o desenvolvimento de modelos de calibração multivariados tem se mostrado apropriado como ferramenta para a determinação da composição química dos frutos;

c) A literatura consultada apresentou ainda bons resultados para o emprego da espectroscopia na região do infravermelho próximo para determinar os parâmetros de qualidade em frutos intactos. Entretanto, nota-se que estas pesquisas foram realizadas em frutos de características semelhantes, ou seja, frutos com casca fina e polpa homogênea: ameixa (LOUW e THERON, 2010; PÉREZ-MARÍN *et al.*, 2010), nectarina, pêssego e ameixa (GOLIC e WALSH, 2006), damasco (BUREAU *et al.*, 2009), tomate (SCIBISZ *et al.*, 2011; SIRISOMBOON *et al.*, 2012). Nenhum estudo foi desenvolvido com o maracujá, o qual é um fruto de importância nacional e apresenta características distintas dos frutos relatados acima;

d) Verificou-se também que poucos trabalhos foram desenvolvidos para determinar a concentração de açúcares individuais em frutos. Ressaltando que entre os vários parâmetros de qualidade, o conteúdo de açúcar é um dos mais importantes;

e) Além disso, constatou-se uma ausência de estudos para a comparação entre as duas técnicas MID e NIR em relação a determinação dos parâmetros de qualidade dos frutos.

CAPITULO 3 – PARÂMETROS DE QUALIDADE DO FRUTO DE MARACUJÁ INTACTO

3.1. Introdução

Quando um fruto é destinado à industrialização ou exportação, a avaliação da qualidade torna-se indispensável, sendo que é através da mesma que se define o valor de comercialização e também qual a melhor utilização do fruto para que possa proporcionar um maior rendimento. Neste contexto, a determinação da qualidade dos frutos torna-se uma questão de grande relevância. O máximo de qualidade que o fruto pode atingir em relação ao conteúdo de sólidos solúveis, acidez titulável, açúcares, ácidos orgânicos, cor, firmeza entre outros parâmetros de qualidade, está relacionada com a sua maturidade fisiológica. No caso da industrialização, após a avaliação da qualidade dos frutos, estes podem ser armazenados caso ainda não tenham atingido o estágio máximo de maturação, ou processados rapidamente para não perder a qualidade ideal. Já para a exportação, a avaliação da qualidade pode auxiliar no controle de amadurecimento, com a aplicação de inibidores de etileno durante o trajeto e se necessária, a aplicação de aceleradores do amadurecimento quando recebidos, garantindo dessa forma, que os mesmos desenvolvam as características desejadas (parâmetros de qualidade) em momentos oportunos.

Para avaliar esses parâmetros de qualidade, muitos dos métodos usados são baseados em processos complexos de preparo da amostra, usam uma grande quantidade de reagentes, envolvem uma considerável quantidade de trabalho manual, demandam tempo e principalmente destroem o fruto (CAYUELA e WEILAND, 2010). Devido a todos esses fatores, muitas vezes, os frutos são processados sem avaliação prévia, e portanto, podem não ter atingido seu ponto ótimo de maturação, ocasionando diminuição de rendimento. Em relação às exportações, em muitos casos, quando não se realiza as análises dos parâmetros de qualidade e não se conhece a maturidade fisiológica dos frutos, estes são perdidos durante as etapas de transporte, armazenamento e distribuição.

No caso do maracujá, os frutos que ainda não completaram o estágio de maturação apresentam baixa concentração de açúcares e elevada acidez. A má qualidade do produto presente no mercado é, muitas vezes, devido à colheita de frutos imaturos (BONGHI *et al.*, 1999). A incidência do sol em algumas regiões das

plantas de maracujá pode influenciar na colheita do fruto, alterando a coloração da casca (verde para amarelo), porém com falsa maturidade fisiológica (SILVA *et al.*, 2005).

Frutos imaturos não permitem a melhor expressão do potencial de qualidade, mas garantem um produto facilmente manipulado ao longo da cadeia comercial (BONGHI *et al.*, 1999; CRISOSTO *et al.*, 2006), principalmente para exportações. Por outro lado, o fruto que atinge a maturidade fisiológica ideal, garante a aceitação do consumidor e maior rendimento na industrialização, mas está associado à alta susceptibilidade, a contusões e a rápida deterioração (INFANTE *et al.*, 2012), necessitando ser processado ou consumido rapidamente.

Neste contexto, a demanda por uma técnica rápida, e principalmente, não destrutiva, para determinar os parâmetros de qualidade de frutos intactos torna-se extremamente interessante tanto para as indústrias como para as exportações. A espectroscopia na região do infravermelho próximo é uma ferramenta com alto potencial analítico, pois fornece um perfil completo da composição da amostra intacta, apresenta alta sensibilidade, é de fácil implementação e de baixo custo operacional (FERRARINI, 2004; TOZETTO, 2005).

Uma busca mais apurada na literatura revelou que ainda não foi verificada a eficiência da técnica NIR para determinar parâmetros de qualidade em frutos de maracujá intactos, apesar da importância econômica deste fruto para o país. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar a eficácia da espectroscopia no infravermelho próximo, para determinar parâmetros de qualidade de frutos de maracujá intactos. Com este intuito, correlações foram desenvolvidas entre os espectros adquiridos do fruto intacto com a composição interna do fruto (acidez titulável e sólidos solúveis) referente a polpa *in natura* e com a composição externa do fruto, particularmente expressa pelos carotenoides e clorofila presentes na casca.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Seleção e preparação dos frutos de maracujá

Um total de 150 frutos de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*), colhidos em nos anos de 2011, 2012 e 2013, com diferentes estádios de maturação

(verde-amarelo e amarelo), adquiridos na região de Curitiba foram utilizados neste estudo.

A Tabela 3.1 apresenta a quantidade de frutos que foram utilizados para cada parâmetro de qualidade. As análises de cor e firmeza são determinações físicas e não foram utilizadas para correlacionar com os espectros NIR, porém foram realizadas a fim de proporcionar a avaliação da maturidade dos frutos. As análises de cor, acidez titulável (AT) e conteúdo de sólidos solúveis (SSC) foram realizadas durante todos os anos de estudo. Para apresentar os resultados obtidos para estes parâmetros nos diferentes anos, foram selecionadas apenas 30 amostras (ou 30 frutos) de cada ano, totalizando 90 amostras. As outras análises, como a firmeza, concentração de carotenóides e de clorofila, foram realizadas apenas nos primeiro ano de pesquisa, quando foi avaliada a relação da espectroscopia NIR com os parâmetros referêntes à casca do fruto de maracujá, empregando-se, portanto, para essa finalidade 60 frutos.

TABELA 3.1 – PERFIL DOS FRUTOS DE MARACUJÁ AVALIADOS NESTE ESTUDO

Análise de referência	Quantidade de amostras/ ano	Ano de estudo
Carotenóides	60	2011
Clorofila	60	2011
Firmeza	60	2011
SSC	30	2011, 2012 e 2013
Acidez titulável	30	2011, 2012 e 2013
Cor	30	2011, 2012 e 2013

Assim que recebidos, os frutos foram identificados e reservados em atmosfera refrigerada (4°C) para análises posteriores. Inicialmente, foram realizadas as análises do fruto intacto, tais como a aquisição dos espectros em NIR e a determinação da cor e firmeza. Em seguida, os frutos foram cortados e a polpa foi separada das sementes através de filtração simples. As cascas e as polpas foram armazenadas sob refrigeração para análises físico-químicas posteriores.

3.2.2. Obtenção dos espectros na região em NIR

Os espectros no infravermelho próximo (NIR) foram registrados em um espectrofotômetro FT-NIR (BrukerOptics, Wissembourg, França) equipado com uma esfera de integração para fornecer medidas de reflectância difusa e um detector de TE-InGaAs. As medidas foram controladas pelo software OPUS Versão 5,0 que foi fornecido pela Bruker Optics.

O espectro NIR de cada fruto intacto foi obtido tomando-se em média 32 varreduras em uma região espectral entre 1000 a 2500 nm com uma resolução de 2 nm. Os frutos foram posicionados com o eixo-tronco na horizontal e os espectros de reflectância difusa foram medidos em várias posições. Trabalhou-se posteriormente com a média dos espectros.

3.2.3. Determinação da cor do fruto

A cor de cada fruto de maracujá foi determinada em triplicata utilizando um espectrofotômetro de reflectância Hunterlab (marca MINISCAN XE plus, modelo 45/0-L). O sistema de cor CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) L^* , a^* e b^* (L^* =luminosidade; a^* =tonalidade verde-vermelha; b^* =tonalidade azul-amarela) foi utilizado.

3.2.4. Determinação da firmeza do fruto intacto

A avaliação da firmeza dos frutos foi feita por compressão utilizando um texturômetro Brookfield CT3 Texture Analyzer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, E.U.A.), com *probe* de compressão cilíndrico P-75 (aço inoxidável, 5 mm comprimento x 75 mm diâmetro) e base retangular TA-BT-KIT. A velocidade do teste foi de 2 mm.s^{-1} até a tensão de 25% ser alcançada. Cada fruto foi comprimido na secção equatorial. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente, e os resultados expressos em quilogramas (kg).

3.2.5. Determinação de carotenóides totais da casca do fruto

A quantificação de carotenóides totais da casca do fruto foi realizada segundo Rodriguez-Amaya (2001). Durante toda a análise tomou-se cuidado com a luz e o

oxigênio. As vidrarias foram cobertas com papel alumínio, e a análise foi feita com o mínimo possível de iluminação para evitar a degradação.

Os reagentes utilizados foram: acetona P.A., éter de petróleo P.A. (mistura de pentano e hexano) e celite.

Os carotenóides foram extraídos em capela de exaustão. A amostra de casca de maracujá (aproximadamente 3 a 5 g) foi triturada e homogeneizada com celite e acetona. Em seguida a solução foi filtrada em papel filtro. A massa retida no papel foi lavada com acetona até descoloração completa (amostra incolor). O filtrado (amostra em acetona) foi coletado e transferido para um funil de separação, onde se adicionou 30 mL de éter de petróleo e 100 mL de água destilada, vagarosamente, evitando a formação de emulsão. Com a adição da água, ocorreu a separação das fases, uma contendo o éter de petróleo e os carotenóides e outra constituída de água e acetona. A remoção da acetona ocorreu, seguida de varias lavagens com água destilada, com cuidado para não haver perda dos carotenóides. No final da lavagem a solução foi recolhida em um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi aferido com éter de petróleo.

As leituras em absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro Ultrospec 1100 *pro* UV-Vis (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) a 450 nm, em triplicata, empregando-se o éter de petróleo como branco. Utilizou-se nos cálculos o valor do coeficiente de absorção do éter de petróleo ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$). Como a leitura da absorbância deveria estar no intervalo de 0,2 a 0,8, amostras com valores inferiores a 0,2 foram descartas do conjunto e amostras com leituras superiores a 0,8 foram diluídas. O calculo do conteúdo de carotenóides totais na casca de maracujá foi realizado através da equação 3.1 (RODRIGUES-AMAYA, 2001).

$$CT (\mu\text{g. g}^{-1} \text{ de materia fresca}) = \frac{10^4 \cdot A \cdot V}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m} \quad (3.1)$$

Onde: CT = concentração de carotenóides totais; A = absorbância no maior pico detectado; V = volume do balão utilizado na diluição (mL); m = massa da amostra (g); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = parâmetro, igual a 2592.

3.2.6. Determinação de clorofila da casca do fruto

A concentração de clorofila a, b e clorofila total foram determinadas por colorimetria de acordo com a metodologia proposta por Arnon (1949). A amostra da casca dos frutos de maracujá (aproximadamente 3 a 5 g) foi triturada e homogeneizada com acetona a 85%. A solução foi filtrada em papel filtro diretamente em um balão volumétrico de 100 mL. A massa retida no papel foi lavada com acetona a 85% até descoloração completa (amostra incolor). O volume foi aferido com a solução de acetona a 85%. As leituras em absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro Ultrospec 1100 *pro* UV-Vis (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) a 645 e 663 nm em triplicata utilizando a acetona a 85% como branco.

Os teores de clorofila foram determinados através das equações 3.2, 3.3 e 3.4 (ESPOSTI, 2002):

$$C_a = \frac{(12.7 \times A_{663} - 2.64 \times A_{645})V}{1000 \times m} \quad (3.2)$$

$$C_b = \frac{(22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663})V}{1000 \times m} \quad (3.3)$$

$$C_{total} = C_a + C_b \quad (3.4)$$

em que: C_a é o teor de clorofila a ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de matéria fresca); C_b é o teor de clorofila b ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); A_{645} e A_{668} são os valores de absorvância em 645 e 668 nm respectivamente e C_{total} é o teor de clorofila total ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

3.2.7. Determinação do conteúdo de sólidos solúveis (SSC) da polpa *in natura*

Alíquotas das polpas (triplicata) foram transferidas para o refratômetro de bancada (RL3 - Warszawar) com compensação de temperatura e o resultado foi expresso em °Brix (AOAC, 1992).

3.2.8. Determinação de acidez titulável (AT) da polpa *in natura*

A AT foi determinada a partir de três medidas realizadas por titulação direta da amostra da polpa *in natura* de maracujá. Essa metodologia é indicada para soluções escuras ou fortemente colorida (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O método baseia-se na titulação potenciométrica da amostra com solução de hidróxido de sódio de concentração 0,1 M, onde se determina o ponto de equivalência pela medida do pH da solução. Pipetou-se 2 ml da amostra homogeneizada em um béquer de 300 mL, diluiu-se com 100 mL de água destilada e manteve-se a solução em agitação constante. Em seguida, mergulhou-se o eletrodo do potenciômetro pHmetro digital (Micronal, modelo B-474, devidamente calibrado em soluções tampão 4 e 7), na solução e titulou-se com a solução de hidróxido de sódio 0,1 M até atingir um valor de pH entre 8,2 e 8,4. O resultado foi expresso em g do ácido orgânico predominante (ácido cítrico) por cem gramas de amostra.

3.2.9. Desenvolvimento dos modelos multivariados

Os espectros foram divididos em dois conjuntos: grupo de calibração com 75% dos espectros e o grupo de validação externa com 25%. Para tanto, foi aplicada a técnica de análise de componente principal (PCA), que além de possibilitar essa divisão, auxilia também na identificação de grupos particulares e de amostras anômalas. Cuidados foram tomados para que as amostras do conjunto de validação externa não fossem as de maiores ou menores concentrações do conjunto total.

Na construção dos modelos de calibração multivariada foi utilizado o método de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR), utilizando o pacote PLS-toolbox 1.5 (Eigenvector Research Inc.), em ambiente Matlab versão 7.0 (Mathworks Inc.).

Modelos multivariados de calibração foram preliminarmente desenvolvidos com características particulares para cada parâmetro, utilizando-se diversas regiões espectrais e vários tipos de pré-processamento de sinais.

Entre os vários pré-processamentos, o SNV (*standard normal variate*), Dados Centrado na Média (DCM), a primeira e segunda derivada foram testados, mas em especial o alisamento (AL) e Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC) foram aplicados sobre os espectros. No primeiro caso, o pré-processamento elimina ruídos aleatórios de espectros de infravermelho próximo (NAES *et al.*, 2002). Enquanto que o MSC é usado para compensar o deslocamento de linha de base e

efeitos multiplicativos nos dados espectrais, que são induzidos por efeitos físicos, (MARTENS e STARK, 1991). A correção por MSC envolve o cálculo de uma regressão linear das respostas espectrais de cada espectro em relação ao espectro médio da população. O valor médio de deslocamento é então subtraído do espectro médio, e o resultado dividido pela inclinação para dar espectro MSC corrigido.

Para definir o melhor número de Variáveis Latentes (VL) foi utilizado o método de validação cruzada, denominada *Leave one out*. Neste procedimento, uma das amostras do conjunto de calibração é excluída da fase de desenvolvimento do modelo, sendo reservada como elemento de previsão. Finalmente, o erro de validação cruzada ou *cross validation* (RMSECV) é obtido. Através do gráfico que correlaciona o RMSECV em relação ao número de VL. Dessa forma é possível visualizar a quantidade mínima de Variáveis Latentes necessárias para desenvolver o modelo com o menor erro de calibração cruzada.

Para identificação de amostras anômalas (*outliers*) foram utilizados os critérios de resíduos de *Student* e *leverage*. O primeiro representa a influência de cada uma das amostras no modelo de regressão, apresentando um valor limite equivalente $\pm 2,5$ com um nível de confiança de 95%, enquanto o segundo pode ser obtido por $3 \text{ VL}/n$, onde VL representa o número de Variáveis Latentes e n o número de amostras. O *leverage* representa a medida de influência de uma amostra no modelo de regressão e pode ser interpretado como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados (FERREIRA *et al.*, 1999).

Por fim, a exatidão dos modelos dos parâmetros de qualidade da polpa liofilizada de maracujá foi analisada por intermédio dos erros expressos na forma de RMSEC (Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Calibração), RMSECV (Raiz da Soma dos Erros de Validação Cruzada) e RMSEP (Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Previsão) e erro relativo padrão (%). Além disso, foram avaliados os coeficientes de regressão dos conjuntos de calibração (R_c), validação cruzada (R_{cv}) e validação externa (R_v). Na verdade, R^2 indica a percentagem de variância na variável Y que é explicada pela variável X. Um valor de R^2 entre 0,50 e 0,65 indica que mais de 50% da variância em Y é contabilizado pela variável X, de forma que a discriminação entre as concentrações alta e baixa podem ser feitas. Um valor para R^2 entre 0,66 e 0,81 indica aproximadas previsões quantitativas, enquanto que um valor de R^2 entre 0,82 e 0,90 revela boa previsão. Modelos de calibração com um valor acima de 0,91 para R^2 são considerados excelentes (WILLIAMS, 2003).

3.3. Resultados e discussões

3.3.1. Caracterização das amostras de maracujá

Com relação à determinação da cor da casca dos frutos intactos, o parâmetro “L” (luminosidade) apresentou um valor médio e desvio padrão de $74,38 \pm 3,01$ e um intervalo de 53,48 a 82,65. Para o parâmetro “a”, relacionado com a tonalidade de verde ao vermelho, obteve-se o valor médio e desvio padrão de $3,28 \pm 1,04$, com um intervalo de -3,75 a 8,36, ressaltando que quanto menor o valor, mais forte é a coloração verde do fruto. O parâmetro “b”, o qual identifica a cor amarela, característica do fruto de maracujá maduro, apresentou um valor médio e desvio padrão de $46,66 \pm 2,84$ e um intervalo de 34,65 a 57,93. Neste caso, quanto maior o valor, maior a coloração amarela do fruto. Os intervalos dos parâmetros L*, a* e b* demonstraram a ampla variabilidade dos frutos utilizados nesse trabalho.

A firmeza de um fruto é o conjunto de propriedades químicas, que compõem a casca dos frutos, podem ser perceptíveis pelo tato e que se relacionam com a deformação e desintegração do alimento sob aplicação de uma força (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Ou seja, quanto maior a força necessária para a compressão do fruto até 25% da tensão ser alcançada, maior a firmeza do fruto, conseqüentemente menor é a sua maturação. Os resultados dos valores de firmeza encontrados para os 60 frutos de maracujá, apresentaram valores dentro do intervalo de 11,86 – 29,92 kg com valor médio de 22,75 kg. A média da firmeza encontrada neste estudo foi maior que os resultados obtidos por Jiménez *et al.*, (2011) os quais observaram valores de $18,65 \pm 3,04$ para frutos de maracujá (*Passiflora edulis Sims. foedulis*) maduros.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados das análises físico-químicas dos pigmentos da casca do fruto de maracujá (carotenóides e clorofila), conteúdo de sólidos solúveis e acidez titulável das amostras utilizadas neste estudo. Esses resultados representam os valores médios encontrados durante as análises, bem como, os intervalos (valores mínimo e máximo) o desvio padrão (δ), o coeficiente de variação (Cv) das análises e o número de amostras (n) utilizadas para cada parâmetro.

TABELA 3.2. PARÂMETROS DE QUALIDADE DO MARACUJÁ INTACTO: NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS (n), INTERVALO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO (δ) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV)

Parâmetro	n	Intervalo	Média	δ^*	Cv**
Carotenóides (mg.g ⁻¹ de matéria fresca)	60	0,12–0,75	0,38	0,14	36,48
Clorofila (mg.g ⁻¹ de matéria fresca)	60	0,03–0,19	0,06	0,02	14,81
AT (g.100g ⁻¹ de matéria fresca)	90	2,59–5,89	4,12	0,85	19,74
SSC (°Brix)	90	7,60–17,00	12,90	0,55	4,25

* δ = desvio padrão; **Cv = coeficiente de variação da análise (desvio padrão da análise / média da análise) x 100 (QUELI, 2010).

Os carotenóides são pigmentos relacionados à coloração que varia de amarelo a vermelho. Para o maracujá, em particular, a cor amarela é predominante na casca do fruto. A análise físico-química revelou um valor médio de 0,38 mg.g⁻¹ de matéria fresca com um coeficiente de variação de 36%. De acordo com Pimentel-Gomes (1985) o coeficiente de variação indica a heterogeneidade das amostras. Portanto, o conteúdo de carotenóides da casca do fruto de maracujá indicou uma grande diversidade das amostras em relação ao parâmetro.

A concentração de clorofila presente nas cascas dos frutos foi expressivamente baixa, com um valor médio de 0,06 mg.g⁻¹ de matéria fresca e um valor de coeficiente de variação de 14,8%, evidenciando que as amostras eram mais homogêneas com relação a este parâmetro.

As transformações físico-químicas dos frutos de maracujá são marcadas por processos degradativos e de síntese. Tais modificações podem ser observadas pela degradação da clorofila (verde) e síntese de carotenóides (amarelo) na casca do fruto. O início das mudanças na cor externa do maracujá amarelo acontece antes do começo da ascensão climatérica, quando há rápida transição da cor verde-amarelo para o amarelo (AWAD, 1993). Entretanto segundo Gamarra e Medina (1995), as alterações no teor de pigmentos da casca se dão de forma bastante irregular. Tal irregularidade foi observada nas amostras utilizadas neste trabalho, pois a amostra com menor teor de clorofila não foi a mesma amostra com maior conteúdo de carotenóides. Tal fato deve-se principalmente a dificuldade de dissolução da amostra (casca rígida do fruto) e a suscetibilidade de degradação dos pigmentos

durante a manipulação. Para nosso conhecimento, não foram encontrados na literatura resultados em relação a análise de pigmento da casca do fruto de maracujá.

Os valores de acidez titulável e conteúdo de sólidos solúveis encontrados nesse estudo foram semelhantes aos valores encontrados por Marchi *et al.*, (2000), com Silva *et al.*, (2005); Oliveira *et al.*, (2014).

3.3.2. Caracterização dos espectros NIR

Os espectros originais na região do infravermelho próximo dos frutos de maracujá intactos sem tratamento matemático estão expostos na Figura 3.1. Os sinais analíticos observados para os frutos de maracujá apresentam sobreposições, possivelmente devido a mistura complexa de componente relacionados à composição da casca. O perfil dos espectros são semelhantes a outros frutos intactos relatados na literatura como o damasco (BUREAU *et al.*, 2009), maçã (LIU e YING, 2005) e tomate (PEDRO e FERREIRA, 2005). A sobreposição de sinais dificulta a atribuição de uma determinada banda a uma única função química exclusivamente.

Sabe-se, entretanto, que estes espectros são de fato, dominados por bandas de absorção de água. Intervalos entre 2500 – 2000 nm são relatados como bandas de absorção de água e de formação O-H. Bandas de absorção em 1000 e 1400 nm são referidas com primeiro e segundo sobretom da água, e as bandas 1800 e 1100 nm são relatadas com primeiro e segundo sobretom de estiramento C-H (XIAPING *et al.*, 2008). Outro aspecto importante que pode ser verificado no gráfico é a similaridade dos espectros, mesmo sendo adquiridos de colheitas e anos diferentes, atribuindo confiabilidade aos resultados obtidos.

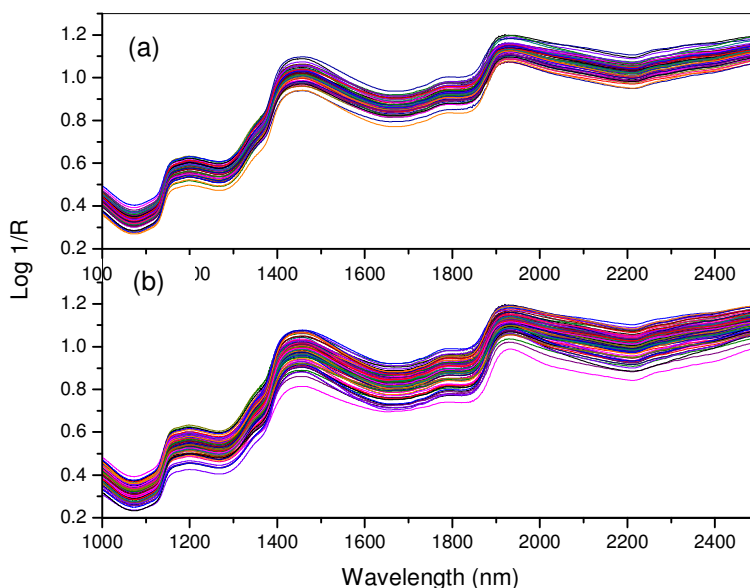


FIGURA 3.1 – ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) DOS FRUTOS DE MARACUJÁ INTACTOS SEM TRATAMENTO PRÉVIO: (a) 60 FRUTOS COLHIDOS EM 2011 E (b) 90 FRUTOS SENDO 30 FRUTOS COLHIDOS EM 2011, 30 FRUTOS COLHIDOS EM 2012 E 30 FRUTOS COLHIDOS EM 2013

Devido a dificuldade de atribuir uma única banda para um determinado composto, procurou-se obter os modelos otimizados para cada parâmetro de qualidade do fruto de maracujá individualmente e, em seguida, verificar se o comprimento de onda considerado como relevante para a construção dos modelos está relacionado às atribuições de absorção de adição das ligações químicas e grupos funcionais dos respectivos componentes estudados (carotenoides, clorofila, acidez titulável e conteúdo de sólidos solúveis).

3.3.3. Análise de Componente Principal

A Figura 3.2 apresenta a Análise de Componente Principal dos espectros de 60 amostras de fruto de maracujá adquiridos em 2011. Diferentes pré-processamentos foram aplicados, buscando obter alguma separação ou identificação de grupos específicos.

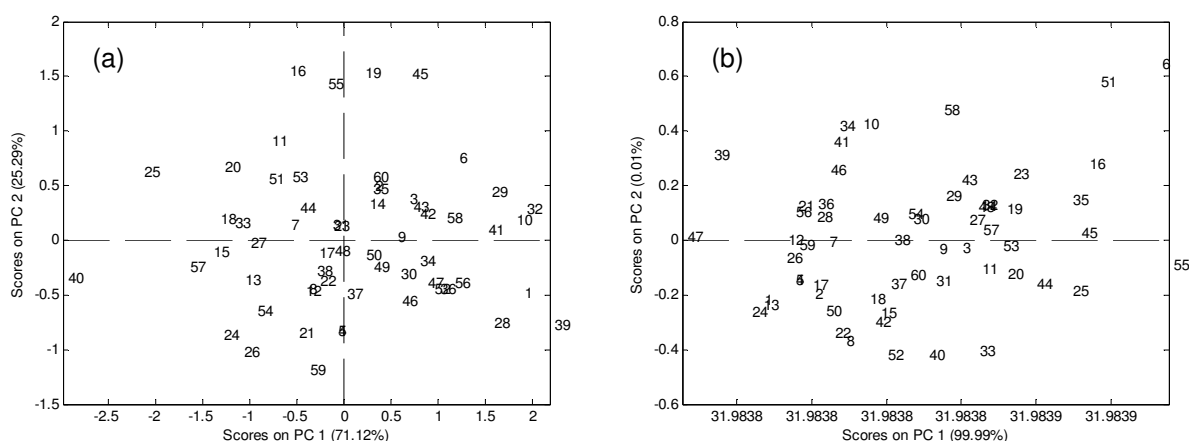


FIGURA 3.2 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DAS 60 AMOSTRAS DE CASCA DE MARACUJÁ COM DIFERENTES PROCESSAMENTOS DE DADOS: DCM (a) E MSC (b)

Mesmo após a aplicação do processamento Dados Centrado na Média (DCM), procedimento este que facilita a visualização dos dados (NICOLAI *et al.*, 2007), não foi possível observar a separação de grupos específicos (FIGURA 2.2a). O processamento Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC) também foi aplicado na tentativa de eliminar as interferências ocasionadas pelo espalhamento de luz no momento da aquisição do espectro. Observou-se a partir da análise da PC1 versus PC2 (FIGURA 2.2b), que a PC1 é responsável por explicar 99,97% da variância do modelo, ou seja, as amostras utilizadas neste estudo apresentavam composição química semelhante da casca do fruto. Resultados similares foram observados em relação aos 90 frutos de maracujá adquiridos em 2011, 2012 e 2013, conforme mostra a Figura 3.3.

A análise de componente principal, aplicando o processamento de sinal DCM (FIGURA 3.3a) revelou que independente do ano, as amostras apresentaram-se similares, não sendo possível separar grupos específicos. Notou-se apenas pequenas flutuações entre algumas amostras, como as amostras 61 e 70 (menor e maior valor de SSC, respectivamente), ambas pertencem ao ano de 2013. Ao analisar a PCA com o pré-processamento MSC (FIGURA 3.3b), observou-se mais uma vez que as amostras formaram um grupo homogêneo sem separação de grupos específicos e que a PC1 foi responsável por 99,98% da variância explicada pelo modelo, ou seja, todas as amostras, mesmo de diferentes anos, eram similares em relação a composição da casca do fruto.

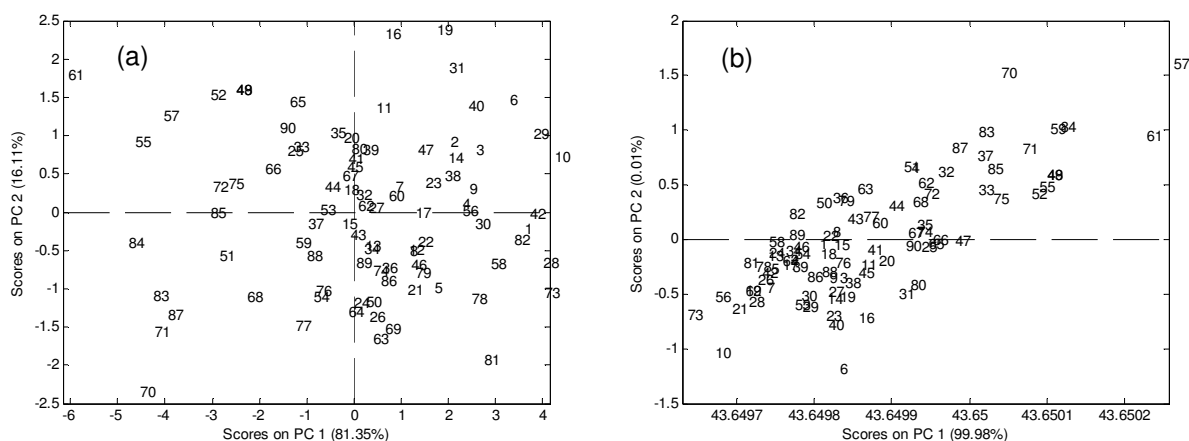


FIGURA 3.3 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DAS 90 AMOSTRAS DE CASCA DE MARACUJÁ EM DIFERENTES ANOS DE COLHEITA (2011, 2012 E 2013) APLICANDO OS PROCESSAMENTOS DE DADOS: DCM (a) E MSC (b)

A partir da análise de PCA para os dois grupos de estudo, 60 amostras para carotenoides e clorofila e 90 amostras para análises de SSC e AT, selecionou-se as amostras para compor o grupo de calibração e validação externa (TABELA 2.3).

TABELA 3.3 – NÚMERO DE AMOSTRAS (n), INTERVALO, DOS GRUPOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO EXTERNA DOS FRUTOS DE MARACUJÁ INTACTOS

Parâmetro	Grupo	n	Intervalo
Carotenoide (mg.g ⁻¹ de matéria fresca)	Calibração	45	0,12 – 0,75
	Validação	15	0,17 – 0,60
Clorofila (mg.g ⁻¹ de matéria fresca)	Calibração	45	0,03 – 0,19
	Validação	15	0,03 – 0,12
AT (g.100g ⁻¹ de matéria fresca)	Calibração	68	2,59 – 5,89
	Validação	22	3,09 – 4,67
SSC (°Brix)	Calibração	68	7,60 – 17,00
	Validação	22	10,00 – 16,00

3.3.4. Modelos de calibração

Inicialmente para a construção dos modelos de regressão multivariados para a determinação da concentração de carotenóides, clorofila, AT e SSC, utilizou-se a faixa espectral completa em NIR compreendida entre 1000 e 2500 nm. Vários tipos de pré-processamentos foram testados, dentre eles: MSC, DCM, Primeira e segunda Derivada (1d e 2d) e normalização. A Tabela 3.4 mostra um resumo dos resultados obtidos pelos modelos multivariados na etapa de calibração. Os melhores modelos para cada parâmetro estão apresentados em negrito.

TABELA 3.4 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA O CONTEÚDO DE CAROTENÓIDES, CLOROFILA, AT, E SSC EM CASCA E POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR

Parâmetro	Pré-processamento	VLs	outlier	RMSEC	RMSECV	R ² _c	R ² _{cv}
Carotenoides (mg g ⁻¹ de matéria fresca)	MSC	4	1	0,087	0,107	0,806	0,694
	MSC+1d	5	1	0,073	0,087	0,870	0,811
	MSC+1d	9	1	0,045	0,077	0,953	0,861
	MSC+2d	5	1	0,059	0,080	0,916	0,842
	Normalização	5	1	0,086	0,104	0,814	0,715
Clorofila (mg.g ⁻¹ de matéria fresca)	MSC	6	1	0,034	0,042	0,550	0,242
	MSC+1d	3	1	0,036	0,039	0,454	0,313
	MSC	7	0	0,027	0,035	0,558	0,198
AT (g 100g ⁻¹ de matéria fresca)	MSC	7	2	0,417	0,489	0,557	0,324
	MSC+1d	5	2	0,397	0,498	0,610	0,308
	MSC+2d	4	2	0,406	0,540	0,653	0,056
	Normalização	6	2	0,415	0,463	0,563	0,409
SSC (°Brix)	MSC	7	0	1,285	1,538	0,789	0,686
	MSC+1d	7	0	0,868	1,559	0,910	0,680
	MSC+2d	3	1	1,797	1,989	0,521	0,388
	Normalização	8	0	1,256	1,570	0,799	0,674

Ao avaliar a capacidade de previsão do conteúdo de carotenóides, clorofila, acidez titulável e sólidos solúveis através do fruto intacto, notou-se uma grande dificuldade para obter uma boa correlação entre os valores calculados pelos modelos e os valores encontrados pelas análises de referência. A literatura pesquisada, evidenciou que existem algumas limitações potenciais na utilização da

espectroscopia NIR que podem dificultar a previsão de parâmetros de qualidade em determinados frutos, são elas:

a) Espectros em NIR de frutos e legumes são dominados por bandas de absorção de água e a concentração típica de outros constituintes podem, em muitos casos não ser medida satisfatoriamente (NICOLAI *et al.*, 2007).

b) Em algumas situações, a dificuldade de predição pode estar vinculada ao fruto em si, tais como: variação do parâmetro de qualidade no interior do fruto e concentração do parâmetro no fruto (LONG E WALSH, 2006); características estruturais, como espessura da casca, ou polpa homogênea (OLIVEIRA *et al.*, 2014), ou local de amostragem do fruto.

c) As propriedades de radiação em NIR, relacionado com a profundidade de penetração em tecidos dos frutos (LAMMERTYN *et al.*, 2000; NICOLAI *et al.*, 2007), é possivelmente a maior dificuldade de determinação de parâmetros de qualidade em frutos intactos.

d) Por fim, existem ainda outras limitações que podem estar relacionadas com a robustez dos modelos de calibração (GOLIC e WALSH, 2006), e com conjuntos de amostras escolhidas, a qual deve apresentar o máximo de variabilidade.

Essas limitações foram cuidadosamente verificadas para cada parâmetro e discutidas na sequência.

3.3.4.1. Quantificação dos parâmetros de qualidade

Na etapa de determinação dos parâmetros de qualidade do maracujá intacto, observou-se que apenas para os carotenoides, pigmento presente na casca do fruto com concentração média de $0,38 \text{ mg.g}^{-1}$ de matéria fresca, foi possível obter uma correlação entre os dados obtidos na análise de referência e os valores determinados pelo modelo.

O melhor modelo de calibração para prever o conteúdo de carotenoides na casca do fruto de maracujá, está associado ao uso de 5 VLs, aplicando-se o MSC e primeira derivada, como processamento dos dados (TABELA 3.4).

A Figura 3.4 apresenta a evolução dos valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes para a construção do modelo para determinação de carotenóides.

A partir dos dados da Figura 3.4 foi possível observar que o modelo obtido apresenta um mínimo de valor de RMSECV com 9 VLs, porém com 5 VLs pouca diferença em termos de minimização dos valores de RMSECV (0,07 e 0,08, respectivamente) foi observada.

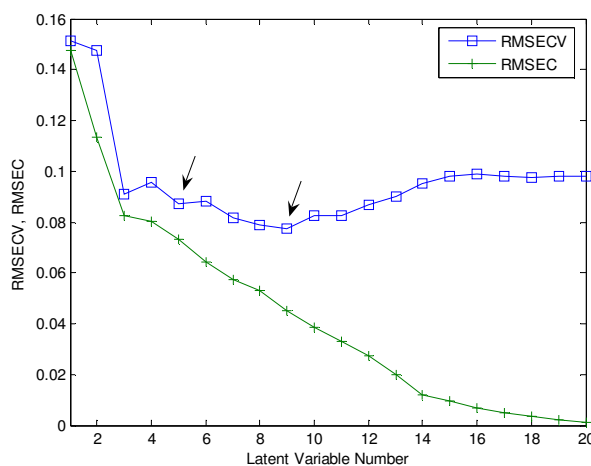


FIGURA 3.4 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA E EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES OBTIDOS DURANTE A CONSTRUÇÃO DO MODELO PARA DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

Além do pouco ganho em termos de minimização de RMSECV, através do gráfico de coeficiente de regressão (FIGURA 3.5) observou-se que o modelo com 9 VLs (FIGURA 3.5a) absorveu muitos ruídos, o que pode comprometer a qualidade de previsão. Por outro lado, no modelo com 5 VLs (FIGURA 3.5b), percebeu-se que este incluiu sinais de absorção específicos de grupamentos C-H e combinações de segundo sobreton (1300 a 1400 nm) e primeiro sobreton em aproximadamente 1800 nm, os quais são grupos da estrutura dos carotenóides (CHEN, ZHANG e MATSUNAGA, 2006) e apresentou menor quantidade de resíduos.

Portanto 5 VLs foram utilizadas para prever os valores de carotenoides totais em cascas de frutos de maracujá intacto. A escolha de um grande número de VLs pode gerar modelos superestimados e comprometer a previsão dos modelos, devido à agregação de ruídos (MADALOZZO, 2010).

As cinco variáveis latentes do modelo de calibração para determinação da concentração de carotenóides em casa de frutos de maracujá foram responsáveis

por explicar 99,13% da variabilidade espectral e 86,88% da variabilidade da concentração de carotenoides.

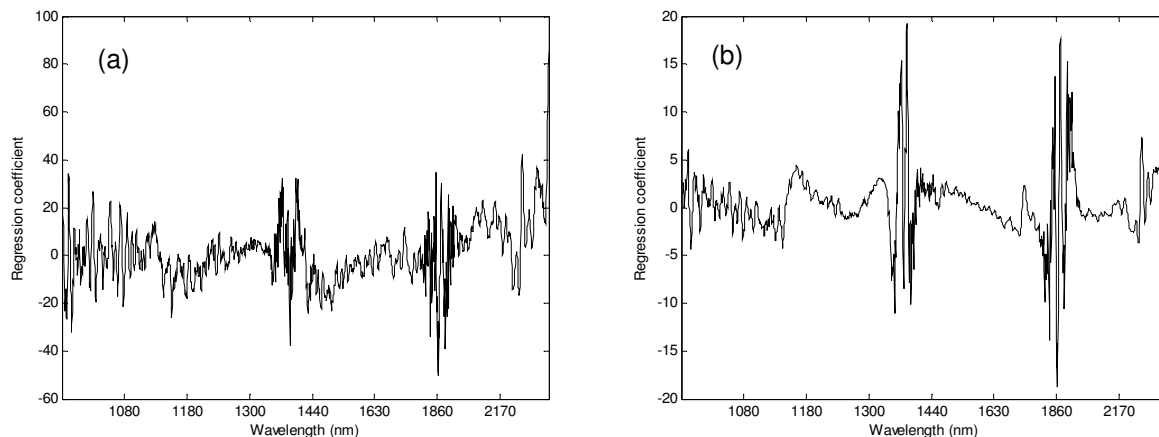


FIGURA 3.5 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS COM (a) 9 VLS E (b) 5 VLS

Outro aspecto importante da otimização do modelo está relacionado a identificação de amostras anômalas. Através da Figura 3.6, foi possível notar que a amostra 43 (em destaque) está fora do limite de resíduo de *Student* de ± 2.5 (95% de confiança). Neste caso, observaram-se os valores dos dados de referência e constatou-se que a amostra 43 apresentava a maior concentração de carotenóides ($0,75 \text{ mg.g}^{-1}$ de matéria fresca), por esse motivo a amostra não foi considerada *outlier* e permaneceu no grupo. Em relação ao limite de *leverage* de 0,33, as amostras 28 e 40 (em destaque) encontravam-se fora desse limite.

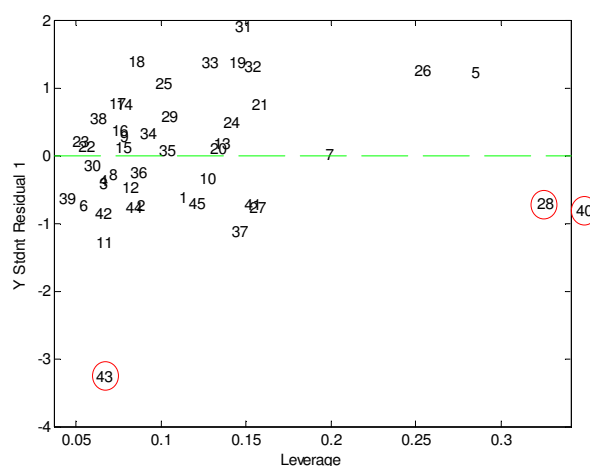


FIGURA 3.6 - RESÍDUOS DE *Student vs Leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES TOTAIS

Os valores das análises de referência revelaram valores de $0,48$ e $0,46 \text{ mg.g}^{-1}$ de matéria fresca para as amostras 28 e 40 respectivamente, os quais estavam dentro do limite mínimo e máximo. Ao verificar os espectros das respectivas amostras (FIGURA 3.7), constatou-se que não havia disparidades em relação à média dos espectros. Sendo assim, as duas amostras foram retiradas do conjunto de calibração, somente para testar o modelo, como não foi observadas alterações significativas nas características do modelo, as amostras 28 e 40 não foram classificadas como anômalas.

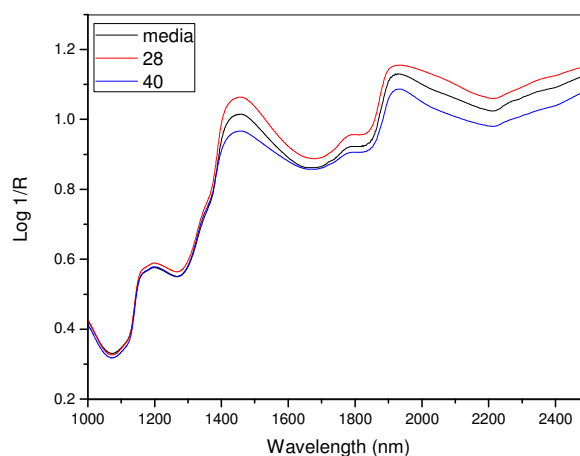


FIGURA 3.7 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS ANÔMALAS COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DO MODELO PLS PARA DETERMINAÇÃO DOS CAROTENÓIDES TOTAIS

Quando o modelo foi aplicado para prever a concentração de carotenóides totais das 15 amostras da etapa de validação externa, obteve-se um coeficiente de regressão de 0,703, um erro médio relativo de 17,9% e RMSEP de 0,08 mg.g⁻¹ de matéria fresca. A Figura 3.8 apresenta a dispersão entre os valores determinados pela análise de referência e previstos pelo modelo multivariado. Observa-se que os dados não se ajustaram adequadamente ao modelo.

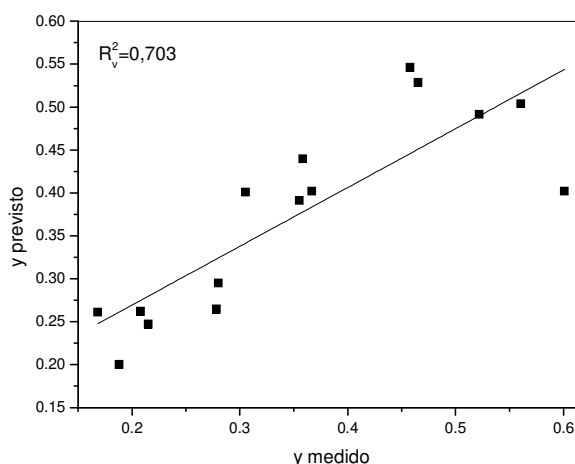


FIGURA 3.8 – VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 15 AMOSTRAS DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO CAROTENOIDES TOTAIS

Notoriamente a utilização da espectroscopia no infravermelho próximo para previsão do conteúdo de carotenoides é relatada na literatura como insatisfatória (RUIZ *et al.*, 2008; BRENNA e BERARDO, 2004). Nestas pesquisas, as análises de carotenóides foram realizadas utilizando como metodologia de referência a análise em HPLC, a qual apresenta maior exatidão e precisão em relação à análise de carotenoides totais pelo método físico-químico, utilizado neste estudo. Mesmo utilizando uma análise mais precisa, estes autores obtiveram resultados não apropriados, o que confirma a dificuldade em utilizar a espectroscopia em NIR para a determinação de carotenóides.

O modelo de calibração para a determinação do conteúdo de carotenóides totais em cascas dos frutos de maracujá demonstrou dificuldade de predição. O alto valor encontrado (17,9%) para o erro médio relativo indica a complexidade do

modelo em determinar o parâmetro. A análise de carotenoides totais pelo método físico-químico é uma análise que pode ser influenciada por muitos interferentes. Estas interferências referem-se a transformações sofridas pelos carotenóides como hidrogenação, desidrogenação, isomerização, rearranjos, etc., com consecutiva degradação do composto rapidamente após a exposição à luz e ao ambiente (SCHULZ *et al.*, 2005). Além disso, a casca do fruto é fibrosa, o que dificulta a extração dos pigmentos. Ademais, os outros componentes presentes na casca do fruto em maior quantidade (como as fibras, carboidratos), podem também interferir no desempenho dos modelos.

Em relação à quantificação de clorofila total através da espectroscopia em NIR, não foi possível obter modelos de calibração multivariados. A baixa concentração de clorofila total na casca dos frutos de maracujá (valor médio de 0.0649 mg.g^{-1} de matéria fresca) impossibilitou a correlação entre os dados de referência e os espectros em NIR. Segundo Alcalà *et al.*, (2008), quando a concentração do analito de interesse é baixa (inferior a 1%, v/v), não é possível o desenvolvimento de modelos de calibração. A técnica NIR possui sensibilidade limitada a essas concentrações.

Por outro lado, altas concentrações dos parâmetros AT e SSC foram encontradas nos frutos de maracujá utilizados neste estudo. Mesmo assim, os modelos multivariados desenvolvidos foram inadequados para prever ambos os parâmetros. Valores extremamente baixos de R^2_{cv} de 0,409 e 0,686 foram observados para acidez titulável e conteúdo de sólidos solúveis respectivamente (TABELA 3.4). Quando os modelos foram aplicados na etapa de previsão os resultados foram ainda piores apresentando coeficientes de regressão muito baixos com $R^2_v = 0,417$ para o conteúdo de sólidos solúveis e $R^2_v = 0,247$ para a acidez titulável e com erro médio relativo de aproximadamente 9,4% para ambos os parâmetros, conforme apresentado na Tabela 3.5.

TABELA 3.5 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA

Parâmetro	Intervalo espectral (nm)	n	RMSEP*	ER (%)	R ² _v
Carotenoides (mg g ⁻¹ de matéria fresca)	1000-2500	15	0,08	17,9	0,703
Clorofila (mg.g ⁻¹ de matéria fresca)	1000-2500	15	0,03	27.3	0,075
AT (g 100g ⁻¹ de matéria fresca)	1000-2500	22	0,43	9,42	0,247
SSC (°Brix)	1000-1800	22	1,37	9,42	0,417

*unidade dos parâmetros

O principal motivo atribuído para essa baixa previsão foi a dificuldade do NIR (especificamente o equipamento usado neste estudo) de ultrapassar a casca do fruto de maracujá. O maracujá é um fruto silvestre, com polpa succulenta. O endocarpo (polpa) contém sementes com arilo carnosos. O pericarpo é fino e branco e podem ser lignificados. Por outro lado a casca do fruto é grossa, podendo a espessura variar de 0,5 a 4,0 cm (VASCONCELLOS *et al.*, 2001). Acredita-se assim que a dificuldade encontrada no desenvolvimento dos modelos para a predição de SSC e AT em frutos intactos esteja associada à casca do fruto. Essa hipótese já se encontra relatada na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Conforme Nicolai *et al.*, 2007, a espessura da casca do fruto atua como uma barreira que impede a penetração da radiação na região do infravermelho. Nicolai e colaboradores (2007) ressaltaram ainda que a penetração da radiação em NIR em tecido de frutos diminui exponencialmente com a profundidade e dependendo da uniformidade do fruto, a determinação dos atributos de qualidade se torna difícil. A grossa casca do fruto de maracujá impediu a utilização de NIR para prever os parâmetros de qualidade SSC e AT presentes na composição interna do fruto.

Guthrie *et al.*, (2006) determinaram os sólidos solúveis totais em melões intactos e observaram um valor de coeficiente de regressão da etapa de calibração (R²_c = 0,74) inferior ao valor de coeficiente de regressão encontrado para outros frutos de casca fina: ameixa com R²_c = 0.98 (SLAUGHTER, THOMPSON, e TAN, 2003), nectarina com R²_c = 0.90 (GOLIC e WALSH, 2006) e damasco com R²_c = 0.92 (BUREAU *et al.*, 2009). O estudo de Guthrie *et al.*, (2006) revelou ainda que a

dificuldade de previsão foi também atribuída à heterogeneidade de distribuição SSC dentro do fruto e principalmente a pobre penetração da radiação NIR através da irregular e grossa casca do melão.

Dull *et al.*, (1989) utilizaram dois comprimentos de onda para avaliar o SSC em fatias de melão (913 e 884 nm) e melão intacto (896 e 860 nm). O coeficiente de regressão e o RMSEP encontrados para a fatia de melão foram de 0,968 e 1,56 °Brix respectivamente, e para o melão intacto estes índices foram iguais a 0,600 e 2,18 °Brix, respectivamente.

Flores *et al.*, (2008) avaliaram SSC em melancias e melões em fatias e intactos, utilizando um espectrofotômetro de arranjo de díodo equipado com faixa que cobre a região do visível e do infravermelho próximo. Os resultados de previsão de SSC para melancias fatiadas ($R^2 = 0,92$, RMSECV = 0,49) e melões ($R^2 = 0,94$, RMSECV = 0,60) foram relativamente melhores do que aqueles de melancias intactas ($R^2 = 0,81$, RMSECV = 0,93) e melões ($R^2 = 0,87$, RMSECV = 0,98).

3.4. Conclusão

A aplicabilidade da técnica de espectroscopia em NIR para determinar a concentração de carotenoides totais, clorofila total, conteúdo de sólidos solúveis e acidez titulável foi avaliada em frutos de maracujá intactos.

O desempenho dos modelos PLS de calibração e predição desenvolvidos para os diferentes parâmetros de qualidade demonstraram que as características físicas deste fruto afetam diretamente os resultados.

Correlações adequadas foram obtidas apenas para determinação do conteúdo de carotenoides totais, o qual é um parâmetro que apresentou um valor médio de concentração de 0,38 mg.g⁻¹ de matéria fresca e foi medido diretamente na casca do fruto. Mesmo assim, os resultados da etapa de previsão revelaram um erro médio relativo de aproximadamente 17%.

O conteúdo de clorofila total não foi previsto pelos modelos multivariados devido à baixa concentração do parâmetro presente na casca do fruto (0,07 mg.g⁻¹ de matéria fresca).

Os baixos valores de correlação entre os espectros em NIR do fruto intacto de maracujá e a concentração de SSC e AT na polpa *in natura* foram atribuídos a casca grossa do fruto, a qual dificulta a penetração da radiação em NIR e

consequentemente a inferência destes parâmetros internos. Mesmo com a baixa correlação encontrada, vale ressaltar que o erro médio de previsão para a determinação de SSC foi de aproximadamente 9,4%; e como o teor de SSC pode ser considerado um excelente indicador de rendimento para as indústrias e para as exportações, a utilização de técnica para a triagem dos frutos se justifica.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, entende-se que a espectroscopia em NIR possui algumas limitações para determinação de parâmetros de qualidade de frutos intactos, onde a boa previsão pode ser afetada pela baixa concentração do constituinte na amostra e principalmente pela característica física dos frutos a qual interfere na penetração da radiação. Portanto, vale a pena notar que há restrições específicas para cada tipo de fruto, como estas observadas para o maracujá intacto e que devem ser consideradas em aplicações da espectroscopia em NIR.

CAPITULO 4 – PARÂMETROS DE QUALIDADE DA POLPA *IN NATURA* DE MARACUJÁ

4.1. INTRODUÇÃO

A polpa de maracujá pode ser utilizada para o consumo *in natura*, entretanto, sua maior importância econômica está na utilização para fins industriais, sendo processada para fabricação de suco integral a 14°Brix e suco concentrado a 50°Brix, além de sorvetes, mousses, bebidas alcoólicas, entre outros (MORZELLE *et al.*, 2009).

A polpa do maracujá-amarelo é muito utilizada como matéria-prima, pois apresenta uma composição rica em nutrientes comparativamente a outros frutos. Geralmente a polpa do maracujá é composta por cerca 84% de água; 0,67% de proteínas; 0,18% de lipídios; 14,45% de carboidratos e 0,17% de fibra. É um produto com elevada acidez, com pH variando de 2,6 a 3,4, sendo o ácido cítrico responsável por mais de 90% da acidez total, seguido pelo ácido málico. Em relação ao conteúdo vitamínico, mostra-se rico em vitamina A (2,4 mg.100g⁻¹), niacina (2,2 mg.100g⁻¹) e ácido ascórbico (18,2 mg.100g⁻¹), apresentando ainda quantidade significativa dos minerais fósforo (25 mg.100g⁻¹), cálcio (4 mg.100g⁻¹) e ferro (0,36 mg.100g⁻¹). O aroma global do suco do maracujá-amarelo fruta é derivado da interação entre mais de trezentos compostos voláteis identificados (CABRAL, FREIRE JÚNIOR e MATTA, 2005).

Com o conhecimento dos constituintes que compõem a polpa dos frutos, torna-se possível uma melhor adequação do processo com consecutivo aumento no rendimento industrial. Existem diversos métodos descritos na literatura para a determinação da composição química de polpa de maracujá. Análises quantitativas de conteúdo de sólidos solúveis, acidez titulável, vitamina C foram realizadas por métodos tradicionais (PINHEIRO *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2009). O conteúdo e a identificação dos carotenoides em polpa de maracujá foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (SILVA e MERCADANTE, 2002). Os açúcares simples, tal como glucose, frutose e sacarose são elementos principais na polpa de maracujá, no entanto, ainda são pouco investigados.

Métodos instrumentais modernos tais como, cromatografia gasosa (GC), HPLC, análise enzimática, eletroquímica ou métodos químicos, podem fornecer

informações sobre os componentes presentes nas polpas dos frutos (GIANNOCCARO, WANG, e CHEN, 2008; RAMBLA, GARRIGUES, e DE LA GUARDIA, 1997). No entanto, a maioria destes métodos muitas vezes requer um processamento complexo, são demorados e principalmente utilizam uma enorme quantidade de reagentes químicos, aumentando os custos e tornando as análises inviáveis.

Diante do exposto, a espectroscopia na região do infravermelho se destaca como método de análise rápido e seguro, utiliza uma pequena quantidade de amostra e pode ser facilmente automatizado, ou seja, pode ser aplicado diretamente na linha processamento, avaliando o produto nas etapas de processamento e também o produto final. Neste sentido, o objetivo deste capítulo, foi avaliar a eficiência das técnicas MID e NIR para determinação dos parâmetros de qualidade da polpa in natura de maracujá.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Seleção e preparação dos frutos de maracujá

Uma quantidade de 130 frutos de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*) coletados na região de Curitiba no ano de 2013 em diferentes estádios de maturação foram utilizados neste estudo. Os frutos foram analisados em duas bateladas (60 frutos na primeira remessa e após 15 dias foram recebidos mais 70 frutos). Assim que recebidos, os frutos foram cortados e despulpados através de filtração simples.

As amostras referentes a cada fruto foram identificadas e após análise não destrutiva (MID e NIR) foram acondicionadas em embalagens com pouca presença de ar e reservadas em atmosfera refrigerada (-18°C) para análises posteriores. Para cada amostra foram adquiridos espectros na região do infravermelho próximo e médio e realizada a sua caracterização por análises físico-químicas e bioquímicas, tais como, açúcares individuais, acidez titulável, pH, vitamina C, SSC. O desvio padrão da análise foi verificado através de cinco repetições de uma mesma amostra.

4.2.2. Aquisição dos espectros na região de MID e NIR

Os espectros no infravermelho médio (MID) foram registrados à temperatura ambiente em um espectrofotômetro Tensor (Bruker Optics, Wissembourg, França) equipado com uma célula de seleneto de zinco, um detector DTGS (Deuterated Tri Glycine Sulfate) e com acessório de reflectância atenuada total (ATR). As medidas foram controladas pelo software OPUS Versão 5,0 que foi fornecido por Bruker Optics.

O espectro MID de cada amostra foi obtido pela média de 32 varreduras com uma região espectral compreendida entre 4000 a 800 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Amostras in natura e homogêneas foram colocadas na superfície do cristal. O espectro do ar foi utilizado como *background*. As amostras foram analisadas em triplicata e o espectro médio foi usado no desenvolvimento dos modelos.

Em relação à região no infravermelho próximo (NIR), os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro FT-NIR (Bruker Optics, Wissembourg, França) equipado com uma esfera de integração para fornecer medidas de reflectância difusa e um detector de TE-InGaAs. As medidas foram controladas pelo software OPUS Versão 5,0 que foi fornecido por Bruker Optics.

O espectro NIR de cada amostra foi obtido com uma média 32 varreduras em uma região espectral compreendida entre 800 a 2500 nm e resolução de 2 nm. Uma alíquota das amostras (aproximadamente 2 mL) de polpa de *maracujá in natura* foi transferida para cubetas de quartzo para aquisição dos espectros. Três espectros de cada amostra e a média da triplicata foram adquiridos e foram utilizados no desenvolvimento do modelo.

4.2.3. Determinação da Vitamina C

O teor de ácido ascórbico foi determinado pelo método Tillmans (titulométrico), que se baseia na redução de 2,6-diclorofenol – indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico (CARVALHO *et al.*, 1990). O DCFI em meio básico ou neutro é azul, em meio ácido é rosa, e sua forma reduzida é incolor. O ponto final da titulação foi detectado pela viragem da solução de incolor para rosa, quando a primeira gota de solução de DCFI foi introduzida no sistema, com todo o ácido ascórbico já consumido.

O sistema de análise era composto por três soluções:

1) Solução de DCFI 0,01%: pesou-se 100 mg de DCFI, diluiu-se em água destilada fervente e transferiu-se para um balão volumétrico de 1 L o qual foi completado com água destilada e adicionado 210 mg de bicarbonato de sódio. Esta solução foi utilizada durante a titulação;

2) Solução de ácido oxálico 2%: obtida diluindo-se 20 g de ácido oxálico em 1 L de água destilada. A solução de ácido oxálico foi utilizada com extratora;

3) Solução padrão de ácido ascórbico: dissolveu-se 125 mg de ácido ascórbico em 50 mL de solução de ácido oxálico 2%. A solução padrão de ácido ascórbico foi empregada para padronizar a solução de DCFI 0,01%.

Por fim, uma pequena quantidade das amostras de polpa *in natura* de maracujá (1 mL) foi homogeneizada com 3 mL de solução de ácido oxálico a 2% e titulada com solução de DCFI a 0,01% até atingir o ponto de viragem (cor avermelhada). A análise de vitamina C foi realizada em duplicata e os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 mL de polpa.

4.2.4. Determinação de açúcares simples

A determinação de açúcares foi realizada segundo metodologia de Xie et al., (2009), com poucas modificações.

As amostras de polpa *in natura* de maracujá reservadas para a determinação de açúcares simples foram devidamente separada em eppendorf de 1,5 mL e armazenada sob refrigeração (-18°C) até o momento da análise. A preparação das amostras consistiu em centrifugar a amostra no próprio eppendorf a 1300 rpm por 5 minutos utilizando uma centrífuga para eppendorf (FANEM, modelo 243 – São Paulo). O sobrenadante foi recuperado e filtrado em uma membrana para solvente orgânico de 0,2 µm (Merck), e 20 µL foram injetados no cromatógrafo. O desvio padrão da análise foi realizado a partir de cinco repetições de determinação de açúcares simples de uma mesma amostra.

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, foi utilizado, Agilent (modelo 110), equipado com forno (65°C), detector de índice de refração, e uma coluna Phenomenex Rezex RSO-oligosaccharide Ag+4%, 200 x 10,0mm, com grupos prata ligados quimicamente a sílica, e uma pré-coluna (10 cm). A fase móvel usada foi água Milli-Q, com vazão de 0,3 mLmin⁻¹ e pressão de 13 bar. O tempo de cada análise foi de 55 minutos.

O método de padronização externa para os três principais açúcares foi empregado para a quantificação. Curvas analíticas com diferentes concentrações (0,125 a 50,0 mg.mL⁻¹) para cada um dos açúcares individuais, glucose, frutose e sacarose, foi obtida através de análise de regressão para cada analito e está apresentada no Apêndice I. Padrões comerciais (Sigma) foram utilizados para construção dos pontos e cada concentração de cada um dos três açúcares foi injetada nas mesmas condições cromatográficas que as amostras de polpa de maracujá. Os resultados foram expressos em mg.mL⁻¹ de polpa.

4.2.5. Determinação do conteúdo de sólidos solúveis (SSC)

Metodologia similar ao item 3.2.7 do capítulo 3.

4.2.6. Determinação do pH

Os valores de pH e temperatura da amostras de polpa de maracujá *in natura* foram verificadas em potenciômetro digital da Micronal, modelo B-474.

4.2.7. Determinação de acidez titulável (AT)

Metodologia similar ao item 3.2.8 do capítulo 3.

4.2.8. Desenvolvimento do modelo

Metodologia similar ao item 3.2.9 do capítulo 3.

4.3. Resultados

4.3.1. Caracterização das amostras de maracujá

A Tabela 4.1 apresenta os resultados dos parâmetros de qualidade das 130 amostras de polpa *in natura* de maracujá. Tanto para a Vitamina C quanto para os açúcares, foram analisadas 50 polpas *in natura* de maracujá. A opção por esse

número de amostras foi devido, no caso da vitamina C, a observação da baixa concentração no fruto e testes preliminares insatisfatórios com os modelos PLS. Para os açúcares, o motivo foi devido a problemas no equipamento para realização das análises. Nesta tabela também encontram os intervalos (valores mínimos e máximos), bem como a média de cada parâmetro.

O valor médio de conteúdo de sólidos solúveis em polpas *in natura* de maracujá foi de 13,3 °Brix, tal resultado está de acordo com os valores encontrados em outros estudos (NAGATO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2008). A ampla variabilidade das amostras pode ser verificada através dos valores mínimo (5,5 °Brix) e máximo (17,0 °Brix) obtidos para este parâmetro.

De acordo com Silva e Durigan (2000), os açúcares são os principais componentes do conteúdo de sólidos solúveis do suco de maracujá. A concentração de açúcares presente na polpa de maracujá é usualmente elevada em relação aos demais parâmetros. Os resultados revelaram valores relativamente próximos para as médias de concentração de glucose ($14,50 \text{ mg mL}^{-1}$) e frutose ($14,10 \text{ mg mL}^{-1}$). Essa ocorrência deve-se possivelmente, ao estágio de amadurecimento do fruto, as condições de cultivo e clima. Os altos valores de coeficientes de variação encontrados para ambos os açúcares, 34% e 29%, respectivamente, representam a grande heterogeneidade das amostras em relação a este parâmetro. A sacarose foi o açúcar predominante, onde a concentração média encontrada foi de $36,13 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo o valor mínimo de $8,85 \text{ mg mL}^{-1}$ e máximo de $50,28 \text{ mg mL}^{-1}$, obtendo-se um coeficiente de variação da ordem de 18,4%, o qual indica um maior grau de homogeneidade das amostras em relação aos outros dois açúcares. Resultados referentes a quantidade de açúcares individuais presente na polpa do maracujá, não foram encontrados na literatura, entretanto, alguns trabalhos revelaram a composição dos açúcares redutores, não redutores e totais, através de métodos químicos. Machado *et al.* (2003) encontraram porcentagens de açúcares redutores de 3,6%, não-redutores de 7,5% e açúcares totais por volta de 11%. Ciabotti, Braga e Mata (2000) determinaram a concentração de açúcares totais em polpa *in natura* de maracujá amarelo e encontraram valor de 8,24%.

A determinação de acidez titulável revelou um valor mínimo de 2,56 e máximo de 6,15 g de ácido cítrico 100 mL^{-1} . Os valores de pH variaram entre 1,64 e 3,24. Segundo Silva *et al.*, (2005), menores valores de pH são observados nos primeiros estádios de maturação do maracujá-amarelo, permanecendo constante a partir do

estádio com 30% de coloração da casca amarelada. Resultados similares foram verificados por Coelho *et al.*, (2010), os quais encontraram valores médios de 4,42% para a acidez titulável e 2,92 para o pH. Os baixos valores de coeficiente de variação 3,5% para a acidez titulável e 1,09% para o pH demonstram uma grande homogeneidade das amostras em relação a esses parâmetros.

O teor de ácido ascórbico da polpa *in natura* de maracujá é um dos principais indicadores do seu valor nutritivo, porém é variável segundo o local de produção, estágio de desenvolvimento, amadurecimento, temperatura de armazenamento e fotoperiodismo (PEDRO, 2009). O valor médio encontrado neste estudo foi de 16,942 mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹ de polpa. Coelho *et al.*, (2010) obtiveram valor médio de 18,75 mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹ de polpa e Cabral *et al.*, (2005) encontraram um valor médio de 18,2 mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹ de polpa, ambos trabalharam com polpa *in natura* de maracujá amarelo. Tais resultados corroboram os resultados deste estudo.

TABELA 4.1 – PARAMETROS DE QUALIDADE DA POLPA DE MARACUJÁ IN NATURA: NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS (n), INTERVALO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO (δ) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV)

Parâmetro	n	Intervalo	Média	δ	CV (%)
Glucose (mg mL ⁻¹)	50	2,05 - 34,23	14,50	±4,96	34,22
Frutose (mg mL ⁻¹)	50	2,94 – 36,07	14,10	±4,19	29,73
Sacarose (mg mL ⁻¹)	50	8,85 – 50,28	36,13	±6,68	18,49
Açúcares Totais (mg mL ⁻¹)	50	19,32 – 106,71	63,08	±10,26	16,27
SSC (°Brix)	130	5,5 – 17,0	13,29	±0,08	0,64
AT (g de ácido cítrico 100 mL ⁻¹ MF)	130	2,56 – 6,15	4,27	±0,15	3,54
pH	130	1,64 – 3,24	2,73	±0,03	1,09
Vitamina C (mg de ácido ascórbico 100 mL ⁻¹)	50	8,80 – 26,17	16,94	±0,50	2,93

Dos parâmetros de qualidade apresentados acima, a correlação com os espectros em MID e em NIR foi realizada apenas para os açúcares individuais, SSC, e AT. A exclusão do parâmetro pH foi devido ao fato de ser um parâmetro que mede íons H⁺ em solução e que este tipo de espécie química (homonuclear) não absorve radiação na região do infravermelho, dessa forma o objetivo da análise foi somente para caracterização das amostras. Por outro lado, a Vitamina C apresenta em sua

composição espécies químicas que sofrem vibrações no momento dipolo e, portanto, absorvem essa radiação. Porém, a pequena quantidade do parâmetro encontrada nas amostras de polpa de maracujá *in natura* foi insuficiente para que este fosse determinado através da espectroscopia em MID e em NIR.

A PCA foi então realizada para a glucose, frutose, sacarose, SSC e AT da polpa *in natura* de maracujá e está apresentada na Figura 4.1. Para que fosse possível notar a dispersão das amostras, o grupo de 50 amostras foi observado, no qual havia sido realizadas todas as cinco análises (glucose, frutose, sacarose, SSC e AT). Na Figura 4.1a, a curva de correlação dos parâmetros de qualidade é apresentada. Observou-se que os parâmetros foram divididos em dois grupos: os relacionados ao sabor doce do fruto (açúcares, SSC) encontravam-se do lado direito da PC1 (positivo) e os relacionados a acidez titulável, referente ao sabor ácido. Esse tipo de separação é característica da maturação dos frutos, uma vez que o conteúdo de açúcar aumenta e a concentração de ácido diminui durante a maturação (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

O mapa das amostras pode ser observado na Figura 4.1b. Mais uma vez notou-se que a PCA forneceu uma classificação das amostras de acordo com seu nível de açúcar (PC1-lado positivo – direito) e conteúdo de ácidos (PC1-lado negativo, esquerdo). As amostras "10", "4" e "13" (no lado direito) são amostras com maior teor de glucose (34,23; 27,83 e 27,48 mg.mL⁻¹ MF, respectivamente), além de apresentarem os maiores valores de conteúdo de sólidos solúveis (17, 16,5 e 15,5 °Brix, respectivamente), enquanto que no lado esquerdo, as amostras "2", "12", apresentaram os menores valores de SSC (9,5 e 8,5° Brix respectivamente). A PC2 foi responsável por separar as amostras de acordo com a concentração de acidez titulável, como é o caso das amostras "34" e "42" que apresentaram o menor (2,59 g de ácido cítrico 100 mL⁻¹ MF) e o maior (5,18 g de ácido cítrico 100 mL⁻¹ MF) valor de acidez titulável, localizadas na PC2 negativa e positiva, respectivamente.

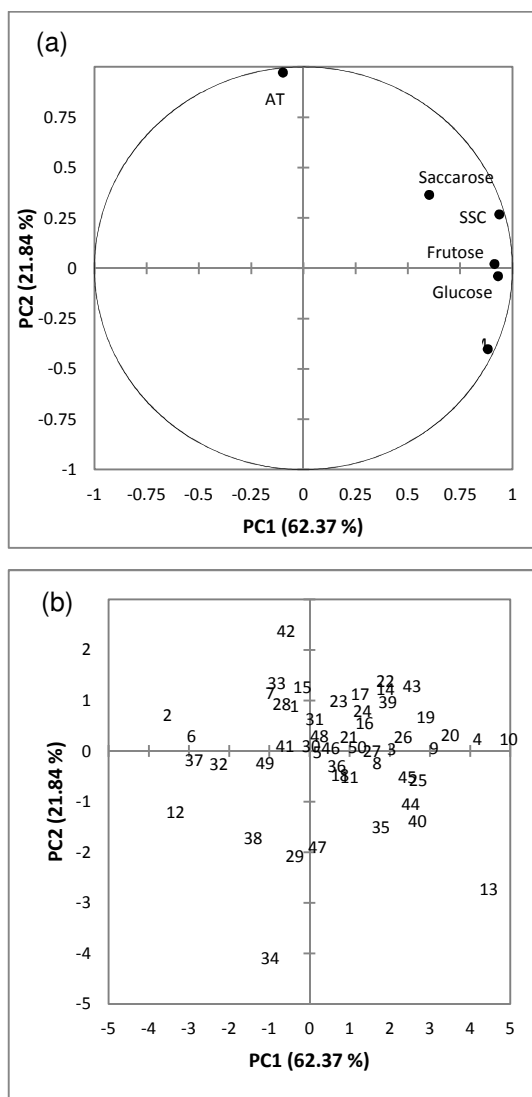


FIGURA 4.1 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) REALIZADA SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: a) CURVA DE CORRELAÇÃO, b) PC MAPA DAS AMOSTRAS.

4.3.2. Caracterização dos espectros em MID e NIR

A média dos espectros MID está apresentada na Figura 4.2a. A maior banda observada está localizada em regiões periodicamente relacionadas com a água, entre 2000 e 3600 cm^{-1} (DUARTE *et al.*, 2002; IRUDAYARAJ e TEWARI, 2003). Vale ressaltar que a polpa de maracujá é constituída de aproximadamente 85% de água (CABRAL; FREIRE JÚNIOR; MATTA, 2005). A banda considerada mais importante para predição dos componentes da polpa *in natura* de maracujá foi verificada na região entre 1000 e 1500 cm^{-1} (destaque, círculo vermelho). Essa

região também foi considerada indispensável para predição dos parâmetros de qualidade do tomate (SCIBISZ *et al.*, 2011) e do damasco (BUREAU *et al.*, 2009). As bandas na região de $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas à deformação de-CH₂ e deformação angular de C-C-H e H-C-O (HINENO, 1977). Aquelas na região $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ são explicados por modos de estiramento de C-C e C-O (PAWAN, BIRCH e VERDE, 1973).

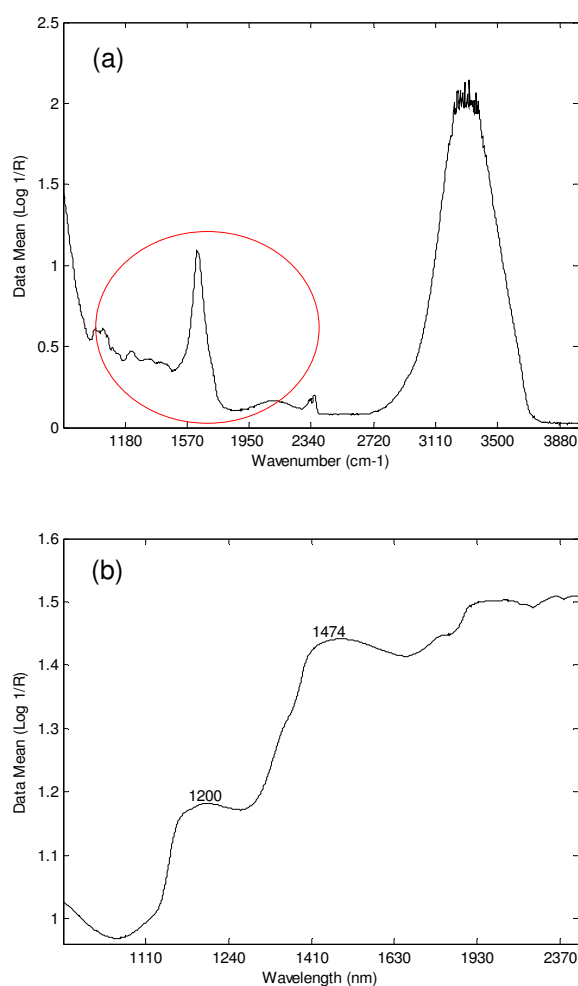


FIGURA 3.2 – MÉDIA DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DE AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ: (a) MID NO INTERVALO DE 800 a 4000 cm^{-1} , (b) NIR NO INTERVALO DE 1000 A 2500 nm.

A Figura 4.2b apresenta a média dos espectros originais NIR de polpa *in natura* de maracujá. O espectro é dominado por bandas de sobretons e banda O-H. Observou-se que as melhores absorvidades moleculares estão na região de comprimento de onda entre 900 e 1600 nm, com valores mais elevados na região do

segundo sobreton (1200 a 1500 nm) e maior intensidade de absorção na região de combinações (1900 – 2380). A região de 800 a 1350 nm, é atribuída aos segundo e terceiro sobretons e é caracterizada por baixa intensidade (GIERLINGER, SCHWANNINGER e WIMMER, 2004). A região de 1200-1500 nm é relacionada aos sobretons C-H e O-He vibrações dos grupos CH₃ e CH₂, enquanto que as bandas situadas entre 2000 e 2300 nm são o primeiro conjunto de bandas de combinação C-H (IÑÓN *et al.*, 2005; LEÓN *et al.*, 2005).

A análise de componente principal (PCA) dos espectros em MID (FIGURA 4.2a) e em NIR (FIGURA 4.2b) foi verificada para se realizar a detecção de espectros anômalos; investigar a formação de grupos específicos e similaridades dos resultados de PCA dos espectros com o resultado de PCA das análises de referência; e ainda definir os grupos de calibração e validação externa. Como o número de amostras para as análises de sacarose, frutose e glucose (50 amostras) era diferente do número de amostras para as análises de SSC e AT (130 amostras), foram verificadas as PCAs dos dois grupos.

Analisou-se primeiramente o mapa dos 50 espectros das amostras em MID, os quais seriam correlacionados posteriormente com a análise dos açúcares simples (FIGURA 4.3a). O pré-processamento MSC foi aplicado, objetivando minimizar as interferências relativas ao espalhamento de luz. Notou-se que a PC1 foi responsável por explicar 98,84% da variação das informações dos espectros MID, sendo assim, todas as amostras pertenciam ao mesmo quadrante (PC1-positivo), assumindo condição de similaridade entre elas. A PC2 contribuiu com pouca informação, apenas 0,13%, porém, foi suficiente para evidenciar que as amostras 49 e 41 apresentavam espectros discrepantes em relação aos demais. Uma suave separação de dois grupos foi observada, como a água é o maior constituinte e interfere significativamente na visualização dos demais componentes, não foi possível atribuir aos grupos características específicas que os identificassem ou até mesmo que fossem similares a análise de PCA dos dados de referência. Posteriormente, foram separadas as amostras do grupo de calibração (12 amostras) e validação externa (38).

A análise de PCA das 130 espectros das amostras de polpa de maracujá in natura em MID, não foi diferente da discutida anteriormente (FIGURA 4.3b). A PC1 foi responsável por 97,01% das informações espectrais e todos os espectros das amostras apresentaram um perfil similar, localizados no lado positivo da PC1. Com a

pouca informação da PC2 (0,20%), alguns espectros se diferenciaram dos demais. A partir de então, foram separadas 98 amostras para o grupo de calibração e 32 amostras para o grupo de validação externa

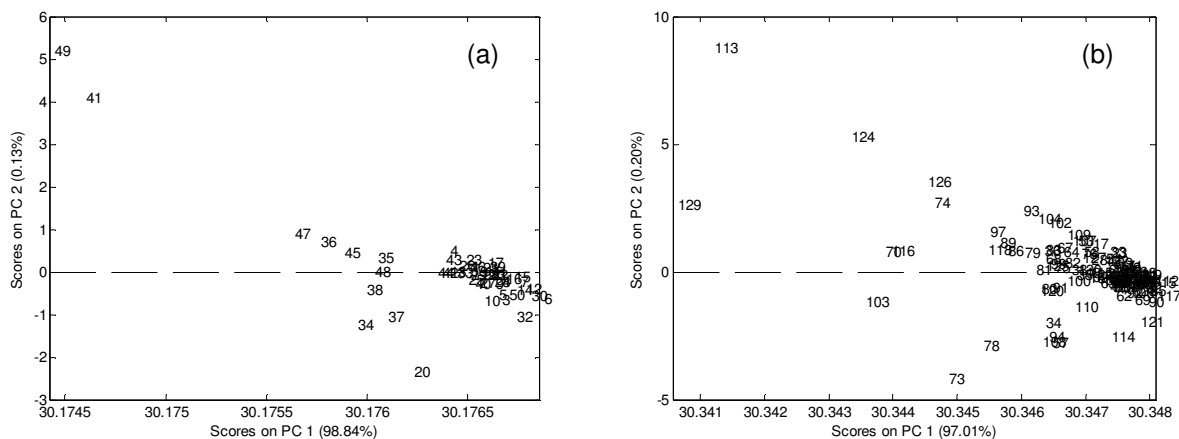


FIGURA 4.3 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ EM MID: (a) 50 ESPECTROS (b) 130 ESPECTROS USANDO PRÉ-PROCESSAMENTO MSC.

A análise da PCA a partir dos espectros das amostras de polpa de maracujá *in natura* em NIR aplicando o pré-processamento DCM está apresentado na Figura 4.4. Inicialmente, os 50 espectros das amostras de polpa de maracujá *in natura*, referentes aos parâmetros de qualidade da sacarose, glucose e frutose, foram observados na Figura 4.4a. Notou-se que a PC1 foi responsável por representar 97,31% da variação espectral, e que a PC2 (2,40% da variação espectral) dividiu as amostras em dois grupos. Novamente não foi possível atribuir características específicas aos grupos. As amostras 1 e 5 foram consideradas diferentes das demais. Não foi possível observar semelhanças entre os dados encontrados pela PCA da análise de referência e a PCA dos espectros em MID. Ao verificar a PCA das 130 amostras (Figura 4.4b), observou-se um comportamento semelhante à PCA das 50 amostras, onde as amostras 1 e 5 foram diferentes das demais e um pequeno grupo se distanciou. A forte absorção da água em regiões em NIR interferem diretamente na observação dos demais constituintes, carregando os espectros e impedindo que possa ser realizada a caracterização das amostras.

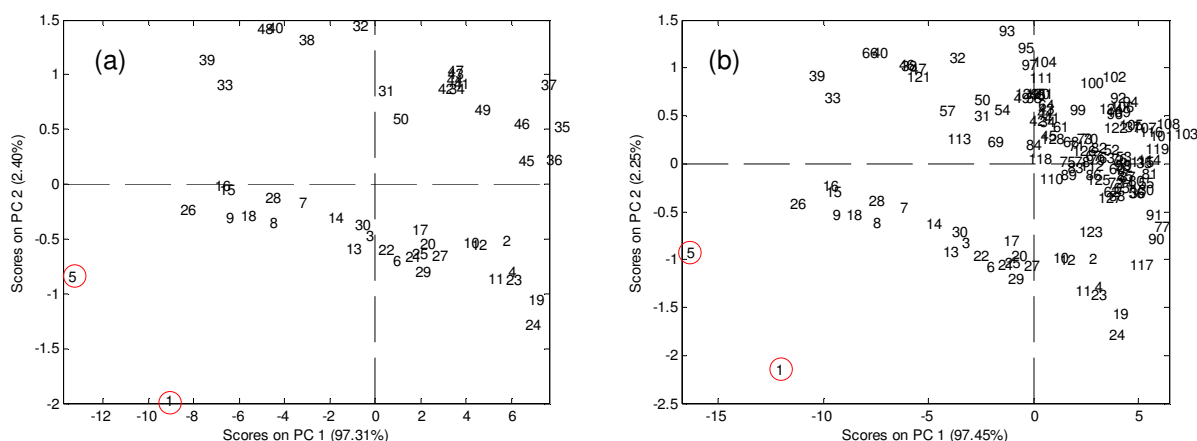


FIGURA 4.4 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ EM NIR: (a) 50 ESPECTROS (b) 130 ESPECTROS USANDO PRÉ-PROCESSAMENTO MSC

4.3.3. Quantificação de açúcares individuais

Durante a fase de calibração, o conjunto composto de 38 espectros adquiridos na região do infravermelho de amostras de polpa *in natura* de maracujá foi correlacionado com o respectivo teor de glucose, frutose, sacarose. Nesta etapa, vários modelos de calibração PLS foram construídos a fim de avaliar a região espectral e os tipos de pré-processamentos de dados que reproduziriam os melhores resultados.

Os melhores modelos multivariados desenvolvidos para os diferentes açúcares individuais da polpa *in natura* de maracujá na região em MID e em NIR estão apresentados na Tabela 4.2. Os modelos foram selecionados avaliando os menores valores dos erros de calibração e validação cruzada. Além disso, foram avaliados os coeficientes de regressão dos conjuntos de calibração e validação cruzada.

TABELA 4.2 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA OS AÇÚCARES (mg.mL^{-1} de polpa) EM POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR

Parâmetro	Região espectral	Pré-processamento	VLs	n	RMSEC*	RMSECV*	R^2_c	R^2_{cv}
Glucose	MID (cm^{-1})	MSC + AL	5	38	1,83	3,05	0,964	0,941
	NIR (nm)	MSC + AL	6	37	3,09	4,16	0,905	0,824
Frutose	MID (cm^{-1})	MSC + AL	4	38	2,64	3,66	0,952	0,859
	NIR (nm)	MSC + AL	6	37	3,26	4,47	0,902	0,811
Sacarose	MID (cm^{-1})	MSC + AL	4	38	5,93	8,25	0,881	0,754
	NIR (nm)	MSC + AL	6	37	5,26	6,87	0,859	0,752

* mg.mL^{-1} de polpa

Ao avaliar a capacidade de previsão do teor de glucose pelos modelos desenvolvidos, observou-se que os menores erros RMSEC e RMSECV estão associados ao uso de 5 VLs para o modelo MID e 6 LVs para o modelo NIR (FIGURA 4.5).

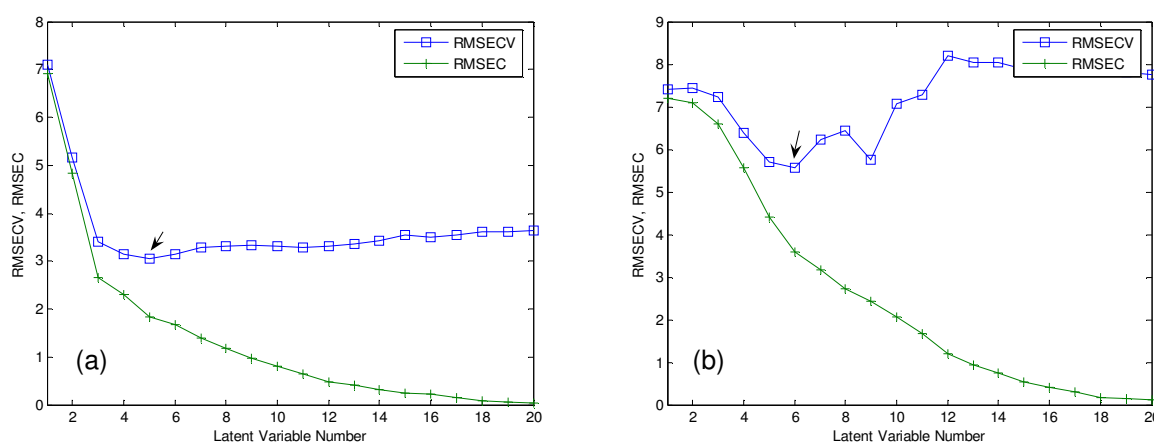


FIGURA 4.5 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b)

O modelo obtido no infravermelho médio não apresentou comportamento tendencioso em superestimar ou subestimar os teores de glucose, com limite de *leverage* de 0,39 e considerando um resíduo de *Student* de $\pm 2,5$ com 95% de confiabilidade, e pode ser comprovado pela boa distribuição das amostras do conjunto de calibração, conforma a Figura 4.6a.

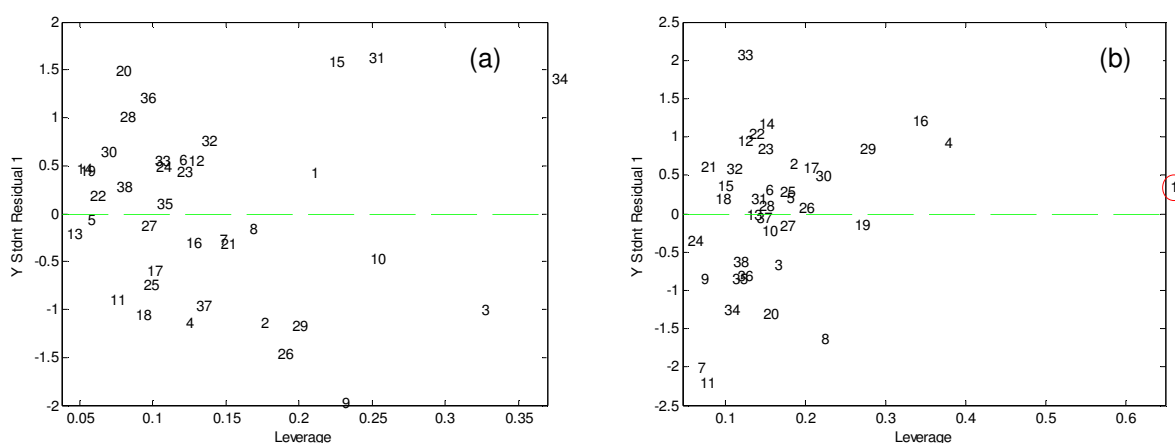


FIGURA 4.6 – RESÍDUOS DE Student vs Leverage PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b)

Por outro lado, o modelo obtido no infravermelho próximo (FIGURA 4.6b), apresentou uma amostra com alto valor de *leverage* (amostra 1), sendo que o limite para este modelo utilizando 6 VLs foi de 0,47. Segundo Ferreira *et al.*, (1999) quando uma medida experimental de uma amostra é diferente das outras do conjunto de calibração, ela provavelmente terá uma alta influência no modelo, que poderá ser negativa. Dessa forma, verificou-se o valor de concentração de glucose ($42,72 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e notou-se que não se tratava nem do maior nem do menor valor da análise de referência. Ao observar o espectro da amostra em relação ao espectro médio (FIGURA 4.7), constatou-se um perfil diferente, com menor intensidade de sinal. A partir de então a amostra 1 foi retirada do grupo de calibração e um novo modelo foi desenvolvido. Houve melhoras significativas em termos de diminuição dos erros de calibração e validação cruzada (TABELA 4.2), porém manteve-se o mesmo número de Variáveis Latentes. Portanto, o modelo desenvolvido para a determinação da concentração de glucose foi constituído de 37 amostras. Vale ressaltar ainda, que a amostra 1 apresentou comportamento distinto também na análise de PCA dos espectros NIR (FIGURA 4.4a).

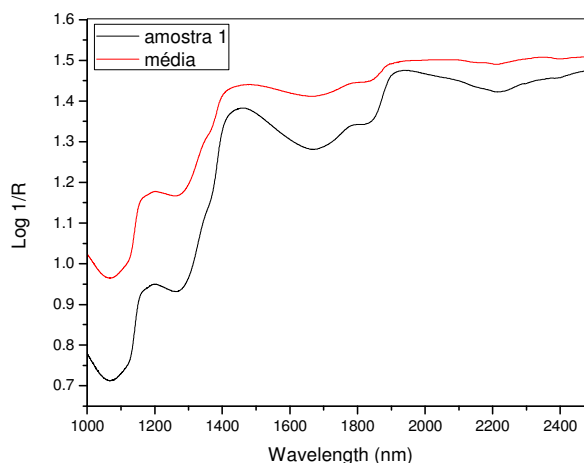


FIGURA 4.7 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DA AMOSTRA 1 COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DOS MODELOS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE EM NIR

Boa correlação entre os valores experimentais e os valores calculados pelo modelo foi encontrada para a determinação de glicose. Os coeficientes de regressão obtidos pelo modelo em MID para o conjunto de calibração e validação cruzada foram de 0,964 e 0,941, respectivamente, utilizando o pré-processamento MSC seguido de alisamento e a faixa espectral de 800 a 2000 cm^{-1} . Quando o modelo foi aplicado para prever as 12 amostras da etapa de validação externa, foi encontrado um alto valor de coeficiente de regressão de 0,930 e valores razoáveis de erro médio relativo 9,99% e erro de previsão 1,955 °Brix (TABELA 4.3). Esses resultados para a determinação de glicose foram melhores que os resultados encontrados por Bureau *et al.*, (2009) que determinaram a concentração de glicose em polpa de damasco no intervalo espectral de 900-1500 cm^{-1} com 7 VLs e encontraram valores iguais a $R^2_v = 0,87$ e ER = 12%. Por outro lado, Scibizs *et al.*, (2011) obtiveram melhores resultados para a polpa de tomate que os relatados neste estudo ($R^2_v = 0,95$ e ER = 5,4%), utilizando a faixa espectral de 1000 - 1800 cm^{-1} e 8 VLs.

TABELA 4.3 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA

Parâmetro*	Região espectral	Intervalo espectral	n	RMSEP*	ER (%)	R ² _v
Glucose	MID (cm ⁻¹)	800-2000	12	1,95	9,99	0,930
	NIR (nm)	1100-2000	12	2,86	18,09	0,775
Frutose	MID (cm ⁻¹)	800 2000	12	2,61	13,56	0,838
	NIR (nm)	1100-2000	12	2,93	14,06	0,785
Sacarose	MID (cm ⁻¹)	800-2500	12	3,09	6,56	0,737
	NIR (nm)	1100-1660	12	6,64	17,17	0,716

*mg.mL⁻¹ de polpa

Para o desenvolvimento do modelo em NIR, o pré-processamento MSC seguido de alisamento na faixa espectral de 1100 a 2000 nm foi utilizado. Valores de coeficiente de regressão do conjunto de calibração e validação cruzada de 0,905 e 0,824 foram obtidos, respectivamente. Na etapa de previsão das 12 amostras da validação externa foram encontrados valores intermediários de R²_v = 0,775 e elevados de erro médio relativo de 18,09% (TABELA 4.3). Xie *et al.*, (2009) apresentaram melhores resultados, obtidos para suco de *bayberry*, com valores de 0,85 para o coeficiente de regressão e RMSEP de 0,095 g.100g⁻¹ aplicando como pré-processamento de dados a segunda derivada e utilizando toda a faixa espectral.

O melhor ajuste do modelo em MID pode ser observado na Figura 4.8 a qual comprova a melhor correlação encontrada para o modelo em MID para a determinação de glucose comparada com a correlação obtida para o modelo em NIR.

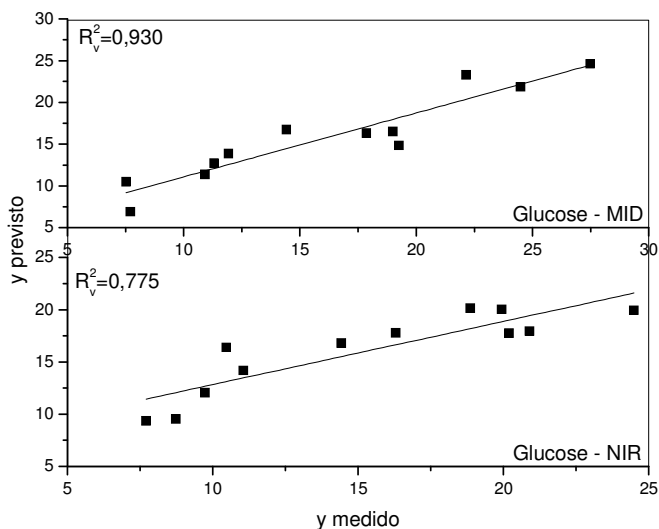


FIGURA 4.8 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERÊNCIA (y medido) DAS 12 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE

Os gráficos dos coeficientes de regressão dos modelos em MID e em NIR desenvolvidos para a determinação de glucose estão apresentados na Figura 4.9. Observou-se que as bandas de maior importância para a o desenvolvimento do modelo em MID estão localizadas em 1100, 1004 cm^{-1} (FIGURA 4.9a). De acordo com a Figura 4.2, esta é a região de maior importância para os compostos orgânicos. A averiguação dessas bandas só tornou-se possível após a exclusão da banda em aproximadamente 3500 cm^{-1} . Devido a esse motivo que a maior parte dos modelos foram desenvolvidos com o intervalo de 800 a 2500 cm^{-1} . Este mesmo intervalo foi relatado por outros trabalhos na literatura como mais indicado para previsão de glucose (SCIBISZ *et al.*, 2011; SIVAKESAVA e IRUDAYARAJ, 2000b), que relata ainda que a glucose apresenta pico característico em 1034 cm^{-1} . No gráfico de coeficiente de regressão para a glucose foi observada uma forte banda em 1004 cm^{-1} (FIGURA 4.9a), que significa que mais uma vez a água pode ter interferido na obtenção de uma melhor resolução. Para o modelo em NIR as bandas com maior intensidade foram verificadas em 1190, 1290, 1359 e 1600 nm. A média dos espectros em NIR de polpa de maracujá apresentou um aumento na intensidade a partir de 1100 nm. Gierlinger, Schwanninger, e Wimmer, (2004) demonstraram que

esta região é dominada por estiramentos e vibrações de grupos C-H, CH₂ e CH₃ os quais fazem parte da estrutura dos açúcares.

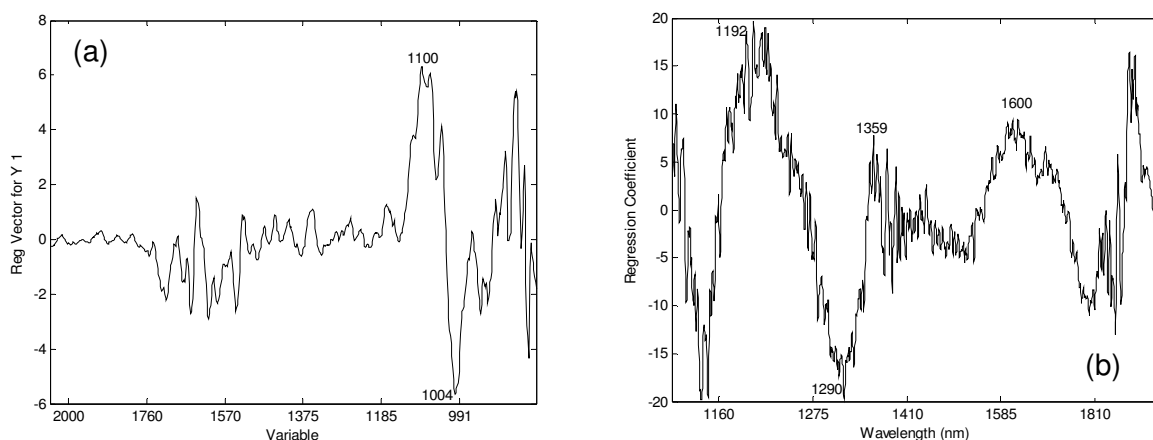


FIGURA 4.9 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE EM MID (a) E NIR (b)

Os resultados obtidos com os melhores modelos de calibração, desenvolvidos para determinar a frutose estão apresentados na Tabela 4.2.

O modelo em MID apresentou melhor capacidade de previsão utilizando 4 Variáveis Latentes com valores de RMSEC = 2,19 e RMSECV = 3,69 mg.mL⁻¹. Enquanto que modelo em NIR apresentou os menores erros de calibração e validação cruzada com 6 Variáveis Latentes, resultado em valores iguais a 4,00 e 5,15 mg.mL⁻¹, respectivamente (FIGURA 4.10).

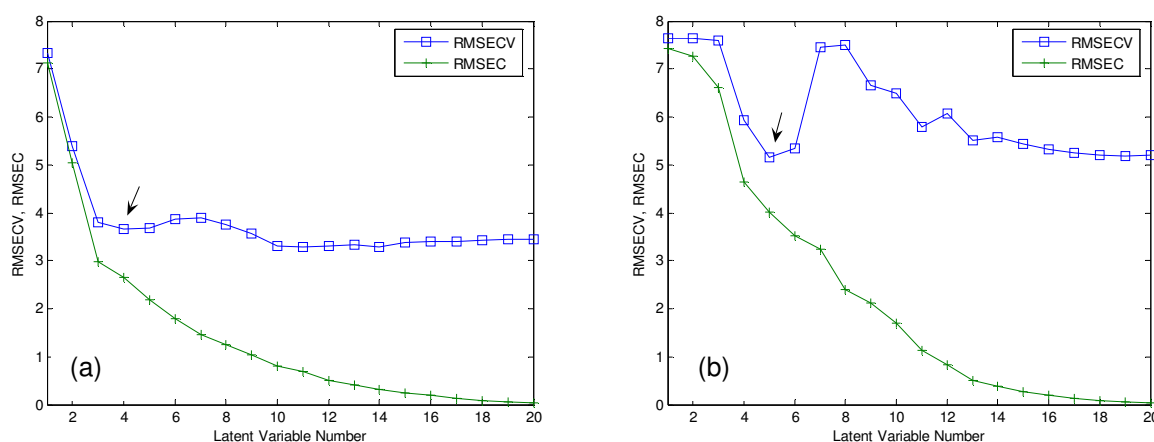


FIGURA 4.10 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b)

A presença de amostras anômalas nos conjuntos de calibração em MID e em NIR foi verificada através da Figura 4.11. O limite de *leverage* para a região em MID foi de 0,32 e para a região em NIR de 0,39.

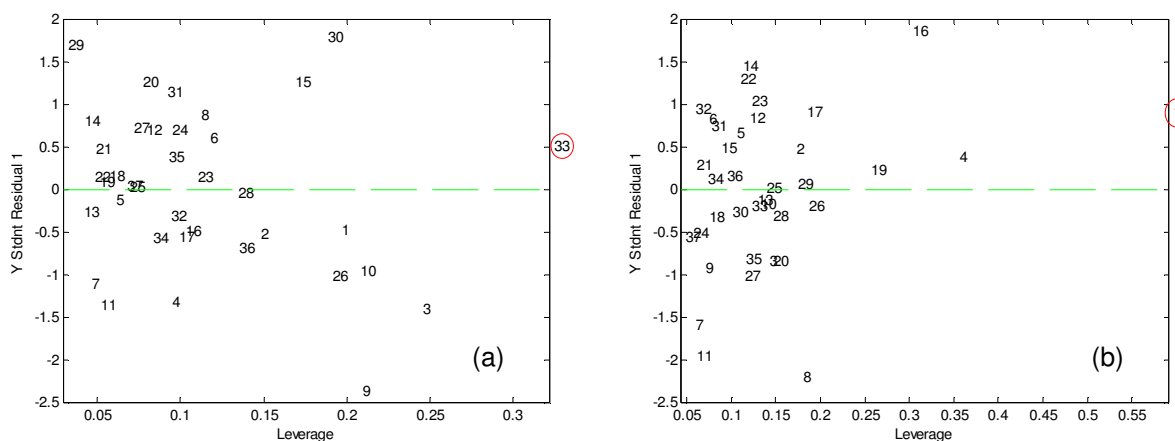


FIGURA 4.11 – RESÍDUOS DE *Student vs Leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E NIR (b)

A amostra 33 referente ao modelo em MID apresentou um valor superior ao limite de *leverage*, portanto, suas características em relação a análise de referência e ao espectro foi verificada. O seu valor de concentração de frutose foi de 10,908 mg.mL⁻¹, valor este dentro do intervalo mínimo e máximo (2,94 – 36,07 mg.mL⁻¹), portanto não se tratava de uma valor discrepante e a amostra poderia ser retirada. Mesmo antes de sua retirada, foi verificado o perfil do espectro. Habitualmente, considera-se que a irregularidade das amostras com comportamento anômalo em *leverage* pode ser devido a interferências ou problemas no momento da aquisição do espectro. A Figura 4.12a apresenta o perfil do espectro da amostra 33 e o perfil do espectro médio das amostras. Não houve diferenças significativas no perfil do espectro que comprometesse o desenvolvimento do modelo. Mesmo assim optou-se pela retida da amostra, para averiguar os resultados. Como não houve melhoras nos parâmetros do modelo, a amostra 33 continuou fazendo parte do grupo de calibração.

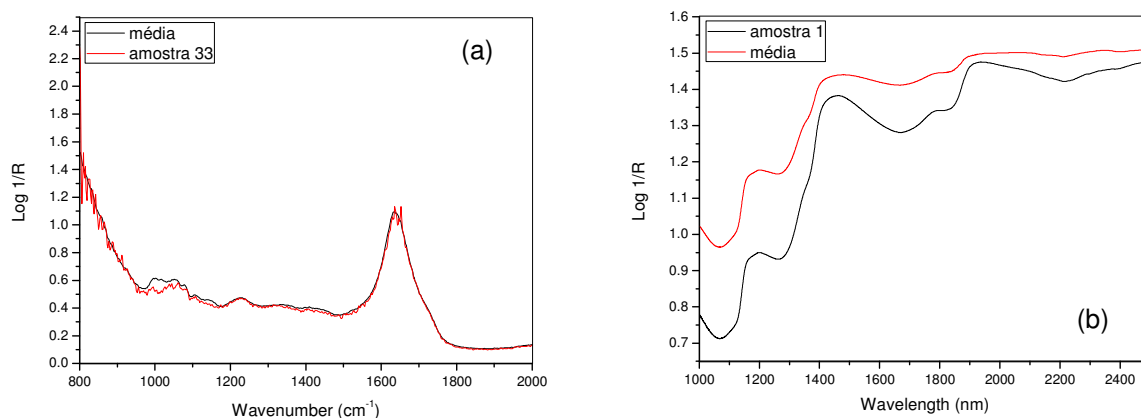


FIGURA 4.12 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS ANÔMALAS COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DOS MODELOS PARA A DETERMINAÇÃO FRUTOSE EM MID (a) e NIR (b)

Para o modelo em NIR, a amostra considerada anômala, foi a mesma amostra discrepante encontrada no modelo desenvolvido para a glicose, a amostra 1 (FIGURA 4.12b). Devido às características já detalhadas em parágrafos anteriores, optou-se pela retirada da mesma. Portanto o modelo de calibração para determinação da frutose foi desenvolvido com 37 amostras, o número de VLs foi 5, porém houve diminuição nos erros de calibração (RMSEC = 4,00) e validação cruzada (RMSECV = 5,15 mg.mL⁻¹) comparado ao desempenho do modelo para a glicose.

O modelo de calibração em MID apresentou boa correlação entre os valores experimentais e previstos, sendo os coeficientes de regressão para os conjuntos de calibração e validação cruzada de 0,952 e 0,859 respectivamente. Para tanto foi empregado o pré-processamento de dados MSC seguido de alisamento na região espectral de 800 a 2000 cm⁻¹. Quando o modelo foi aplicado para prever a concentração de frutose das 12 amostras da etapa de validação externa, encontrou-se um bom valor de coeficiente de regressão (0,838) com 13,56% de erro médio relativo e RMSEP de 2,61 mg.mL⁻¹ (TABELA 4.3). Os resultados encontrados neste estudo foram melhores que os resultados relatados para o damasco, utilizando o pré-processamento de dados SNV, o intervalo espectral de 900 a 1500 cm⁻¹ e 8 Variáveis Latentes, o qual apresentou valores de $R^2_v = 0,74$, ER = 16% RMSEP = 0,15 g.100g⁻¹ (BUREAU *et al.*, 2009). Por outro lado, melhores resultados foram verificados para

o tomate com R^2_v de 0,92, ER de 6,8% e RMSEP de $0,102 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ empregando o intervalo espectral de $920 \text{ a } 1200 \text{ cm}^{-1}$, 8 VLs e o pré-processamento de dados SNV (SCIBISZ *et al.*, 2011).

Para o modelo em NIR foram verificados valores de $R^2_c = 0,902$ e $R^2_{cv} = 0,811$ aplicando também pré-processamento MSC seguido de alisamento na região espectral de $1000 \text{ a } 2000 \text{ nm}$. Na etapa de previsão das 12 amostras, o valor de coeficiente de regressão foi de 0,785 com um valor de erro médio relativo de 14,06% e RMSEP de 2,93 (TABELA 4.3). Melhores resultados foram verificados para o suco de *bayberry* com valores de R^2_v de 0,963 e RMSEP de $0,212 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ aplicando a segunda derivada e utilizando 4 VLs. Neste trabalho, os autores não relatam o erro médio relativo, o qual é considerado de mais fácil interpretação (XIE *et al.*, 2009).

A Figura 4.13 ilustra o gráfico dos valores previstos pelos modelos de regressão *versus* os valores experimentais obtidos pela análise de referência das 12 amostras da etapa de validação externa para predição de frutose. Novamente, o modelo em MID apresentou melhor ajuste em relação ao modelo desenvolvido em NIR.

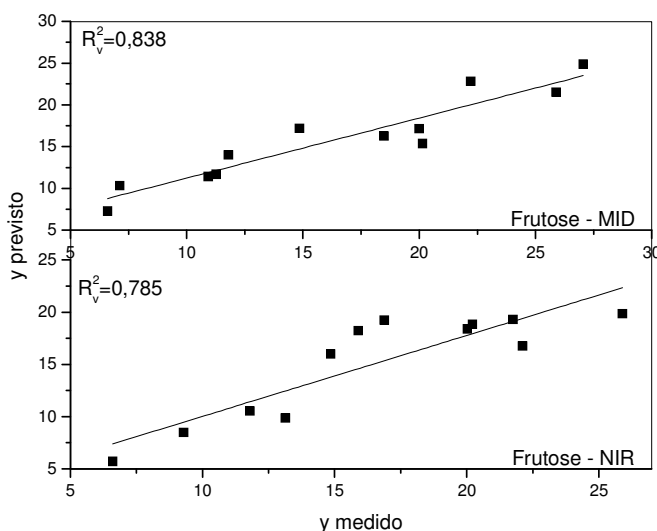


FIGURA 4.13 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 12 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE

Através da análise dos gráficos de coeficiente de regressão (FIGURA 4.14), observou-se que para o modelo desenvolvido em MID para a determinação de frutose, as banda de maior absorção (1004 e 1100 cm^{-1}) foram semelhantes às observadas para o modelo de determinação de glucose. Este fato é atribuído a semelhança das moléculas de glucose e frutose. A similaridade das bandas com maior intensidade também foram verificadas para o modelo em NIR, onde os comprimentos de onda em 1192, 1290 e 1600 foram os principais responsáveis por informações relevantes e foram similares para o desenvolvimento do modelo para a glucose.

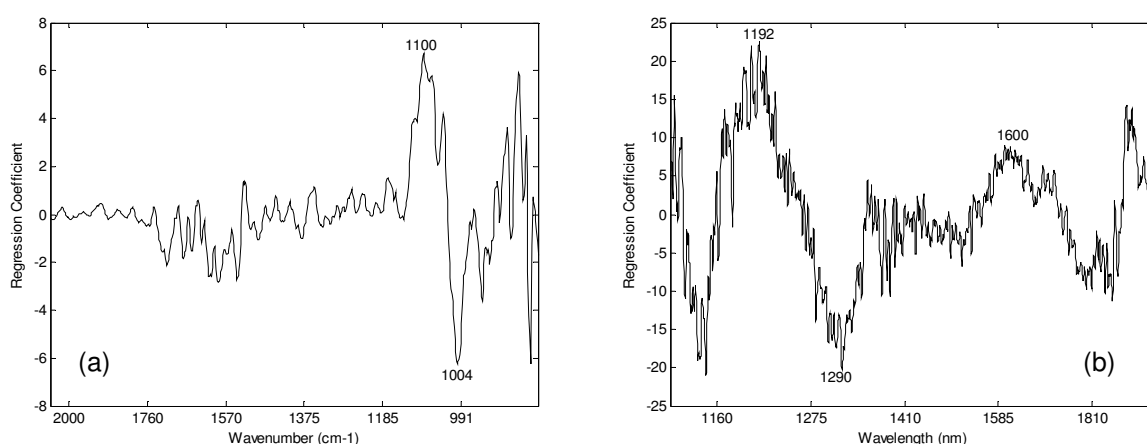


FIGURA 4.14 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE EM MID (a) E NIR (b)

Os resultados dos melhores modelos de calibração multivariados, com os valores de erros e dos coeficientes de regressão do conjunto de calibração e validação cruzada, o número de VL e o pré-processamento de dado utilizado na determinação da concentração de sacarose em polpa *in natura* de maracujá, estão apresentados na Tabela 4.2.

A evolução dos valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes, para os modelos em MID e em NIR estão representados na Figura 4.15. A partir da quarta variável latente em MID e sexta em NIR, observou-se que houve diminuição em relação aos valores de RMSECV e portanto os modelos foram desenvolvidos com 4 e 6 VL, respectivamente.

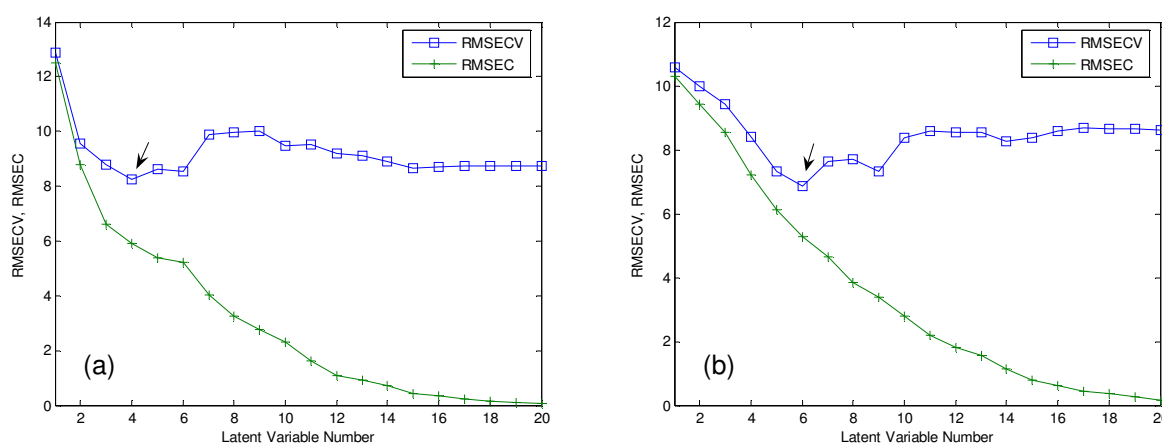


FIGURA 4.15 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b)

A averiguação da presença de amostras anômalas foi realizada através do gráfico de resíduos de *Student versus leverage* para os modelos desenvolvidos para a concentração de sacarose em MID (a) e em NIR (b) e estão apresentados Figura 4.16.

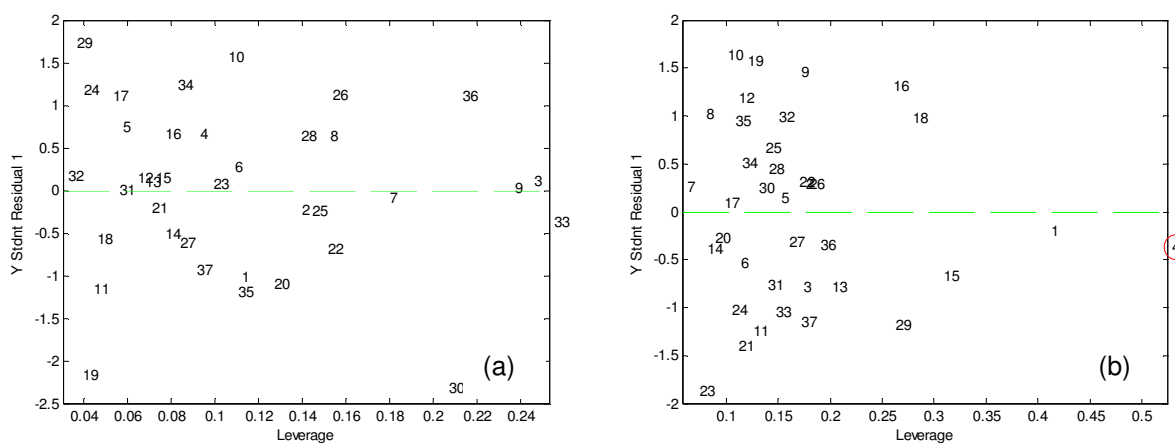


FIGURA 4.16 – RESÍDUOS DE *Student vs Leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b)

Para o modelo em MID o limite de *leverage* foi de 0,32, portanto não foi verificada a presença de amostras anômalas no conjunto de calibração. O limite de *leverage* para a região em NIR foi de 0,47. Dessa forma, a amostra 4 apresentou um elevado valor de *leverage*, e poderia estar influenciando negativamente nos

resultados do modelo. O valor de concentração de sacarose da amostra 4 era de $32,72 \text{ mg.mL}^{-1}$, portanto não se tratava dos valores mínimos e máximos do parâmetro. Quando foi verificado o espectro da amostra em relação às médias dos espectros, observou-se que o mesmo apresentava uma menor intensidade (FIGURA 4.17). Devido a isso, optou-se pela retirada da amostra e no desenvolvimento de um novo modelo de calibração com 37 amostras. O novo modelo, continuou com o mesmo número de VLs porém com minimização do valor de RMSEC e RMSECV. É importante destacar que a amostra 4 é a amostra 5 apresentada na PCA dos espectro em NIR como irregular (FIGURA 4.4a). A diferença de numeração é devido à retirada das amostras para compor o grupo de validação externa.

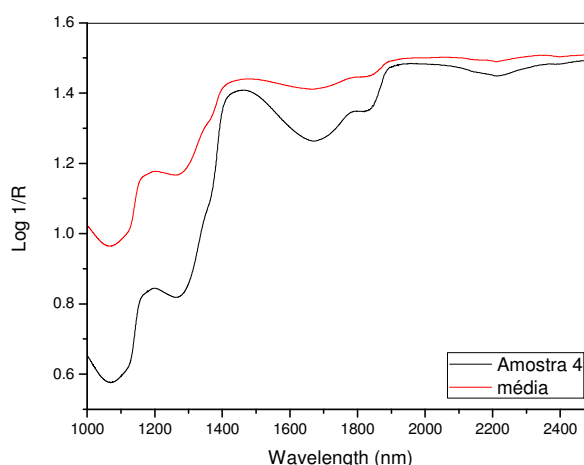


FIGURA 4.17 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DA AMOSTRA 4 COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DO MODELO PARA A DETERMINAÇÃO SACAROSE EM NIR

A capacidade de previsão dos modelos no infravermelho médio e próximo para determinar a concentração de sacarose em polpa *in natura* de maracujá foi considerada regular. O melhor modelo em MID foi desenvolvido aplicando o pré-processamento MSC seguido de alisamento na faixa espectral de 800 a 2500, e forneceu coeficientes de regressão para as etapas de calibração e validação cruzada de 0,881 e 0,754 respectivamente. Quando o modelo foi aplicado para prever a concentração de sacarose das 12 amostras da etapa de validação externa, obteve-se um valor de $R^2_v = 0,737$ e um baixo erro médio relativo igual a 6,56% (TABELA 3.3). Bureau *et al.*, (2009) verificaram um maior valor de coeficiente de

regressão na etapa de validação externa ($R^2_v=0,85$) para determinação de sacarose em maçã liofilizada porém o valor de erro médio relativo foi mais elevado (ER = 12%).

O modelo em NIR desenvolvido com os mesmos pré-processamentos (MSC seguido de alisamento) aplicado no intervalo espectral de 1100 a 1600 nm, revelou resultados iguais a $R^2_c = 0,859$ para a etapa de calibração e $R^2_{cv} = 0,752$ para a validação cruzada. Na etapa de validação externa, para predição das 12 amostras, obteve-se um valor de coeficiente de regressão semelhante ao modelo em MID ($R^2_v = 0,716$), porém, com um elevado erro médio relativo, igual a 17,17% (TABELA 3.3). Mais uma vez, o resultado encontrado por Xie *et al.*, (2009) avaliando a concentração de sacarose em suco de *bayberry*, foi melhor. Os autores encontram um valor de coeficiente de regressão igual a 0,99 com RMSEP de $0,108 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ aplicando a segunda derivada e utilizando 5 Variáveis Latentes.

Os gráficos de valor previsto versus valor medido ilustram o baixo ajuste dos modelos para a determinação de sacarose em MID e em NIR (FIGURA 4.18).

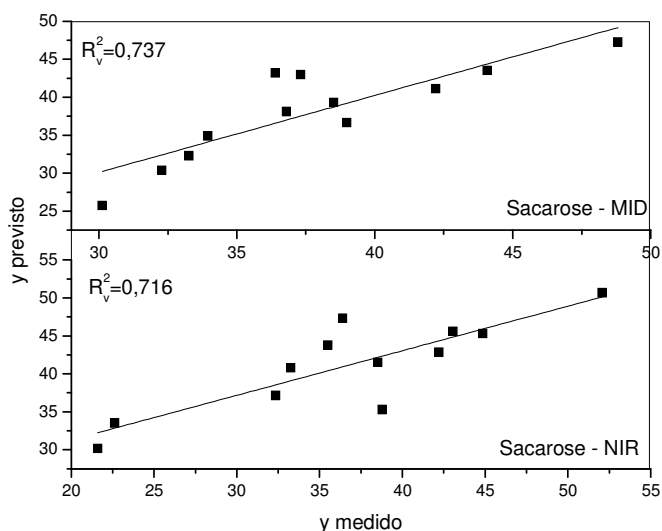


FIGURA 4.18 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 12 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE

A análise dos gráficos de coeficiente de regressão relevou que tanto para o modelo desenvolvido para a região em MID (FIGURA 4.19a), quanto na região NIR (FIGURA 4.19b) apresentaram bandas com maior intensidade nos números e comprimentos de onda característicos aos modelos apresentados anteriormente para a glucose e frutose. Isto é devido à composição da molécula de sacarose, a qual é constituída de uma molécula de glucose e uma molécula de frutose. No modelo em MID observa-se que os sinais mais relevantes foram em 1620, 1100 e 1004 cm^{-1} os quais estão relacionados com grupos aromáticos de C=C e C-H (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). Em relação ao modelo em NIR os comprimentos de onda com informações analíticas mais relevantes foram em 1192 e 1290, os quais estão relacionados a regiões do segundo sobreton e combinações de grupos C-H, CH_2 e CH_3 (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

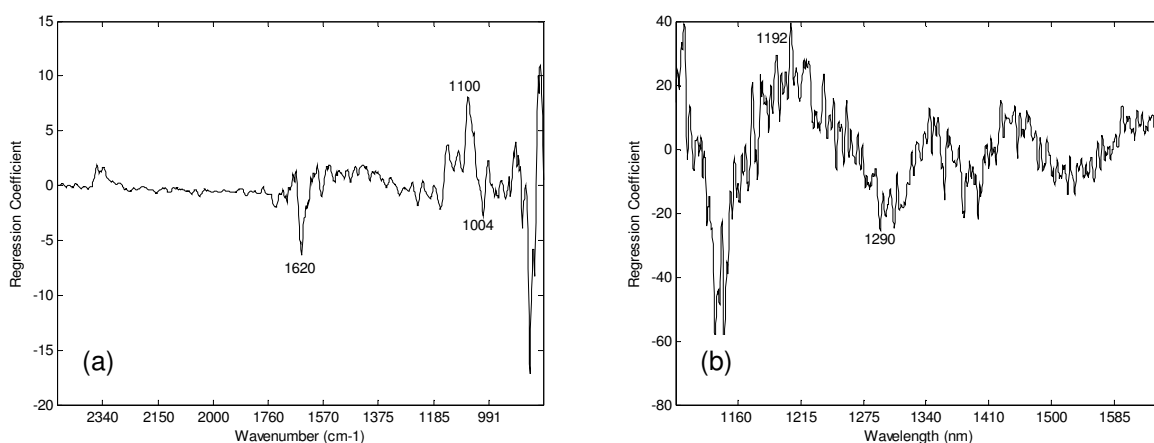


FIGURA 4.19 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS DESENVOLVIDOS PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE EM MID (a) E NIR (b)

4.3.4. Quantificação de conteúdo de sólidos solúveis

Um conjunto composto de 98 espectros adquiridos na região do infravermelho de amostras de polpa *in natura* de maracujá foi utilizado para desenvolver os modelos de calibração multivariados para determinação do conteúdo de sólidos solúveis.

Os modelos multivariados desenvolvidos na região em MID e em NIR com diferentes pré-processamentos de dados e regiões espectrais estão apresentados na Tabela 4.4. Para selecionar o melhor modelo, foram considerados os menores

valores dos erros (RMSEC, RMSECV). Além disso, foram avaliados os coeficientes de regressão dos conjuntos de calibração e validação cruzada. Os melhores modelos em ambas as regiões (MID e NR) estão em destaque (negrito).

TABELA 4.4 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE SSC

Região espectral	Modelo	Intervalo espectral	Pré-processamento	VLs	outlier	n	RMSEC	RMSECV	R^2_c	R^2_{cv}
MID (cm^{-1})	1	800-4000	MSC	7	8	98	0,583	1,602	0,948	0,572
	2	800-4000	MSC + AL	8	6	98	0,602	1,116	0,944	0,801
	3	900-2500	MSC + AL	6	4	98	0,437	0,557	0,971	0,953
	4	900-2500	MSC + AL	6	1	95	0,405	0,524	0,975	0,958
NIR (nm)	1	1000-2500	MSC	7	2	98	0,758	0,974	0,904	0,835
	2	1000-2500	MSC +AL	7	2	98	0,796	0,969	0,893	0,837
	3	1100-1660	MSC + AL	7	3	96	0,623	0,778	0,937	0,900
	4	1100-1660	MSC + AL	7	1	94	0,564	0,717	0,948	0,915

RMSEC e RMSECV = *°Brix

O modelo 4 foi o mais apropriado para prever o conteúdo de sólidos solúveis na região do infravermelho médio. Observou-se que os menores erros das etapas de calibração e validação cruzada (RMSEC = 0,405 °Brix e RMSECV = 0,524 °Brix) estão associados ao uso de 6 Variáveis Latentes. Esse comportamento pode ser visualizado na Figura 4.20.

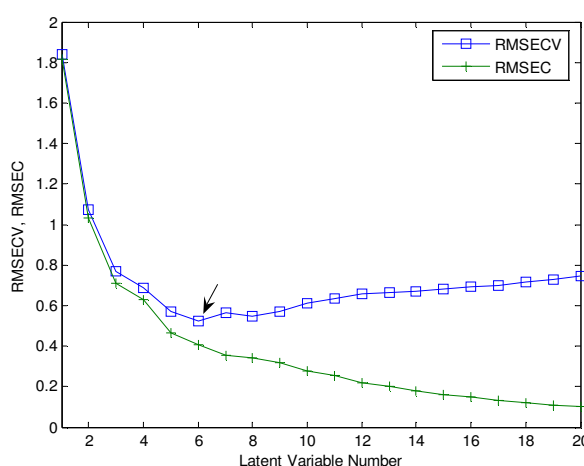


FIGURA 4.20 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO EM MID

As seis Variáveis Latentes do modelo para determinação de SSC foram responsáveis por explicar 99,98% da variabilidade espectral e 99,91% da variabilidade da concentração de SSC em polpa *in natura* de maracujá.

A averiguação de presença de amostras *outliers* na construção do modelo multivariado foi verificada através da Figura 4.21, que relaciona o resíduo de *Student* com *leverage*. Considerando que o limite de *leverage* era de 0,18 e que o resíduo de *Student* é de $\pm 2,5$ (95% de confiança), a amostra 84 (em destaque) encontrava-se com alto valor de *leverage* e estava longe do grupo. Quando foram analisadas suas características, constatou-se que se tratava da amostra com menor concentração de conteúdo de sólidos solúveis (5,5 °Brix), portanto, não foi excluída do grupo de calibração.

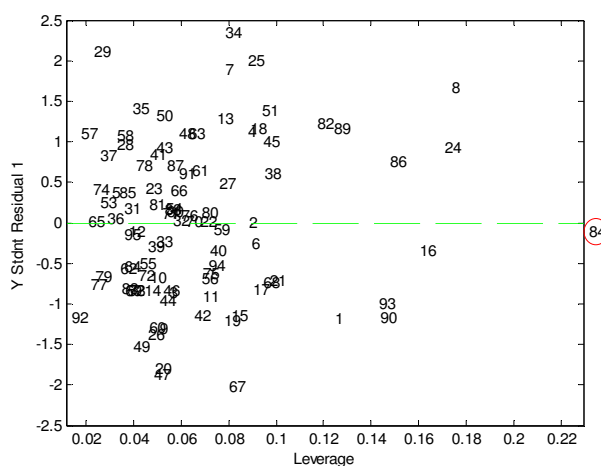


FIGURA 4.21 – RESÍDUOS DE *Student* vs *Leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO MID

O modelo de calibração em MID desenvolvido para determinação de SSC em polpa *in natura* de maracujá utilizou a faixa espectral de 900 a 2500 cm^{-1} e os pré-processamentos MSC seguido de alisamento. Valores elevados de $R^2_c = 0,975$ e $R^2_{cv} = 0,958$ foram encontrados. Ao aplicar o modelo para prever a conteúdo de sólidos solúveis das 32 amostras da etapa de validação externa, obteve-se excelentes resultados com alto valor de coeficiente de regressão, igual a 0,948 e baixos valores de ER = 2,03% e RMSEP = 0,33 °Brix. Os valores apresentados neste trabalho foram mais satisfatórios que os valores reportados para a polpa de groselha preta, onde o R^2_v foi 0,84 e RMSEP = 1,14 °Brix (CAMPS *et al.*, 2010). Os autores utilizaram 3 VLs e toda o intervalo espectral (600 – 7000 cm^{-1}).

O bom ajuste do modelo desenvolvido na região do infravermelho médio, para a determinação de SSC pode ser observado na Figura 4.22.

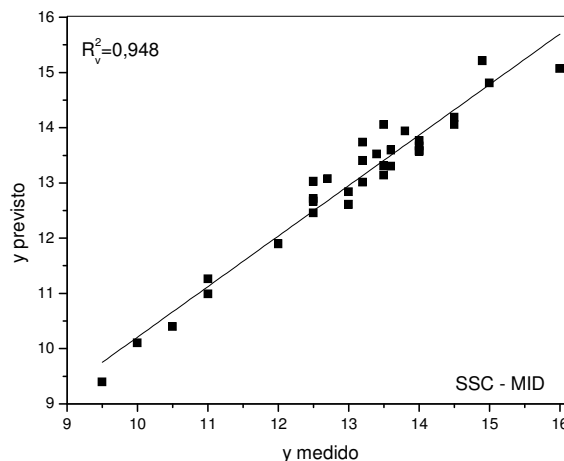


FIGURA 4.22 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 32 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE SSC EM MID

O gráfico de coeficiente de regressão do modelo em MID desenvolvido para determinar o conteúdo de sólidos solúveis em polpa *in natura* de maracujá está apresentado na Figura 4.23. O SSC é constituído de vários compostos (açúcares, vitaminas, ácidos, aminoácidos e algumas pectinas), tornando-se difícil atribuir importância a uma única banda. Porém, números de onda próximos aos relatados para os açúcares (1012 e 1051 cm^{-1}) foram também observados com relevantes para o desenvolvimento do modelo em MID para determinação de SSC, possivelmente por se tratar do maior constituinte do conteúdo de sólidos solúveis. A banda observada no número de onda próximo a 1600 cm^{-1} (especificamente em 1635 cm^{-1}), pode estar relacionada a presença de ácidos orgânicos na polpa *in natura* de maracujá.

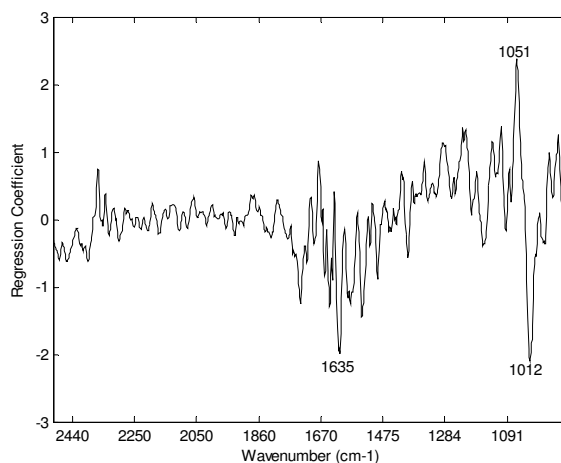


FIGURA 4.23 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA O MODELO PLS DESENVOLVIDO PARA DETERMINAR SSC EM MID

O resumo dos resultados dos modelos de calibração multivariada, desenvolvidos a partir dos espectros adquiridos na região do infravermelho próximo estão apresentados na Tabela 4.4. O modelo 4 (destaque) foi o mais indicado para previsão de SSC em NIR.

O melhor modelo PLS em NIR para predição do conteúdo de sólidos solúveis em polpa *in natura* de maracujá, foi desenvolvido com 7 Variáveis Latentes, sendo que acima dessa quantidade não observou-se ganho significativo em termos de minimização dos valores de RMSECV (FIGURA 4.24)

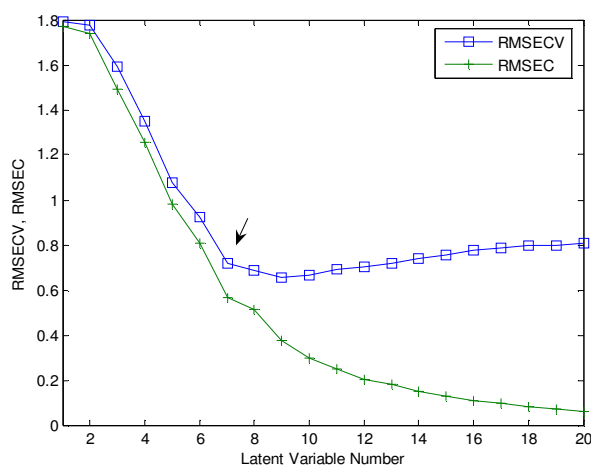


FIGURA 4.24 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO EM NIR

As 7 Variáveis Latentes utilizadas para desenvolver o modelo, foram responsáveis por explicar 100% da variância espectral e 99,82% da variância do parâmetro de qualidade SSC.

Uma segunda característica importante do modelo, é que o grupo de calibração foi constituído por 94 amostras. Isso se deve ao fato que durante as etapas de desenvolvimento dos modelos, conforme apresentado na Tabela 4.4, vários pré-processamentos de dados e regiões espectrais foram testados. As amostras identificadas como anômalas, e que apresentavam características que permitiam suas retiradas foram excluídas do grupo. Ao final, o modelo 4 foi desenvolvido com 94 amostras e através da Figura 4.25, ainda foi possível observar que o modelo escolhido para a predição de SSC em polpa *in natura* de maracujá apresentava uma amostra *outlier* (amostra 82).

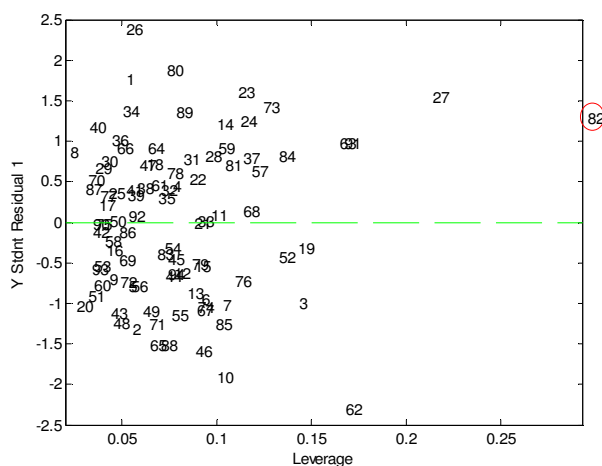


FIGURA 4.25 – RESÍDUOS DE *Student vs Leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SSC NA REGIÃO EM NIR

A amostra 82 está fora do limite de *leverage* de 0,22, porém assim como no caso anterior, refere-se a amostra com menor conteúdo de sólidos solúveis (5,5°Brix), portanto foi mantida no grupo de calibração.

Sendo assim, o modelo de calibração multivariado desenvolvido para a determinação de SSC em polpa *in natura* de maracujá a partir da região em NIR, utilizou 94 amostras, os pré-processamentos MSC seguido de alisamento e o intervalo de 1100 a 1660 nm. Resultados satisfatórios foram obtidos na etapa de

calibração com elevados valores de R^2_c de 0,948 e R^2_{cv} de 0,915. Quando o modelo foi aplicado para determinar o conteúdo de sólidos solúveis das 32 amostras da etapa de validação externa, obteve um bom valor de R^2_v de 0,908 e baixos valores de erro médio relativo (3,77%) e RMSEP (0,57 °Brix). Estes resultados foram melhores que os estudos realizados por Pérez-Marín *et al.*, (2010) e Louw e Theron (2010) com ameixas. Valores de R^2_v de 0,73 e RMSECV de 1,11% foram reportados por estes autores utilizando o intervalo espectral de 515 a 1650 nm e os pré-processamentos de dados, primeira e segunda derivada seguida de alisamento (PÉREZ-MARÍN *et al.*, 2010). Louw e Theron (2010) encontraram um valor mais elevado de coeficiente de regressão de 0,946 com RMSEP de 0,610%Brix, porém os autores utilizaram um grande número de variáveis latentes (VL=12) para desenvolver o modelo, o intervalo espectral de 800 a 1800 nm e os pré-processamentos primeira derivada seguido de SNV.

A Figura 4.26 ilustra a correlação entre os dados experimentais e os previstos pelo modelo, sendo possível observar que alguns valores não se ajustaram perfeitamente ao modelo.

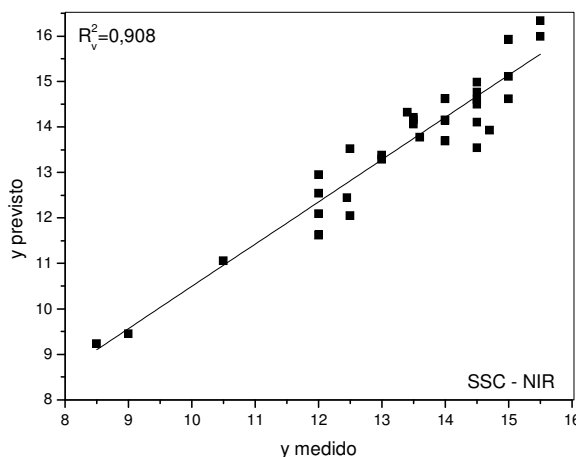


FIGURA 4.26 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 32 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE SSC EM NIR

A Figura 4.27 apresenta o gráfico de coeficiente de regressão para o modelo em NIR desenvolvido para determinar o conteúdo de sólidos solúveis em polpa *in*

natura de maracujá. Maiores intensidades foram observadas nas regiões de 1160 e 1500 nm, a qual é relatada por apresentar os grupos orgânicos, os quais fazem parte das estruturas dos compostos presentes na polpa de maracujá. Os comprimentos de onda 1149, 1192 e 1350 nm foram os mais relevantes para o desenvolvimento do modelo PLS.

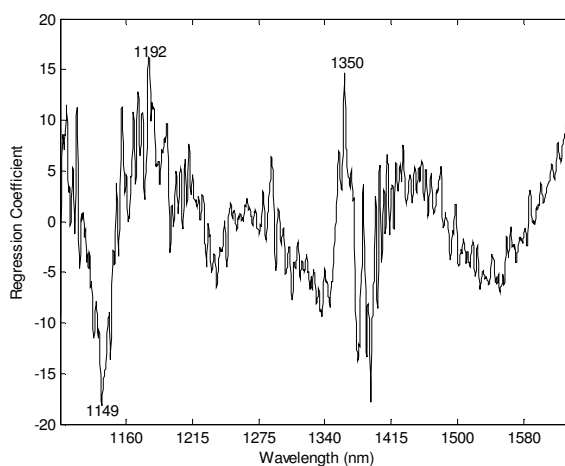


FIGURA 4.27 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA O MODELO PLS DESENVOLVIDO PARA DETERMINAR SSC EM NIR

4.3.5. Quantificação de acidez titulável

Os modelos desenvolvidos para determinação de acidez titulável (AT) utilizaram um conjunto inicial de 130 espectros de amostras de polpa *in natura* de maracujá, dividido em 98 espectros para o grupo de calibração e 32 espectros para o grupo de validação externa. Os modelos multivariados em MID e em NIR com diferentes pré-processamentos de dados e regiões espectrais estão apresentados na Tabela 4.5. Mais uma vez o melhor modelo (modelo 3 para MID e NIR em destaque) foi selecionado considerando os menores valores dos erros (RMSEC, RMSECV) e os maiores coeficientes de regressão dos conjuntos de calibração e validação cruzada.

TABELA 4.5 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE AT

Região espectral	Modelo	Intervalo espectral	Pré- processa mento	VLs	outlier	n	RMSEC	RMSECV	R ² _c	R ² _{cv}
MID (cm ⁻¹)	1	800-4000	MSC + AL	10	7	98	0,224	0,541	0,927	0,574
	2	900-2500	MSC	7	4	98	0,172	0,341	0,958	0,822
	3	900-2500	MSC	7	0	94	0,109	0,281	0,971	0,882
	4	900-2500	MSC + AL	8	0	94	0,202	0,311	0,941	0,854
NIR (nm)	1	1000-2500	MSC+AL	10	3	98	0,333	0,628	0,850	0,367
	2	1100-2500	MSC	8	4	98	0,402	0,581	0,773	0,477
	3	1100-2500	MSC	8	0	94	0,375	0,551	0,799	0,512
	4	1100-2500	MSC + AL	8	0	94	0,428	0,538	0,728	0,530

RMSEC e RMSECV =g de ácido cítrico 100 mL⁻¹ de polpa

Empregando a região espectral em MID para o desenvolvimento dos modelos, observou-se que somente após delimitar o intervalo espectral (900 a 2500 cm⁻¹) e retirar as amostras *outliers* foi possível obter um melhor modelo (modelo 3) para previsão de acidez titulável (TABELA 4.5). A partir dos dados da Figura 4.28, nota-se que não há ganhos significativos em termos de minimização do erro RMSCV acima de 7 Variáveis Latentes.

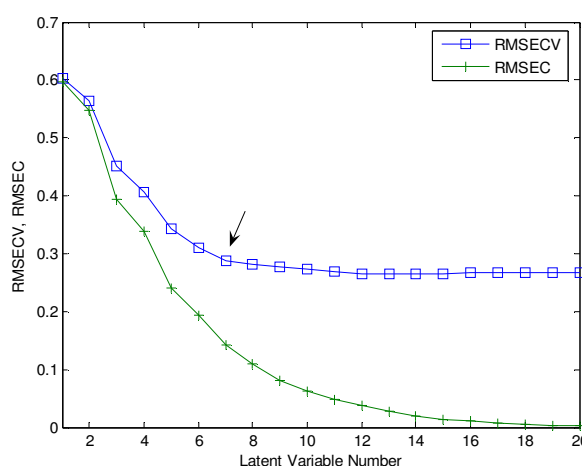


FIGURA 4.28 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AT NA REGIÃO EM MID

A ausência de amostras anômalas foi confirmada através do gráfico que correlaciona os resíduos de *Student versus leverage*, e está apresentado na Figura 4.29. O modelo de calibração PLS (modelo 3) foi desenvolvido com 94 amostras,

portanto, o limite de *leverage* foi de 0,22 e foi considerado o limite de resíduos de *Student* de $\pm 2,5$ com 95% de confiabilidade.

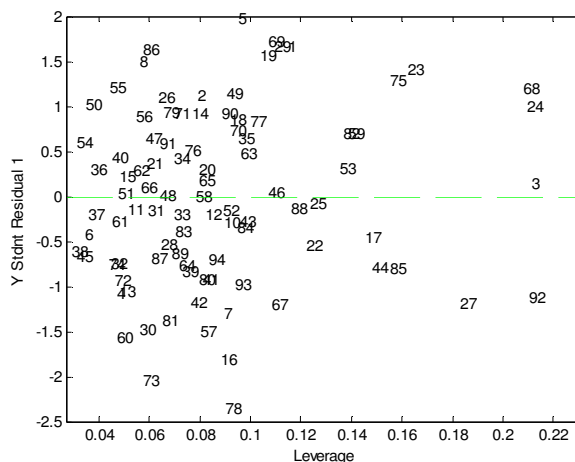


Figura 4.29 – RESÍDUOS DE *Student* vs *Leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AT NA REGIÃO EM MID

O modelo com melhor desempenho em MID resultou em bons valores de $R^2_c = 0,971$ e $R^2_{cv} = 0,882$. Quando o modelo foi aplicado para determinar a acidez titulável das 32 amostras da etapa de validação externa, obteve um valor de R^2_v de 0,856 e baixos valores de erro médio relativo (4,15%) e RMSEP (0,23 g de ácido cítrico 100 mL⁻¹ de polpa). Resultados análogos foram relatados por Camps *et al.*, (2010) que encontraram valores de R^2_v de 0,87 e RMSECV de 2,61 g.L⁻¹ para polpa de groselha preta utilizando 4 VLs e todo o intervalo espectral. Por outro lado, Scibzs *et al.*, (2010) utilizaram o intervalo espectral de 1200 a 1800 cm⁻¹, o pré-processamento SNV e 8 VLs obtiveram melhores resultados para a polpa de tomate ($R^2_v = 0,96$, Er = 4,8 e RMSEP = 0,363 meq.100g⁻¹).

O modelo desenvolvido com as características exibidas acima apresentou boa correlação entre os valores calculados pelo modelo e os valores obtidos pela análise de referência. Ainda assim, observou-se que algumas amostras não se ajustaram adequadamente ao modelo (FIGURA 4.30).

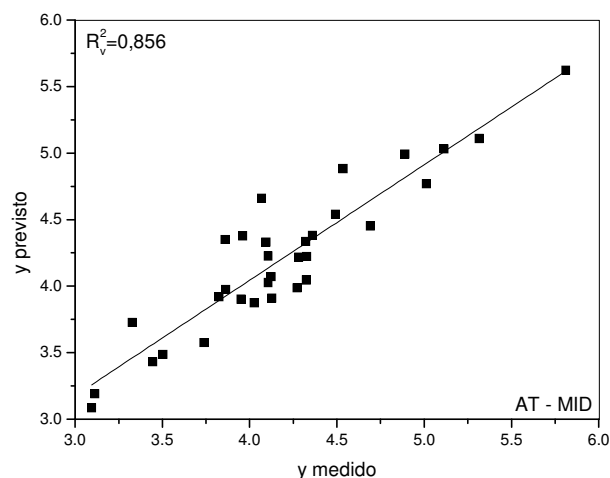


FIGURA 4.30 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 32 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE AT EM MID

Não foi possível atribuir bandas específicas para a construção do modelo (FIGURA 4.31). O pré-processamento de dados aplicado (MSC) é um método usado para compensar o desvio de linha base e os efeitos multiplicativos de refletância (NICOLAI *et al.*, 2007). Mesmo assim, percebeu-se a presença de grande quantidade de ruídos. As bandas identificadas anteriormente como as de maior relevância para a construção dos modelos pôde ser sutilmente observadas nos números de onda de 1004 e 1640 cm^{-1} . Além disso, entende-se que algumas regiões foram mais importantes para o desenvolvimento do modelo, pois são regiões de forte absorção de grupos C-O (1000 e 1300 cm^{-1}) e grupo C=O (1600 a 1800 cm^{-1}), os quais fazem parte da estrutura dos principais ácidos orgânicos presente na polpa *in natura* de maracujá e que são responsáveis pela acidez do fruto (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

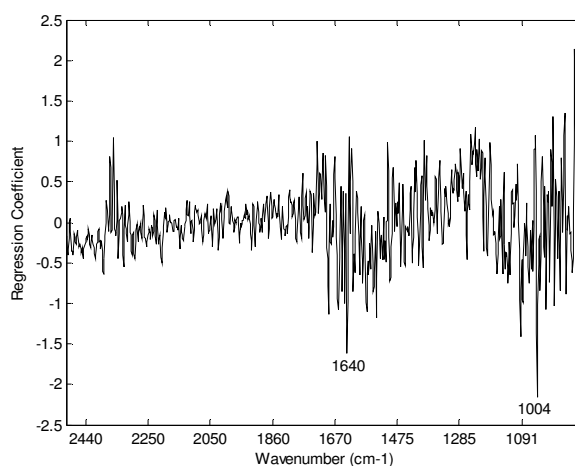


FIGURA 4.31 - COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA O MODELO PLS DESENVOLVIDO PARA DETERMINAR AT EM MID

O emprego da região espectral em NIR para a determinação de acidez titulável em polpa *in natura* de maracujá não foi satisfatória. Vários modelos foram desenvolvidos, com diferentes pré-processamentos e regiões espectrais, mas nenhum foi suficiente para prever a concentração de AT. Um resumo desses modelos está apresentado na Tabela 4.5.

O modelo de número 3 foi o que apresentou melhor valor de $R^2_c = 0,799$ com um erro de calibração de 0,375 g de ácido cítrico 100 mL⁻¹ de polpa. Um baixo valor de coeficiente de regressão na etapa de validação cruzada foi verificado ($R^2_{cv} = 0,512$) e um valor de RMSECV de 0,551 g de ácido cítrico 100 mL⁻¹ de polpa. Quando o modelo foi aplicado para prever a concentração de AT das 32 amostras da etapa de validação externa o valor do coeficiente de regressão foi ainda menor ($R^2_v = 0,359$) e um erro médio relativo foi de 7,22%. Esse baixo valor do coeficiente de regressão da validação externa, demonstra o baixo ajuste do modelo e portanto não houve correlação entre os dados calculados pelo modelo e os valores encontrados pela análise de referência e pode ser observado na Figura 4.32.

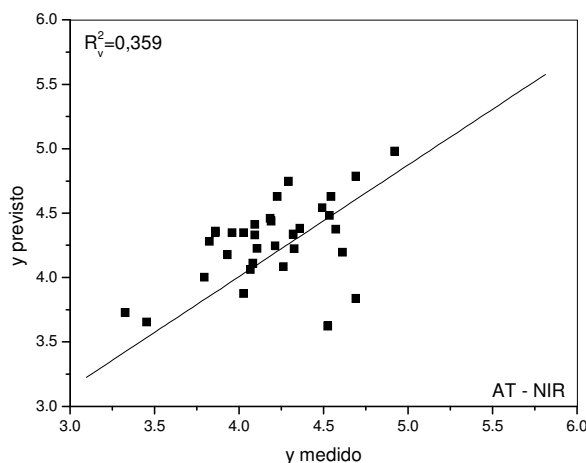


FIGURA 4.32 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERÊNCIA (y medido) DAS 32 AMOSTRAS DE POLPA IN NATURA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE AT EM NIR

Trabalhos publicados para predição AT aplicando a espectroscopia NIR são reduzidos em comparação com os relatados para SSC. Nicolai *et al.*, (2007) explicam essa escassez, afirmando que o espectro NIR de frutos é dominado por bandas de absorção de água e que a concentração típica de ácido é baixa, em comparação com os açúcares encontrados no fruto, e portanto, pode não ser medido adequadamente. A baixa previsibilidade foi também verificada em mangas ($R_v^2 = 0,393$) (SCHMILOVITCH *et al.*, 2000) em nêspersas ($R_v^2 = 0,374$) (FU *et al.*, 2009) e ameixa ($R_v^2 = 0,608$) (LOUW e THERON, 2010). Previsões aceitáveis foram verificadas para polpa de *bayberry* com valores de R_c^2 de 0,895 e RMSECV de 2.89 g.L^{-1} (XIE *et al.*, 2011) e para o damasco com valores de R_v^2 de 0,88, ER de 15% e RMSEP de 3,62 meq.100g^{-1} de matéria fresca que foram relatados por Bureau *et al.*, (2009) utilizando 10 VLs e o intervalo espectral entre 110 a 2500 nm.

4.4. Conclusões

A espectroscopia na região do infravermelho aliada à calibração multivariada permitiu a obtenção de modelos com bom desempenho para previsão dos parâmetros de qualidade da polpa *in natura* de maracujá.

Os melhores modelos para cada um dos parâmetros (glucose, frutose, sacarose, SSC e AT) foram desenvolvidos avaliando diferentes pré-processamentos de dados e regiões espectrais. De maneira geral, para a região em MID o intervalo espectral utilizado foi de 800 a 2500 cm^{-1} e para a região em NIR o intervalo mais adequado foi entre 1100 a 2000 nm. Os pré-processamentos que auxiliaram na extração das informações analíticas sem prejudicar os resultados foram o MSC e o alisamento.

De forma geral as duas metodologias foram adequadas para previsão dos parâmetros de qualidade em polpa *in natura* de maracujá. Entretanto a região do infravermelho médio forneceu melhores resultados para a glucose ($R^2_v = 0,930$ e erro médio relativo de 9,988%), a frutose ($R^2_v = 0,838$ e erro médio relativo de 13,56%), a sacarose ($R^2_v = 0,737$ e erro médio relativo de 6,56%), o SSC ($R^2_v = 0,948$ e erro médio relativo de 2,03%) e a AT ($R^2_v = 0,856$ e erro médio relativo de 4,15%). A baixa previsão da região do infravermelho próximo foi a devido possivelmente a presença da água, a qual apresenta alta intensidade de absorção da nessa região e pode ter interferido na menor especificidade das bandas.

CAPITULO 5. PARÂMETROS DE QUALIDADE DA POLPA LIOFILIZADA

5.1. Introdução

A água é o mais abundante e um importante constituinte químico dos frutos. Polpas de frutos *in natura* apresentam aproximadamente 80% de umidade. A molécula de água possui uma grande diferença de cargas no momento dipolo, o que resulta em fortes bandas de absorção no espectro infravermelho (COATES, 1999; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). Dessa forma, medidas de parâmetros de qualidade de frutos e polpas *in natura* por espectrometria no infravermelho tendem a ser complicadas. Os espectros nesses casos são dominados por conjuntos de sobretons e combinações de bandas de água. Tal fato, em conjunto com a complexa composição química de um fruto, faz com que a interpretação dos dados dos espectros adquiridos no infravermelho próximo e médio seja altamente complicada, principalmente para determinar individualmente cada parâmetro de qualidade.

São vários os trabalhos que registraram que as maiores bandas de absorção em espectros adquiridos na região do infravermelho em frutos intactos (LOUW e THERON, 2010; PÉREZ-MARÍN *et al.*, 2010; ZUDE *et al.*, 2011) e em polpa *in natura* (XIE *et al.*, 2009; REID *et al.*, 2005; CARLINI, MASSANTINI e MENCARELLI, 2000; XIE *et al.*, 2011) são bandas referentes a água. Nicolai *et al.*, (2007) afirmam que como as bandas de absorção de água dominam os espectros, não é provável que os constituintes menores possam ser medidos. Sendo assim, o presente capítulo, tem por objetivo analisar os parâmetros de qualidade da polpa liofilizada de maracujá através da espectroscopia em MID e em NIR.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Seleção e preparação dos frutos de maracujá

Cinquenta e seis frutos de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*) em diferentes estádios de maturação foram coletados na região de Curitiba no ano de 2011. A polpa foi separada da semente através de filtração simples e, em seguida liofilizada utilizando a temperatura de -56°C até secagem completa das amostras (liofilizador BOC EDWARDS, São Paulo). A polpa liofilizada foi usada

neste estudo, com o intuito de eliminar interferências causadas pelas características físicas do fruto intacto (OLIVEIRA *et al.*, 2013) e também para minimizar a influência da água na aquisição das bandas de absorção na região do infravermelho (WILLIAMS e NORRIS, 1987). Cada amostra foi caracterizada por suas propriedades espectrais e bioquímicas (açúcares individuais, ácidos orgânicos e carotenóides) e o desvio padrão da análise foi verificado através de cinco repetições de uma mesma amostra.

5.2.2. Aquisição dos espectros na região de MID e NIR

Os espectros no infravermelho médio (MID) foram registrados à temperatura ambiente em um espectrofotômetro 27 Tensor (Bruker Optics, Wissembourg, França) equipado com a célula de cristal de diamante (Golden Gate, Bruker Optics), um detector DTGS (Deuterated Tri Glycine Sulfate) e com acessório de reflectância atenuada total (ATR). As medidas foram controladas pelo software OPUS Versão 5.0 fornecido por Bruker Optics.

O espectro MID de cada amostra foi obtido pela média de 32 varredura sem uma região espectral compreendida entre 4000 a 650 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Amostras liofilizadas e homogeneizadas foram colocadas na superfície do cristal de diamante e foram prensadas com um sistema de *press tip flap*. O espectro do ar foi utilizado como *background*. Dois espectros foram adquiridos, a partir de duas alíquotas diferentes da mesma amostra. O espectro médio foi usado no desenvolvimento do modelo.

Os espectros no infravermelho próximo (NIR) foram obtidos à temperatura ambiente em um espectrofotômetro FT-NIR (Bruker Optics, Wissembourg, França) equipado com uma esfera de integração para fornecer medidas de reflectância difusa e um detector de TE-InGaAs. As medidas foram controladas pelo software OPUS Versão 5,0 que foi fornecido por Bruker Optics.

O espectro NIR de cada amostra foi obtido com uma média 32 varreduras em uma região espectral compreendida entre 800 a 2500 nm e resolução de 2 nm. As polpas de maracujá liofilizadas foram colocadas sobre 30 posições automatizadas, com cada posição correspondente a um orifício de diâmetro de 18 mm. Assim que adquirido o primeiro espectro, cada amostra foi homogeneizada e um segundo

espectro, foi capturado. A média da duplicata para cada amostra foi utilizada no desenvolvimento do modelo.

5.2.3. Determinação de açúcares simples

A análise de açúcares individuais, glucose, frutose e sacarose foi realizada com base no princípio de hidrólise enzimática (VERMIER *et al.*, 2007; VELTEROP, e VOS, 2001) utilizando um kit para análise de alimentos (Boehringer Mannheim Co., Mannheim, Germany). As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro (FLX-Xenius, SAFAS, Monaco) à 430 nm equipado com um dispositivo de injeção automática. O conteúdo de cada açúcar individual foi expresso em mg.g^{-1} de matéria seca (MS).

Para o preparo da amostra, inicialmente foi pesado 100 mg de polpa de maracujá liofilizada, a qual foi homogeneizada com 800 mg de água mili-Q. A amostra líquida foi diluída para uma concentração de 0 a 2 g.L^{-1} para determinação de glucose e frutose e de 0 a 4 g.L^{-1} para determinação de sacarose. Em seguida as amostras diluídas foram centrifugadas (Hettich Universal 320R - UK) por 5 minutos a 9000 rpm à temperatura de 4°C .

As amostras de maracujá ($5 \mu\text{L}$) foram transferidas para a microplaca juntamente com $250 \mu\text{L}$ dos reagentes específicos para cada tipo de açúcar. A microplaca foi colocada no espectrofotômetro à 37°C e as leituras em absorbância (430 nm) foram realizadas automaticamente, após o tempo de reação necessário para a cada quantificação. A Tabela 5.1 apresenta os reativos utilizados para determinação de cada açúcar simples, os quais fazem parte do kit enzimático e tempo de reação necessário.

TABELA 5.1 – REATIVOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

Açúcar	Reagentes	Tempo de reação (minutos)
Glucose	NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio)	10
	ATP (Adenina trifosfato)	
	Enzima hexoquinase	
	Glucose-6-fosfato desidrogenase	
Frutose	NADH/ATP	16
	Enzima hexoquinase	
	Glucose-6-fosfato desidrogenase	
	Fosfoglucose isomerase	
Sacarose	β -frutosidade	8

Uma curva de calibração foi construída com seis diferentes concentrações de soluções padrões de D-glucose, D-frutose e sacarose, as quais foram preparadas conforme mostra a Tabela 5.2. Pesou-se a quantidade referente a cada solução, 200 mg, para a glucose e frutose e 400 mg para a sacarose, e completou-se o volume para 100 ml de água mili-Q. Leituras de absorbância de cada solução dos três açúcares foram registradas em espectrofotômetro à 430 nm (FLX-Xenius, SAFAS, Monaco). Os resultados obtidos para cada curva de calibração, estão apresentados no Apêndice II.

TABELA 5.2 - SOLUÇÕES PADRÃO DE D-GLUCOSE, D-FRUTOSE E SACAROSE

Número da Solução	0	1	2	3	4	5	6
Volume de água (μ L)	200	175	150	125	100	50	0
Volume solução padrão (μ L)	0	25	50	75	100	150	200
Concentração ($g L^{-1}$)	0	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0

A concentração de glucose da amostra de polpa de maracujá liofilizada foi calculada através da equação 4.1.

$$Glu\ cos\ e(mg.g^{-1}materia\ sec\ a) = \frac{(C_{glu} \cdot D)/10}{m/(m+v)} \quad (4.1)$$

onde C_{glu} é o valor da concentração de glucose presente na solução, encontrada através da equação da curva de calibração, D é o fator de diluição da glucose, m é a massa da amostra liofilizada, v é o volume de água utiliza na extração.

A concentração da frutose na amostra foi calculada através da equação 4.2.

$$Fructose(mg.g^{-1}matéria\ sec\ a) = \frac{((C_{fru} - C_{glu}) \cdot D)/10}{m/(m+v)} \quad (4.2)$$

onde C_{fru} é o valor da concentração de frutose presente na solução, encontrada através da equação da curva de calibração.

A concentração da sacarose na amostra foi calculada pela equação 4.3.

$$Sacarose(mg.g^{-1}matéria\ sec\ a) = \frac{((C_{glu-total} - C_{glu}) \cdot D)/10}{m/(m+v)} \cdot 1.9 \quad (4.3)$$

onde $C_{glu-total}$ é o valor da concentração de glucose total (antes e depois da inversão da sacarose) presente na solução, encontrada através da equação da curva de calibração.

5.2.4. Determinação de ácidos orgânicos

O método enzimático também foi aplicado para determinar a concentração dos ácidos cítrico e málico das amostras de maracujá liofilizada. Kits para análise de alimentos (Boehringer Mannheim Co., Mannheim, Germany) foram utilizados de acordo com as metodologias propostas por Vermier *et al.*, (2007) e Velterop, e Vos, (2001) com pequenas modificações. Uma curva de calibração foi desenvolvida relacionando a concentração de cada ácido com absorbância em 430 nm. As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro (FLX-Xenius, SAFAS, Monaco) equipado com um dispositivo de injeção automática. O conteúdo dos ácidos orgânicos foi expresso em $mg.g^{-1}$ de matéria seca (MS).

O preparo da amostra deu-se similarmente aos procedimentos utilizados para a determinação de açúcares, onde 100 mg de polpa de maracujá liofilizada foram homogeneizadas com 800 mg de água mili-Q. A amostra líquida foi diluída para uma

concentração de 0 a 1 g.L⁻¹ para os dois principais ácidos orgânicos (cítrico e málico). Em seguida as amostras diluídas foram centrifugadas (Hettich 320R) por 5 minutos a 9000 rpm à temperatura 4 °C.

O volume de 5 µL das amostras diluídas e 250 µL dos reagentes utilizados para cada ácido (TABELA 5.3) foram transferidas para uma microplaca, a qual foi colocada no espectrofotômetro à 37 °C e após o tempo necessário para cada reação e as leituras de absorvâncias à 430 nm foram realizadas automaticamente.

TABELA 5.3 – REATIVOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Ácido	Reagentes	Tempo de reação (minutos)
Ácido cítrico	Citrato liase	16
	L-Malato desidrogenase	
	L-Lactato desidrogenase	
	NADH	
Ácido málico	Glutamato	16
	NAD	
	L-Malato desidrogenase	

Soluções padrão de ácidos cítrico e málico de 1 g.L⁻¹ foram preparadas para a construção da curva de calibração conforme mostra a Tabela 5.4. Pesou-se 100 mg de ácidos cítrico e málico e completou-se o volume para 100 ml de água mili-Q. Os resultados referente as curvas de calibração, estão apresentados no Apêndice II.

TABELA 5.4 - SOLUÇÕES PADRÃO DE ÁCIDOS CÍTRICO E MÁLICO

Número da Solução	0	1	2	3	4	5	6
Volume de água (µ L)	200	180	160	120	80	40	0
Volume solução padrão (µ L)	0	20	40	80	120	160	200
Concentração (g L ⁻¹)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

A concentração de ácido cítrico na amostra foi calculada através da equação 4.4

$$\text{Ácidocítrico}(mg.g^{-1} \text{ matéria seca}) = \frac{(C_{\text{cítrico}} \cdot D)/10}{m/(m+v)} \quad (4.4)$$

onde $C_{\text{cítrico}}$ é a concentração do ácido cítrico determinada através da curva de calibração.

A concentração do ácido málico na amostra foi calculada através da equação 4.5.

$$\text{Ácido.málico}(mg.g^{-1}\text{ matéria seca}) = \frac{(C_{\text{málico}} \cdot D)/10}{m/(m+v)} \quad (4.5)$$

onde $C_{\text{málico}}$ é a concentração do ácido málico determinada através da curva de calibração.

5.2.5. Determinação de carotenóides

A extração dos carotenóides de polpa de maracujá liofilizada foi realizada de acordo com o procedimento apresentado por Serino *et al.*, (2009). A metodologia consistiu em pesar 50 mg de polpa liofilizada do fruto em um eppendorf (2 mL), adicionar 400 μL de água Mili-Q, 10 μL de β -apo-8'-carotenal (trans) seguida de agitação em vortex (Maxi Speed, RT) por 30 segundos. Para proteger a degradação e oxidação dos carotenóides, as demais etapas conforme mostra Figura 5.1 foram conduzidas sob luz limitada.

A quantificação dos carotenóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com um cromatógrafo (UFLC prominence; Shimadzu), equipado com um detector de conjunto de diodos (SPD-M20A), bombas (LC-20AD), injetor automático refrigerado (SIL-20AC HT) em ambiente com temperatura controlada (30°C). Os cromatogramas e a integração das áreas obtidas foram realizadas com o auxílio de do software LabSolutions.

Os carotenóides foram separados em uma coluna C_{30} (Pack YMC C30; YM; 3 μm) 250 x 4.6 mm. Foi utilizado um gradiente binário como fase móvel (metabol/MTBE).

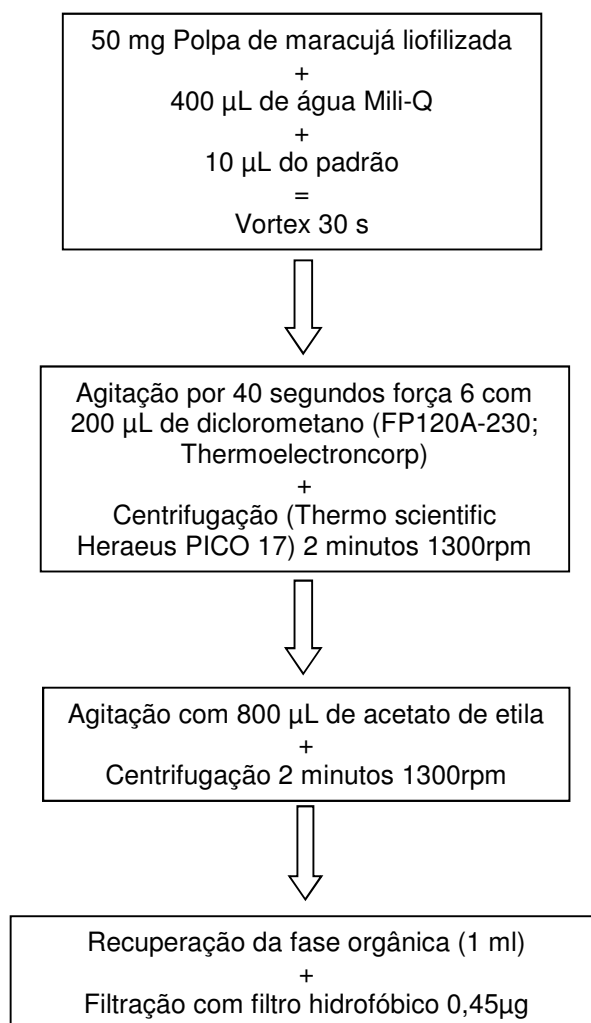


FIGURA 5.1 – PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES EM POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ

O método de padronização externa foi aplicado para avaliação dos resultados. A quantificação dos carotenoides foi calculada utilizando uma curva de calibração padrão. Tal curva, foi construída utilizando o padrão comercial de β -caroteno (0,5 mg) diluído em diclorometano e completado o volume para 100 mL de acetato de etila. Com essa solução, uma alíquota foi submetida a varredura em espectrofotômetro (FLX-Xenius, SAFAS, Monaco) para conhecer o comprimento de onda de máxima absorção. Posteriormente, a partir da solução concentrada prepararam-se cinco amostras diluídas, com concentrações variando de 0.1 – 3.75 mg.mL⁻¹, as quais foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas que as amostras de polpa de maracujá liofilizada (Apêndice III).

5.2.6. Desenvolvimento dos modelos

Metodologia similar ao item 3.2.8 do capítulo 3.

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterização das amostras de maracujá

A Tabela 5.5 mostra a faixa de valores obtida com as análises de referência dos parâmetros de qualidade das amostras de polpa liofilizada de maracujá. De acordo com os dados apresentados, a sacarose é o açúcar em maior quantidade presente na polpa de maracujá. Haard e Chism (1996) salientam que os principais açúcares nos frutos de maracujá são os três açúcares simples: sacarose, glucose e frutose e que a sacarose é o principal açúcar, seguido de glucose e frutose. Os mesmos autores afirmam ainda que os açúcares representam cerca de 80% dos sólidos solúveis de polpa de maracujá. No que diz respeito aos ácidos orgânicos (TABELA 5.5), os dois principais ácidos foram separados e identificados: ácido cítrico e ácido málico. O principal ácido orgânico encontrado foi o ácido cítrico com média de 236,23 mg.g⁻¹ MS, enquanto que o ácido málico esteve presente em uma concentração muito baixa, aproximadamente 39.80 mg.g⁻¹ MS. Os carotenóides individuais, β-caroteno, fitoflueno, e fitoeno foram identificados. Vestígios de outros carotenóides foram observados no cromatograma, mas a sua identificação não foi possível uma vez que estavam presentes numa quantidade muito pequena. O carotenóide mais importante foi β-caroteno, presente em uma concentração de 0 a 0,29 mg.g⁻¹ MS.

TABELA 5.5 – PARÂMETROS DE QUALIDADE (mg.g⁻¹ MS) DA POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: INTERVALO, MÉDIA, DESVIO PADRÃO (δ) E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV)

Parâmetros	Intervalo	Média	δ	CV*
Glucose	23,64 – 217,39	94,52	±3,55	3,76
Frutose	28,37 – 240,03	101,55	±6,23	6,14
Sacarose	40,43 – 396,22	287,37	±3,83	1,33

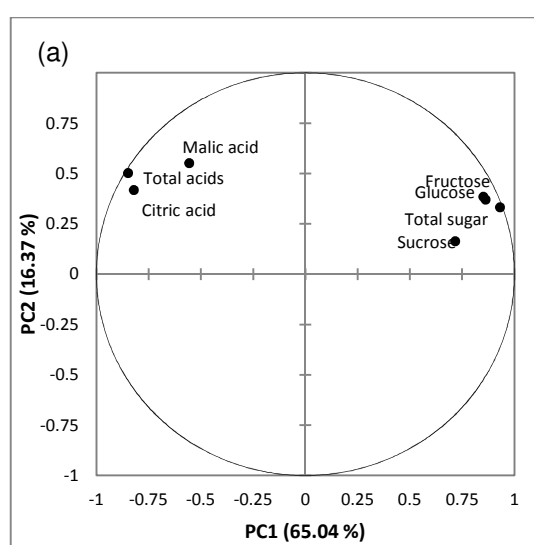
Ácido Cítrico	113,93 – 435,04	236,23	±7,23	3,06
Ácido Málico	7,22 – 81,87	39,80	±18,47	46,41
β-caroteno	0 – 0,29	0,08	±0,06	75,00

*Coeficiente de Variação (desvio padrão da análise/média da análise)x 100 (Queji, 2008)

Valor elevado de desvio padrão foi observado para o ácido málico, tal fato pode ser atribuído a baixa concentração do ácido nas amostras, o que faz com que pequenas variações entre as quintuplicatas (desvio padrão da análise) gerem valores elevados de desvio. Os altos valores reportados de coeficientes de variações para o ácido málico, e os carotenóides, apontam uma heterogeneidade das amostras em relação a estes parâmetros.

Os dados apresentados para todos os parâmetros da Tabela 5.5 apontam a grande variabilidade do grupo de amostra usado neste trabalho, o que contribui para aumentar a aplicabilidade dos modelos desenvolvidos a partir destes dados. De acordo com a resultados de espécies de maracujá já relatados (ZERAİK *et al.*, 2009; JIMÉNEZ *et al.*, 2011, OLIVEIRA *et al.*, *in press*), o conjunto de dados deste trabalho parece ser representativo e, portanto, adequado para este estudo.

A análise de componente principal (PCA) dos açúcares individuais, ácidos orgânicos e β-caroteno da polpa liofilizada de maracujá está apresentada na Figura 5.2. Essa figura representa a dispersão dos frutos.



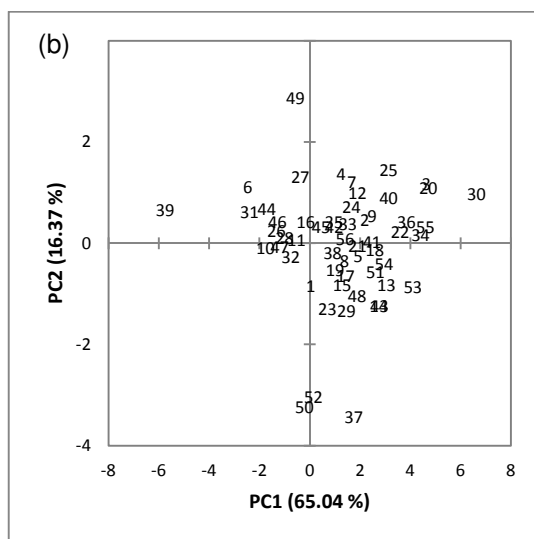
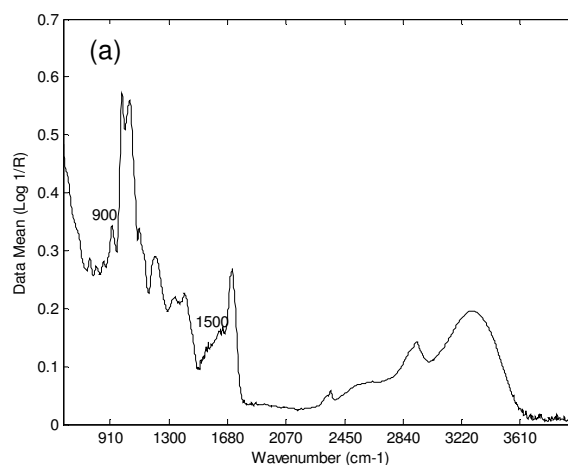


FIGURA 5.2. – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) REALIZADA SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: a) CURVA DE CORRELAÇÃO, b) PC MAPA DAS AMOSTRAS.

Na Figura 5.2a, a primeira PC-score (PC1) discriminou os frutos de acordo com seu amadurecimento. No lado direito (PC1-positivo), encontram-se as amostras com maior concentração de açúcar e no lado esquerdo (PC1-negativo) as amostras com conteúdos mais elevados de ácidos são predominantes. Esta variação está relacionada ao amadurecimento, uma vez que o conteúdo de açúcar aumenta e a concentração de ácido diminui durante a maturação (CHITARRA e CHITARRA, 2005). A dispersão das amostras pode ser observada na Figura 5.2b. A PCA forneceu uma classificação das amostras de acordo com seu nível de açúcar e conteúdo de ácidos. Desta forma, as amostras de frutos mais doces estão agrupadas no lado direito do gráfico e os frutos mais ácidos estão dispostos no lado esquerdo. Por exemplo, as amostras "30", "20" e "3" (no lado direito) são amostras com maior teor de glicose (217,37; 175,52 e 172,62 mg.g⁻¹ MS, respectivamente), enquanto que no lado esquerdo, as amostras "39", "10" e "31", apresentaram os menores teores de glicose (23,64; 55,14 e 55,37 mg.g⁻¹ MS respectivamente) e os maiores teores de ácido cítrico (435,037; 298,682 e 378,370 mg.g⁻¹ MS respectivamente). Além disso, as amostras 37, 50 e 52 estão separadas das demais devido à sua baixa concentração de açúcares e ácidos.

5.3.2. Caracterização dos espectros em MID e em NIR

As médias dos espectros originais de polpa liofilizada de maracujá em MID e em NIR são mostradas nas Figuras 4.3a e b, respectivamente. Na Figura 5.3a o espectro em MID, apresentou zonas de absorção importantes. A zona de absorção de 1500-900 cm^{-1} corresponde à região de absorção dos principais componentes químicos, particularmente: açúcares e ácidos orgânicos. (BUREAU *et al.*, 2009; RUIZ *et al.*, 2008). O espectro em MID apresentou um perfil similar a maçã liofilizada relatada por Bureau *et al.*, (2012). Observando a Figura 5.3b, média dos espectros em NIR, nota-se que quatro principais picos de absorção foram identificados em torno das regiões de 1190, 1450, 1790, e 2380 nm. O pico em 1190 nm está relacionado com as regiões de segundo e terceiro sobretons de C-H associados com soluções de açúcar (OSBORNE, JORDAN e KÜNNEMEYER 1997). O pico em 1790 nm sobrepõe com a região do primeiro sobreton C-H, que também está relacionada com o teor de açúcar. O pico em 2300 nm está dentro da região de combinações de agrupamento C-H e O-H.



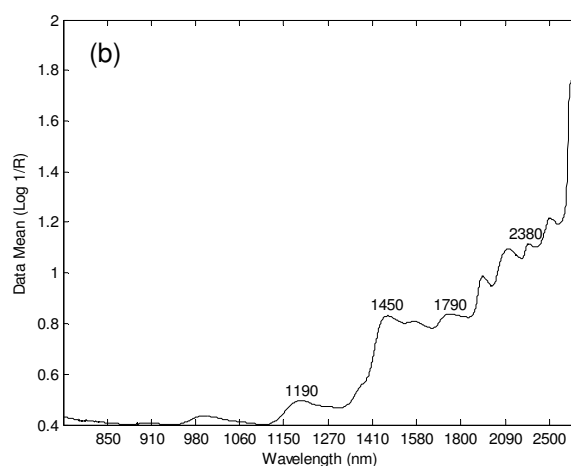
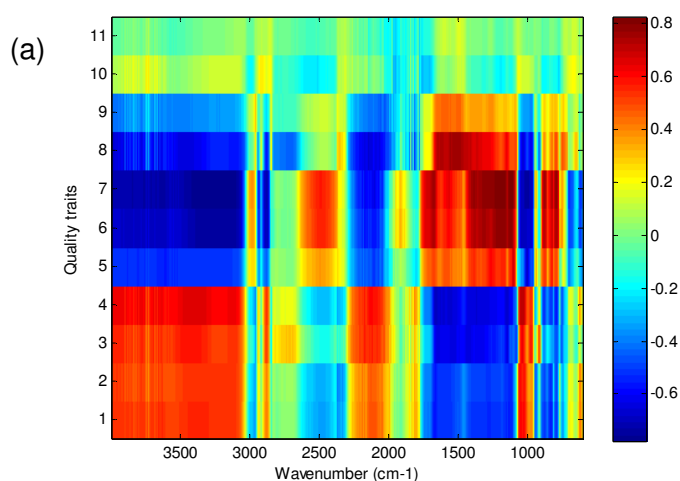


FIGURA 5.3 – MÉDIA DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DE AMOSTRAS DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: (a) MID NO INTERVALO DE 4000 A 600 cm^{-1} , (B) NIR NO INTERVALO DE 700 A 2500 nm.

A identificação das zonas de maior intensidade de absorção para cada um dos parâmetros de qualidade da polpa liofilizada de maracujá foi também avaliada através dos gráficos de cores para os espectros em MID (FIGURA 5.4a) e em NIR (FIGURA 5.4b).



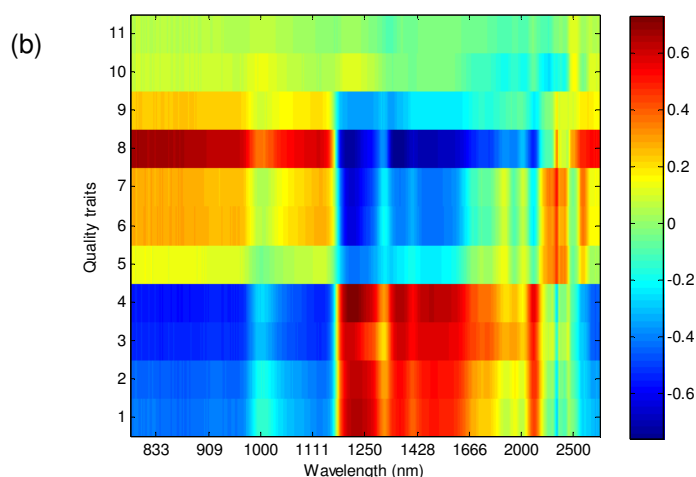


FIGURA 5.4. – INTENSIDADE DE ABSORÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ PARA OS ESPECTROS EM (a) MID E (b) NIR: GLUCOSE (1), FRUTOSE (2), SACAROSE (3), AÇUCARES TOTAIS (4), ÁCIDO MÁLICO (5), ÁCIDO CÍTRICO (6), ÁCIDOS TOTAIS (7), B-CAR

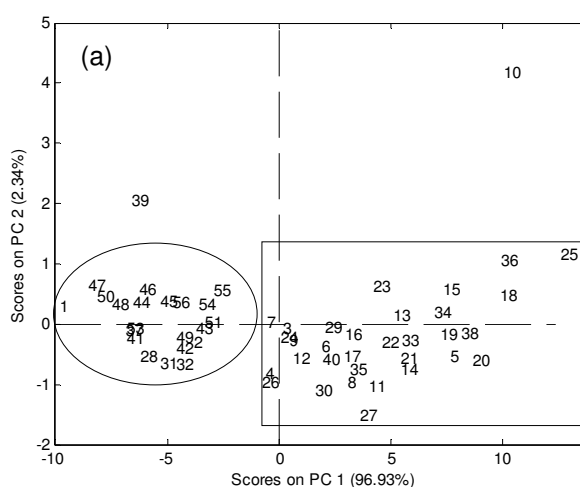
A escala, ao lado esquerdo do gráfico, demonstra que zonas com maior intensidade apresentam cor vermelha e azul forte, por outro lado a cor próxima do verde claro a intensidade do sinal é fraco e certamente de difícil previsão. Por exemplo, para a glucose em MID (número 1, lado direito da FIGURA 5.4a), pode ser observada uma zona de maior intensidade na região entre $1800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ (azul escuro), representando o intervalo de maior interesse para os compostos orgânicos e corroborando as afirmações acima citadas na Figura 5.3. Por outro lado, os carotenóides, fitoeno (número 10), fitoflueno (número 11) encontravam-se próximos a faixa de intensidade mínima (verde claro) em ambos os espectros em MID (FIGURA 5.4a) e em NIR (FIGURA 5.4b). Essas zonas de absorção foram levadas em consideração no desenvolvimento dos modelos PLS posteriormente.

Antes de desenvolver os modelos de previsão, a análise de componente principal (PCA) dos espectros em MID (FIGURA 5.5a) e em NIR (FIGURA 5.5b) foi realizada, a fim de verificar se haviam espectros anômalos e se as amostras formariam grupos específicos. Também foi verificado se os resultados de PCA obtidos com os espectros eram semelhantes ao resultado de PCA das análises de referência e ainda separar o grupo de calibração e o grupo de validação externa.

Analisou-se o mapa dos espectros das amostras em MID (FIGURA 5.5a), e notou-se que a primeira PC-score (PC1) discriminou os frutos em dois grupos. O

primeiro grupo, marcado com um círculo, corresponde aos frutos mais ácidos, e o segundo conjunto, marcado com um quadrado, para os frutos mais doces. Aproximadamente 97% de variação das informações dos espectros em MID, poderia ser representada ao longo da PC1, enquanto que a PC2 contribuiu com pouca informação (2,3%) porém foi suficiente para separar as amostras 10 e 39, as quais eram as amostras mais imaturas do grupo, semelhante aos resultados encontrados na PCA dos dados de referência. A observação dessa separação dos grupos das amostras mais ricas em conteúdos de açúcares e ácidos foi devido a ausência da água. Possivelmente, a polpa liofilizada permitiu a análise mais detalhada dos constituintes da amostra sem interferência da banda de água.

O mapa das amostras dos espectros em NIR (FIGURA 5.5b), também identificou a amostra 39 como diferente do grupo (lado esquerdo superior), assim como a análise de PCA dos dados de referência (FIGURA 4.2b) e a análise de PCA dos espectros em MID (FIGURA 4.5a). Vale ressaltar que a amostra 39 apresentou o maior conteúdo de ácido, enquanto a amostra 30 apresentou um elevado conteúdo de açúcar, no lado direito inferior. A especificidade das bandas é menor na faixa em NIR em relação a faixa em MID (BELLON-MAUREL e MCBRATNEY, 2011). Entende-se que por essa razão, não foi possível observar na Figura 4.5b, separação de grupos específicos. A diferença de concentração dos constituintes entre as amostras foi verificada através de uma reta, que apresentou um aumento gradual na concentração de ácidos orgânicos.



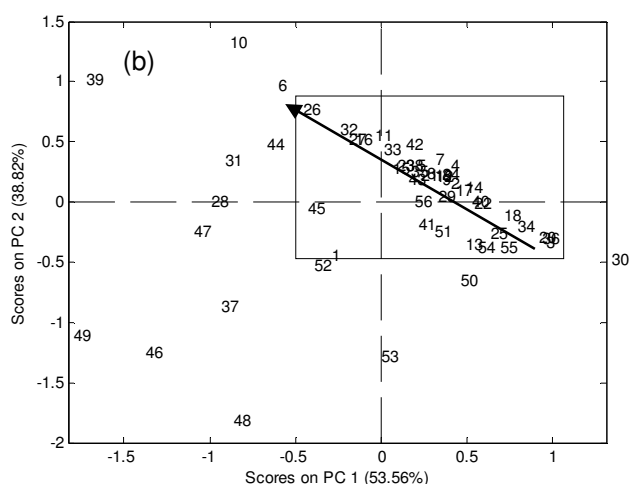


FIGURA 5.5 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE POLPA DE MARACUJÁ LIOFILIZADA: ESPECTROS MID (A) E NIR (B) USANDO O PRÉ-PROCESSAMENTO DCM.

Com a análise das PCAs, os grupos de calibração e validação externa, foram definidos, os quais passaram a conter 42 e 14 amostras respectivamente.

5.3.3. Quantificação de açúcares individuais

O desenvolvimento dos modelos PLS, com as técnicas *leave-one-out* e validação cruzada, entre os dados de análise de referência e os espectros adquiridos em MID e em NIR para cada um dos açúcares da polpa liofilizada de maracujá proporcionou diferentes resultados (TABELA 5.6).

TABELA 5.6 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA OS AÇÚCARES ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) EM POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR

Parâmetro*	Região	Pré-processamento	n	VL	RMSEC*	RMSECV*	R^2_c	R^2_{cv}
Glucose	MID (cm^{-1})	MSC	41	5	10,926	13,903	0,965	0,942
	NIR (nm)	AL	40	6	16,155	21,643	0,923	0,862
Frutose	MID (cm^{-1})	MSC	41	5	12,104	15,773	0,965	0,934
	NIR (nm)	AL	40	6	21,342	21,343	0,894	0,842
Sacarose	MID (cm^{-1})	MSC	41	6	21,800	28,531	0,946	0,936
	NIR (nm)	AL	41	6	36,54	48,83	0,846	0,723

* $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS

Uma atenção especial foi dada no início do desenvolvimento dos modelos para a escolha de número de Variáveis Latentes (LV). Limitar este número é necessário, a fim de executar um modelo de confiança. O número ideal de LV corresponde está relacionada ao menor valor de RMSECV, pois altos valores de RMSECV com baixos valores de RMSEC são um indicativo de *overfitting*. As Figuras 4.6a e 4.6b representam os perfis de RMSECV e RMSEC avaliados para a definição de menor número de Variáveis Latentes utilizados no desenvolvimento dos modelos para determinação da concentração de glucose. Para o modelo em MID (FIGURA 5.6a) o menor erro de validação cruzada (RMSECV) é observado com 8 VLs. Já para os espectros em NIR, o menor erro de validação cruzada encontrado para a determinação de glucose foi com 6 VLs (FIGURA 5.6b).

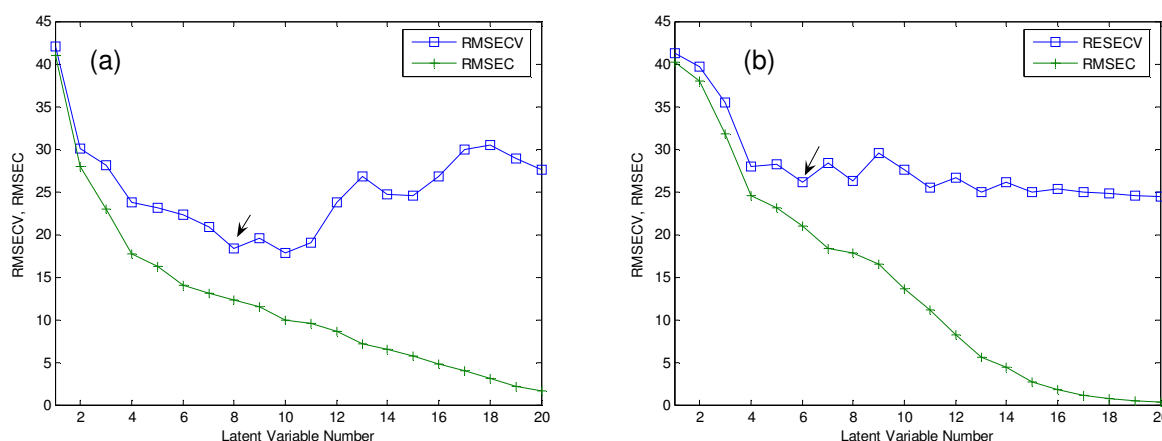


FIGURA 5.6 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b).

Outro fator importante na otimização do modelo de calibração é averiguação da presença de amostras anômalas. A Figura 5.7 mostra o gráfico de resíduos de *Student vs leverage* para os modelos desenvolvidos para determinar a concentração de glucose em MID (a) e em NIR (b).

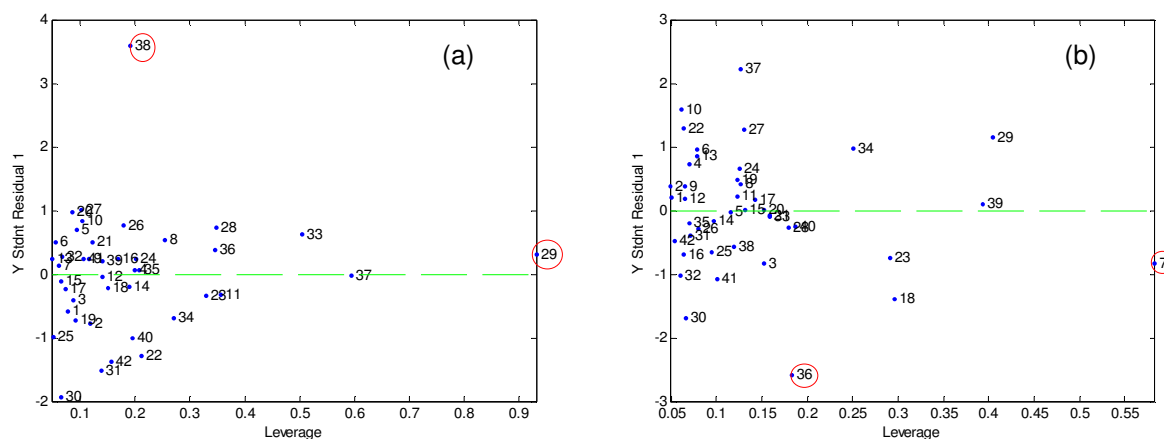


FIGURA 5.7 – RESÍDUOS DE *Student vs Leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b)

Ao avaliar os limites de resíduos de *Student* ($\pm 2,5$, com 95% de confiança), e de *leverage* 0,57 (FIGURA 5.7a), observou-se duas amostras *outliers* (29 e 38). Antes mesmo da retirada das amostras, cada uma foi avaliada individualmente segundo suas características. Quando anomalias são encontradas em relação aos limites de resíduos de *Student*, como a amostra 38, supõe-se que pode ter havido erro na análise de referência. Analisando os valores concentração de glucose, observou-se um valor de $52,97 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, que não é o menor nem o maior valor do grupo portanto poderia ser retirada do grupo. Mesmos assim, verificou-se o perfil do espectro (FIGURA 5.8a) e observou-se que apresentava comportamento semelhante a média dos espectros em MID, portanto a anomalia não era devido a aquisição do espectro. Dessa forma optou-se pela remoção da amostra para verificar se a mesma estava interferindo no desempenho do modelo. A amostra 29 foi indicada *outlier* pelo limite de *leverage*. Este tipo de irregularidade é proveniente em muitos casos, de interferências no momento da aquisição dos espectros. Ao observar o espectro referente a amostra 29 em comparação com a média dos espectros em MID (FIGURA 5.8a), notou-se que realmente a amostra apresentou um espectro com características diferenciadas da média dos espectros, tal motivo poderia de fato estar interferindo na performance do modelo. Porém, quando foi verificada a concentração de glucose (análise de referência), notou-se que possivelmente a diferença constatada no espectro é resultado da menor concentração do açúcar entre as amostras ($23,64 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). Portanto a amostra

continuou no grupo de calibração. A partir dessa análise, os modelos em MID para glucose foram desenvolvidos com 41 amostras para o grupo de calibração e 14 amostras para o grupo de validação externa.

Em relação ao modelo em NIR desenvolvido para determinar a concentração de glucose com 6 VLs, as amostras 7 e 36 foram identificadas como anômalas (FIGURA 5.7b). A amostra 36 destacou-se fora do limite de resíduos de *Student*, portanto, primeiramente foi verificada o valor da concentração de glucose (112,57 mg.g⁻¹ MS), e constatou-se que não se tratava da amostra de maior ou menor valor. Posteriormente, analisou-se também o espectro, o qual apresentou uma intensidade menor que a intensidade do espectro médio (FIGURA 5.8b). De maneira semelhante, verificou-se o motivo pelo qual a amostra 7 estava fora do limite de *leverage* (0,43) e verificou-se um espectro com maior intensidade que o espectro médio. Optou-se por retirar as duas amostras, para testar o desempenho do modelo. Melhoras significativas foram observadas em relação aos erros de calibração e de previsão. Portanto, as amostras 7 e 36 foram definitivamente consideradas anômalas e retiradas do grupo de calibração, que passou a ser constituído de 40 amostras.

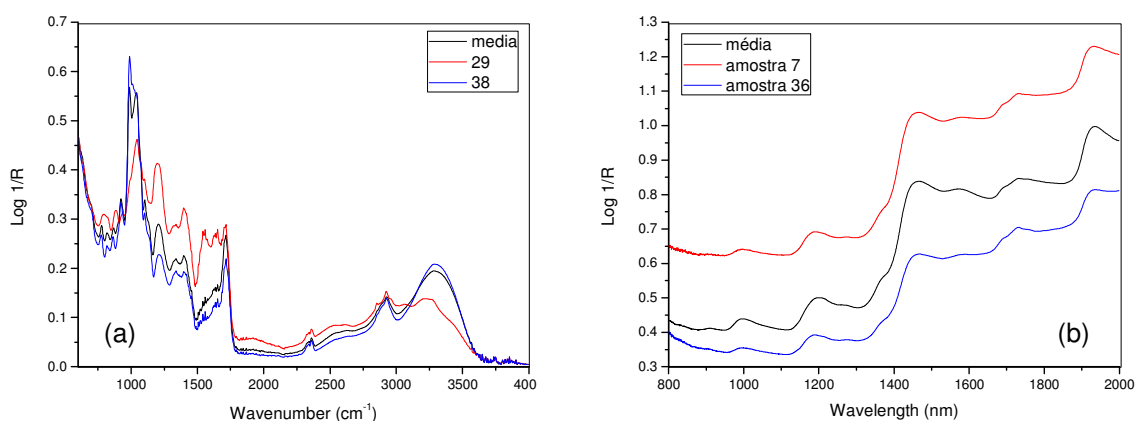


FIGURA 5.8 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DAS AMOSTRAS ANÔMALAS COM A MÉDIA DOS ESPECTROS DOS MODELOS PARA A DETERMINAÇÃO GLUCOSE EM (a) MID e (b) NIR.

Normalmente, a exclusão das amostras *outliers* fornece um conjunto de dados mais homogêneo, o que permite a construção de um modelo mais previsível, eficiente e preciso (VANDEGINSTE *et al*, 1998; FERREIRA *et al*, 1999).

Após a retirada das amostras anômalas, novos modelos de calibração foram desenvolvidos para determinar a concentração da glucose e foram apresentados na Tabela 5.6. Para a espectroscopia no infravermelho médio, o melhor resultado foi obtido utilizando o pré-processamento MSC e toda a faixa espectral, o qual quando aplicado para prever a concentração de glucose das amostras da validação externa, resultou em excelente valor de $R^2_v = 0,938$ e baixo valor de erro médio relativo 7,82% e RMSEP 8,51 mg.g^{-1} MS (TABELA 5.7). Estes resultados foram inferiores aos resultados encontrados por Bureau *et al.*, (2012) para maçã liofilizada. Os autores encontraram valores de coeficientes de regressão e erros de previsão de 0,99 e 3,4 %. Queji *et al.*, 2010 apresentaram também um alto valor de coeficiente de regressão para validação externa (0,976) para a determinação de glucose de bagaço de maçã liofilizado através da espectroscopia MID e um erro médio relativo de 6,6%.

TABELA 5.7 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA

Parâmetro*	Região	Intervalo espectral	n	RMSEP*	ER (%)	R^2_v
Glucose	MID (cm^{-1})	800 – 4000	14	8,51	7,82	0,938
	NIR (nm)	800 – 2000	14	11,56	12,89	0,841
Frutose	MID (cm^{-1})	800 – 4000	14	9,58	6,78	0,907
	NIR (nm)	800 – 2500	14	12,58	12,30	0,832
Sacarose	MID (cm^{-1})	800 – 4000	14	15,02	4,34	0,921
	NIR (nm)	800 – 2500	14	22,53	7,0	0,690

* mg.g^{-1} MS

Para a espectroscopia no infravermelho próximo, o melhor resultado alcançado utilizou o pré-processamento alisamento e a faixa espectral entre 800 a 2000 nm (conforme sugerido na FIGURA 5.4). Os resultados obtidos através do modelo desenvolvido com os espectros em NIR, não foram tão satisfatórios quanto o modelo em MID, porém, também foi eficaz para prever a concentração de glucose, resultando em um coeficiente de regressão da validação externa de 0,841 com um erro médio relativo de 12,89% e um erro de previsão de 11,56 mg.g^{-1} MS. De acordo com Williams (2003) valores de coeficientes de correlação entre 0,82 e 0,90, revelam uma boa previsão. Melhores resultados foram relatados para determinação de glucose em bagaço de maçã liofilizado, com $R^2_v = 0,968$ com erro médio relativo de 7,4% porém foi utilizada a região espectral de 4000 a 6000 cm^{-1} .

Através da Figura 5.9 que apresenta as dispersões dos valores experimentais e previstos pelos modelos em MID e em NIR para determinação de concentração de glucose das amostras do grupo de validação externa, pode-se observar um melhor ajuste do modelo em MID aos dados experimentais em comparação ao modelo em NIR.

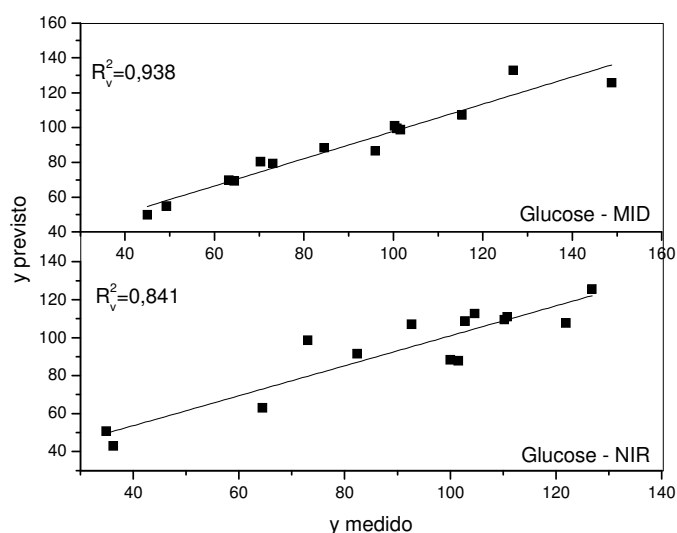


FIGURA 5.9 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 14 AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE

Para o açúcar frutose, o modelo em MID precisou de 8 Variáveis Latentes para atingir o menor erro de validação cruzada, enquanto que, para o modelo em NIR o menor erro foi encontrado com 6 Variáveis Latentes (FIGURA 5.10). Em ambos os casos foi verificado um aumento crescente no valor do erro após essa quantidade de VLs.

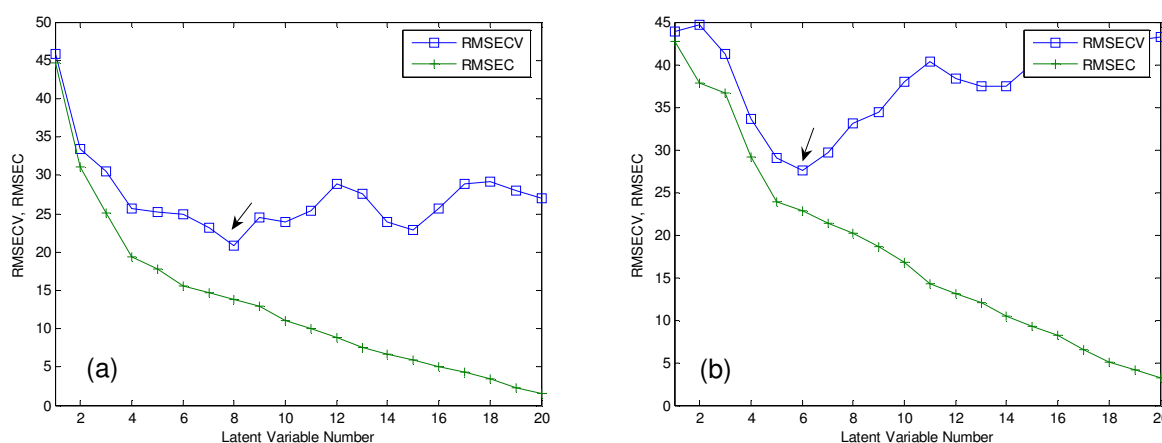


FIGURA 5.10 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b)

A presença de amostras *outliers* foi verificada a partir da Figura 5.11. O modelo desenvolvido a partir dos espectros em MID (FIGURA 5.11a) apresentou um perfil semelhante ao observada para a glucose, onde as amostras 38 e 29 exibiram características anômalas. Para a amostra 38, foi encontrado uma concentração de frutose de $43,337 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, valor este que está dentro os limites de concentração do açúcar nas amostras ($28,37 - 240,03 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) e como o perfil já havia sido verificado (FIGURA 5.8a), optou-se por remover a amostra do grupo de calibração. Por outro lado, a amostra 29, considerada anômala pelo limite de *leverage* (0,57), não foi retirada do grupo de calibração, devido a ser a amostra com menor concentração do açúcar ($28.37 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). O grupo de calibração responsável pelo desenvolvimento do modelo na região em MID para determinação de frutose em polpa de maracujá liofilizada, após a análise de *outliers*, passou a conter 41 amostras.

O modelo em NIR desenvolvido para determinar a concentração de frutose (FIGURA 5.11b), apontou as amostras 7 e 37 como anômalas. A amostra 7, assim como discutida anteriormente para a glucose (FIGURA 4.8b), apresenta maior intensidade em relação ao espectro médio, e um valor de concentração de frutose de $62,03 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, assim sendo, optou-se pela retirada da mesma. Em relação a amostra 37, a qual está fora do limite de resíduos de *Student*, apresentou um valor de concentração de frutose de $43,34 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, o qual está entre os intervalo máximo e mínimo, portanto foi retirada o grupo de calibração. Com a exclusão das

duas amostras, verificou-se uma melhora no desempenho do modelo. A partir de então o grupo de calibração dos espectros em NIR para determinação da concentração de frutose passou a ser constituído por 40 amostras.

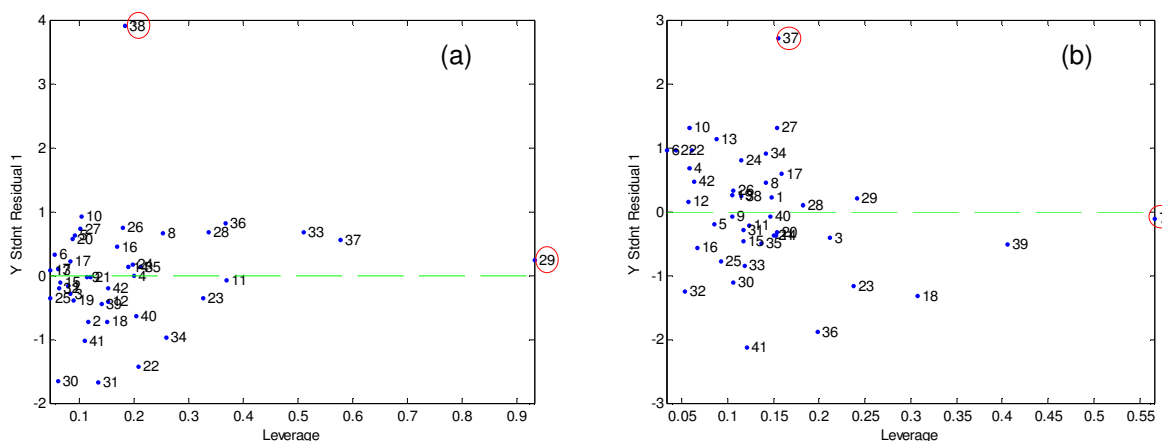


FIGURA 5.11 – RESÍDUOS DE *Student vs leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b)

Os valores dos melhores modelos de calibração em MID e em NIR para determinar a concentração de frutose em polpa de maracujá liofilizado estão apresentados na Tabela 4.6. Os modelos de calibração apresentaram boa correlação entre os valores experimentais e os valores previstos quando aplicados para prever o conteúdo de frutose nas amostras de validação externa (TABELA 5.7). Na região do infravermelho médio, o modelo foi desenvolvido com o pré-processamento MSC utilizando toda a faixa espectral. O coeficiente de regressão obtido pelo modelo para prever a concentração de frutose das amostras de validação externa foi de 0,907 com valores de ER = 6,78% e RMSEP de 9,58 mg.g⁻¹ MS. Resultados mais adequados foram observados para a maçã liofilizada, $R^2_v = 0,97$ e ER = 2,4% aplicando o pré-processamento SNV e intervalo espectral de 1100 a 1700 cm⁻¹ (BUREAU *et al.*, 2012), por outro lado correlações inferiores foram observadas para o bagaço da maçã, $R^2_v = 0,731$ e ER = 3,9% empregando os pré-processamento alisamento, primeira derivada e autoescalamento no intervalo de 500 a 4000 cm⁻¹ (QUEJI *et al.*, 2010).

Para a região em NIR, utilizando o pré-processamento alisamento e também com toda a faixa espectral, o coeficiente de regressão da validação externa (14 amostras) foi de 0,832 e valores de ER de 12,30% RMSEP de 12,58 mg.g⁻¹ MS. No

estudo de Queji e colaboradores (2010) foram referidos menores valores de $R_v=0,721$ e $ER=6,8\%$.

A diferença de previsão entre as duas técnicas pode ser observada na Figura 5.12, que exibe os dados previstos pelo modelo versus os dados da análise de referência para determinação da concentração de frutose. A reta do gráfico para o modelo em MID apresenta-se bem próxima aos pontos experimentais, fornecendo um melhor ajuste, enquanto que para o modelo em NIR, observa-se que houve uma pequena dispersão, portanto um menor ajuste do modelo, ocasionando uma previsão um pouco inferior.

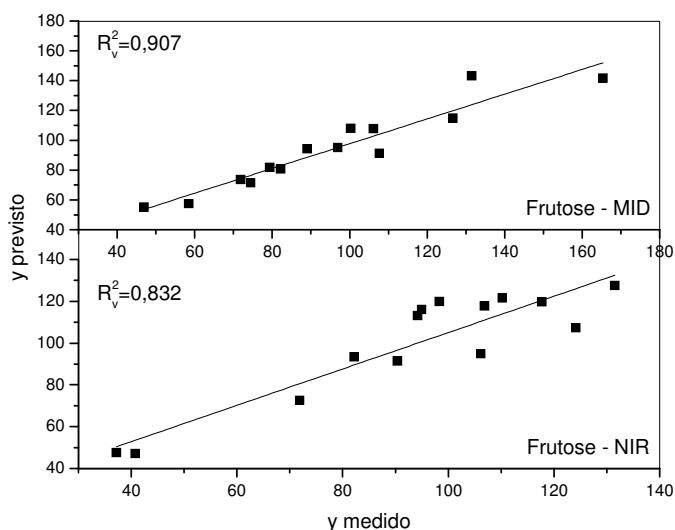


FIGURA 5.12 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 14 AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE

Os menores números de Variáveis Latentes para determinar a concentração de sacarose em polpa liofilizada de maracujá, inicialmente foram 5 para o modelo em MID e 7 para o modelo em NIR (FIGURAS 5.13 a e b respectivamente). Maiores números de VLs em ambos os casos apresentavam aumento no erro de validação cruzada.

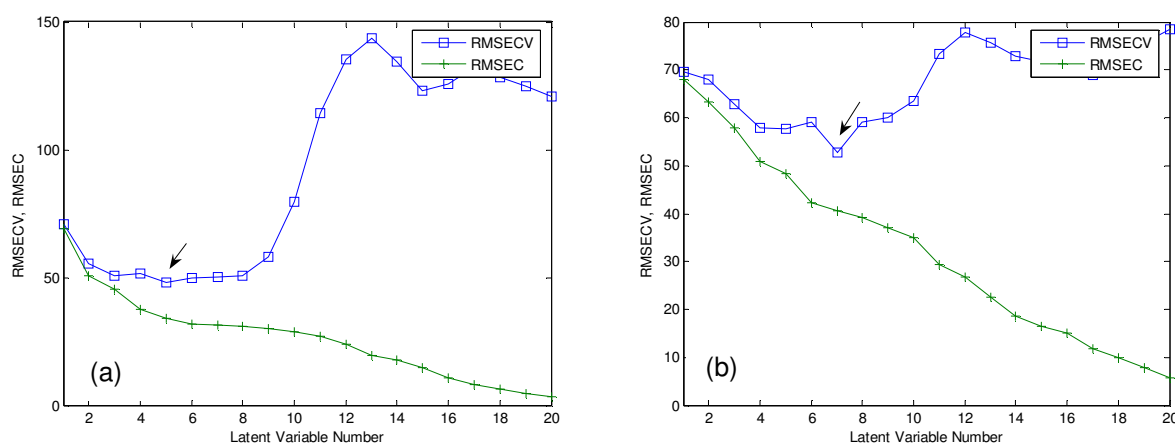


FIGURA 5.13 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b)

Através da Figura 5.14, verificou-se a presença de amostras *outliers*. As amostras 38 e 29 também se encontraram fora dos limites de resíduos de *Student* e *leverage*, respectivamente, assim como nos modelos apresentados para glucose e frutose em MID. Ao analisar a amostra 38 (FIGURA 5.14a), encontrou-se uma concentração de sacarose de $318,90 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, sendo que o intervalo da concentração desse açúcar na polpa liofilizada de maracujá foi de 40,43 a $396,22 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, e como os perfil do espectro já havia sido verificado nas discussões anteriores (FIGURA 5.8a), a amostra foi retida do grupo, e verificou-se melhorias no desempenho do modelo. Já a amostra 29, considerada anômala pelo limite de *leverage* (0,57), não foi retirada do grupo de calibração, pois apresentava a menor concentração de sacarose entre as amostras. Dessa forma, 41 amostras foram utilizadas para o desenvolvimento do modelo MID na determinação de sacarose em polpa de maracujá liofilizada.

As amostras 29 e 37 foram consideradas anômalas para o modelo desenvolvido pela a espectroscopia em NIR (FIGURA 5.14b). A amostra 29, assim como para o modelo em MID, não foi retirada do grupo de calibração, pois apresentou o menor valor de concentração de sacarose. Em contrapartida, a amostra 37, foi excluída do grupo de calibração, pois estava fora do limite de resíduos de *Student*, e apresentou um valor de concentração de sacarose de $150,96 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$, o qual está entre o intervalo máximo e mínimo. A partir de então o grupo de calibração dos espectros em NIR, que passou a ser constituído por 41 amostras.

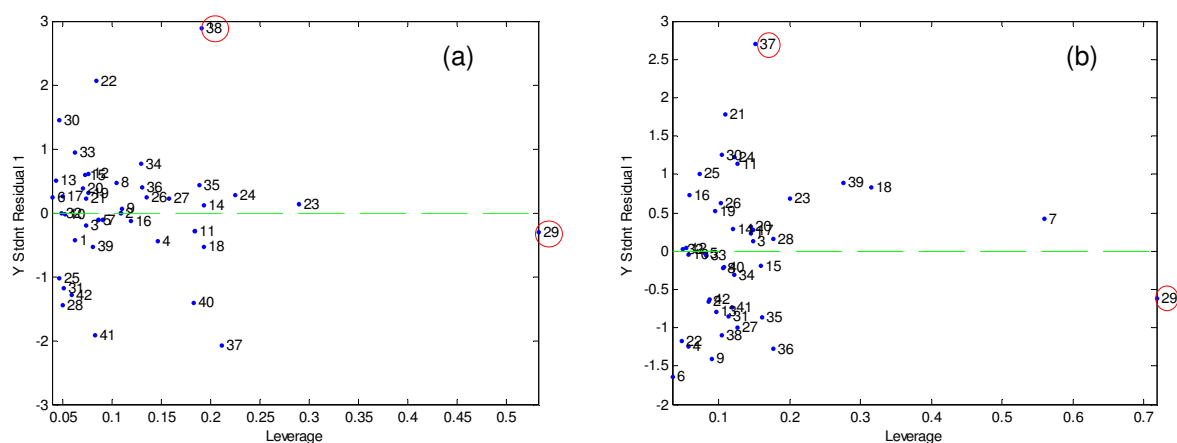


FIGURA 5.14 – RESÍDUOS DE *Student vs leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA REGIÃO MID (a) E NIR (b)

Um resumo do desempenho dos modelos de calibração em MID e em NIR para a sacarose também está apresentado na Tabela 5.6. Quando o modelo em MID, desenvolvido com o pré-processamento MSC e utilizando toda a faixa espectral foi utilizado para prever a concentração de sacarose do grupo de validação externa, um ótimo coeficiente de regressão (0,921) e valores baixos de erro médio relativo (4,34%) e RMSEP (15,02 mg.g⁻¹ MS) foram encontrados (TABELA 5.7). Os resultados apresentados para previsão de sacarose, em polpa liofilizada de maracujá na região do infravermelho médio, foram inferiores aos resultados encontrados por Bureau *et al.*, (2012) para maçã liofilizada ($R^2_v = 0,99$ e ER = 1,9%). Essa melhor eficiência dos modelos pode ser atribuída a menor faixa espectral (1010 a 1700 cm⁻¹) utilizada pelos autores acarretando menores interferências no desempenho de previsão.

O modelo em NIR, com o pré-processamento alisamento e também com toda a faixa espectral, apresentou baixa capacidade de previsão, com um R^2_v de 0,691, ER de 7,0% e RMSEP de 22,53 mg.g⁻¹ MS (TABELA 5.7). Queji *et al.*, (2010) obtiveram melhores resultados R^2_v de 0,991, ER de 12,9% aplicando os pré-processamentos normalização e autoescalamento no intervalo espectral de 4000 a 6000 cm⁻¹.

As menores dispersões dos dados e conseqüentemente melhor ajuste do modelo foi observado em MID em comparação com o modelo em NIR podem ser

notadas na Figura 5.15.

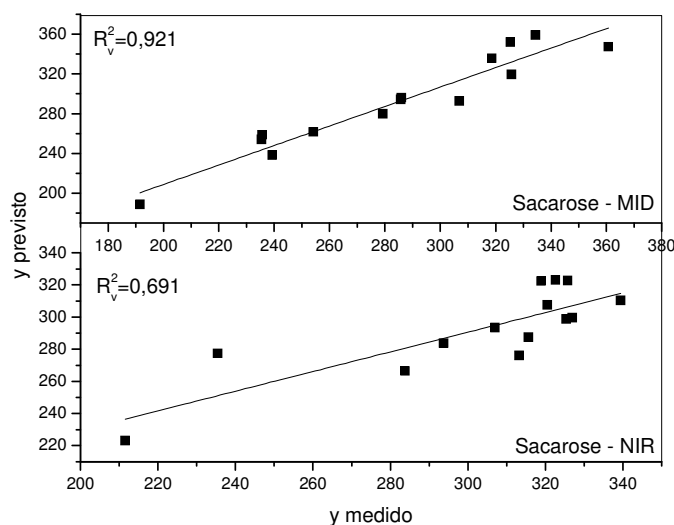


FIGURA 5.15 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 14 AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE

5.3.4. Quantificação de ácidos orgânicos

No que diz respeito aos modelos desenvolvidos para prever os ácidos orgânicos, a espectroscopia no infravermelho médio apresentou melhor desempenho, em comparação com espectroscopia no infravermelho próximo, particularmente para determinar a concentração de ácido cítrico e podem ser observados na Tabela 5.8.

TABELA 5.8 – DESEMPENHO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA OS ÁCIDOS ORGÂNICOS (mg.g⁻¹ MS) EM POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA REGIÃO EM MID E EM NIR

Parâmetro*	Região	Pré-processamento	n	VL	RMSEC*	RMSECV*	R ² _c	R ² _{cv}
Ácido Cítrico	MID (cm ⁻¹)	MSC	42	6	11,695	22,312	0,983	0,940
	NIR (nm)	MSC +AL	42	5	20,919	32,421	0,943	0,918
Acido Málico	MID (cm ⁻¹)	MSC	42	6	7,7	9,192	0,90	0,857
	NIR (nm)	MSC	42	3	15,4	16,428	0,59	0,571

*mg.g⁻¹ MS

As técnicas de espectroscopia em MID e em NIR apresentaram o menor erro de validação cruzada com 6 e 7 Variáveis Latentes respectivamente (FIGURA 5.16).

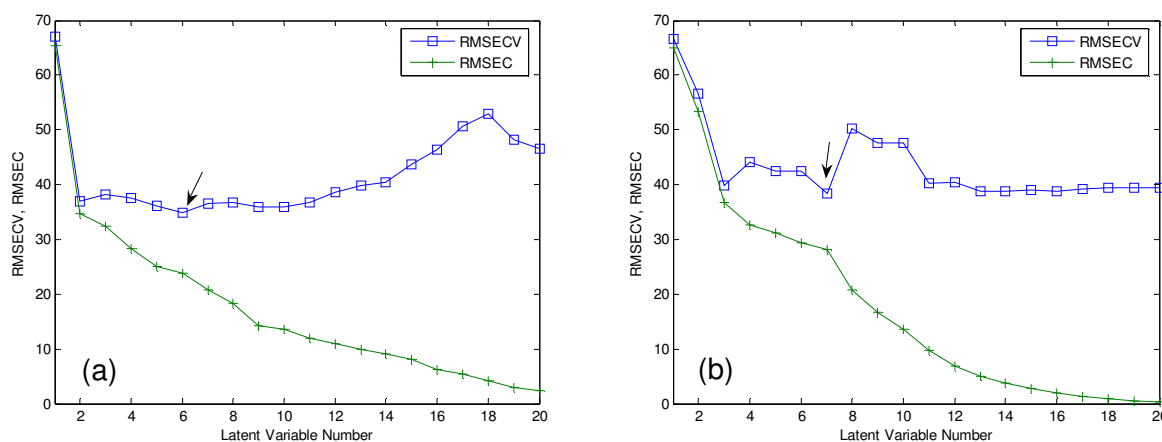


FIGURA 5.16 – ERRO DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO CRUZADA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO NAS REGIÕES EM MID (a) E EM NIR (b)

A análise de presença de amostras anômalas foi verificada através da Figura 4.17. Em ambos os casos, as amostras que apareceram fora do limite de resíduos de *Student* (com 95% de confiança) foram as amostras 28 para o modelo em MID e 29 para o modelo em NIR, e nos dois casos eram as amostras com menor concentração de ácido cítrico ($113,92 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). De maneira semelhante, a amostra 29 no modelo em MID (FIGURA 5.17a) e amostra 30 no modelo em NIR (FIGURA 5.17b) que estavam fora do limite de *leverage* (0,42 e 0,5 respectivamente), foram as amostras com maior concentração do ácido orgânico no grupo de calibração. Sendo assim, em ambos os casos, as duas amostras não foram excluídas do grupo de calibração em MID e em NIR.

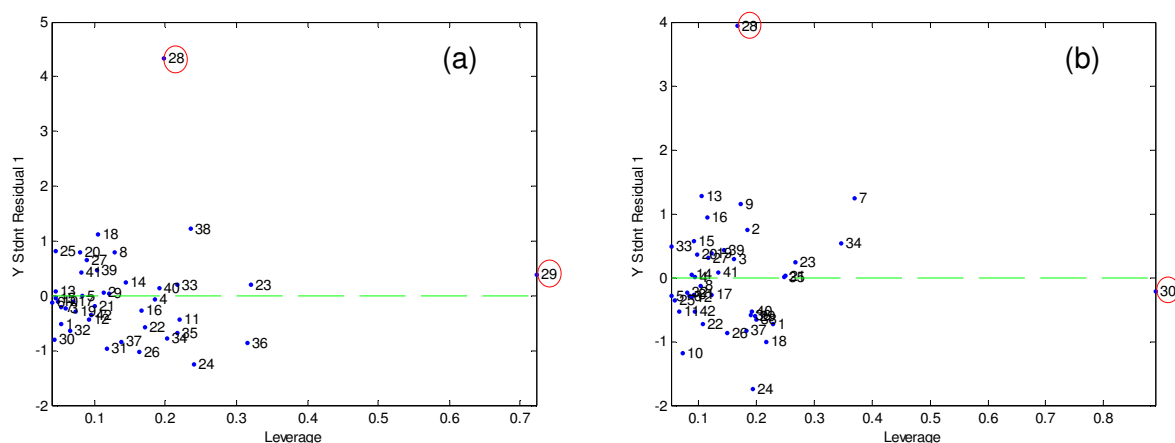


FIGURA 5.17 – RESÍDUOS DE *Student vs leverage* PARA O MODELO PLS DE DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO NA REGIÃO EM MID (a) E EM NIR (b)

Quando os modelos de calibração em MID e em NIR foram aplicados para prever concentração de ácido cítrico das amostras do grupo de validação externa (14 amostras) uma boa correlação foi verificada (TABELA 5.9). O desempenho do modelo em MID foi ligeiramente melhor com um valor de coeficiente de regressão de 0,918 e um baixo erro médio relativo de 4,27%. O modelo em NIR apresentou um R^2_v de 0,879 e ER igual a 5,09%.

TABELA 5.9 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA

Parâmetro*	Região	Intervalo espectral	n	RMSEP*	ER (%)	R^2_v
Ácido Cítrico	MID (cm^{-1})	800 – 4000	14	10,49	4,27	0,918
	NIR (nm)	1670 - 2500	14	15,32	5,09	0,879
Acido Málico	MID (cm^{-1})	800 – 4000	14	1,46	26,46	0,553
	NIR (nm)	800 - 2500	14	1,12	25,38	0,506

* mg.g^{-1} MS

A Figura 5.18 apresenta a dispersão dos dados calculados versus os dados medidos pelos modelos. O melhor desempenho do modelo em MID comparado ao modelo em NIR pode ser verificado pelo melhor ajuste do modelo, sendo que o modelo em NIR apresentou dificuldades para prever o valor de concentração de ácido cítrico em algumas amostras.

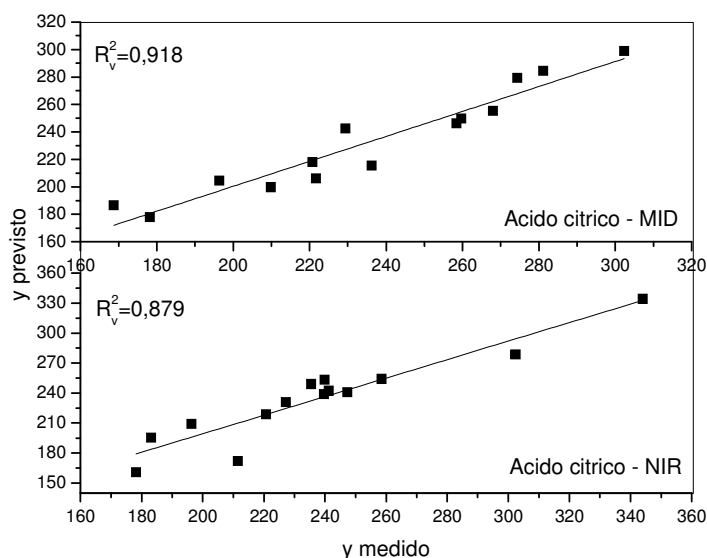


FIGURA 5.18 - VALORES PREVISTOS PELO MODELO (y previsto) VS VALORES REAIS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE REFERENCIA (y medido) DAS 14 AMOSTRAS DE POLPA LIOFILIZADA DE MARACUJÁ NA ETAPA DE VALIDAÇÃO EXTERNA PARA A DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

Os modelos desenvolvidos para determinar a concentração de ácido málico em polpa liofilizada de maracujá, para ambas as técnicas em MID e em NIR foram insatisfatórios (TABELA 5.8). Os coeficientes e regressão na etapa de previsão foram baixos, com valores iguais a 0,553 para o modelo em MID e 0,506 para o modelo em NIR, e altos valores de erro médio relativo de 26,46% e 25,38%, respectivamente (TABELA 5.9). Este fato foi atribuído à baixa concentração de ácido málico no fruto de maracujá. Este resultado é confirmado pela investigação de Rudnitskaya *et al.*, (2006), que verificaram que o erro médio de previsão aumenta com uma diminuição da concentração de ácidos orgânicos em maçãs. Por conseguinte, os mesmo autores relatam a utilização da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a previsão dos ácidos orgânicos mais abundantes (ácidos galacturônico e málico) em maçãs, enquanto que os ácidos cítrico, tartárico e succínico não foram previstos de forma satisfatória.

Os resultados apresentados nesse estudo pelos modelos em MID para determinação da concentração de ácido cítrico e málico são semelhantes aos reportados para a maçã liofilizada por Bureau *et al.*, 2012. Os autores obtiveram uma boa correlação para o ácido málico (intervalo de concentração no fruto de 2,5-

7,7 g.kg⁻¹) com valor de coeficiente de regressão da validação externa de 0,97 e 4,7% de erro de previsão. Por outro lado, quando aplicaram o modelo para prever o ácido cítrico (intervalo de concentração no fruto de 0,0 - 0,32 g.kg⁻¹) obtiveram valores absolutamente inadequados (R^2_v de 0,12 e RMSEP igual a 100%). Tais resultados confirmam a dificuldade de previsão de componentes com baixa concentração.

5.3.5. Quantificação de β -caroteno

Modelos de regressão PLS foram desenvolvidos para a concentração de β -caroteno, que é o carotenóide em maior quantidade nas amostras de polpa liofilizada de maracujá. Para a região no infravermelho médio, o modelo desenvolvido, utilizou o pré-processamento MSC, a região espectral de 4000 a 1000 cm⁻¹ e três Variáveis Latentes. Os coeficiente de regressão e os erros da etapa de calibração e validação cruzada foram $R^2_c = 0,843$ com RMSEC de 0,03 mg.g⁻¹ MS e $R^2_{cv} = 0,810$ com RMSECV de 0,043 mg.g⁻¹ MS, respectivamente. Ao aplicar o modelo para prever a concentração de β -caroteno das amostras da validação externa, um baixo valor para o coeficiente de regressão ($R^2_v = 0,556$) e um alto valor de erro médio relativo (ER = 36,08%) foram verificados. Tais resultados demonstram a baixa capacidade de previsão do modelo desenvolvido para determinação de β -caroteno em polpa liofilizada de maracujá.

O modelo em NIR apresentou resultados ligeiramente melhores do que o modelo em MID. Os valores encontrados foram, 0,900 e 0,03 mg.g⁻¹ MS para o coeficiente de regressão e erro do grupo de calibração, e 0,818 e 0,045 mg.g⁻¹ MS para o coeficiente de regressão e erro de etapa de validação cruzada. Quando o modelo foi aplicado para prever a concentração do carotenóide nas amostras da validação externa, foi encontrado um valor de R^2_v de 0,772 e um alto valor de erro médio relativo, 25,51%. Mesmo com uma melhora significativa no coeficiente de regressão, o erro de previsão encontrado é extremamente alto, quando comparado ao desvio padrão da análise que foi de 0,06.

Os baixos coeficientes de regressão e altos valores de erro de previsão para β -caroteno obtidos neste estudo foram semelhantes aos resultados encontrados para damasco (RUIZ *et al.*, 2008) e milho (BRENNAN e BERARDO, 2004). Estes

investigadores relataram que técnicas de espectroscopia em MID e em NIR são inadequadas para a determinação do teor em carotenóides, provavelmente devido às suas baixas concentrações e também por apresentarem bandas de absorção relativamente menos intensas na sua região de comprimento de onda, em comparação com compostos principais, tais como açúcares e ácidos.

5.3.6. Coeficientes de regressão dos espectros em MID e em NIR para os diferentes parâmetros

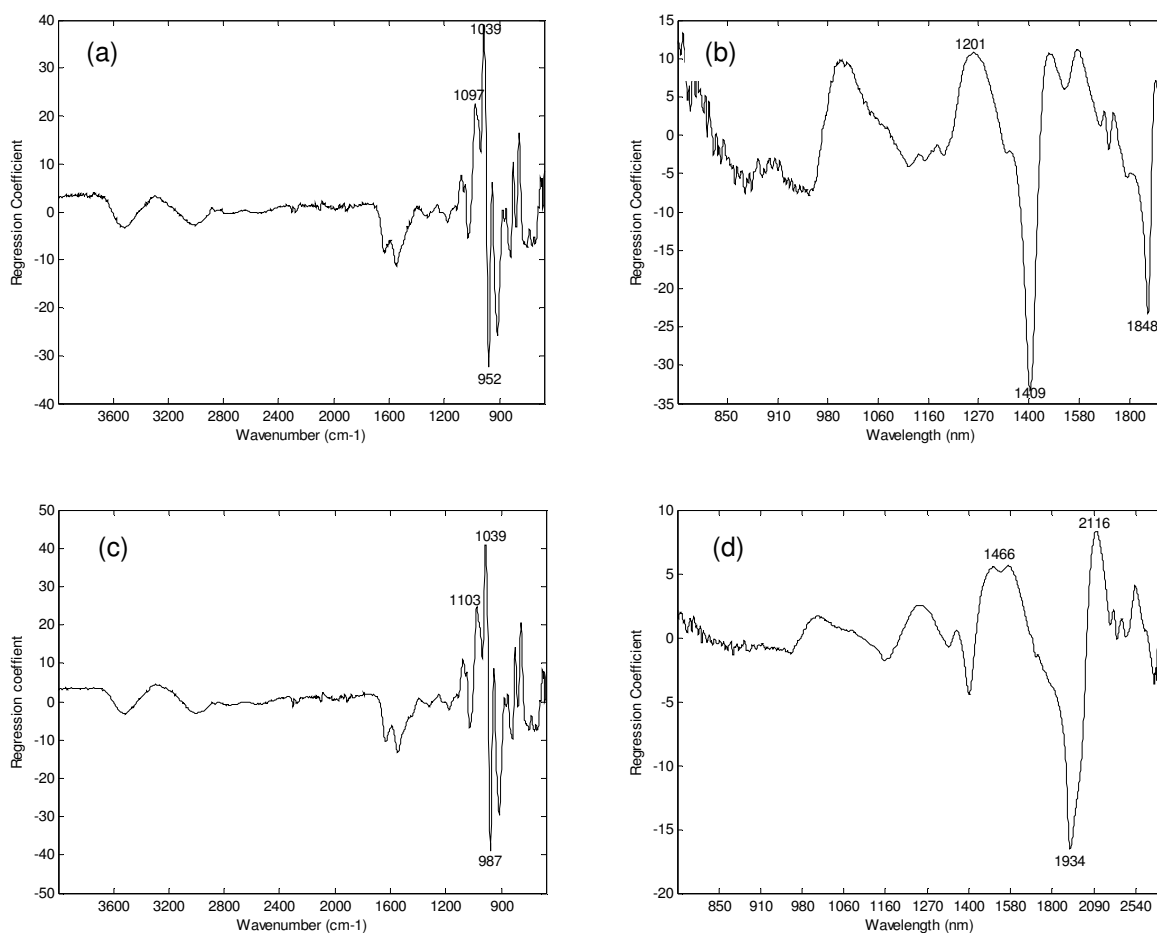
Com o intuito de averiguar as principais bandas utilizadas para o desenvolvimento dos modelos PLS para a determinação de glucose, frutose, sacarose e ácido cítrico, foram avaliados os gráficos de coeficientes de regressão (FIGURA 5.19) nas regiões em MID e em NIR.

De acordo com a Figura 5.3a, a qual ilustra o perfil do espectro médio em MID, observa-se que a região espectral entre $1800-920\text{ cm}^{-1}$, apresentou maior intensidade e está relacionada com os compostos orgânicos. O perfil dos coeficientes de regressão para a glucose utilizando os espectros em MID (FIGURA 5.19a) mostra que as bandas de intensidade mais elevada foram observadas em 1097 , 1034 e 952 cm^{-1} . Um comportamento similar foi obtido para frutose, onde as bandas com maior intensidade foram encontradas entre 1103 , 1039 e 987 cm^{-1} (FIGURA 5.19c). Estes resultados foram análogos aos reportados por Kacurakova *et al.*, (2000) e Scibisz *et al.*, (2011), que relataram que os coeficientes de regressão para o modelo de glucose resultaram em uma banda forte em 1035 cm^{-1} . Também, Sivakesava e Irudayaraj (2000) observaram bandas de maior intensidade em 1034 e 1062 cm^{-1} para a glucose e frutose, respectivamente.

A média dos espectros em NIR (FIGURA 5.3b) demonstrou bandas com elevadas absorções localizadas de 1100 a 2300 nm , que são bandas características de absorção de açúcares. Na Figura 5.19 b e d, observam-se os coeficientes de regressão para os modelos PLS desenvolvidos para determinar os conteúdos de glucose e frutose na região do infravermelho próximo. As bandas mais significativas para a construção do modelo corresponderam aos comprimentos de onda de 1201 e 1409 nm para a glucose, e 1466 , 1934 e 2116 nm para a frutose. Cabe ressaltar que o modelo desenvolvido para a glucose utilizou a faixa espectral entre 800 a 2000 nm e para a frutose o modelo desenvolvido utilizou toda a faixa espectral. Resultados

análogos para esses açúcares foram descritos por Xie *et al.*, (2009) e Rambla *et al.*, (1997), confirmando os resultados deste trabalho.

Os coeficientes de regressão para o modelo PLS desenvolvido para a sacarose a partir de MID (FIGURA 5.19e) e NIR (FIGURA 5.19f) apresentaram bandas com maior intensidade semelhantes as observadas para a glucose e frutose. Isto pode ser explicado, devido à sacarose ser constituída de uma molécula de glucose e uma de frutose. A região mais importante para na região em MID foi observada em 987 e 1039 cm^{-1} e para a região em NIR entre 2118 e 2288 nm. De nosso conhecimento, os resultados para os coeficientes de regressão de sacarose não foram até então, relatados na literatura.



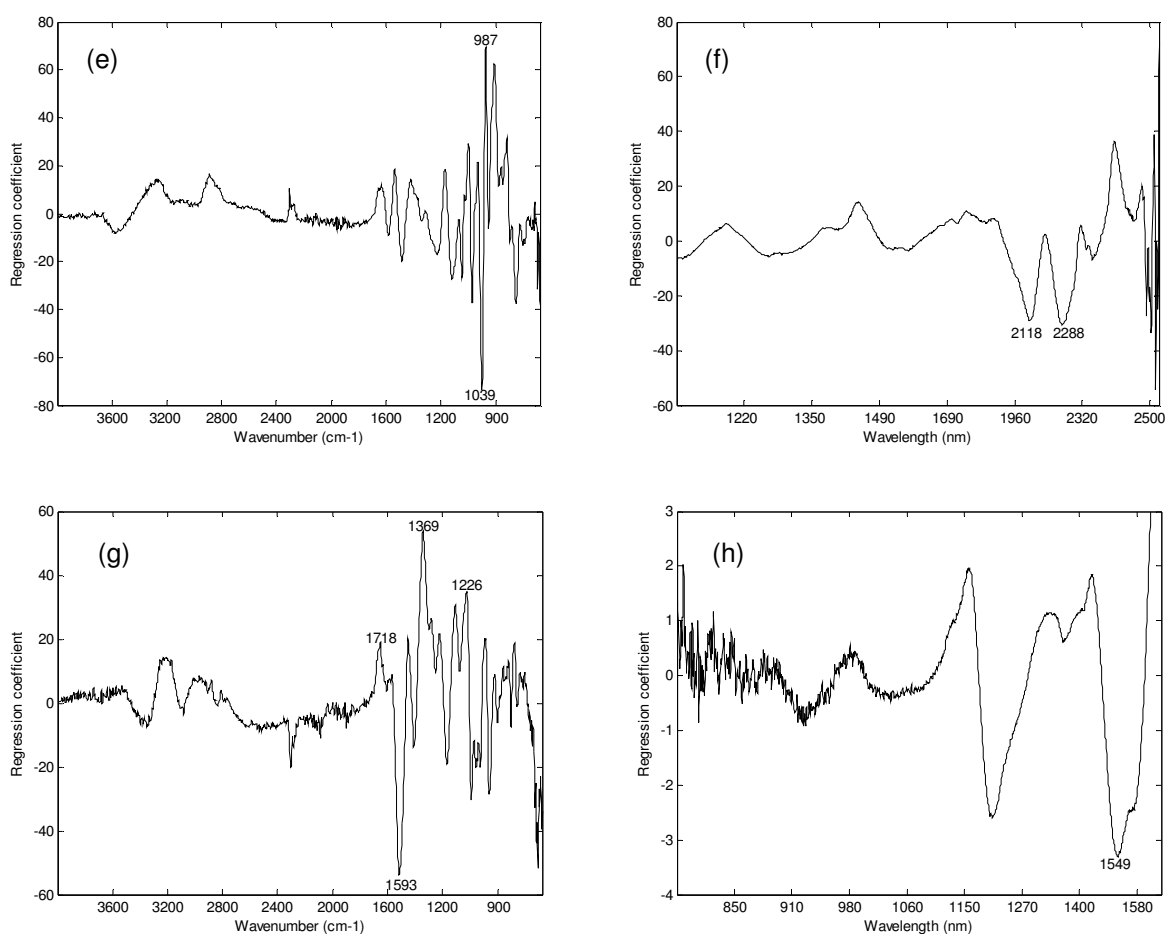


FIGURA 5.19 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO PARA OS MODELOS PLS PARA A GLUCOSE EM MID (a) E NIR (b), FRUTOSE EM MID (c) E NIR (d), SACAROSE EM MID (e) E NIR (f) E ÁCIDO CÍTRICO EM MID (g) E NIR (h)

Os coeficientes de regressão do modelo PLS desenvolvido para o teor de ácido cítrico (FIGURA 5.19g) com espectros em MID mostraram picos fortes em 1718, 1593, 1369 e 1226 cm⁻¹. Os coeficientes de regressão obtidos por espectros em NIR (FIGURA 5.19h) revelaram picos intensos entre 1100 e 1600 nm. De acordo com a literatura (XIE *et al.*, 2011), esta região espectral é a mais importante para os ácidos orgânicos em NIR, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

Todos os intervalos de maior importância observados nas figuras dos coeficientes de regressão (FIGURA 5.19.) estão em concordância com as zonas de maior intensidade observadas nas figuras dos espectros originais (FIGURAS 5.3). Esta observação confirma que a calibração multivariada utiliza as informações mais relevantes para a construção dos modelos PLS de predição para os diferentes parâmetros.

5.4. Conclusão

A aplicabilidade das técnicas espectroscópicas nas regiões em MID e em NIR combinadas com regressão PLS foi avaliada para a determinação de açúcares simples, ácidos orgânicos e conteúdo de β -caroteno em polpa liofilizada de maracujá. Modelos de calibração multivariados foram desenvolvidos neste trabalho, abrangendo diferentes estágios de maturação de maracujá e, portanto, um amplo intervalo de composições química do fruto.

Os métodos espectroscópicos permitiram a determinação dos principais parâmetros de qualidade, tais como a concentração de glucose, frutose, sacarose e ácido cítrico, superando as limitações dos métodos de referência em relação ao tempo, o consumo de reagente e os erros de análise. A espectroscopia em MID foi superior na determinação do conteúdo de glucose, frutose, sacarose e ácido cítrico. Em relação ao ácido málico e β -caroteno, as técnicas na região do infravermelho em MID e em NIR não foram satisfatórias para previsão destes constituintes, devido à baixa concentração destes compostos encontrada no maracujá.

A exclusão da água pela etapa de liofilização permitiu uma melhor verificação dos parâmetros de qualidade, além da identificação das bandas de maior intensidade e de grupos específicos. Portanto, a espectroscopia na região em MID e em NIR foi eficaz para determinação de parâmetros de qualidade da polpa liofilizada de maracujá.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectroscopia na região do infravermelho médio e próximo com transformada de Fourier (FT-IR) foi investigada para determinar parâmetros de qualidade dos frutos de maracujá. As determinações das metodologias de referência foram essenciais para a constituição dos grupos de calibração e de validação externa e posteriormente para desenvolvimento dos modelos multivariados. Vários tipos de pré-processamentos e seleção de número e comprimento onda foram verificados.

As técnicas de espectroscopia no infravermelho médio e próximo empregadas para determinar os principais parâmetros de qualidade de frutos de maracujá, de uma maneira geral, apresentaram bons resultados. Cabe salientar que os métodos espectroscópicos também apresentaram algumas vantagens sobre os métodos analíticos de referência, considerando o tempo de análise, a não geração de resíduos, além do baixo custo e rapidez, justificando a sua utilização para análises de determinação dos parâmetros de qualidade em frutos de maracujá. Entretanto, algumas características particulares foram destacadas:

a) Os resultados obtidos com os frutos intactos revelaram que a estrutura física do fruto interfere na penetração da radiação em NIR e conseqüentemente, pobres correlações foram verificadas entre os espectros em NIR e as análises de referência (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A técnica NIR associada ao método PLS de regressão permitiu a quantificação da concentração de carotenóides totais presentes na casca do fruto. Para o parâmetro SSC uma baixa correlação foi encontrada, mas com base nos resultados obtidos e devido a importância deste parâmetro, a técnica NIR pôde ser aplicada para triagem de frutos intactos com um erro médio de previsão de 9,4%. Dessa forma, os estudos realizados com o fruto intacto demonstraram que a casca do maracujá, por ser espessa, foi um obstáculo a penetração da radiação dificultando à obtenção de um modelo adequado a predição dos parâmetros de qualidade.

b) Para excluir a influência da estrutura do fruto na determinação dos parâmetros internos, foram desenvolvidos modelos utilizando a polpa *in natura* dos frutos, através das técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo e médio. Os resultados demonstraram uma forte absorção de banda de água nas regiões em MID e em NIR, a qual se sobrepôs as demais bandas características de compostos

orgânicos. Tal absorção impediu a identificação de grupos específicos através da análise de PCA. Os modelos desenvolvidos na região em MID revelaram melhores resultados que os encontrados para a região em NIR para os parâmetros de qualidade sacarose, glucose, frutose e SSC. A técnica mostrou-se eficiente para determinação da concentração destes parâmetros. Para a acidez titulável apenas a região no infravermelho médio foi eficiente para prever a concentração deste parâmetro em polpa *in natura* de maracujá. Assim, foi possível verificar a partir destes resultados, a grande influência da água nos espectros obtidos, sobrepondo a absorção dos outros compostos, presentes em menores concentrações.

c) A polpa liofilizada de maracujá foi analisada nas regiões em MID e em NIR. Com os resultados obtidos pela análise de PCA, foi possível identificar bandas características e grupos específicos de amostras. Além disso, excelentes modelos multivariados foram desenvolvidos para predição da concentração dos diferentes parâmetros de qualidade, sacarose, glucose, frutose e ácido cítrico. Uma baixa correlação foi verificada para o ácido málico e o β -caroteno, devido à baixa concentração de ambos na polpa do fruto. A eliminação da água proporcionou bons resultados em ambas as técnicas, porém melhores resultados foram observados na região em MID. A exclusão da água, pelo processo de liofilização, proporcionou uma melhora significativa nos modelos desenvolvidos a partir das técnicas em MID e em NIR, corroborando a forte influência que mesma proporciona aos espectros (OLIVEIRA *et al.*, *in press*).

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a espectroscopia em MID e em NIR apresenta limitações, principalmente para determinar parâmetros de qualidade em frutos com casca grossa, estrutura interna heterogênea e polpa com alta concentração de água. Apesar destas limitações, os resultados encontrados através dos modelos multivariados foram apropriados para determinação dos parâmetros de qualidade, principalmente os relacionados a polpa *in natura* dos frutos de maracujá, apontando que a técnica pode ser implementada nas indústrias para uma melhor utilização da polpa como matéria-prima.

REFERÊNCIAS

- ADAMS-PHILLIPS, L.; BARRY, C.; GIOVANNONI, J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 7, p. 331–338, 2004.
- ALCALA, M.; LEÓN, J.; ROPERO, J.; BLANCO, M.; ROMAÑACH, R.J. Analysis of Low Content Drug Tablets by Transmission Near Infrared Spectroscopy: Selection of Calibration Ranges According to Multivariate Detection and Quantitation Limits of PLS Models. **Journal of pharmaceutical sciences**, p. 1-10, 2008.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. **Plant physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15.ed. Arlington, 1992.
- AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 140p.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A practical guide**. New York: Wiley, 1998.
- BELLON-MAUREL, V.; MCBRATNEY, A. Near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopic techniques for assessing the amount of carbon stock in soils e Critical review and research perspectives. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p.1398–1410, 2011.
- BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa, FAPESP, 2003. p. 247-248.
- BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br>>. Acesso em: 13 de Março de 2013.
- BOBELYN, E.; SERBAN, A. S.; NICU, M.; LAMMERTYN, J.; NICOLAIA, B. M.; SAEYS, W. Postharvest quality of apple predicted by NIR-spectroscopy: Study of the effect of biological variability on spectra and model performance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, p. 133–143, 2010.
- BONGHI C.; RAMINA A.; RUPERTI B.; VIDRIH R.; TONUTTI P. Peach fruit ripening and quality in relation to picking time, and hypoxic and high CO₂. **Postharvest Biology and Technology**, v. 16, p. 213-222, 1999.
- BRAZ, V. B.; NUNES, E. S.; VIEIRA, G.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; BERTINI, L. A.; COUTO, F. A. D. Indução do amadurecimento de mangas cv. Tommy Atkins e cv. Ubá pela aplicação de ehtephon pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 67, n. 1, p. 225-232, 2008.

BRENNA, O. V.; BERARDO, N. Application of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to the evaluation of carotenoids content in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5577–5582, 2004.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **The Analyst**, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

BRODY, A. L. **Envasado de alimentos em atmosferas controladas, modificadas y vacío**. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 220.

BUREAU, A.; RUIZ, D.; REICH, M.; GOUBLE, B.; BERTRAND, D.; AUDERGON, J. M.; RENARD, C. M. G. C. Rapid and non-destructive analysis of apricot fruit quality using FT-near-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1323–1328, 2009.

BUREAU, S.; SCIBISZ, I.; BOURVELLEC, C.; RENARD, C. M. G. C. Effect of Sample Preparation on the Measurement of Sugars, Organic Acids, and Polyphenols in Apple Fruit by Mid-infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3551–3563, 2012.

BURNS, A. D.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis**. 3. ed. New York:, CRC Press, 2007.

CABRAL, L. M. C.; FREIRE JÚNIOR, M.; DA MATTA, V. M. Suco de maracujá. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. p. 293-307.

CAMPS, C.; CHRISTEN, D. Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1125–1131, 2009.

CAMPS, C.; ROBIC, R.; BRUNEAU, M.; LAURENS, F. Rapid determination of soluble solids content and acidity of Black currant (*Ribes nigrum L.*) juice by mid-infrared spectroscopy performed in series. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1164-1167, 2010.

CANTERI, M. H. G. **Caracterização Comparativa entre Pectinas Extraídas do Pericarpo de Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 162 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos e Docteur en Science des Procédés, Sciences des Aliments), Setor de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná e à Ecole Doctoral Sciences des Procédés, Science des Aliments de l'Université d'Avignon et Pays de Vaucluse, Curitiba, 2010.

CARLINI, P.; MASSANTINI, V.; MENCARELLI, F. Vis-NIR Measurement of Soluble Solids in Cherry and Apricot by PLS Regression and Wavelength Selection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5236-5242, 2000.

CARVALHO, A. M. Melhoramento cultural do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, Sociedade Brasileira de Fruticultura, Documento II, 1-9, 1974.

CARVALHO, C. R. L.; MANTOVANI, D. M. B.; CARVALHO, P. R. N.; MORAES, R. M. M. **Análises químicas de alimentos**. Campinas: ITAL; 1990.

CAYUELA, J. A.; WEILAND, C. Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 58, p. 113–120, 2010.

CEREDA, E.; LIMA, U. A.; CUNHA, R. J. P.; CEREDA, M. P. Conservação e armazenamento do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa Deg*). III- variações no teor de ácido ascórbico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 4, p. 517-523, 1984.

CHAGAS, I. P. **Desenvolvimento de um fotômetro portátil NIR para determinação do teor de água no álcool combustível e do teor de etanol na gasolina**. 151 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CHEN, J. Y.; ZHANG, H.; MATSUNAGA, R. Rapid determination of the main organic acid composition of raw Japanese apricot fruit juices using near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9652–9657, 2006.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavra: UFLA, 2005. p. 785.

CIABOTTI, E. D.; BRAGA, M; E. D.; MATA, M. E. R. M. C. Alterações das características físico-químicas da polpa de maracujá amarelo submetido a diferentes técnicas de congelamento inicial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.2, n.1, p.51-60, 2000.

CLARK, C. J.; MCGLONE, V. A.; REQUEJO, C.; WHITE, A.; WOOLF, A. B. Dry matter determination in 'Hass' avocado by NIR Spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29 p. 300–307, 2003.

CRISOSTO C. H.; CRISOSTO G. M.; ECHEVERRIA G.; PUY J. Segregation of peach and nectarine (*Prunus persica (L.) Batsch*) cultivars according to their organoleptic characteristics. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p. 10-18, 2006.

COATES, J. A review of current new technology: Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy, **Spectroscopy**, v. 14, n. 10, p. 21-34, 1999.

CÔCCO, L. C. **Previsão de propriedades físico-químicas e composição química da gasolina a partir de espectros no infravermelho**. 873 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Térmicos e Químicos). Programa de Pós- Graduação em Engenharia - PIPE, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

COELHO, A. A.; CENCI, S. A.; RESENDE, E. D. Quality of yellow passion fruit juice in different harvest points and after ripening. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 722-729, 2010.

CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T B.; WINTER, C. M. G.; KASKANTZIS NETO, G.; FREITAS, R. J. S. de. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis Flavicarpa Degener*) obtido por secagem. **Boletim CEPPA**, v. 23, n.2, p. 220-230, 2005.

DAVEY, M. W.; SAEYS, W.; HOF, E.; RAMON, H.; SWENNEN, R. L.; KEULEMANS, J. Application of Visible and Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (Vis/NIRS) to Determine Carotenoid Contents in Banana (*Musa spp.*) Fruit Pulp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1742-1751, 2009.

DUARTE, I. F.; BARROS, A.; DELGADILLO, I.; ALMEIDA, C.; GIL, A. M. Application of FTIR spectroscopy for quantification of sugars in mango juice as a function of ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3104–3111, 2002.

DULL, G. G.; BIRTH, G. S.; SMITTLE, D. A.; LEFFLER, R. G. Near infrared analysis of soluble solids in intact cantaloupe. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 393–395, 1989.

DURIGAN, J. F. Colheita e conservação pós-colheita. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5, 1998, Jaboticabal. FUNEP, 1998.p. 388.

EGIDIO, V. D.; SINELLI, N.; LIMBO, S.; TORRI, L.; FRANZETTI, L.; CASIRAGHI, E. Evaluation of shelf-life of fresh-cut pineapple using FT-NIR and FT-IR spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**, v. 54, p. 87–92, 2009.

EMBRAPA. Fruticulturas. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 09 de maio de 2013.

FERRARINI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FERRÃO, M. F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecnológica**, v. 5, p. 65-85, 2001.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 1-15, 1999.

FLORES, K.; SANCHEZ, M. T.; PEREZ-MARIN, D. C.; LOPEZ, M. D.; GUERRERO, J. E.; GARRIDO-VARO, A. Prediction of total soluble solid content in intact and cut melons and watermelons using near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 16, p. 91–98, 2008.

Food and Agriculture Organization (FAO). Statistical Yearbook 2005-2006. Table B3. **Production of fruits and vegetables and share in world**. Disponível em: <>. Acesso em: 12 de março de 2013.

FU, X.; LI, J.; ZHOU, Y.; YING, Y.; XIE, L.; NIU, X.; YAN, Z.; YU, H. Determination of soluble solid content and acidity of loquats based on FT-NIR spectroscopy. **Journal of Zhejiang University Science**. V. 10, p.120–125, 2009.

GAMARRA ROJAS, G.; MEDINA, V. M. Mudanças Bioquímicas do Suco do Maracujá Amarelo em Função da Idade do Fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 18, n. 1, p. 75-83, 1996.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression – A tutorial. **Analytical Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y. J.; CHEN, P. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 324–330, 2008.

GIERLINGER, N.; SCHWANNINGER, M.; WIMMER, R. Characteristics and classification of Fourier-transform near infrared spectra of the heartwood of different larch species (*Larix sp.*). **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 12, p. 113–119, 2004.

GOLIC, M.; WALSH, K. B. Robustness of calibration models based on near infrared spectroscopy for the in-line grading of stone fruit for total soluble solids content. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 286–291, 2006.

GOMEZ, A. H.; HE, Y.; PEREIRA, A. G. Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR spectroscopy techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 2, p. 313–319, 2006.

GORRY, P. A. General least-squares smoothing and differentiation by the convolution (Savitsky-Golay) method. **Analytical Chemistry**, v. 62, n.6, p. 570–573, 1990.

GUTHRIE, J.; LIEBENBERG, C. J.; WALSH, K. NIR model development and robustness in prediction of melon fruit total soluble solids. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, p. 1–8, 2006.

HAALAND, D. M. **Multivariate calibration methods applied to quantitative FT-IR analysis practical Fourier transform infrared spectroscopy**. **Industrial and Laboratory Chemical Analysis**. San Diego: Academic Press, 1990. p.395-469.

HAARD, N. F.; CHISM, G. W. Characteristics of edible plant tissues. In: FENNEMA, O. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. p. 944 – 966.

HELLAND, I. S. On the structure of partial least square regression. **Communications in statistics – simulation and computation**, v.17, p.581-607, 1998.

HINENO, M. Infrared spectra and normal vibrations of D-glucopyranose. **Carbohydrate Research**, v. 56, p. 219–227, 1977.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e de Estatística. Indicadores: produção agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 fevereiro de 2013.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutos. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/estatisticas>>. Acesso em 11 de março de 2013.

INFANTE R., Harvest maturity indicators in the stone fruit industry. **Stewart Postharvest Review**, p. 1-6, 2012.

IÑÓN, F. A.; LLARIO, R.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Development of a PLS based method for determination of the quality of beers by use of NIR: Spectral ranges and sample-introduction considerations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 7, p. 1549–1561, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise dos alimentos. 3.ed. São Paulo, 1985.

IRUDAYARAJ, J.; TEWARI, J. Simultaneous monitoring of organic acids and sugars in fresh and processed apple juice by Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 1599–1604, 2003.

JACKMAN, R. L.; STANLEY, D. W. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. **Food Science and Technology**, v. 6, p. 187–194, 1995.

JIMÉNEZ, A. M.; SIERRA, C. A.; RODRÍGUEZ-PULIDO, F. J.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J.; OSORIO, C. Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1912–1918, 2011.

JORNAL DA UNICAMP. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/ju347pg07.pdf. Acesso em 28 de agosto de 2013.

KACURAKOVA, M.; CAPEK, P.; SASINKOVA, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVA, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195–203, 2000.

KHOSHESAB, Z. M. **Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology**. Edited by Prof. Theophanides Theophile. 2012, p. 236

KLIEMANN, E.; SIMAS, K. N.; AMANTE, E. R.; PRUDÊNCIO, E. S.; TEOÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; AMBONI, R. D. M. C. Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 476–483, 2009.

KOWALSKI, B. R.; SEASHOLTZ, M. B.; Recent developments in multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, v. 5, p. 129-145, 1991.

LAMMERTYN, J.; PEIRS, A.; DE BAERDEMAEKER, J.; NICOLAI, B. Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment. **Postharvest Biology and Technology**, v. 18, p. 121–132, 2000.

LEÓN, L.; KELLY, J. D.; DOWNEY, G. Detection of apple juice adulteration using near-infrared transmittance spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 59, n. 5, p. 593–599, 2005.

LEORO, M. G. V. **Desenvolvimento de cereal matinal extrusado orgânico à base de farinha de milho e farelo de maracujá**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

LONG, R. L.; WALSH, K. B. Limitations to the measurement of intact melon total soluble solids using near infrared spectroscopy. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, p. 403–410, 2006.

LOUW, E. D. E THERON, K. I. Robust prediction models for quality parameters in Japanese plums (*Prunus salicina* L.) using NIR spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**, v. 58, p. 176–184, 2010.

LIU, Y.; YING, Y. Use of FT-NIR spectrometry in non-invasive measurements of internal quality of 'Fuji' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 37, n.1, p. 65–71, 2005

MACHADO, S. S.; CARDOSO, R. L.; MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S. Caracterização física e físico-química de frutos de maracujá amarelo proveniente da região de Jaguaquara (2003). Disponível em <http://www.magistra.ufba.br/publica/V17N2A2005/06_v17n2a2005.pdf>. Acesso em: 24 de Maio de 2013.

MADALOZZO, E. S. **Caracterização físico-química de ricotas via espectroscopia no infravermelho e métodos de calibração multivariada**. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

MARCHI, R.; MONTEIRO, M.; BENATO, E. A.; SILVA, C. A. R. Uso da cor da casca como indicador de qualidade do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) destinado à industrialização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p.381-387, 2000.

Martens, H.; Naes, T. **Multivariate calibration**. New York: Wiley, 1996.

MARTENS, H.; STARK, E. Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction—new preprocessing methods for near-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, v. 9, p.625-635, 1991.

MCGOVERIN, C. M., WEERANANTANAPHAN, J., DOWNEY, G., MANLEY, M. Review: the application of near infrared spectroscopy to the measurement of bioactive compounds in food commodities. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 18, p. 87-111, 2010.

MEDEIROS, S. A. F.; YAMANISHI, O. K.; PEIXOTO, J. R.; PIRES, M. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RIBEIRO, J. G. B. L. Caracterização físico-química de progênies de maracujá-roxo e maracujá-azedo cultivados no distrito federal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 492-499, 2009.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, p.083-091, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BRÜCKNER, C. H. Melhoria Genética. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

MESSERSCHMIDT, I. **Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada**. Tese (Doutorado em química) Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MORGANO, M. A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. 127 f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas 2005.

MORZELLE, M.C.; SOUZA, E. C.; ASSUMPÇÃO, C. F.; FLORES, J. C. J.; OLIVEIRA, K. A. M. Agregação de valor a frutos de ata através do desenvolvimento de néctar misto de maracujá (*passiflora edulis sims*) e ata (*annona squamosa l.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 389-393, 2009.

NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T.A **user-friendly guide to multivariate calibration and classification**. NIR Publications, Chichester: United Kingdom. 2002

NAGATO, L. A. F.; RODAS, M. A. B.; DELLA TORRE, J. C. M.; CANO, C. B.; YOTSUYANAGY, K. Parâmetros físicos e químicos e aceitabilidade sensorial de sucos de frutas integrais, maracujá e uva, de diferentes marcas brasileiras. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 127-136, 2003.

NARAIN, N.; BORA, B. S. Post harvest changes in some volatile flavour constituents of yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, n. 4, p. 529-530, 1992.

NICOLAI, B. M.; BEULLENS, K.; BOBELYN, E.; PEIRS, A.; SAEYS, W.; THERON, K. I.; LAMMERTYN, J. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, p. 99–118, 2007.

OLIVEIRA, G. A.; BUREAU, S.; RENARD, C. M.G. C.; PEREIRA-NETTO, A. B. E CASTILHOS, F. Comparison of NIRS approach for prediction of internal quality traits in three fruit species. **Food Chemistry**, v. 143, p. 223–230, 2014.

OLIVEIRA G. A.; CASTILHOS, F.; RENARD, C. M.G. C.; BUREAU, S. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. **Food Research International**, 10.1016/j.foodres.2013.10.051. IN PRESS.

OSBORNE, S. D.; JORDAN, R. B.; KÜNNEMEYER, R. Method of wavelength selection for partial least square, **The Analyst**, v. 122, p. 1531-1537, 1997.

OZAKI, Y.; McCLURE, W.F.; CHRISTY, A. A. **Near-infrared spectroscopy in food science and technology**. USA: Wiley-Interscience, 2007.

PAWAN, G. L. S.; BIRCH, G. G.; GREEN, L. F. Molecular structure and function of food carbohydrates. London: Applied Science Publishers. 1973. p. 65–80.

PEDRO, A. M. K.; FERREIRA, M. M. C. Nondestructive Determination of Solids and Carotenoids in Tomato Products by Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2505-2511, 2005

PEDRO, M. A. M. Influência de encapsulantes e do método de secagem nas propriedades físico-químicas e atributos de qualidade de polpa de maracujá (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*) em pó. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

PÉREZ-MARÍN, D; PAZ, P. GUERRERO, J. E.; GARRIDO-VARO, A.; SÁNCHEZ, M. T. Miniature handheld NIR sensor for the on-site non-destructive assessment of post-harvest quality and refrigerated storage behavior in plums. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 294–302, 2010.

PIMENTEL-GOMES, **Curso de Estatística Experimental**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1985.

PINHEIRO, E, R.; SILVA, I. M. D. A.; GONZAGA, L. V.; AMANTE, E. R.; TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; AMBONI, R. D. M. C. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5561–5566, 2008.

QUEJI, M. D. **Determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maçã por espectroscopia no infravermelho e método de calibração multivariada**. Dissertação, (Mestrado em ciências e

tecnologia de alimentos), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta grossa, 2008.

QUEJI, M. D.; WOSIACKI, G.; CORDEIRO, G. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; NAGATA, N. Determination of simple sugars, malic acid and total phenolic compounds in apple pomace by infrared spectroscopy and PLSR. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 602–609, 2010.

RAMBLA, F. J.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M de la. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 344, n. 1, p.41-53, 1997.

REID, L. M.; WOODCOCK, T.; O'DONNELL, C.P.; KELLY, J. D.; DOWNEY, G. Differentiation of apple juice samples on the basis of heat treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR data. **Food Research International**, v. 38, p. 1109–1115, 2005.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis**. HarvestPlus Technical Monography Series 2, International Food Policy Research Institute (IFPRI), Washington: DC, 2004, 58 p.

RUDNITSKAYA, A.; KIRSANOV, D.; LEGIN, A.; BEULLENS, K.; LAMMERTYN, J.; NICOLAÏ, B. M.; IRUDAYARAJ, J. Analysis of apples varieties—comparison of electronic tongue with different analytical techniques. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 116, p. 23–28, 2006.

RUIZ, D.; REICH, M.; BUREAU, S.; RENARD, C. M. G. C.; AUDERGON, J. M. Application of Reflectance Colorimeter Measurements and Infrared Spectroscopy Methods to Rapid and Nondestructive Evaluation of Carotenoids Content in Apricot (*Prunus armeniaca L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4916–4922, 2008.

RYALL, A. L.; LIPTON, W. J. **Handling, transportation and storage of fruits and vegetables**. 2nd ed. Wesrport: Avi, 1979. v.1, p.587.

SALOMÃO, L. C. C. Colheita. Maracujá: pós-colheita. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 51p. 2002.

SALUNKHE, D. K.; DESAI, B. B. **Postharvest technology of fruits**. v. 2. Boca Raton: CRC Press, 1984. 147p.

SCIBISZ, I.; REICH, M.; BUREAU, S.; GOUBLE, B.; CAUSSE, M.; BERTRAND, D.; RENARD, C. M.G.C. Mid-infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1390–1397, 2011.

SCHMILOVITCH, Z.; MIZRACH, A.; HOFFMAN, A.; EGOZI, H.; FUCHS, Y. Determination of mango physiological indices by near-infrared spectrometry. **Postharvest Biology Technology**, v. 19, p. 245–252, 2000.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M.; BARANSKI, R. Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoid Analysis. **Biopolymers**, v. 77, p. 212–221, 2005.

SERINO, S., L. HPLC Assay of Tomato Carotenoids: Validation of a 539 Rapid Microextraction Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 540, p. 8753–8760, 2009.

SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. **Biochemistry of fruit ripening**. 1. ed. Ondon: Chapman & Hall, 1993. p. 454.

SHARAF, M. A.; ILLMAN, D.L.; KOWALSKI, B. R. **Chemometrics**, 1ª ed., New York: John Wiley & Sons, 1986, p. 332.

SHIOMI, S.; KUBO, Y.; WAMOCHO, L. S.; KOAZE, H.; NAKAMURA, R.; INABA, A. Postharvest ripening and ethylene biosynthesis in purple passion fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 8, p. 199-207, 1996.

SHIROMA, C.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 596–605, 2009.

SILVA, A. C.; SÃO JOSÉ, A. R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A R. (Ed) **Maracujá: Produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. cap.1, p.1-5.

SILVA, A. P.; DURIGAN, J. F. A cultura do maracujazeiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.21, n.206, p.67-71, 2000.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*passiflora edulis flavicarpa*) in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 254-258, 2002.

SILVA, T. V.; RESENDE, E. D.; VIANA, A. P.; ROSA, R. C. C.; PEREIRA, S. M. F.; CARLOS, L. A.; VITORAZI, L. Influência dos estádios de maturação na qualidade do suco do maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 472–475, 2005.

SIRISOMBOON, P.; TANAKA, M.; KOJIMA, T E WILLIAMS, P. Nondestructive estimation of maturity and textural properties on tomato ‘Momotaro’ by near infrared spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 112, p. 218–226, 2012.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Analysis of potato chips using FTIR photoacoustic spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1805–1810, 2000.

SKOOG, D.A; HOLLER, F. J; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SLAUGHTER, D. C.; THOMPSON, J. F.; TAN, E. S. Nondestructive determination of total and soluble solids in fresh prune using near infrared spectroscopy. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 437–444, 2003.

SOUZA, A. C. G. de; SANDI, D. Industrialização. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 472p.

SOUZA, J. S.; CARDOSO, C. E. L.; FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. Maracujá: pós-colheita. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2002. 51p.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. 2nd. ed. New York: J. Wiley & sons, 2004, 203 p.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO). NEPAUNICAMP, versão II – 2ª edição, Campinas-SP, 2006, 113p.

TAVAKOLIAN, M. S. S.; SILAGHI, F. A.; FABBRI, A.; MOLARI, G.; GIUNCHI, A E GUARNIERI, A. Differentiation of post harvest date fruit varieties non-destructively using FT-NIR spectroscopy. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1-7, 2013.

TOZETTO, A. **Controle de qualidade de edulcorantes em adoçantes comerciais via espectrometria e métodos de calibração multivariada**. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2005.

TRUCKER, G. A. Introduction. In SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TRUCKER, G.A. **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman e Hall, 1993. Cap.1 p.2-51.

UCHOA, A. M. A.; DA COSTA, J.M.C.; MAIA, G. A.; SILVA, E. M. C.; CARVALHO, A. F. F. U.; MEIRA, T. R. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

VALDERRAMA. P. Avaliação de figuras de mérito em calibração Multivariada na determinação de parâmetros de Controle de qualidade em indústria alcooleira por Espectroscopia no infravermelho próximo. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; DE JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1998.

VASCONCELLOS, M. A. S.; SAVAZAKI, E. T.; GRASSI, F. H.; BUSQUET, R. N. B.; MOSCA, J. L. Caracterização física e quantidade de nutrientes em frutos de maracujá doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 690–694, 2001.

VELTEROP, J. S.; VOS, F. A rapid and inexpensive microplate assay for the enzymatic determination of glucose, fructose, sucrose, L-malate and citrate in tomato

(*Lycopersicon esculentum*) extracts and in orange juice. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 299–304, 2001.

VERMEIR, S.; NICOLAÏ, M. B.; JANS, K.; MAES, G.; LAMMERTYN, J. High-Throughput Microplate Enzymatic Assays for Fast Sugar and Acid Quantification in Apple and Tomato. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 3240–3248, 2007.

WORKMAN JR, J. J. Interpretative spectroscopy for near infrared, **Applied Spectroscopy Review**, v. 31, n. 3, p. 251-320, 1996.

WILLIAMS P. **Near-Infrared Technology – Getting the Best out of Light**. 2ed. Canada: Value Added Wheat, 2003.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. 2th ed. USA: American Association of Cereal Chemists. 1987.

XIAOBO, Z.; JIEWEN, Z.; POVEY, M. J. W.; HOLMES, M.; HANPIN, M. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 667, p. 14–32, 2010.

XIE, L.; YE, X.; LIU, D.; YING, Y. Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1135–1140, 2009.

XIE, L.; YE, X.; LIU, D.; YING, Y. Prediction of titratable acidity, malic acid, and citric acid in bayberry fruit by near-infrared spectroscopy. **Food Research International**, v. 44, 2198–2204, 2011.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 459–471, 2010.

ZUDE, M.; PFLANZ, M.; SPINELL, L.; DOSCHE, C.; TORRICELLI, A. Non-destructive analysis of anthocyanins in cherries by means of Lambert–Beer and multivariate regression based on spectroscopy and scatter correction using time-resolved analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 68–75, 2011.

APÊNDICES

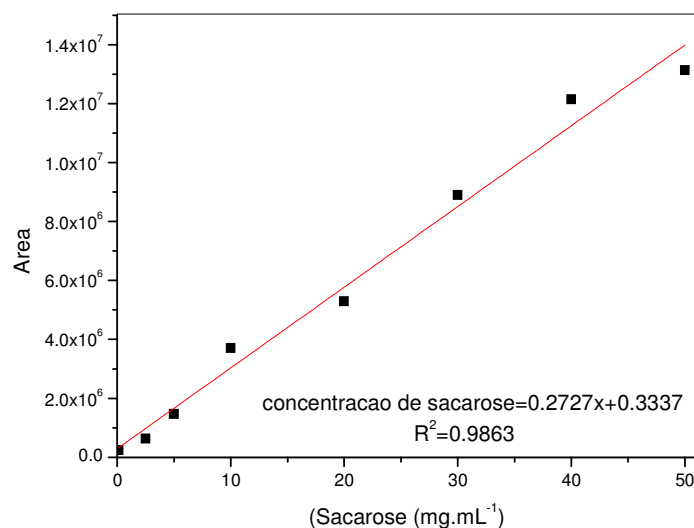
APÊNDICE I – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS AÇUCARES SIMPLES OBTIDAS PARA A DETERMINAÇÃO DE SACAROSE, GLUCOSE E FRUTOSE PELO MÉTODO HPLC

FIGURA 1: CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL OBTIDA PELO MÉTODO HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE SACAROSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0.125 a 50.0 mg.mL⁻¹)

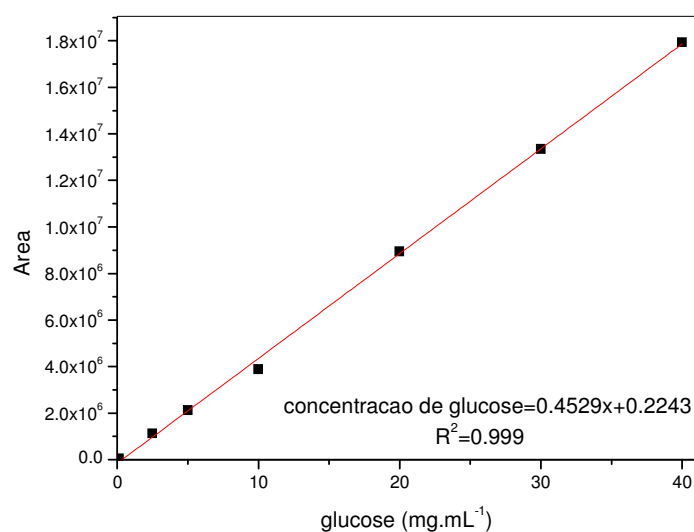


FIGURA 2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL OBTIDA PELO MÉTODO HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0.125 a 40.0 mg.mL⁻¹)

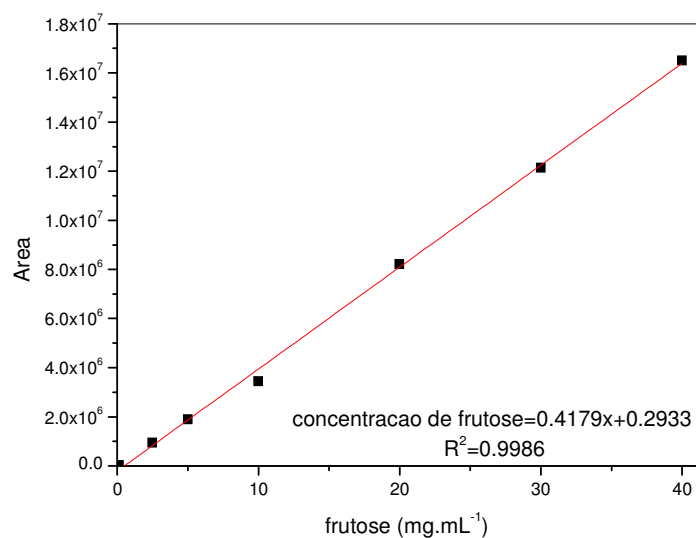


FIGURA 3 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL OBTIDA PELO MÉTODO HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE FRUTOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0.125 a 40.0 mg.mL⁻¹)

APÊNDICE II—CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS AÇUCARES SIMPLES E ÁCIDOS ORGÂNICOS, OBTIDAS PARA A DETERMINAÇÃO DE SACAROSE, GLUCOSE, FRUTOSE, ÁCIDOS CÍTRICO E MÁLICO PELO MÉTODO ENZIMÁTICO

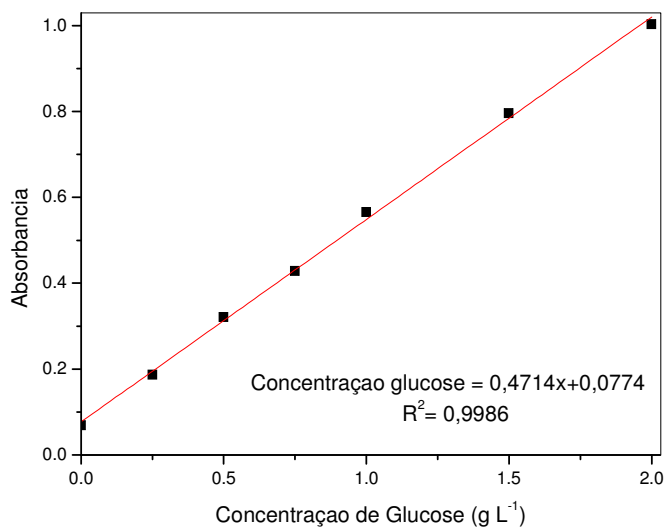


FIGURA 1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL PARA DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0 a 2 g.L⁻¹)

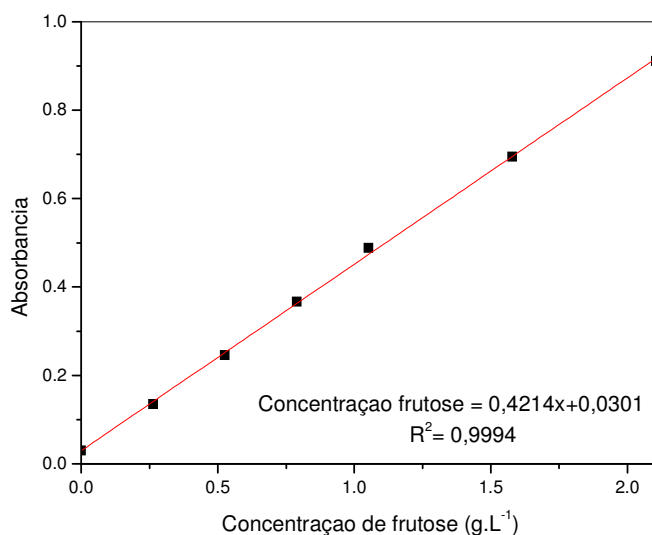


FIGURA 2: CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL PARA DETERMINAÇÃO DE FRUTOSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0 a 2 g.L⁻¹)

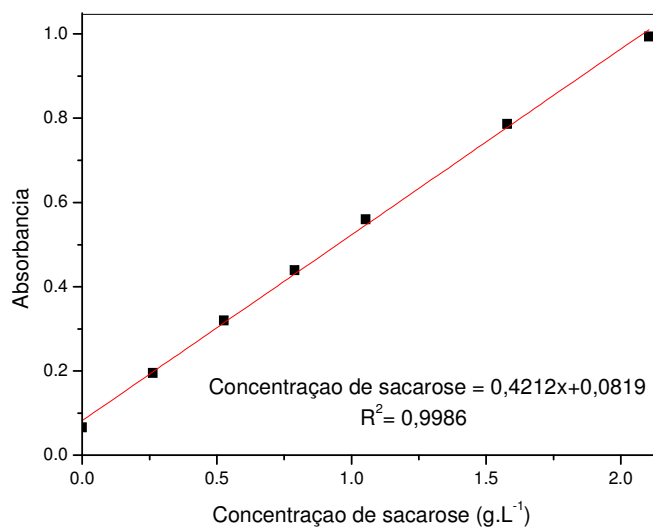


FIGURA 3: CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL PARA DETERMINAÇÃO DE SACAROSE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0 a 2 g.L⁻¹)

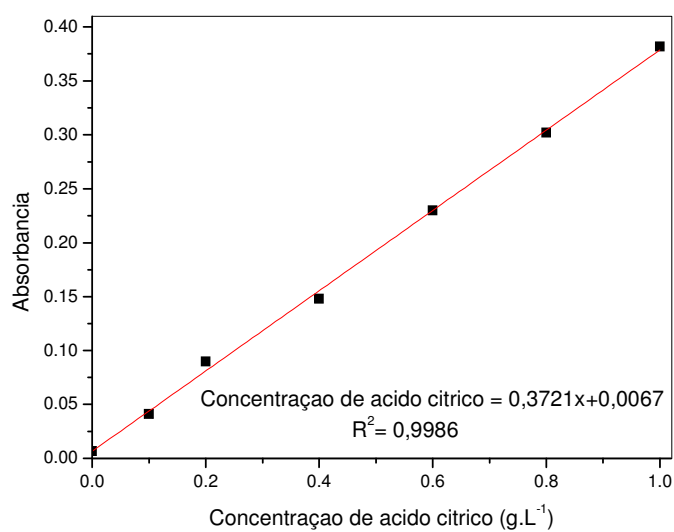


FIGURA 4: CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0 a 1 g.L⁻¹)

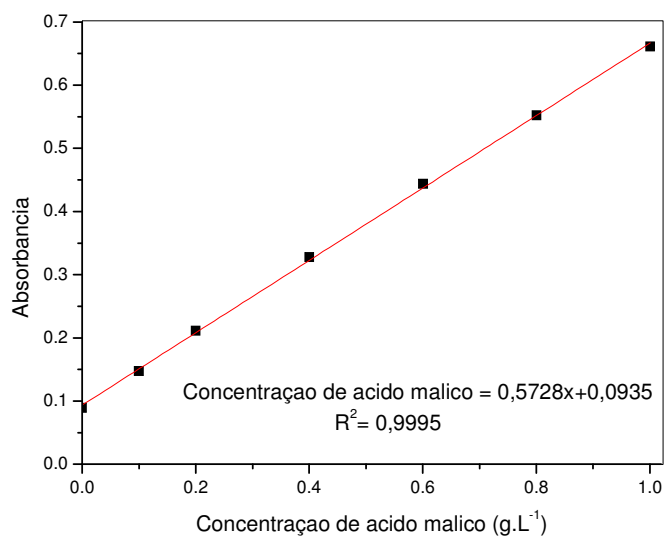


FIGURA 5: CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0 a 1 g.L⁻¹)

APÊNDICE III - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O β -CAROTENO OBTIDA PELO MÉTODO HPLC

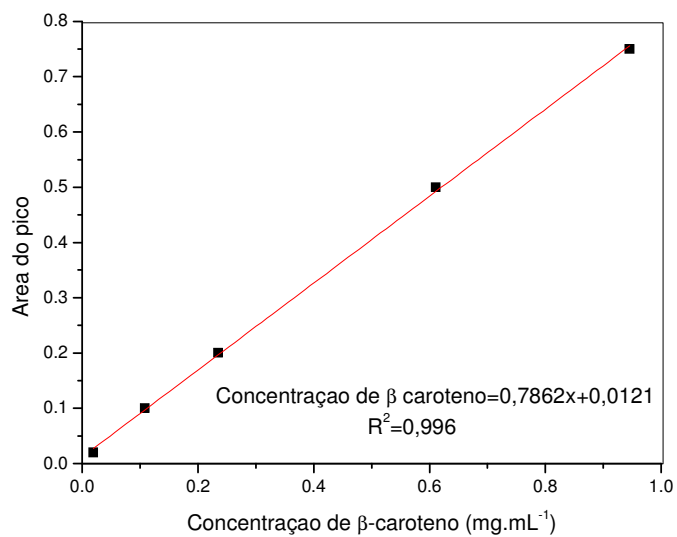


FIGURA 1: CURVA DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL PARA DETERMINAÇÃO DE β -CAROTENO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ($0.1 - 3.75 \text{ mg.mL}^{-1}$)