UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação S*tricto-sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

MARY DIAS QUEJI

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SIMPLES, ÁCIDO MÁLICO E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM BAGAÇO DE MAÇÃ POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

PONTA GROSSA
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MARY DIAS QUEJI

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SIMPLES, ÁCIDO MÁLICO E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM BAGAÇO DE MAÇÃ POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

Ponta Grossa
2008

TERMO DE APROVAÇÃO

MARY DIAS QUEJI

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SIMPLES, ÁCIDO MÁLICO E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM BAGAÇO DE MAÇÃ POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

_____

Profa. Dra. Noemi Nagata
UEPG/PR

_____

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
UEPG/PR

_____

Prof. Dra. Iara Messerschmidt
UFPR/PR

Ponta Grossa, 05 de março de 2008.

Dedico esta dissertação
a minha família e
meu marido Lívio
pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela vida e pela força para poder vencer mais este desafio.

A meu marido Lívio pelo amor, compreensão e incentivo em todos os momentos.
A meus pais, Elton e Maria, e irmãos, Mônica e Junior pelo apoio e pelas palavras que me proporcionaram coragem durante este período.

A minha orientadora, Profª. Dra. Noemi Nagata, pela orientação segura, clara e objetiva em todos os momentos em que conversamos e, acima de tudo, pela compreensão e atenção dispensada.

Ao professor colaborador, Dr. Gilvan Wosiacki, pela idéia principal do trabalho e pelas sugestões durante o estudo.

Aos amigos Prof. Dr. Patrício Peralta-Zamora e Gilcélia Cordeiro, da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda durante as análises de espectroscopia no infravermelho e pelas valiosas informações para obtenção dos modelos de calibração multivariados.

Aos professores do curso, que contribuíram para meu crescimento acadêmico.
Aos amigos do curso, pelos momentos de descontração e alegria.

Aos funcionários do Laboratório de Alimentos, Danianni, Denise e Rita, pela amizade e auxílio.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária Catarinense (EPAGRI), do município de Caçador – SC, que me disponibilizou as amostras de maçãs.

Aos professores membros da banca examinadora, que aceitaram o convite de fazer parte da defesa desta dissertação e pelas valiosas sugestões ao aprimoramento do trabalho.

E a todas as pessoas que, de alguma forma, possibilitaram a realização deste trabalho.

“Nem tão longe que eu não possa ver,
nem tão perto que eu possa tocar,
nem tão longe que eu não possa crer,
que um dia chego lá.”

Humberto Gessinger

RESUMO

A agroindústria da maçã gera, durante o processamento, o bagaço que é considerado o principal subproduto deste setor. Levantamentos mostram que da quantidade total de fruta que é processada para a obtenção do suco de maçã, 20 a 40% correspondem a este subproduto, que, normalmente, é destinado como complemento na alimentação animal ou dispensado no solo como adubo orgânico. Sua composição química, em base úmida, é constituída por umidade (80%), fibras (5%) e sólidos solúveis (14%), estes últimos representados, principalmente, por frutose, glucose e sacarose, bem como, ácidos orgânicos, representados, majoritariamente pelo ácido málico. O bagaço da maçã também apresenta compostos fenólicos, que são fito-nutrientes de grande importância sensorial e nutricional. Portanto, a quantificação desses constituintes representa uma importante fonte de dados na caracterização do bagaço de maçã para finalidades biotecnológicas, visando atribuir um fim mais nobre a este subproduto. As metodologias convencionais empregadas para a quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e fenóis totais, embora façam parte das análises de rotina nos laboratórios de controle de qualidade, são onerosas, demoradas e geram resíduos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica analítica rápida, versátil, de baixo custo e não poluente. Para tal, utilizou-se a espectroscopia no infravermelho por refletância difusa (DRIFTS) aliada a métodos de calibração multivariada (Regressão de Mínimos Quadrados Parciais - PLSR). Para a construção dos modelos multivariados, foram utilizadas as médias das concentrações dos açúcares simples, ácido málico e fenóis totais, obtidas pelas metodologias convencionais, bem como, os dados de espectroscopia no infravermelho médio (MID) e próximo (NIR). Os espectros foram obtidos em duplicata, sendo que dos 52 espectros das amostras de bagaço de maçã, 47 fizeram parte do conjunto de calibração e 5 do conjunto de validação externa. Os modelos de regressão para a previsão da concentração de frutose, sacarose, fenóis totais e ácido málico obtiveram melhores resultados no MID, com médias de erro padrão relativo de 3.9% (com 5 Variáveis Latentes), 6.6% (com 5 Variáveis Latentes), 6.4% (com 4 Variáveis Latentes) e 5.9% (com 5 Variáveis Latentes), respectivamente. Já a melhor capacidade de previsão para a concentração de glucose foi obtida pelo NIR, na qual a média de erro padrão relativo foi de 7.4% (com 6 Variáveis Latentes). Os resultados obtidos demonstram a boa capacidade de previsão dos modelos multivariados fundamentados em espectroscopia no infravermelho e vantagens características da associação DRIFT-PLSR.

Palavras-chave: bagaço de maçã, açúcares simples, ácido málico, fenóis totais, espectroscopia no infravermelho, PLSR.

ABSTRACT

The agro industry of the apple generates, during the processing, the pomace which is considered the main by-product. Studies show that of the total amount of fruit that is processed to obtain the apple juice, 20 to 40% correspond to this by-product, which, is usually destined as a complement in animal feed or delivered onto the soil as organic fertilizer. The chemical composition, in moist base, is constituted by moisture (80%), fibers (5%) and soluble solids (14%) represented, mainly, by fructose, glucose and sucrose, as well as, by organic acids, represented, in the most part by malic acid. The apple pomace also presents phenolic compounds that are target nutrients of great sensory and nutritional importance. Therefore, the quantification of its constituents represents an important source of data in the characterization of apple pomace for biotechnological purposes, seeking to attribute an appropriate use for this by-product. The conventional methodologies used for the quantification of sugars, organic acids and total phenols, although being part of the routine analyses in the quality control laboratories, are onerous, time consuming and generate residues. The aim of this study was to develop a fast, versatile analytical technique, of low cost and no pollutant, using the diffuse reflectance infrared spectroscopy (DRIFTS) allied to methods of multivariate calibration (PLSR). For the construction of the multivariate models, the averages of the concentrations of the simple sugars, malic acid and total phenols were used, obtained by the conventional methodologies, as well as the data in the medium infrared spectroscopy (MID) and near (NIR), obtained in duplicate, and of the 52 spectra obtained for the samples of apple pomace, 47 made part of the set calibration and 5 of the set validation. The regression models for the prediction of the concentration of fructose, sucrose, total phenols and malic acid obtained better results in MID, with averages of relative standard errors of 3.9% (with 5 Latents Variable), 6.6% (with 5 Latents Variable), 6.4% (with 4 Latents Variable) and 5.9% (with 5 Latents Variable), respectively. Already the best capacity prediction for glucose concentration was obtained by NIR, in which the average of relative standard error was 7.4% (with 6 Latents Variable). The obtained results demonstrate the good capacity of prediction of the multivariate models based in infrared spectroscopy and characteristic advantages of the association DRIFT-PLSR.

Key-words: apple pomace, simple sugars, malic acid, total phenols, infrared spectroscopy, PLSR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Organização dos dados para calibração multivariada..... 30

FIGURA 2 - Fluxograma de processamento da maçã..... 40

FIGURA 3 - Espectros no infravermelho (DRIFT) do conjunto de calibração..... 49

FIGURA 4 – Espectros no infravermelho (DRIFT) do conjunto de calibração na região do NIR.....50

FIGURA 5 - Espectros no infravermelho (DRIFT) do conjunto de calibração na região do MID..... 50

FIGURA 6 - Região do NIR com baixa razão sinal/ruído..... 52

FIGURA 7 - Região do MID com baixa razão sinal/ruído..... 52

FIGURA 8 - Correlograma para glucose incluindo infravermelho médio e próximo..... 53

FIGURA 9 - Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para glucose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 55

FIGURA 10 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para glucose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 56

FIGURA 11 - Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para glucose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 57

FIGURA 12 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de glucose..... 58

FIGURA 13 - Correlograma para frutose incluindo infravermelho médio e próximo..... 59

FIGURA 14 - Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para frutose no infravermelho médio (MID2) e próximo (NIR1)..... 61

FIGURA 15 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para frutose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 62

FIGURA 16 - Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para frutose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 62

FIGURA 17 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de frutose..... 63

FIGURA 18 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para frutose no infravermelho médio (MID 2).....64

FIGURA 19 - Correlograma para sacarose incluindo infravermelho médio e próximo..... 65

FIGURA 20 - Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 67

FIGURA 21 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 68

FIGURA 22 - Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1)..... 68

FIGURA 23 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de sacarose..... 69

FIGURA 24 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2).....70

FIGURA 25 - Correlograma para compostos fenólicos totais incluindo infravermelho médio e próximo..... 71

FIGURA 26 - Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1)..... 73

FIGURA 27 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1)..... 74

FIGURA 28 - Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1)..... 75

FIGURA 29 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de compostos fenólicos totais..... 76

FIGURA 30 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3).....77

FIGURA 31 - Correlograma para ácido málico incluindo infravermelho médio e próximo..... 78

FIGURA 32 - Gráfico de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3)..... 80

FIGURA 33 - Gráfico de Resíduos *vs* Valor Experimental obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3)..... 80

FIGURA 34 - Gráfico de Leverage *vs* Resíduo Student obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3)..... 81

FIGURA 35 - Gráfico de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtido pelo modelo de calibração no infravermelho médio (MID 3) para previsão da concentração de ácido málico..... 82

FIGURA 36 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3)..... 83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Área e produção de maçã no Brasil em 2004..... 19

TABELA 2 - Produção brasileira de maçãs (em toneladas), de 2003 a 2006, por grupo de cultivares..... 19

TABELA 3 - Amostras utilizadas durante o estudo..... 38

TABELA 4 - Reagentes e equipamentos utilizados nas diversas etapas do presente estudo..... 39

TABELA 5 - Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental 2^4..... 41

TABELA 6 - Resultados da otimização via planejamento experimental 2^4..... 46

TABELA 7 - Resultados dos teores de frutose, glucose, sacarose, ácido málico e compostos fenólicos totais encontrados nas amostras de farinha de bagaço de maçã..... 48

TABELA 8 - Regiões espectrais no MID e NIR relacionadas às ligações químicas de açúcares simples..... 51

TABELA 9 – Regiões espectrais no MID e NIR relacionadas às ligações químicas do ácido málico e compostos fenólicos.....52

TABELA 10 - Modelos de calibração para a determinação de glucose no MID e NIR..... 54

TABELA 11 - Resultados da previsão da concentração de glucose para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID2) e próximo (NIR1).....58

TABELA 12 - Modelos de calibração para a determinação de frutose no MID e NIR..... 60

TABELA 13 - Resultados da previsão da concentração de frutose para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID2) e próximo (NIR1)..... 63

TABELA 14 - Modelos de calibração para a determinação de sacarose no MID e NIR..... 66

TABELA 15 - Resultados da previsão da concentração de sacarose para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID2) e próximo (NIR1)..... 69

TABELA 16 - Modelos de calibração para a determinação de compostos fenólicos totais no MID e NIR..... 72

TABELA 17 - Resultados da previsão da concentração de compostos fenólicos totais para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1).....76

TABELA 18 - Modelos de calibração para a determinação de ácido málico no MID e NIR..... 79

TABELA 19 - Resultados da previsão da concentração de ácido málico para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelo modelo no infravermelho médio (MID 3)..... 82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 15

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 18
2.1 MAÇÃ..... 18
2.2 BAGAÇO DA MAÇÃ..... 22
2.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS NA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SIMPLES, ÁCIDO MÁLICO E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS..... 23
2.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA..... 27
2.5 QUIMIOMETRIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... 29
2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E REGRESSÃO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS..... 34

3 OBJETIVOS..... 37
3.1 OBJETIVO GERAL..... 37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 37

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 38
4.1 AMOSTRAS..... 38
4.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS..... 39
4.3 METODOLOGIA DE PREPARAÇAO DAS AMOSTRAS..... 40
4.4 ANÁLISES QUÍMICAS CONVENCIONAIS..... 41
4.4.1 Determinação da concentração dos açúcares simples e da acidez total titulável (expressa em % (m/m) de ácido málico)..... 41
4.4.2 Determinação da concentração de compostos fenólicos totais..... 43
4.5 ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA..... 44
4.5.1 Seleção das amostras..... 44
4.5.2 Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados..... 44

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 46
5.1 RESULTADOS DA OTIMIZAÇAO VIA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... 46
5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES QUÍMICAS CONVENCIONAIS..... 47
5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA.... 49
5.3.1 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de glucose..... 53
5.3.2 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de frutose..... 59
5.3.3 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de sacarose..... 65
5.3.4 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de compostos fenólicos totais..... 71
5.3.5 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de ácido málico..... 78

6 CONCLUSÕES 84

7 TRABALHOS FUTUROS..... 85

REFERÊNCIAS..... 86

1 INTRODUÇÃO

O mercado doméstico brasileiro é altamente exigente na qualidade da maçã. Em cada safra uma classificação comercial e um rigoroso processo de seleção acarretam o descarte de toneladas de frutas, que apresentam defeitos físicos, fisiológicos e/ou fitossanitários, a fim de satisfazer as exigências dos consumidores. A maior parte do descarte é destinada à fabricação de suco de maçã (clarificado ou concentrado) e o restante ao processamento de fermentados (sidra, vinagre e destilados). Da quantidade total de maçã processada, cerca de 20 a 40% corresponde ao bagaço, que é considerado o principal subproduto deste setor (NOGUEIRA et al., 2005).

O bagaço de maçã compreende cascas (epicarpo) e polpa (mesocarpo) (94,5%), sementes (4,4%) e centros (endocarpo) (1,1%). Sua composição química, em base úmida, é constituída por umidade (80%), fibras (5%, sendo composto por celulose, pectina e lignina) e sólidos solúveis (14%) representados, majoritariamente, por uma mistura de açúcares simples (frutose, glucose e sacarose). Em base seca, os açúcares totais no bagaço de maçã podem chegar a 40 % (m/m) e os açúcares redutores a 25,8 % (m/m), sendo uma elevada porcentagem quando comparada ao bagaço de mandioca (1,1 % (m/m)), o qual apresenta maior teor em amido (51,3 % (m/m)) (BRAMORSKI et al., 1998; PAGANINI et al., 2005).

Além dos açúcares simples, os ácidos orgânicos também fazem parte dos sólidos solúveis, sendo representados, predominantemente, pelo ácido málico. Já os compostos fenólicos totais, que apresentam grande importância sensorial e nutricional, são classificados como fito-nutrientes presentes em elevados teores no bagaço de maçã (FERTONANI et al., 2006; PAGANINI et al., 2004).

Embora as características de qualidade físico-química no bagaço da maçã sejam dependentes das operações de obtenção e de beneficiamento da fruta, dos métodos de análise empregados e das diferenças varietais, seu teor em açúcares faz deste subproduto um substrato potencial para finalidades biotecnológicas (fermentação, bioconversão, dentre outros). Esta e outras estratégias de redução de resíduos, visando atribuir um fim mais nobre a este subproduto, são de grande importância, haja vista que no Brasil este bagaço, geralmente, é dispensado no solo como adubo orgânico ou utilizado como complemento na alimentação animal. Assim, a quantificação de açúcares simples (frutose, glucose e sacarose), a acidez total titulável (expressa como ácido málico) e os compostos fenólicos totais (expressos em catequina), representam uma

importante fonte de dados na caracterização do bagaço da maçã. A partir destes atributos, é possível definir seu reaproveitamento, bem como, utilizá-los como marcadores de qualidade na classificação das amostras de maçã com relação ao seu potencial de industrialização (FERTONANI et al., 2006; KENNEDY et al., 1999).

Os métodos convencionais utilizados para a quantificação de açúcares simples (glucose, frutose e sacarose) são baseados em análises físicas, químicas e enzimáticas. Dentre os métodos químicos, pode-se citar a análise colorimétrica de Somogyi e Nelson, descrita por SOMOGYI (1952), que permite a quantificação de sacarose e frutose. Já os métodos enzimáticos que são mais seletivos e, muitas vezes, superam os métodos físicos e químicos, permitem, por exemplo, a quantificação de glucose através da metodologia enzimática-colorimétrica descrita por Bergmeyer e Bernt (1974).

Dentre as metodologias para a quantificação de ácido málico e de compostos fenólicos totais, pode-se empregar, respectivamente, o método químico titulométrico descrito por Tanner e Brunner (1985) e Instituto Adolfo Lutz (IAL) (1985) e o método químico colorimétrico descrito por Singleton et al. (1999) e Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1965).

Essas metodologias convencionais, embora façam parte das análises de rotina nos laboratórios de controle de qualidade, necessitam de extração prévia dos analitos de interesse e, por conseqüência, uma extensiva preparação da amostra, utilização de grande quantidade de reagentes, vidrarias e equipamentos, o que as torna laboriosas e onerosas.

Neste contexto, torna-se interessante o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas, seletivas, sensíveis, de simples operação e baixo custo. A espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta com alto potencial analítico, pois fornece um perfil completo da composição de uma amostra (necessitando apenas de secagem e moagem), apresenta alta sensibilidade, é de fácil implementação e baixo custo. Outro parâmetro 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 sinal e a não linearidade entre a intensidade do sinal e a concentração das espécies químicas associadas, torna-se necessária a utilização de métodos de calibração multivariada, que auxiliam na identificação e quantificação dos componentes individuais a partir desta resposta instrumental complexa (FERRARINI, 2004; TOZETTO, 2005).

A calibração multivariada utiliza diversos procedimentos matemáticos e estatísticos que viabilizam a determinação de várias espécies químicas, favorecendo a previsão de uma resposta de interesse a partir de dados com discrepância mínima, ou seja, mesmo sob condições de interferências inter-espécies. Dentre as várias metodologias matemáticas, pode-se citar o PLSR (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais) que não apresenta restrições em relação à quantidade de variáveis independentes e, além disso, permite extrair o máximo de informação relevante que será condensada em variáveis ou fatores, a fim de construir um modelo de calibração para posterior previsão (RAMBLA; GARRIGUES; GUARDIA, 1997).

Desta forma, este trabalho tem por objetivo desenvolver modelos de calibração multivariada exatos e robustos, com o auxílio do método PLSR, que permitam a quantificação dos teores de glucose, frutose, sacarose, ácido málico e compostos fenólicos totais, em amostras de bagaço de maçã, utilizando espectroscopia no infravermelho médio (MID) e próximo (NIR) por refletância difusa (DRIFT).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MAÇÃ

A pomicultura tem apresentado um crescimento linear e gradativo, de grande importador na década de 70 o Brasil passou para exportador e o consumo per capta aumentou de 2 Kg/ano, em 1990, para quase 5 kg/ano, em 2004. Vale a pena ressaltar que este crescimento também foi observado em termos de área plantada e, conseqüentemente, na produção de maçãs. Em 1990, a área de plantio era de, aproximadamente, 22 mil hectares com produção de 276 mil toneladas, enquanto em 2004, passou para 33 mil hectares e 980 mil toneladas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2006).

Em 2005, o Brasil ocupou o décimo quarto lugar na produção mundial de maçãs, com 870 mil toneladas, o que representa 1,3% da produção mundial. Destaque deve ser dado quanto à qualidade de produção e à infra-estrutura disponível no cenário mundial, onde o Brasil ocupa o 5º (quinto) e 7º (sétimo) lugares, respectivamente. A China é considerada a maior produtora mundial; seus pomares produziram em 2004, 25 milhões de toneladas ou 39,4% de toda a produção global. Os Estados Unidos são o segundo maior produtor de maçãs, com 4,25 milhões de toneladas ou 6,7% do total (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006; WOSIACKI; PHOLMAN; NOGUEIRA, 2004).

O cultivo da maçã no Brasil teve início em 1962, através da criação da sociedade Safra (Sociedade Agrícola Fraiburgo Ltda) em Fraiburgo (Santa Catarina), e, a partir de 1969, quando o governo federal incluiu a macieira na Lei de Incentivos Fiscais para Reflorestamento, surgiram os primeiros pomares comerciais nesta região (ALMEIDA; ALVES, 2006).

Em 2004, os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul concentraram mais de 95% da produção brasileira de maçãs, conforme ilustra a Tabela 1, sendo que nestes Estados a produção concentra-se em três pólos, ao redor dos municípios de Fraiburgo e São Joaquim (Santa Catarina) e do município gaúcho de Vacaria. Ou seja, os Estados do Sul do Brasil abastecem, quantitativamente, o mercado nacional e participam de processos de exportação da maçã para entrepostos holandeses, competindo, em ambos os casos, com tradicionais exportadores, como a Argentina e a Nova Zelândia (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (EPAGRI), 2006; WOSIACKI; PHOLMAN; NOGUEIRA, 2004).

TABELA 1 - Área e produção de maçã no Brasil em 2004

Estados	Área (ha)	Produção (t)	Participação (%)
Santa Catarina	17.644	583.205	59,50
Rio Grande do Sul	13.447	353.140	36,03
Paraná	1.694	41.297	4,21
São Paulo	150	1.875	0,19
Minas Gerais	58	686	0,07
Total	32.993	980.203	100,00

Fonte: IBGE (2006)

Atualmente, as cultivares Gala e Fuji, com suas diversas mutações, concentram quase toda a produção brasileira (Tabela 2), devido à aceitação pela coloração, sabor, mercado e consumidores, bem como, pela facilidade de conservação frigorífica que estas variedades oferecem. Estas duas variedades constituem, aproximadamente, 95% da produção brasileira e fazem parte do conjunto de maçãs mais importantes em termos mundiais, embora não apresentem boas características para processamento industrial, com relação ao teor de compostos fenólicos e acidez total titulável (World Apple and Pear Association (WAPA), 2006; WOSIACKI; PHOLMAN; NOGUEIRA, 2004).

TABELA 2 - Produção brasileira de maçãs (em toneladas), de 2003 a 2006, por grupo de cultivares.

Cultivares	2003	2004	2005	2006
Fuji e mutações	278.652	357.386	300.173	276.610
Gala e mutações	380.431	579.845	437.297	402.970
Golden e Belgonden	15.178	-	-	-
Outras	26.754	50.778	22.160	20.420
Total	701.015	988.009	759.630	700.000

Fonte: WAPA (2006)
(-) dados não divulgados

As exigências do mercado interno, para consumo *in natura* da fruta, revelam preferências por maçãs de epiderme vermelha e polpa de baixa acidez, portanto, há uma grande necessidade de suprir o abastecimento deste mercado com maçãs de mesa de alta qualidade e fomentar o setor agroindustrial a utilizar frutas desqualificadas à obtenção de produtos nobres, tais como: sucos (concentrados, clarificados e néctares), sidras, vinagres e bebidas alcoólicas destiladas (DENARDI; CAMILO, 1997).

As maçãs desqualificadas, durante o processo de seleção e classificação para consumo *in natura*, no Brasil, chegam a representar 30% da produção total. Essas frutas apresentam características que as tornam sem valor comercial, tais como: baixa qualidade quanto à forma, tamanho e coloração não uniforme; presença de cicatrizes (provenientes de insetos, pássaros, granizo) ou ferimentos (resultantes de tratos culturais e transporte inadequados); sintomas de doenças (manchas de sarna e de podridões) e problemas fisiológicos como o *russeting* (confere aspecto de rugosidade a superfície do fruto e coloração ferruginosa), o *bitter pit* (confere manchas pequenas de cor escura na casca, geralmente durante a fase de frigoconservação), e escurecimentos internos (AMARANTE; CHAVES; ERNANI, 2006; CAMILO; DENARDI, 2001; PAGANINI et al., 2004).

Com o aumento da produção desta matéria-prima, as indústrias classificadoras têm processado as frutas descartadas como forma de agregar valor, pois cerca de 2/3 são ainda adequados para o processamento após a retirada daqueles frutos portadores de doenças ou apodrecidos. Vale ressaltar, que a composição físico-química de algumas frutas de descarte (aquelas que apresentam deformidades, tamanho impróprio, manchas ou cicatrizes) é praticamente a mesma da maçã de mesa e, portanto, podem ser utilizadas pelas indústrias processadoras de sucos, possibilitando a oferta de um produto nobre ao longo de todo o ano. As frutas que apresentam problemas fito-sanitários ou aberturas na epiderme são encaminhadas para a fabricação de sidra, vinagre e destilados (WOSIACKI et al., 2002).

A composição química da maçã depende de fatores naturais onde estão instalados os pomares (tais como solo, clima) e fatores agronômicos de produção da fruta (cultivares, tratos culturais, adubações, tratamentos fito-sanitários, épocas de colheita) que basicamente, podem afetar os teores de umidade, sólidos solúveis (açúcares e ácidos orgânicos), compostos fenólicos, minerais e vitaminas (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005).

A umidade na maçã, que pode chegar a 90%, representa o principal componente para a obtenção do suco, o que torna a fruta um produto agrícola essencialmente perecível. Porém sua epiderme constitui uma barreira eficaz aos processos de infestação e infecção, bem como, os seus componentes químicos intrínsecos impedem e/ou reduzem a deterioração química e biológica (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005).

Dentre os sólidos solúveis, destacam-se os açúcares simples (frutose, glucose e sacarose) que podem chegar em até 14%, em base úmida, sendo que, normalmente, a frutose está presente

em maiores proporções, conferindo um apelo funcional na elaboração de produtos derivados desta fruta. O ácido málico é o ácido orgânico predominante na maçã por determinação gênica (95% do total) seguindo-se o ácido cítrico e outros de menor importância, presentes somente em traços (CZELUSNIAK et al., 2003; EPAGRI, 2002).

Os compostos fenólicos, também denominados fenóis totais, são fito-nutrientes de grande importância sensorial e nutricional. Sensorialmente, contribuem com as características relacionadas à cor, sabor (amargo e adstringente), formação de aromas e na claridade em bebidas. Já a sua capacidade antioxidante, que influencia na proteção dos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo sobre a saúde, justifica a sua importância nutricional. As principais classes de fenóis na maçã são as flavonas (quercitina), os flavonóides ([-]- epicatequina, [+]- catequina e seus oligômeros, procianidinas), as antocianinas (cianidina galactosidada), as diidroalconas (floridizina) e o ácido clorogênico, distribuídos na casca e polpa da fruta (SUN et al., 2002; WIECHETECK et al., 2005).

As maçãs destinadas ao processamento de suco, por exemplo, devem apresentar alguns parâmetros de sólidos solúveis e de fenóis totais desejáveis à obtenção de um produto final de qualidade. Dentre eles pode-se destacar: acidez total titulável (expressa em % (m/m) de ácido málico) superior a 0,45; compostos fenólicos totais (expressos como catequinas em ppm) no mínimo 200 ppm e a razão açúcar/ácido que deve ser próximo ou inferior a 20 (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005).

Dentre os minerais presentes na maçã (que são absorvidos na forma de complexos orgânicos), o potássio predomina sobre os demais (fósforo, magnésio, cálcio, sódio e ferro). Já a vitamina C está presente em quantidades apreciáveis, sendo que a concentração é duas a três vezes superior na epiderme do que na polpa da fruta (EPAGRI, 2002).

2.2 BAGAÇO DA MAÇÃ

A quantidade de bagaço de maçã produzida está diretamente relacionada com a tecnologia empregada na extração do suco da maçã, que pode representar de 20 a 40% do peso das frutas processadas. Em 2004, cerca de 50.000 toneladas de bagaço fresco foram obtidas no Brasil e, normalmente, este resíduo é dispensado no solo como adubo orgânico ou utilizado como ração animal (SCHEMIN, 2003).

Porém, muitos estudos consideram o bagaço da maçã como uma matéria-prima de grande interesse econômico e ambiental. Isto é conseqüência de sua composição química rica em sólidos solúveis, fibras e fito-nutrientes. A distribuição destes componentes depende, além das operações de obtenção e de beneficiamento da maçã, de fatores extrínsecos (solo, clima, tratos culturais, adubação, colheita, dentre outros) e intrínsecos (cultivares), bem como dos métodos de análise empregados (ENDREß, 2000; FERTONANI, 2006; KENNEDY et al., 1999; PROTZEK, 1997; SCHEMIN, 2003).

Dentre esses estudos para reutilização deste subproduto, pode-se citar o emprego do bagaço da maçã como substrato para finalidades biotecnológicas, tais como fermentação para obtenção de etanol (visto que o álcool de frutas tem um valor de mercado superior ao álcool de cana), quitosana fúngica, aromas e compostos voláteis, proteína microbiana, ácidos orgânicos, enzimas, suplemento para ração animal, dentre outros. No bagaço, também, é muito comum realizar o esgotamento dos sólidos solúveis, com a finalidade de aumentar o rendimento em sucos (ALBUQUERQUE, 2003; BRAMORSKI, 1997; KENNEDY et al., 1999; PAGANINI et al., 2005; STREIT, 2004; VILLAS BOAS, 2001).

Na Alemanha, os açúcares presentes no resíduo líquido após despectinização do bagaço de maçã, são concentrados até 65 – 70º Brix e o produto obtido é comercializado como adoçante colorido de maçã, sendo que os pigmentos, que conferem cor e sabor ao extrato úmido, podem ser removidos por deionização e concentrados até 70 – 80º Brix, sendo denominado de adoçante de maçãs ou adoçante de frutas (SCHEMIN, 2003).

Dos compostos fenólicos cerca de 97% estão localizados nos vacúolos, sendo que nas células da epiderme e sub-epiderme a concentração é superior à encontrada nos tecidos internos da fruta (a concentração de fenóis em relação à casca/polpa pode ser de três a dez vezes superior). Estudos indicam a potencialidade de utilizar o bagaço da maçã como fonte de polifenóis de

elevada atividade antioxidante (LU; FOO, 1997; NASATO et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2003; SOARES et al., 2006).

2.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS NA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SIMPLES, ÁCIDO MÁLICO E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação dos açúcares simples em uma determinada amostra pode ser realizada através de métodos relacionados com a propriedade física (análise polarimétrica, índice de refração e densidade) e química (métodos espectrofotométricos, titulométricos e gravimétrico) desses açúcares, bem como, pelo emprego de técnicas enzimáticas (métodos espectrofotométricos e biosensores) e cromatográficas (RAMBLA; GARRIGUES; GUARDIA, 1997; TOZETTO, 2005).

A análise polarimétrica (utilizada nas usinas de cana de açúcar para determinar a concentração de sacarose), o índice de refração ou grau Brix (determina a concentração de açúcar total em xaropes, mel e geléias) e a determinação da densidade (relaciona-se com a concentração dos carboidratos presentes em solução, sendo rotineiramente utilizado em sucos e bebidas) constituem os métodos físicos mais importantes na indústria alimentícia, porém substâncias como ácidos orgânicos ou sais podem somar-se ao resultado oferecendo um valor de sólidos solúveis totais e não de açúcares (TOZETTO, 2005).

Os métodos químicos estão baseados nas reações dos açúcares com outros componentes para a formação de complexos coloridos que serão quantificados. Dentre os métodos químicos espectrofotométricos pode-se citar o Somogyi e Nelson, o ADNS (emprega o ácido dinitrossalicílico), o Fenol-Sulfúrico (utiliza fenol e ácido sulfúrico concentrado) e o Antrona (que conduz a formação de derivados do furfuraldeído para reagir com antrona). As técnicas titulométricas de Lane-Eynon (que utiliza o reativo de Fehling), de Luff-Schoorl e por complexometria com EDTA são exemplos de métodos químicos utilizados para quantificar açúcares simples, porém são morosas e necessitam da prática do analista. Por gravimetria pode-se empregar o método químico de Munson-Walker, onde a concentração de açúcares é obtida através de uma tabela de conversão (CHAVES et al., 2004; FERREIRA et al., 2003; SILVA et al., 2003).

O método químico espectrofotométrico de Somogyi e Nelson pode ser utilizado para a quantificação de frutose e sacarose e está baseado na propriedade redutora dos açúcares sobre o cobre, presente no reativo de Somogyi, que reduz a reação arsênio-molibídico (reativo de Nelson) a óxido de molibdênio de coloração azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de açúcares. As Equações 1 e 2 mostram como ocorrem essas reações (SILVA et al., 2003).

$$\text{Açúcar} + Cu^{++} \Longrightarrow \text{Ácido glucônico} + Cu^{+} \qquad \text{(Equação 1)}$$

$$Cu^{++}\text{Arseno-fosfomolibdato} \Longrightarrow Cu^{++} + \textbf{Óxido de molibdênio} \qquad \text{(Equação 2)}$$

Este método é amplamente utilizado devido a características como alta sensibilidade (capacidade de detectar baixas concentrações de açúcares) e por ser menos susceptível a presença de interferentes na amostra, conforme um levantamento realizado por Deng e Tabatabai (1994); Gutierrez-Miceli et al. (2002) e Silva et al. (2003).

As técnicas enzimáticas mostram-se seletivas e específicas na determinação dos açúcares em uma amostra, além de serem rápidas e reprodutíveis. Dentre os métodos empregados pode-se citar a detecção espectrofotométrica, que dependendo do tipo de enzima a quantificação dos açúcares pode ser simultânea, como por exemplo, o emprego da hexoquinase que conduz a formação de NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato), proporcional à concentração de açúcares presentes. A utilização de biosensores é uma nova tendência em técnicas enzimáticas, porém seu uso industrial é limitado devido ao alto custo e reduzida vida útil dos sensores biológicos (RODRIGUES-SAONA et al., 2001; TOZETTO, 2005).

O método enzimático espectrofotométrico, descrito por Bergmeyer e Bernt (1974), para determinar a concentração de glucose é seletivo, pois permite a identificação individual do açúcar em uma mistura. A enzima glucoseoxidase (GOD), disponível em muitos kits comerciais, catalisa a oxidação da glucose para ácido glucurônico e peróxido de hidrogênio, que através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido formado reage com um grupo cromóforo doador de hidrogênio (DH2) sendo oxidado a um derivado colorido (D), cuja leitura da absorbância é feita em espectrofotômetro na região do visível. A concentração

de glucose é proporcional a concentração de peróxido formado, conforme ilustram as Equações 3 e 4 (TOZETTO, 2005).

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Ácido glucurônico} + H_2O_2 \qquad \text{(Equação 3)}$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{POD}} D + 2\,H_2O \qquad \text{(Equação 4)}$$

Os métodos cromatográficos permitem a identificação e a quantificação simultânea dos açúcares, e são considerados rápidos, seletivos, sensíveis e precisos. As principais técnicas utilizadas são Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia de Troca Iônica com Detecção Amperométrica Pulsada e a Cromatografia de Afinidade Iônica. A CLAE destaca-se como a mais importante técnica quando comparada com a CG, que necessita de derivatização dos açúcares para torná-los voláteis (IRUDAYARAJ; TEWARI, 2003; LENDL; KELLNER, 1995; TOZETTO, 2005).

A cromatografia também se mostra eficaz na determinação dos ácidos orgânicos presentes nos alimentos. Técnicas de Cromatografia com Eletroforese Capilar vêm se destacando na identificação de ácidos orgânicos de cadeia curta, porém quando da indisponibilidade deste equipamento, a CLAE pode ser adequada para esta determinação, bem como a Cromatografia Líquida de Troca Iônica. A CG não é uma técnica muito utilizada para a determinação de ácidos orgânicos, pois necessita de derivatização dos compostos e não é aplicável a um maior número de amostras (RIZZON; SGANZERLA, 2007; VIGNOLI; BASSOLI, 2007).

Outra maneira de se determinar os ácidos orgânicos em uma amostra é através da titulometria por determinação da acidez total titulável, onde se expressa a porcentagem do ácido orgânico correspondente através de um fator de correção. Na maçã utiliza-se um fator para o ácido málico, pois os demais ácidos orgânicos não chegam a atingir 5% do total, razão pela qual são usualmente negligenciados. O fundamento desta técnica consiste em adicionar o titulante (NaOH) sobre a amostra até que ela tenha sido neutralizada, visível pelo uso de um indicador ácido-base (IAL, 1985; TANNER; BRUNNER, 1985).

A quantificação dos compostos fenólicos totais em alimentos utiliza técnicas espectrofotométricas, tais como o Folin-Ciocalteau, o Folin-Denis e o método Azul da Prússia. O Folin-Denis é um método muito utilizado em bebidas e foi modificado por Swain e Hillis, em 1959, a fim de padronizá-lo como análise de rotina nos laboratórios. Esta técnica fundamenta-se na ação redutora dos fenóis sobre o reagente de Folin-Denis (ácido fosfomolibdato-fosfotungstato) até formação de um complexo de coloração azul, em presença de solução alcalina. O método Azul da Prússia, descrito por Price e Butler em 1977, foi inicialmente utilizado em grãos e baseia-se na capacidade redutora dos compostos fenólicos sobre o íon férrico com formação do complexo ferrocianido-ferroso, também chamado Azul da Prússia. Já o Folin-Ciocalteau, método descrito por Singleton et al. (1999) e AOAC (1965), fundamenta-se na capacidade do fosfomolibdato e tungstato em formar subespécies azuis quando reduzidas pelos polifenóis, cuja absorbância é medida em espectrofotômetro na região do visível (LAMUELA-RAVENTOS et al., 2004; ROESLER et al., 2007; SHAHIDI; NACZK, 2004).

Quando se pretende determinar as classes dos compostos fenólicos, as técnicas cromatográficas são, evidentemente, importantes e muito utilizadas em pesquisas científicas. Um exemplo disso é a CLAE que permite identificar e quantificar, simultaneamente, esses compostos em diversos alimentos. A Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido sem uso de adsorvente, que vem sendo utilizada para fracionar os compostos fenólicos. Outras técnicas cromatográficas também podem ser utilizadas para purificação e separação de fenóis em alimentos, tais como a Cromatografia em Papel (CP), a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Gasosa (CG) (MCGUIE; HUNT; BARNETT, 2005; SHAHIDI; NACZK, 2004).

Outras estratégias metodológicas para a determinação de compostos fenólicos são os métodos eletroquímicos (Voltametria Cíclica e Cromatografia Líquida/Eletroquímica), a Eletroforese Capilar (que auxilia na separação das classes dos fenóis baseada na migração eletroforética dos analitos carregados) e a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que permite detectar a ocorrência de sinais de ressonância típicos dos compostos fenólicos (MARASCHIN et al., 2003; SCHIEBER et al., 2003; SHAHIDI; NACZK, 2004).

2.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA

A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de números de onda entre 14.290 e 200 cm^{-1}. A região que apresenta número de ondas entre 4000 – 400 cm^{-1} é a mais comumente utilizada pela química orgânica, sendo denominada infravermelho médio. A região chamada infravermelho próximo, 14.290 a 4000 cm^{-1}, tem recebido, recentemente, muita atenção, em particular com relação a análises quantitativas de amostras com matrizes complexas (BARBOSA, 2007).

A espectroscopia no infravermelho determina grupos funcionais de uma amostra, sendo que cada grupo absorve em freqüência característica. Essas freqüências apresentam vibrações específicas, que podem ser de estiramento ou de deformação, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Os espectros no infravermelho podem ser obtidos a partir de amostras sólidas, liquidas e gasosas, e a qualidade desses espectros depende do método de preparo da amostra e do tipo de acessório utilizado para sua obtenção. Os métodos mais empregados envolvem transmitância e refletância, sendo este último muito utilizado para análises qualitativas e quantitativas. O método por refletância pode apresentar acessórios para obtenção de espectros por Refletância Total Atenuada (ATR), Refletância Especular e Refletância Difusa (SKOOG et al., 2002).

A técnica que utiliza a refletância difusa é conhecida como DRIFTS (*Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), ocorrendo em 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. É importante salientar que a energia, na refletância difusa, é atenuada após entrar em contato diversas vezes com as partículas da amostra, fornecendo muitas informações analíticas (CORDEIRO, 2006).

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 ótico da luz pode ser variável, enquanto que no espectro de transmissão ele é constante para todo o comprimento de onda, o que torna as intensidades relativas das bandas diferentes (SKOOG et al., 2002).

Na refletância difusa também se observa a refletância especular, que é de maior intensidade na região onde a amostra apresenta elevada absorção e, por isso, podem ocorrer distorções nos espectros obtidos. As energias absorvidas pelas moléculas da amostra fornecem informações qualitativas, enquanto que a concentração dos compostos em estudo não é completamente proporcional à intensidade espectral, sendo necessário utilizar funções e fórmulas complexas para este fim, como é o caso da função de Kubelba-Munk (Equação 5). Esta equação é utilizada para definir uma afinidade linear entre a intensidade da banda e a concentração da amostra (FERRÃO, 2001).

$$f(R\alpha) = (1 - R\alpha)^2 / 2\,R\alpha \qquad \text{(Equação 5)}$$

Onde: $R\alpha$ é a refletância 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 6.

$$f(R\alpha) = K / S \qquad \text{(Equação 6)}$$

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

Porém, em muitas aplicações de espectroscopia por refletância difusa as características da amostra não seguem a suposição feita pela equação de Kubelka-Munk, pois a equação foi derivada para absorções fracas, sendo, então, mais aplicada para amostras diluídas (FERRARINI, 2004).

2.5 QUIMIOMETRIA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A quimiometria é definida como uma disciplina da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e lógica formal, a fim de selecionar os melhores procedimentos experimentais, fornecer a máxima informação química relevante através da análise dos dados e obter conhecimento sobre os sistemas químicos (HOPKE, 2003).

Dentre as várias áreas de atuação, a calibração multivariada é aquela que permite determinar um componente de interesse em matrizes complexas ou analisar, simultaneamente, vários componentes em sistemas mais simples, mesmo sob ocorrência de interferência espectral. A base da calibração multivariada é, portanto, estabelecer uma relação entre duas matrizes de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

A calibração multivariada consiste, basicamente, de duas fases: a calibração e a previsão. Na fase de calibração, "n" espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em "p" valores de comprimento de onda diferentes, formando uma matriz **Xcal**, com "n" linhas e "p" colunas. Também uma matriz **Ycal** com os valores de concentração, pode ser formada contendo "n" linhas (relacionadas as diferentes amostras) e "q" colunas (indicando o número de diferentes analitos de interesse presentes nas amostras) (FERREIRA et al., 1999).

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado (determinando o vetor dos coeficientes de regressão – **b**) que melhor possa reproduzir **Ycal** a partir dos dados da matriz **Xcal** (Equação 7). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (Equação 8). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator Y da Equação 7 para obtenção da Equação 8, implica na utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, $\mathbf{(Xteste)^t}$ (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

$$\mathbf{Xcal = b \,.\, Ycal} \qquad \text{(Equação 7)}$$

$$\mathbf{Yteste = (Xteste)^t \,.\, b} \qquad \text{(Equação 8)}$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme ilustra a Figura 1. Os valores de absorbância dos espectros, a cada comprimento de onda, correspondem as

variáveis independentes, e as concentrações das amostras indicam as variáveis dependentes (TOZETTO, 2005).

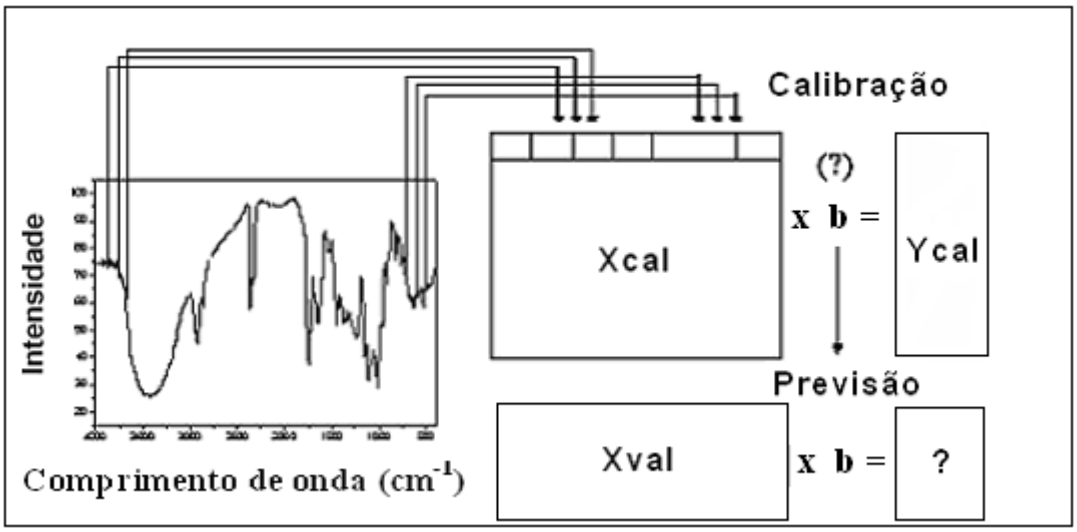


FIGURA 1 – Organização dos dados para calibração multivariada.

Dentre as várias metodologias para determinar o vetor do coeficiente de regressão (**b**), pode-se citar a Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), baseada na Análise de Componentes Principais (PCA), que decompõe a matriz das variáveis independentes **Xcal** (Equação 9) e a matriz das variáveis dependentes **Ycal** (Equaçao 10) em um novo sistema de eixos (denominados componentes principais, variáveis latentes ou fatores), representando as amostras em um menor número de dimensões, sem perda de informação analítica relevante. As novas coordenadas da amostra são denominadas de "scores" (**T** ou **U**) e o peso que cada variável antiga contribui para formar as componentes principais é chamado de "loadings" (**P** ou **Q**). Posteriormente, realiza-se uma relação entre as duas matrizes de "scores" (Equação 11), das variáveis dependentes e independentes, através de um modelo linear (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

$$\mathbf{Xcal = TP' + E} \qquad \text{(Equação 9)}$$

$$\mathbf{Ycal = UQ' + E} \qquad \text{(Equação 10)}$$

$$\mathbf{U = b \,.\, T} \qquad \text{(Equação 11)}$$

A escolha do número de variáveis latentes suficientes para explicar toda a informação analítica necessária, bem como, a detecção de amostras anômalas com sua subseqüente retirada (essas amostras apresentam um comportamento espectral diferenciado da média, e podem distorcer o modelo construído) constituem os principais fatores de análise para a correta obtenção do vetor **b,** o qual é utilizado para realizar as previsões das concentrações de novas amostras através de seus respectivos dados espectrais (empregando-se a Equação 8) (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

De acordo com Ferrão (2001), a escolha do número adequado de variáveis latentes ocorre no ponto onde há o menor erro de previsão. A adição de um maior número de variáveis latentes aumenta a complexidade do modelo e pode resultar em uma super estimativa dos dados, comprometendo a etapa de previsão da concentração das amostras. A metodologia da validação cruzada é utilizada para auxiliar na escolha do número de variáveis latentes com base na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um determinado modelo de calibração.

A detecção de amostras anômalas ou "outliers" é uma etapa tão importante quanto a determinação do número de variáveis latentes, e ocorre com o auxílio de duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de *Student*. A *leverage* é uma medida de influência de uma amostra no modelo de regressão e pode ser interpretada como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados, sendo seu valor limite obtido pela Equação 12 (onde $\boldsymbol{k}$ é igual ao número de variáveis latentes e $\boldsymbol{n}$ ao número de amostras do conjunto de calibração). Já os resíduos de *Student* indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, para isto seu valor limite é de ±2,5%. Portanto, a análise do gráfico dos resíduos de *Student versus leverage* para cada amostra é a melhor maneira de se identificar possíveis anomalias (FERREIRA et al., 1999).

$$\textit{leverage} = 3 \cdot k / n \qquad \text{(Equação 12)}$$

Para melhorar a eficiência dos modelos multivariados por Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), alguns procedimentos de transformação e/ou pré-processamento de dados são empregados. Os métodos matemáticos de transformação de dados são orientados nas linhas da matriz independente (Xcal) e os procedimentos de pré-processamento orientam-se nas colunas das matrizes de dados independente (Xcal) e dependente (Ycal).

Dentre os métodos de transformação de dados utilizados pode-se citar:

- Primeira derivada: faz a compensação do aumento da linha de base e melhora 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 o 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.

- Alisamento ou *Smooth*: esta transformação tem a finalidade de reduzir os ruídos espectrais, através da utilização do algoritmo de Savitzky-Golay.

- Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC): auxilia na correção das variações do espalhamento de luz ocasionadas pelas medidas de refletância difusa. Para cada amostra o espalhamento é estimado em relação ao de uma amostra de referência (neste estudo, a média dos 47 espectros do conjunto de calibração) e cada espectro é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra referência. Essa correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda, ignorando-se variações devidas a variações químicas.

- Normalização: reduz o efeito das diferenças de caminho óptico das amostras, normalizando a escala do espectro através da divisão de cada intensidade espectral pela raiz quadrada da soma dos quadrados de todas as intensidades do espectro correspondente, ou seja, multiplica cada elemento no vetor linha por uma constante B, conforme Equação 13 (FERRARINI, 2004):

$$B = \frac{1}{\left(\sum_{j=i}^{p} Xij^2 \right)^{1/2}} \qquad \text{(Equação 13)}$$

Com relação aos procedimentos de pré-processamento podem-se citar Dados Centrados na Média e Autoescalamento, que são os métodos mais empregados em dados espectroscópicos e têm como objetivo facilitar a extração de informações espectrais, bem como, interpretação desses dados. O pré-processamento de Dados Centrados na Média calcula a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrai cada intensidade do respectivo valor médio. Já o

Autoescalamento tem por base centrar os dados na média e dividi-los pelo respectivo desvio padrão (um para cada comprimento de onda) (FERREIRA, 1999).

Para selecionar um bom modelo de calibração, métodos de validação são usualmente empregados. A metodologia de validação cruzada ou validação interna avalia os dados do conjunto de calibração através da remoção de uma amostra (sistema *leave-one-out*) ou de um conjunto de amostras (sistema *venetian blinds*), sendo reservada(s) como elemento(s) de previsão. Este processo é repetido *n* vezes, de maneira a permitir que todas as amostras da calibração participem como elementos de previsão (CORDEIRO, 2006).

Sendo a validação cruzada uma metodologia de auxílio para a escolha do número de variáveis latentes, a seleção do melhor modelo de calibração ocorre através da avaliação dos menores erros de previsão (Erro Padrão Relativo, RMSEC e RMSECV).

O Erro Padrão Relativo (Er) é uma medida de erro dada em porcentagem, obtido através da Equação 14:

$$\%Er = ((y \times 100) / y') - 100 \qquad \text{(Equação 14)}$$

Onde *y* é o valor previsto e *y'* o experimental

Já a Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Calibração (RMSEC) e a Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Validação Externa (RMSECV) são importantes medidas obtidas no processo de validação cruzada do tipo *venetian blinds*, onde o gráfico é fornecido em função do número de Variáveis Latentes, protegendo contra uma superestimativa na calibração dos dados. A fórmula para obtenção do RMSEC ou RMSECV pode ser visualizada na Equação 15.

$$\text{RMSEC ou RMSECV} = \left(\sum_{i=1}^{n} \left(y' - y \right)^2 \right) / n \Bigg)^{1/2} \qquad \text{(Equação 15)}$$

Além desses parâmetros de erros, que auxiliam na escolha dos modelos de calibração, a análise dos valores dos coeficientes de correlação (R), entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais, permite avaliar a capacidade de previsão dos modelos multivariados.

A metodologia multivariada PLSR apresenta a vantagem de não restringir ao número de comprimentos de onda para a calibração, possibilitando extrair o maior número de informações

do espectro; a presença de interferentes (ruídos experimentais, colinearidade e não linearidade) nem sempre influi na calibração e requer somente a concentração do analito de interesse e, além disso, é uma técnica robusta, ou seja, seus parâmetros praticamente não são alterados com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (FERREIRA et al., 1999; RAMBLA; GARRIGUES; GUARDIA, 1997).

2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E REGRESSÃO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS

Uma das primeiras aplicações da espectroscopia no infravermelho, como ferramenta analítica, foi durante o período da Segunda Guerra Mundial, onde já se sabia que os espectros armazenavam uma gama de informações sobre a amostra e apresentavam um elevado potencial para serem empregados nos mais diversos tipos de análises químicas e/ou físicas. Porém era praticamente impossível extrair informações quantitativas dos espectros e, por este motivo, a espectroscopia no infravermelho restringia-se a aplicações qualitativas ou para reforçar hipóteses sobre a estrutura química das espécies (COSTA FILHO; POPPI, 2002).

Nos meados dos anos oitenta, com o desenvolvimento da microeletrônica e popularização dos microcomputadores, houve um significativo avanço nas análises instrumentais possibilitando a aquisição de um grande número de dados de uma mesma amostra. Entretanto, a modelagem desses dados tornou-se mais complexa e só foi solucionada com a aplicação de técnicas quimiométricas, as quais contribuíram para a utilização da espectroscopia como ferramenta de análise em aplicações qualitativas e quantitativas na química analítica (COSTA FILHO; POPPI, 2002).

Como técnica de análise quantitativa para o controle de alimentos e produtos industrializados, a espectroscopia no infravermelho obteve crescimento após o advento da Transformada de Fourier e a utilização do interferômetro de Michelson, o que tornou o método mais rápido e robusto (SALIBA et al., 2003).

A região do infravermelho médio e as técnicas de refletância para análises em alimentos vêm sendo amplamente utilizadas desde o início dos anos noventa. Nesta década, inúmeros estudos revelaram as aplicações da espectroscopia na análise de leite, carne, óleos, gorduras e

frutas, avaliando aspectos quantitativos e qualitativos, bem como, para obtenção de certificação da qualidade. Já a utilização da espectroscopia no infravermelho próximo é consagrada desde o início da década de sessenta, no qual um método foi proposto para determinar umidade em sementes (FERRÃO et al., 2004).

Há, portanto, um vasto número de trabalhos utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho em conjunto com métodos de calibração multivariada, tais como o PLSR, com diversos propósitos. Este acentuado crescimento e aperfeiçoamento nos últimos anos revelam o contínuo interesse por métodos analíticos rápidos, não destrutivos e invasivos e que não gerem subprodutos químicos tóxicos.

Morgano et al. (2007) utilizaram a espectroscopia no infravermelho próximo para quantificar açúcar total em amostras de café cru a partir do método de regressão PLSR. O modelo analítico proposto permitiu a determinação de açúcar total com erros de previsão menores que 8% em relação à metodologia convencional de Munson-Walker.

A potencialidade do método PLSR, através de dados espectrais na região do infravermelho médio, para a quantificação de açúcares em sucos de fruta, tem sido reportada em muitos estudos. Duarte et al. (2002), propuseram um modelo de regressão para indicar o grau de maturação da manga em função dos teores de glucose, frutose e sacarose. Os resultados permitiram uma boa correlação com o estágio de amadurecimento da fruta, o que auxiliará na detecção de um super amadurecimento em frutas frescas e na previsão da estabilidade no transporte e no armazenamento.

A utilização do infravermelho próximo para quantificar açúcares em sucos de maçã e laranja foi estudada por Rodriguez-Saona et al. (2001). Esses autores elaboraram modelos de calibração (PLSR) independentes para as técnicas de refletância, transflectância e transmitância, sendo que esta última mostrou melhor reprodutibilidade na previsão da concentração de açúcares em sucos, com baixos desvios-padrão entre as replicatas.

Além dos açúcares (glucose, frutose e sacarose), os ácidos orgânicos (ácidos cítrico e málico) presentes nos alimentos também podem ser determinados pela espectroscopia no infravermelho, como demonstra um estudo realizado por Li; Goovaerts e Meurens (1996), em suco de laranja. Os espectros do suco, sob a forma de extrato seco, foram obtidos na região do infravermelho próximo, sendo que o método de calibração PLSR forneceu ótimos resultados.

Estudos na região do infravermelho médio, para determinar a concentração de açúcares e ácidos orgânicos em sucos de fruta, tendo como método de referência a Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (CLAE), foram relatados na literatura. O método PLSR propiciou boas correlações entre os dados espectrais e as determinações de interesse (DUPUY et al., 1992; IRUDAYARAJ; TEWARI, 2003).

Morgano; Moriya e Ferreira (2003) empregaram a técnica de espectroscopia no infravermelho, com acessório de refletância total atenuada (ATR), para quantificar a concentração de sacarose em amostras de açúcar cristal de 20 diferentes usinas. A região do infravermelho médio, situada entre 1400 e 870 cm^{-1} foi utilizada para obtenção dos modelos de regressão pelo método PLSR e os resultados foram comparados com o método de referência da polarimetria. O modelo multivariado permitiu prever a concentração de sacarose com erros médios relativos de 0,34% e erro padrão de previsão de 0,021 g/100 mL.

A presença de adulterantes em alimentos também pode ser monitorada pela espectroscopia no infravermelho em associação com métodos de calibração multivariada. O método PLSR auxiliou na obtenção dos modelos de regressão, na região do infravermelho médio, para quantificar os açúcares de beterraba e invertido, considerados adulterantes no suco de maçã. O coeficiente de correlação (R) encontrado foi de 0,98 e os erros de validação foram menores que 2% (SIVAKESAVA; IRUDAYARAJ; KORACH, 2001).

Shahidi e Naczk (2004) relatam alguns estudos envolvendo a identificação e a quantificação de compostos fenólicos em alimentos por espectroscopia no infravermelho e métodos de calibração multivariada, tais como a discriminação de vinhos tintos utilizando o infravermelho médio e técnicas quimiométricas, emprego da análise multivariada para estabelecer uma correlação entre polifenóis e a atividade antioxidante em vinhos, quantificação de fenóis em folhas de chá verde através da espectroscopia no infravermelho próximo e método PLSR, dentre outros.

Além de determinar carboidratos e ácidos orgânicos, a técnica da espectroscopia no infravermelho, associada a métodos multivariados de análise, possibilita a determinação de proteína, cinzas, fibras, extrato etéreo, resíduo mineral e umidade, com rapidez e segurança, em diferentes tipos de alimentos (FERRÃO et al., 2004; FERRARINI, 2004; GUCHARDI, 2000; LEMONS e SILVA et al., 2006; MORGANO et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos de calibração multivariada (PLSR) para viabilizar as determinações de açúcares simples (frutose, glucose e sacarose), acidez total titulável (expressa em % m/m de ácido málico) e compostos fenólicos totais em amostras de bagaço de maçã, utilizando-se Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Difusa (DRIFTS).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar açúcares simples (frutose, glucose e sacarose), acidez total titulável (expressa em % m/m de ácido málico) e compostos fenólicos totais no bagaço de maçã desidratado, através de metodologias convencionais;
- Desenvolver modelos de calibração multivariada (PLSR) utilizando-se espectroscopia no infravermelho por refletância difusa nas regiões do infravermelho médio (MID) e próximo (NIR);
- Testar a capacidade de previsão dos modelos de calibração multivariada (PLSR) desenvolvidos;
- Validar os modelos de calibração multivariada (PLSR) a partir da metodologia de validação cruzada;
- Prever as concentrações dos analitos de interesse, do conjunto de validação externa, através da comparação dos modelos de calibração multivariada com as metodologias convencionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Neste trabalho foram utilizadas 26 amostras de maçãs (incluindo variedades comerciais e experimentais) cedidas pela EPAGRI, do município de Caçador – SC (safras 2004 – 2005 e 2006 - 2007), e outras adquiridas no comércio local (safra 2005 – 2006), conforme ilustra a Tabela 3. As amostras M 13/00, M11/00 Agric., M11/00, M12/00, M6/00, MRC11/95, M8/01, M11/01 e M2/01 estão em fase de avaliação agronômica e com possibilidade de serem colocadas no comércio.

TABELA 3 – Amostras utilizadas durante o estudo.

Amostras	Variedades	Procedências	Safras
1	M13/00	EPAGRI	2004 – 2005
2	M11/00 Agric.	EPAGRI	2004 – 2005
3	M11/00	EPAGRI	2004 – 2005
4	M12/00	EPAGRI	2004 – 2005
5	M6/00	EPAGRI	2004 – 2005
6	MRC11/95	EPAGRI	2004 – 2005
7	M8/01	EPAGRI	2004 – 2005
8	M11/01	EPAGRI	2004 – 2005
9	M2/01	EPAGRI	2004 – 2005
10	Joaquina	EPAGRI	2004 – 2005
11	Catarina	EPAGRI	2004 – 2005
12	Eva	EPAGRI	2004 – 2005
13	Caricia	EPAGRI	2004 – 2005
14	Condessa	EPAGRI	2006 - 2007
15	Sansa	EPAGRI	2006 - 2007
16	Daiane	EPAGRI	2006 - 2007
17	Imperatriz	EPAGRI	2006 - 2007
18	Mollies	EPAGRI	2006 - 2007
19	Fuji	EPAGRI	2006 – 2007
20	Gala	EPAGRI	2006 – 2007
21	Golden	EPAGRI	2006 – 2007
22	Star Red (Argentina)	Comércio local	2005 – 2006
23	Gala	Comércio local	2005 – 2006
24	Fuji	Comércio local	2005 – 2006
25	Granny Smith	Comércio local	2005 – 2006
26	Golden	Comércio local	2005 – 2006

4.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes e equipamentos utilizados estão apresentados na Tabela 4. Vale ressaltar que todos os reagentes empregados para preparo de soluções ou para uso direto nas análises químicas são de grau analítico PA. Todas as soluções foram preparadas com água destilada, padronizadas conforme necessidade, e utilizando-se material volumétrico.

TABELA 4 – Reagentes e equipamentos utilizados nas diversas etapas do presente estudo.

Etapa	Reagente (s)	Equipamento (s)
Processamento da maçã para obtenção do bagaço	_	Multiprocessador (Metvisa), Prensa hidráulica (capacidade de 15 toneladas), Centrífuga, Estufa com circulação de ar (Tecnal TE 394/2), Liquidificador, Peneira (60 Mesh ou 250 µm).
Determinação da concentração de glucose	Padrão de glucose (50 $\mu g.mL^{-1}$), Kit enzimático-colorimétrico da Gold Analisa Diagnostica.	Balança analítica (BG 400 Gehaka), Centrífuga (CELM COMBATE – Tecnal), Espectrofotômetro UV-Vis (1240 – Shimadzu).
Determinação da concentração de frutose	Padrão de glucose (150 $\mu g.mL^{-1}$), Reativo de Somogyi e Nelson.	Balança analítica (BG 400 Gehaka), Centrífuga (CELM COMBATE – Tecnal), Espectrofotômetro UV-Vis (1240 – Shimadzu).
Determinação da concentração de sacarose	Padrão de glucose (150 $\mu g.mL^{-1}$), Reativo de Somogyi e Nelson, HCl concentrado, Solução de NaOH 30%.	Balança analítica (BG 400 Gehaka), Centrífuga (CELM COMBATE – Tecnal), Espectrofotômetro UV-Vis (1240 – Shimadzu).
Determinação da concentração de ácido málico	Solução de NaOH 0,01 $mol.L^{-1}$, Biftalato de potássio (para padronizar a solução de NaOH) , Fenolftaleína.	Balança analítica (BG 400 Gehaka), Centrífuga (CELM COMBATE – Tecnal).
Determinação da concentração de fenóis totais	Padrão de catequina (400 $\mu g.mL^{-1}$), Solução extratora (álcool, água destilada e ácido fórmico), Reativo de Folin-Ciocalteau filtrado, Solução saturada de Na_2CO_3 20%.	Balança analítica (BG 400 Gehaka), Centrífuga (CELM COMBATE – Tecnal), Freezer (Continental 470), Espectrofotômetro UV-Vis (1240 – Shimadzu).
Análise de espectroscopia no infravermelho	_	Espectrofotômetro Excalibur (modelo FTS 4000 – Bio-Rad).
Análise multivariada	_	Programa PLS-Toolbox 3.0, que opera em ambiente Matlab 6.5.

4.3 METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As maçãs foram processadas a nível laboratorial, conforme descrito por Wosiacki et al. (1989) e esquematizada na Figura 2.

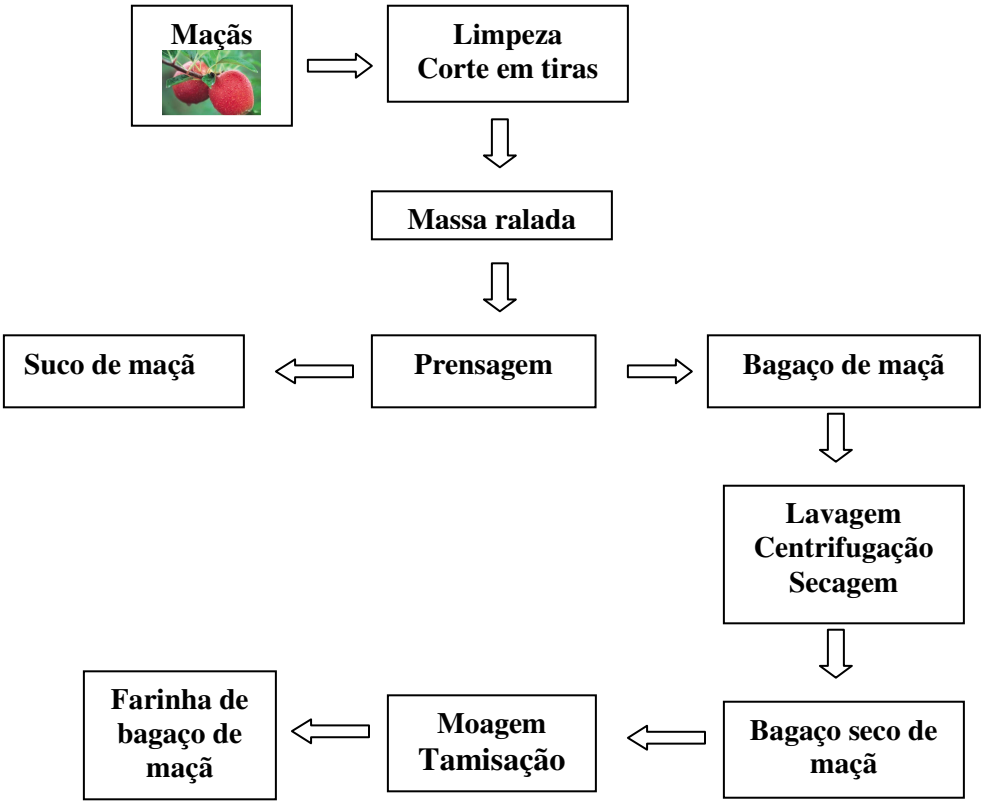


FIGURA 2 – Fluxograma de processamento da maçã

As maçãs inteiras foram lavadas e, com o auxílio de um multiprocessador, cortadas em tiras, resultando em uma massa ralada que foi acondicionada em cartuchos de tela plástica e prensada sob uma pressão de três toneladas por dez segundos. Neste processo obtém-se o suco varietal e o bagaço da maçã, com uma quantidade apreciável de sólidos totais.

O bagaço obtido foi acondicionado em sacos de algodão e esses foram imersos em água para proceder à etapa de lavagem (com auxilio de um béquer, foram adicionados 1 litro de água para cada quilograma de bagaço fresco e este permaneceu imerso por 2 minutos). Em seguida, o

bagaço foi centrifugado para auxiliar na remoção do excesso de água e facilitar a etapa de secagem, feita em estufa com circulação de ar, na temperatura de 60ºC até peso constante e umidade menor que 12%. O produto final desta etapa, denominado bagaço seco de maçã, foi homogeneizado e moído em liquidificador com sua posterior tamisação em peneira de 60 Mesh (250 μm), para obtenção da farinha de bagaço de maçã, que foi envasada em frascos de vidro, hermeticamente fechados, e armazenada a temperatura ambiente sob proteção da luz solar.

4.4 ANÁLISES QUÍMICAS CONVENCIONAIS

Com a finalidade de otimizar o processo de extração de açúcares simples (empregando-se a metodologia para açúcares redutores de Somogyi e Nelson) na farinha de bagaço de maçã, um planejamento experimental completo foi conduzido utilizando-se 2 níveis para os 4 fatores em estudo (Tabela 5), totalizando 16 ensaios analisados em triplicata.

Para conduzir este planejamento foi escolhida a variedade M13/00 e em todos os ensaios foi utilizado 1 grama da referida amostra. Vale ressaltar que as frações solúveis, obtidas após centrifugação da mistura amostra e água destilada, é que foram empregadas para a quantificação dos açúcares redutores.

TABELA 5 – Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental 2^4

	Fatores			
	Temperatura da água (ºC)	Granulometria da farinha (Mesh / micrômetro)	Volume de água (mL)	Tempo de agitação (s)
Níveis (-)	20	80 / 180	30	15
(+)	40	60 / 250	60	30

4.4.1 Determinação da concentração dos açúcares simples e da acidez total titulável (expressa em % (m/m) de ácido málico)

A amostra foi pesada em balança analítica (1,000 g) e homogeneizada em água destilada (a 40ºC) por 15 minutos, sendo centrifugada. A porção solúvel foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com água destilada, e utilizada nas determinações de frutose, glucose, sacarose e ácido málico na farinha de bagaço de maçã.

a) Determinação da concentração de frutose

A partir da fração solúvel recuperada em balão volumétrico de 100,0 mL, foram retiradas alíquotas para as diluições (cada amostra apresentou diluições específicas conforme concentração de frutose presente), seguindo-se como parâmetro uma curva de calibração de até 150 $\mu g.mL^{-1}$ de glucose (as diluições para obtenção da curva de calibração foram 150, 125, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu g.mL^{-1}$ de glucose). Após as diluições procedeu-se à análise a partir do método químico colorimétrico de Somogyi e Nelson, descrito por Somogyi (1952), fazendo a amostra reagir com os reativos para sua posterior medição em espectrofotômetro a 520 nanômetros. A obtenção da concentração de frutose (em % (m/m)) ocorre a partir da diferença entre açúcares redutores e a concentração de glucose obtida pelo método enzimático-colorimétrico.

b) Determinação da concentração de glucose

A fração solúvel retida no balão volumétrico de 100,0 mL foi utilizada para as diluições (cada amostra apresentou diluições especificas conforme concentração de glucose presente), seguindo-se como parâmetro uma curva de calibração de até 50 $\mu g.mL^{-1}$ de glucose (as diluições para obtenção da curva de calibração foram 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu g.mL^{-1}$ de glucose). O método empregado para a determinação de glucose (em % (m/m)) foi o enzimático-colorimétrico, descrito por Bergmeyer e Bernt (1974), sendo o açúcar medido em espectrofotômetro a 520 nanômetros.

c) Determinação da concentração de sacarose

A quantificação da sacarose na farinha de bagaço de maçã foi realizada pelo método químico colorimétrico de Somogyi e Nelson, descrito por Somogyi (1952), que determina a concentração de açúcares redutores totais após hidrólise ácida da porção solúvel presente no balão volumétrico de 100,0 mL. Para esta etapa, foram adicionados 50 mL de água destilada e 25,00 mL da amostra, que após atingirem a temperatura de 65ºC (em banho de água fervente) foram hidrolisados com 5 mL de HCl concentrado, permanecendo neste banho por 5 minutos entre 65 e 70ºC. Após este tempo, a amostra foi resfriada e com o auxílio de uma pipeta adicionou-se NaOH 30% até atingir pH básico. Esta fração foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com água destilada, para posteriores diluições (cada amostra apresentou diluições especificas conforme concentração de açúcares

totais presentes), seguindo-se como parâmetro uma curva de calibração de até 150 $\mu g.mL^{-1}$ de glucose (as diluições para obtenção da curva de calibração foram 150, 125, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu g.mL^{-1}$ de glucose). Após as diluições procedeu-se à técnica de análise, fazendo a amostra reagir com o reativo de Somogyi e Nelson para posterior medição em espectrofotômetro a 520 nanômetros. A obtenção da concentração de sacarose (em % (m/m)) ocorre a partir da diferença entre os teores de açúcares redutores totais e açúcares redutores.

d) Determinação da acidez total titulável (expressa em % (m/m) de ácido málico)

O método titulométrico, descrito por Tanner e Brunner (1985) e IAL (1985), foi empregado para a determinação da acidez total titulável (expressa em % (m/m) de ácido málico), utilizando-se a fração solúvel retida no balão volumétrico de 100,0 mL. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram transferidos 10,00 mL da amostra para um erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada e indicador fenolftaleina. A titulação foi realizada com uma solução padronizada de NaOH 0,01 $mol.L^{-1}$, anotando-se o volume gasto para posterior quantificação do ácido málico, através do fator de correção 0,67 (este fator está relacionado com o equivalente-grama do ácido málico).

4.4.2 Determinação da concentração de compostos fenólicos totais

A extração dos compostos fenólicos totais foi realizada conforme método descrito por McGhie; Hunt e Barnett (2005), e a posterior determinação destes compostos (em $mg.L^{-1}$) foi feita pelo método químico colorimétrico descrito por Singleton et al. (1999) e AOAC (1965). Para esta análise pesou-se, 1,000 g de farinha de bagaço de maçã em tubo de centrífuga, com auxílio de balança analítica, e foram adicionados 10,00 mL de solução extratora (esta solução contém álcool etílico 70%, água destilada e ácido fórmico, na proporção de 80:20:1, respectivamente). Esta mistura permaneceu em freezer por cerca de 20 horas, sendo em seguida centrifugada para recuperar todo o sobrenadante, que foi transferido para um balão volumétrico de 25,00 mL, completando-se o restante do volume com água destilada. Em continuidade, procedeu-se a técnica de fenóis totais fazendo a amostra reagir com o reativo de Folin-Ciocalteau e com a solução saturada de Na_2CO_3 20%, para sua posterior medição em espectrofotômetro a 720 nanômetros. Esta determinação teve como parâmetro uma curva de calibração de até 400

$\mu g.mL^{-1}$ de catequina (as diluições para obtenção da curva de calibração foram 400, 300, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu g.mL^{-1}$ de catequina).

4.5 ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro da série Excalibur BIORAD, FTS-4000, equipado com acessório de refletância difusa na região entre 7000 e 400 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1}, sendo acumuladas 128 varreduras.

Para a montagem das matrizes de dados espectrais e de concentração dos analitos de interesse utilizou-se o software Origin Pro 6.1®, enquanto que para a elaboração dos modelos empregou-se o pacote PLS-Toolbox 3.0, que opera em ambiente Matlab 6.5.

4.5.1 Seleção das amostras

A análise espectral das 26 amostras de farinha de bagaço de maçã foi conduzida em duplicata, totalizando 52 espectros em valores de porcentagem de refletância (%R). A seleção das amostras para os conjuntos de calibração e validação externa teve como parâmetro a obtenção de conjuntos homogêneos e representativos das determinações analisadas. Para a fase de calibração trabalhou-se com 47 espectros e para a fase de validação externa, 5 espectros correspondentes a 5 amostras de farinha de bagaço de maçã distintas.

4.5.2 Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados

Para a construção dos modelos de regressão multivariados foram utilizados os 47 espectros da farinha de bagaço de maçã e os valores médios dos teores de frutose, glucose, sacarose, ácido málico e compostos fenólicos totais.

Os espectros gerados foram organizados na região do infravermelho médio (MID) e próximo (NIR), eliminando-se regiões de baixa razão sinal/ruído. Posteriormente, um processo de

seleção de variáveis baseado em dados de correlação foi utilizado na tentativa de otimizar os modelos multivariados de calibração.

O correlograma é obtido calculando-se o coeficiente de correlação linear (*r*) entre as variáveis independentes (matriz espectral) e cada uma das variáveis dependentes (matriz de concentração dos analitos de interesse) de modo que no final do processo se tem para cada variável independente um valor associado a *r*, que ao serem dispostos em um gráfico geram o correlograma (MORGANO et al., 2007). A escolha do melhor valor de corte está baseada nas análises das menores médias de erro padrão relativo, das amostras do conjunto de validação externa, em função do número de Variáveis Latentes (VLs).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO VIA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os resultados da otimização via planejamento experimental estão ilustrados na Tabela 6, com os valores médios da concentração de açúcares redutores, obtidos pelas triplicatas de cada ensaio, o que possibilitou o cálculo do desvio do efeito para este planejamento.

TABELA 6 – Resultados da otimização via planejamento experimental 2^4

Ensaios	Granulometria (µm)	Tempo de agitação (min.)	Volume de água (mL)	Temperatura da água (ºC)	Concentração de açúcares redutores (% m/m)
1	-	-	-	-	26,9
2	+	-	-	-	28,2
3	-	+	-	-	27,5
4	+	+	-	-	28,9
5	-	-	+	-	27,5
6	+	-	+	-	28,8
7	-	+	+	-	26,6
8	+	+	+	-	28,4
9	-	-	-	+	27,3
10	+	-	-	+	29,6
11	-	+	-	+	27,6
12	+	+	-	+	29,3
13	-	-	+	+	27,9
14	+	-	+	+	28,8
15	-	+	+	+	27,7
16	+	+	+	+	30,2

Os resultados da otimização mostram que os efeitos significativos, com 95% de confiança, foram granulometria (efeito de +1,6) e temperatura da água de homogeneização (efeito de +0,7), considerando-se o valor do desvio de 0,5. Sendo assim, quando a granulometria da farinha de bagaço de maçã passa de 180 para 250 µm, a extração dos açúcares redutores aumenta em 1,6%. Este efeito positivo nas partículas maiores da amostra deve-se, provavelmente, a concentração dos açúcares na superfície da farinha de bagaço de maçã. Assim, a diminuição do tamanho de partícula, ao invés de aumentar a extração, como esperado, pode provocar adsorção dos açúcares através da exposição de uma maior área superficial da amostra. Já quando a temperatura da água destilada passa de 20 para 40ºC esta extração aumenta em 0,7%.

Portanto, para todas as variedades de farinha de bagaço de maçã, procurou-se trabalhar com granulometria de 60 Mesh ou 250 µm e temperatura da água de homogeneização em 40ºC, durante a determinação dos açúcares simples (frutose, glucose e sacarose) e do ácido málico, já que para esta última determinação se aproveita a mesma fração solúvel.

A importância de se conduzir um planejamento experimental é enfatizada por Bruns; Scarminio e Barros Neto (1995), pois auxilia a planejar detalhadamente um experimento, promove uma redução dos custos operacionais das análises e garante que os resultados contenham informações relevantes para a solução do problema.

5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES QUÍMICAS CONVENCIONAIS

A Tabela 7 apresenta os resultados dos teores de frutose (% m/m), glucose (% m/m), sacarose (% m/m), ácido málico (% m/m) e compostos fenólicos totais ($mg.L^{-1}$), das 26 amostras de farinha de bagaço de maçã utilizadas neste estudo. Estes resultados representam os valores médios encontrados durante as análises, sendo que as determinações dos açúcares simples e do ácido málico foram feitas em triplicata, assim como a pesagem das amostras. A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada em triplicata e a pesagem em duplicata.

Nesta tabela também se encontram os intervalos (valores mínimo e máximo), bem como a média amostral de cada determinação. Vale ressaltar que a umidade das 26 amostras encontrava-se abaixo de 8% (IAL, 1985), sendo que o limite para conferir estabilidade físico-química é de até 12%, conforme descrito por Schemin (2003).

Com relação aos açúcares simples, a glucose representa a fração minoritária na fruta, onde a concentração média encontrada foi de 6,7% m/m, sendo o valor máximo de 12,4% m/m (variedade Fuji) e mínimo de 2,5% m/m (variedade Caricia), obtendo-se um coeficiente de variação da ordem de 35,0%. Isto era esperado, pois a maçã apresenta valores expressivos de frutose, com média de 23,0% m/m e valores máximo e mínimo de 31,0 (variedade Fuji) e 18,0% m/m (variedade Mollies), respectivamente, sendo que o coeficiente de variação encontrado foi de 14,0%, proporcionando um maior grau de homogeneidade das amostras.

A determinação da concentração de sacarose forneceu o maior coeficiente de variação, com 46,0%, indicando uma maior heterogeneidade das amostras em relação a este parâmetro. Os

valores máximo e mínimo obtidos foram de 24,0 (variedade M 12/00) e 3,4% m/m (variedade Star Red - Argentina), respectivamente. Paganini et al. (2004) também encontraram maior coeficiente de variação para a sacarose, indicando uma importante variação deste componente entre as cultivares.

TABELA 7 – Resultados dos teores de frutose, glucose, sacarose, ácido málico e compostos fenólicos totais encontrados nas amostras de farinha de bagaço de maçã.

Amostras	*Código	Frutose / **desvio	Glucose / **desvio	Sacarose / **desvio	Ácido málico/ **desvio	Fenóis totais / **desvio
Carícia	1 – C; 1 – V	19,9 ± 1,1	2,5 ± 0,2	21,0 ± 0,8	0,19 ± 0,003	4.484 ± 57,2
Daiane	2 – C; 3 – C	22,1 ± 0,9	5,8 ± 0,2	23,0 ± 1,6	0,08 ± 0,0001	4.597 ± 8,3
Fuji (Safra 06-07)	4 – C; 5 – C	18,0 ± 0,8	8,5 ± 0,1	3,8 ± 0,8	0,05 ± 0,0007	3.082 ± 43,3
Granny Smith	6 – C; 2 – V	21,0 ± 0,6	10,3 ± 0,2	5,5 ± 0,4	0,15 ± 0,003	3.954 ± 0,0
M 11/00 Agric.	7 – C; 3 – V	23,5 ± 0,4	5,9 ± 0,03	18,7 ± 0,7	0,08 ± 0,004	3.915 ± 33,4
M 12/00	8 – C; 9 – C	22,2 ± 0,1	5,3 ± 0,1	24,0 ± 1,1	0,09 ± 0,004	3.352 ± 37,5
M 6/00	10 – C; 11 – C	18,8 ± 0,2	4,8 ± 0,05	21,0 ± 0,4	0,07 ± 0,003	2.553 ± 41,7
Sansa	12 – C; 4 - V	23,5 ± 1,9	6,3 ± 0,08	16,8 ± 0,6	0,08 ± 0,002	4.394 ± 30,9
Condessa	13 – C; 14 – C	27,2 ± 2,6	3,9 ± 0,06	22,2 ± 0,8	0,07 ± 0,001	3.623 ± 4,2
Gala (Safra 06-07)	15 – C; 16 – C	22,2 ± 0,4	6,3 ± 0,2	9,4 ± 0,7	0,06 ± 0,0001	4.230 ± 44,4
Imperatriz	17 – C; 18 – C	24,5 ± 0,3	4,8 ± 0,1	17,9 ± 0,9	0,07 ± 0,003	5.834 ± 62,0
M 11/01	19 – C; 20 – C	20,7 ± 0,4	6,3 ± 0,2	19,9 ± 1,5	0,07 ± 0,004	1.836 ± 27,8
Mollies	21 – C; 22 – C	18,0 ± 0,4	5,9 ± 0,09	8,0 ± 0,3	0,05 ± 0,0001	5.771 ± 10,0
M 2/01	23 – C; 24 – C	24,6 ± 0,3	5,3 ± 0,04	16,0 ± 0,5	0,08 ± 0,004	5.329 ± 12,2
Joaquina	25 – C; 26 – C	25,1 ± 0,9	8,6 ± 0,03	14,0 ± 0,7	0,06 ± 0,001	4.770 ± 8,3
M 11/00	27 – C; 28 – C	23,3 ± 0,3	5,7 ± 0,1	17,2 ± 0,5	0,07 ± 0,002	3.310 ± 5,6
M 8/01	29 – C; 30 – C	24,2 ± 0,1	6,4 ± 0,05	14,2 ± 1,7	0,06 ± 0,0007	4.072 ± 44,5
Eva	31 – C; 32 – C	20,8 ± 0,2	3,2 ± 0,09	13,0 ± 0,3	0,12 ± 0,002	1.742 ± 70,9
Fuji	33 – C; 34 – C	31,0 ± 0,4	12,4 ± 0,2	5,4 ± 0,5	0,07 ± 0,001	3.962 ± 77,8
Gala	35 – C; 36 – C	28,6 ± 0,4	9,7 ± 0,2	11,7 ± 1,0	0,09 ± 0,001	4.794 ± 8,3
Golden	37 – C; 38 – C	28,3 ± 0,4	9,0 ± 0,06	5,3 ± 0,1	0,07 ± 0,001	4.946 ± 10,0
M 13/00	39 – C; 5 – V	21,7 ± 0,07	5,8 ± 0,1	21,8 ± 0,3	0,09 ± 0,0006	2.553 ± 0,0
MRC 11/95	40 – C; 41 – C	24,5 ± 0,5	6,5 ± 0,02	15,2 ± 0,8	0,10 ± 0,001	3.841 ± 4,2
Star Red (Argentina)	42 – C; 43 - C	22,6 ± 0,6	10,0 ± 0,2	3,4 ± 0,4	0,06 ± 0,003	4.536 ± 122,0
Catarina	44 – C; 45 – C	19,7 ± 0,8	5,4 ± 0,3	20,3 ± 0,6	0,08 ± 0,002	4.571 ± 16,7
Golden (Safra 06-07)	46 – C; 47 - C	27,0 ± 0,5	8,5 ± 0,08	5,6 ± 0,6	0,06 ± 0,0	4.838 ± 37,5
Intervalos		18,0-31,0	2,5-12,4	3,4-24,0	0,05-0,19	1.742-5.834
Média amostral		23,0	6,7	14,4	0,08	4.034
***** Desvio padrão**		3,4	2,3	6,7	0,03	1.065
****** C V (%)**		14,0	35,0	46,0	37,0	26,4

*Código, refere-se à numeração das amostras do conjunto de calibração (C) e de validação externa (V).

** Desvio padrão entre as replicatas.

*** Desvio padrão amostral: $s = \left(\sum \left(x_i - \bar{x}\right)^2 / n-1\right)^{1/2}$, somatória dos desvios em relação a média amostral, elevado ao quadrado, dividido pelo número de amostras menos um (CZELUSNIAKI et al., 2002).

**** C V: Coeficiente de variação amostral: (Desvio padrão amostral / Média amostral) x 100 (CZELUSNIAKI et al., 2002).

Os teores de ácido málico encontrados na farinha de bagaço da maçã obtiveram uma média de 0,08% m/m com coeficiente de variação de 37,0%, sendo o valor mínimo encontrado de 0,05% m/m (variedade Fuji safra 2006-2007) e máximo de 0,19% m/m (da variedade Carícia). Esta característica pode ser decorrente da variedade da fruta ou de um processo incompleto de maturação, conferindo uma acidez total elevada (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005).

A concentração de compostos fenólicos totais mostrou uma amplitude que vai desde 1.742 (variedade Eva) até 5.834 $mg.L^{-1}$ (variedade Imperatriz), com média de 4.034 $mg.L^{-1}$ e coeficiente de variação de 26,4%. São valores expressivos, visto que estes compostos apresentam atividade antioxidante contra o estresse oxidativo das células.

5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA

Os espectros no infravermelho do conjunto de calibração estão apresentados na Figura 3. O desenvolvimento dos modelos multivariados foi feito com o auxílio da metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e a exclusão de variáveis (números de onda), com pouca influência na construção dos modelos, foi feita pela utilização do correlograma.

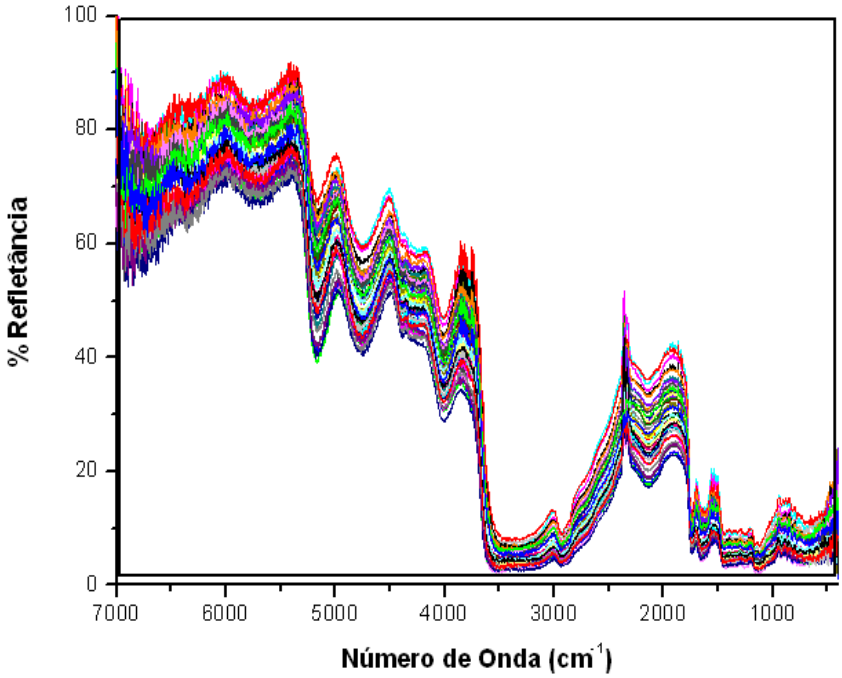


FIGURA 3 – Espectros no infravermelho (DRIFT) do conjunto de calibração.

O espectro foi dividido em infravermelho próximo (NIR), entre 7000 e 4000 cm^{-1}, conforme ilustra a Figura 4, e infravermelho médio (MID), entre 4000 e 400 cm^{-1}, Figura 5, para verificar qual região apresenta melhor capacidade de previsão para cada uma das determinações de interesse.

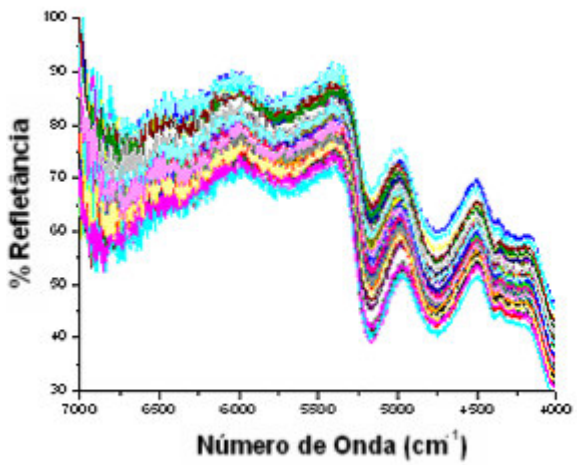


FIGURA 4 – Espectros no infravermelho (DRIFT) do conjunto de calibração na região do NIR.

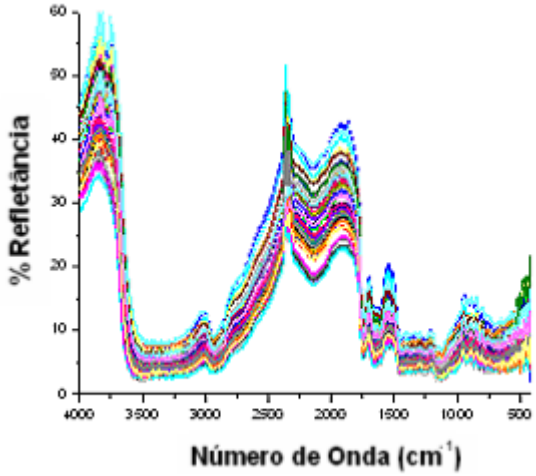


FIGURA 5 – Espectros no infravermelho (DRIFT) do conjunto de calibração na região do MID.

Conforme se observa nas Figuras 4 e 5, os espectros no infravermelho evidenciam que as amostras de farinha de bagaço de maçã apresentam uma mistura muito complexa de componentes. Com isso, existem em seus espectros informações de diversos grupos funcionais, cujos sinais analíticos apresentam-se sobrepostos. Isto dificulta à atribuição de uma determinada banda a uma única função química exclusivamente.

Em função de todos os aspectos levantados, procurou-se obter os modelos otimizados para cada determinação e, em seguida, verificar se os números de onda considerados como relevantes para a construção do modelo estão relacionados às atribuições de absorção de radiação das ligações químicas e grupos funcionais dos respectivos componentes estudados. A Tabela 8 mostra as ligações químicas e grupos funcionais dos açúcares simples (frutose, glucose e sacarose), juntamente com dados das regiões no infravermelho médio e próximo, que podem estar envolvidos com a determinação destes compostos na farinha de bagaço de maçã. Por outro lado, a Tabela 9 apresenta as atribuições para o ácido málico e compostos fenólicos.

TABELA 8 – Regiões espectrais no MID e NIR relacionadas às ligações químicas de açúcares simples.

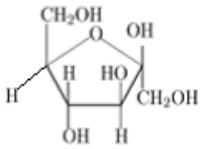
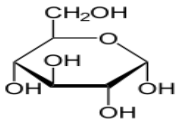
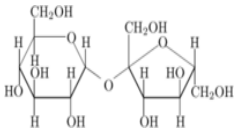
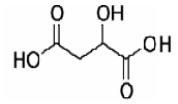
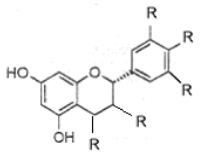
Compostos	Atribuições	Regiões no IV (cm^{-1})	Referências
Frutose	-	1086, 1055, 962	DUARTE et al., 2002
	estiramento C - C	970	COSTA FILHO e POPPI, 2002
	estiramento C - O - C	1060	
	estir. O - C - H, C - C - H	1200	
	C - C - H, C - O – H, C - H	5950 - 5700	RODRIGUEZ-SAONA et al., 2001
	estiramentos O - H e C - H	5250	
	O - H, C - C e comb. C - C, C - H	4600 - 4000	
	sobretons C - H de grupos CH_2	5900, 5865, 5797	MORGANO et al.,2007
	estiramento C - O (álcool)	1200 - 1020	BARBOSA, 2007
	estiramento O - H (álcool)	3600 - 3200	
	estiramento C - H (alcano)	3300 - 2800	
	deformação angular de CH_2	1450 - 1375	
	estiramento C = O (cetona)	1850 - 1610	
	estiramento C - O - C	1300 - 1050	
Glucose	-	1111, 1095, 1072, 1018, 978	DUARTE et al., 2002
	estiramento C - C	990 - 980	COSTA FILHO e POPPI, 2002
	estiramento C - O	1150 - 1130	
	estiramentos C - O e C - C	1150 - 904	
	deformação angular O - C - H, C - C - H, C - O – H	1474 - 1199	
	C - H	5950 - 5700	RODRIGUEZ-SAONA et al., 2001
	estiramentos O - H e C - H	5250	
	O - H, C - C e comb. C - C, C - H	4600 - 4000	
	sobretons C - H de grupos CH_2	5900, 5865, 5797	MORGANO et al., 2007
	estiramento C - O (álcool)	1200 - 1020	BARBOSA, 2007
	estiramento O - H (álcool)	3600 - 3200	
	estiramento C - H (alcano)	3300 - 2800	
	deformação angular CH_2	1450 - 1375	
	estiramento C - O - C	1300 - 1050	
	estiramento C - H (aldeído)	2820 – 2720	
Sacarose	–	1149, 1080, 1062, 1024, 1008, 956, 937	DUARTE et al., 2002
	C – H	5950 - 5700	RODRIGUEZ-SAONA et al., 2001
	estiramentos O - H e C – H	5250	
	O - H, C - C e comb. C - C, C – H	4600 - 4000	
	sobretons C - H de grupos CH_2	5900, 5865, 5797	MORGANO et al., 2007
	estiramento C - O (álcool)	1200 - 1020	BARBOSA, 2007
	estiramento O - H (álcool)	3600 - 3200	
	estiramento C - H (alcano)	3300 - 2800	
	deformação angular de CH_2	1450 - 1375	
	estiramento C = O (cetona)	1850 - 1610	
	estiramento C - O - C	1300 - 1050	
	estiramento C - H (aldeído)	2820 - 2720	

TABELA 9 – Regiões espectrais no MID e NIR relacionadas às ligações químicas do ácido málico e compostos fenólicos.

Compostos	Atribuições	Regiões no IV (cm^{-1})	Referências
Ácido málico 	estiramento C = O (ácido carboxílico)	1850 - 1610	BARBOSA, 2007
	estiramento O - H (ácido carboxílico)	3400 - 2300	
Compostos fenólicos 	estiramento O - H (fenol)	3600 - 3200	BARBOSA, 2007
	estiramento C - O (fenol)	1250 - 1200	
	estiramento C - H (aromático)	3300 - 2800	
	deformação angular de C - H (aromático)	1000 - 650	
	estiramento C = C (aromático)	1650 - 1500	
R = -H, -O, -OH, $-OCH_3$, Galato, outros.	deformação angular de C - H (aromático)	900 - 650	
	-	5500 - 4900	MORGANO et al., 2001

Para todos os modelos construídos, utilizando os espectros na região do infravermelho, foram eliminadas algumas variáveis com baixa razão sinal/ruído. Para o NIR, é possível observar que a região compreendida entre 7000 e 6000 cm^{-1} (Figura 6) apresenta pouca informação analítica relevante, já que o ruído é predominante. Esta mesma consideração foi realizada para a região do MID, cujas informações espectrais associadas as variáveis entre 500 e 400 cm^{-1} (Figura 7) também foram excluídas.

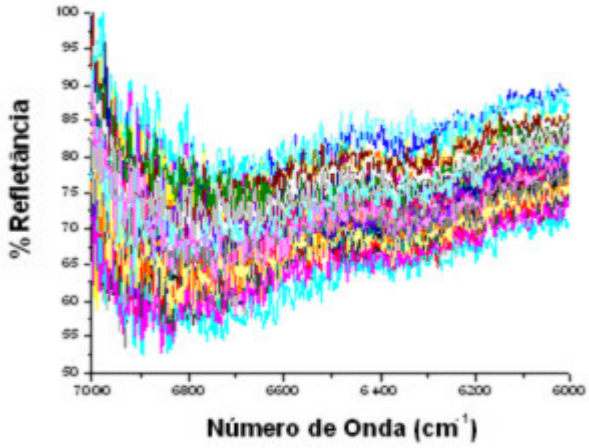


FIGURA 6 – Região do NIR com baixa razão sinal/ruído

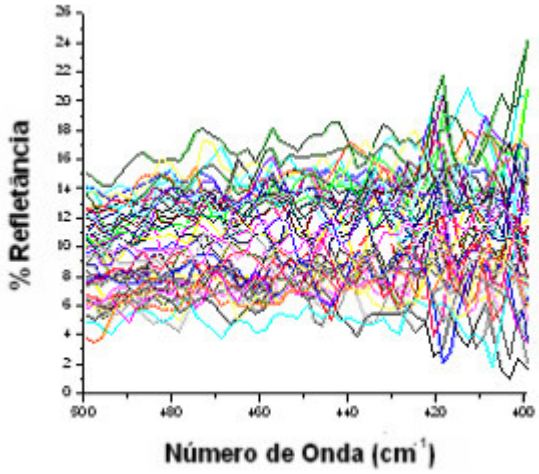


FIGURA 7 – Região do MID com baixa razão sinal/ruído

A metodologia de calibração multivariada foi conduzida essencialmente via processo de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais - PLSR que possibilita otimizar um modelo para cada determinação de interesse. A aplicação desta forma operacional envolve alguns problemas de caráter prático, principalmente relacionados com a necessidade de investir mais tempo para a elaboração do modelo. Por outro lado, os modelos obtidos por esta metodologia tendem a apresentar uma melhor capacidade de previsão.

5.3.1 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de glucose

Durante a fase de calibração, o conjunto composto pelos 47 espectros no infravermelho das amostras de farinha de bagaço de maçã foi correlacionado com o respectivo teor de glucose. Nesta etapa, vários modelos PLSR foram construídos a fim de avaliar a região espectral e os tipos de transformação/pré-processamento de dados que produziriam os melhores resultados.

Para avaliar a região espectral, trabalhou-se com o espectro na região do infravermelho médio - MID completo (4000 e 500 cm^{-1}) e no infravermelho próximo - NIR completo (6000 e 4000 cm^{-1}). Além disso, uma seleção de variáveis foi realizada através de dados de correlação (refletância *versus* concentração) para cada número de onda com o teor de glucose obtido através da metodologia de referência. Os dados fornecidos pelo gráfico do correlograma, Figura 8, são apresentados a seguir.

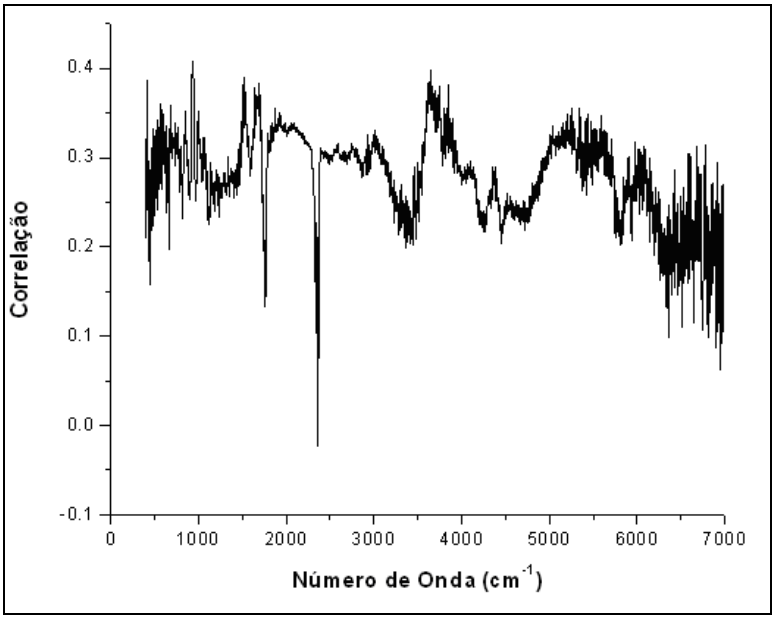


FIGURA 8 - Correlograma para glucose incluindo infravermelho médio e próximo.

Os valores de corte na região do MID foram 0,25, 0,3 e 0,35. Já para o NIR trabalhou-se com os cortes 0,25 e 0,3, pois não existem dados de refletância com correlação igual ou superior a 0,35. Vale a pena ressaltar, que esses valores de corte baseiam-se na inclusão das variáveis independentes (números de onda) que apresentam correlação igual ou superior ao valor de corte estabelecido.

Para a escolha do melhor modelo foram analisados os valores dos menores erros de previsão (Erro Padrão Relativo das amostras da validação externa, RMSEC - Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Calibração e RMSECV - Raiz Quadrada da Soma dos Erros de Validação Interna) em função do menor número de Variáveis Latentes obtidas pelo método de validação cruzada. Além disso, foram avaliados os coeficientes de correlação dos conjuntos de calibração (Rcal) e validação externa (Rval). A Tabela 10 mostra um resumo dos resultados obtidos pelos modelos multivariados, na região do MID e do NIR.

TABELA 10 – Modelos de calibração para a determinação de glucose no MID e NIR

Região	Transformação/ Pré-processamento	* Nº VLs	RMSEC/ RMSECV	** Rcal/ Rval	*** Erro padrão relativo (%)
MID 1	MSC e Autoescalamento	8	0,3 / 1,5	0,99 / 0,99	8,6
MID 2	**MSC e Autoescalamento**	**8**	**0,4 / 1,3**	**0,98 / 0,99**	**6,4**
MID 3	MSC e Autoescalamento	9	0,4 / 1,6	0,98 / 0,98	10,4
MID 4	MSC e Autoescalamento	8	0,9 / 3,2	0,92 / 0,44	37,4
NIR 1	**Normalização e Autoescalamento**	**6**	**0,4 / 1,5**	**0,99 / 0,98**	**7,4**
NIR 2	MSC, Alisamento e 1ª derivada	8	0,1 / 2,5	0,99 / 0,97	6,7
NIR 3	MSC e Autoescalamento	6	0,2 / 2,5	0,99 / 0,80	16,3

* Número de Variáveis Latentes
** Coeficientes de correlação do conjunto de calibração (Rcal) e validação externa (Rval)
*** Média do Erro padrão relativo do conjunto de validação externa

Legenda:
MID 1 – sem corte (4000 – 500 cm^{-1}) – 1815 números de onda
MID 2 – corte 0,25 (4000 – 500 cm^{-1}) – 1621 números de onda
MID 3 – corte 0,3 (3950 – 500 cm^{-1}) – 998 números de onda
MID 4 – corte 0,35 (3855 – 561 cm^{-1}) – 128 números de onda

NIR 1 – sem corte (6000 – 4000 cm^{-1}) – 1037 números de onda
NIR 2 – corte 0,25 (6000 – 4000 cm^{-1}) – 713 números de onda
NIR 3 – corte 0,3 (5983 – 4953 cm^{-1}) – 299 números de onda

Ao avaliar a capacidade de previsão do teor de glucose pelos modelos desenvolvidos, observa-se que o menor erro de previsão na região do infravermelho médio (MID 2) está

associado ao uso de 8 Variáveis Latentes, com erro padrão relativo médio de 6,4% e um RMSECV de 1,3, aplicando-se Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo (MSC) como transformação de dados e Autoescalamento como sistema de pré-processamento.

Com relação aos modelos de regressão no infravermelho próximo, observa-se que a região sem cortes (NIR 1), empregando-se Normalização e Autoescalamento como sistemas de transformação e pré-processamento dos dados, respectivamente, proporcionou melhores resultados. O erro padrão relativo médio obtido pelo modelo foi de 7,4%, com 6 Variáveis Latentes para explicar a variabilidade dos dados, e o RMSECV foi menor do que os obtidos nas regiões do NIR 2 e NIR 3.

A Figura 9 apresenta a evolução dos valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes para os modelos no MID 2, empregando MSC e Autoescalamento, e NIR 1, utilizando Normalização e Autoescalamento.

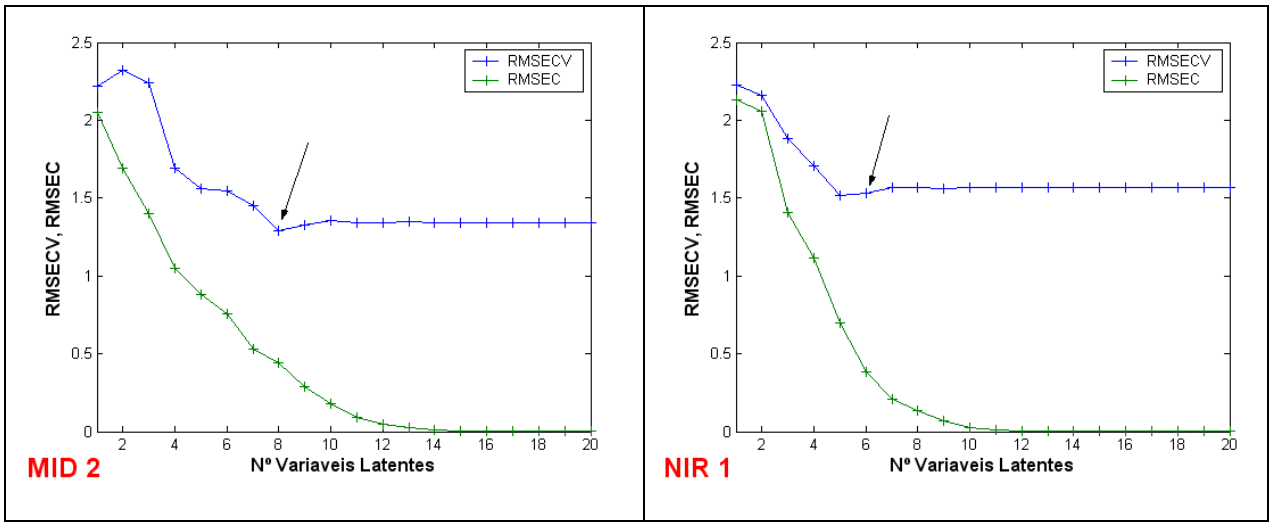


FIGURA 9 – Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para glucose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

A partir da visualização da Figura 9 é possível certificar-se que o modelo obtido no MID 2 não apresenta nenhum ganho significativo em termos de minimização dos valores RMSECV com mais de 8 Variáveis Latentes. O mesmo raciocínio é aplicado para o modelo no infravermelho próximo (NIR 1), onde acima de 6 Variáveis Latentes os valores de RMSECV, praticamente, não se alteram. A escolha de um maior número de Variáveis Latentes pode gerar

modelos superestimados e ocasionar o comprometimento da previsão dos teores de glucose, devido à agregação de ruídos ao modelo.

Além disso, as 8 Variáveis Latentes do modelo no MID 2 já são responsáveis por explicar 88,0% da variabilidade espectral (matriz X) e 96,0% da variabilidade da concentração de glucose (matriz Y). Com relação ao modelo no NIR 1, as 6 Variáveis Latentes descrevem 94,0% da variância dos dados espectrais e 97,0% da concentração de glucose.

Os modelos obtidos no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR1) não apresentaram comportamento tendencioso em superestimar ou subestimar os teores de glucose, o que pode ser comprovado pela boa distribuição das amostras do conjunto de calibração em relação ao resíduo, conforme Figura 10.

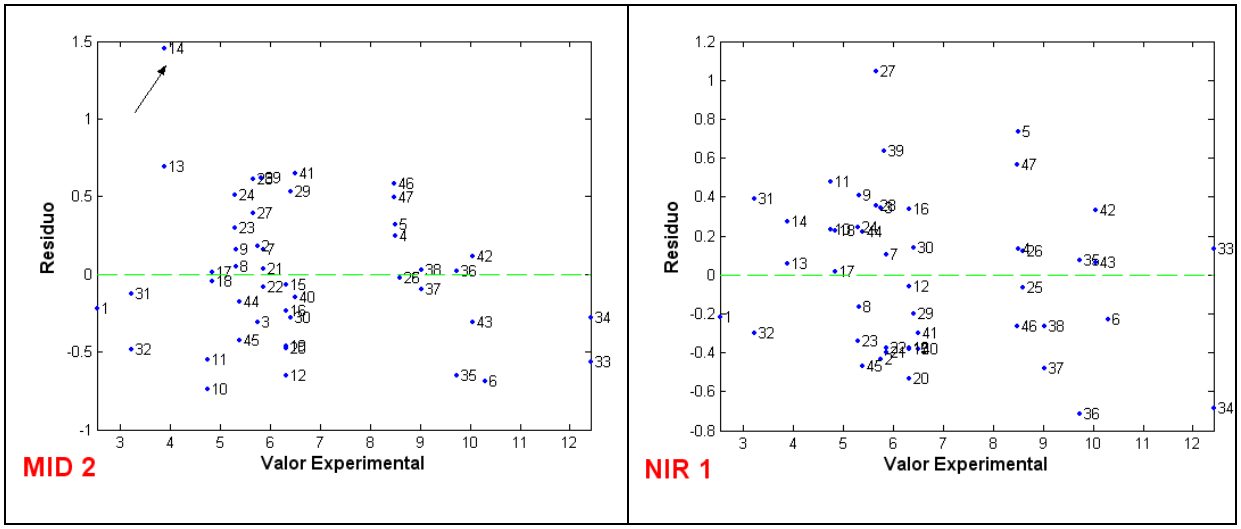


FIGURA 10 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para glucose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

Porém, o modelo obtido no infravermelho médio (MID 2), apresentou 1 amostra com alto valor de resíduo de Student (amostra 14). De acordo com a literatura, amostras com alto resíduo de Student apresentam fortes indícios de comportamento anômalo, pois se tornam diferentes das demais amostras do conjunto de calibração e os valores previstos pelo modelo discordam dos valores reais (TOZETTO, 2005).

Considerando o modelo de calibração obtido no MID 2, percebe-se que a amostra 14, além de apresentar alto valor de resíduo de Student (conforme Figura 11), apresenta-se isolada das demais amostras no gráfico de Resíduos versus Valor Experimental (Figura 10). Para efeitos

de comparação, é possível observar que a duplicata desta amostra (correspondente à amostra 13) apresenta valores de resíduos menores, mas assim mesmo, é o segundo maior resíduo positivo. Tal característica pode ser um indício de que se trata de uma particularidade da amostra e por este motivo ao ser retirada do conjunto de calibração não alterou, significativamente, as características do modelo (não houve redução no número de Variáveis Latentes e nos valores de RMSEC, RMSECV e Erro Padrão Relativo, sendo que os coeficientes de correlação (Rcal e Rval) diminuíram). No MID 2 o limite da *leverage* foi de 0,51, considerando-se 8 Variáveis Latentes e no NIR 1 de 0,38, com 6 Variáveis Latentes.

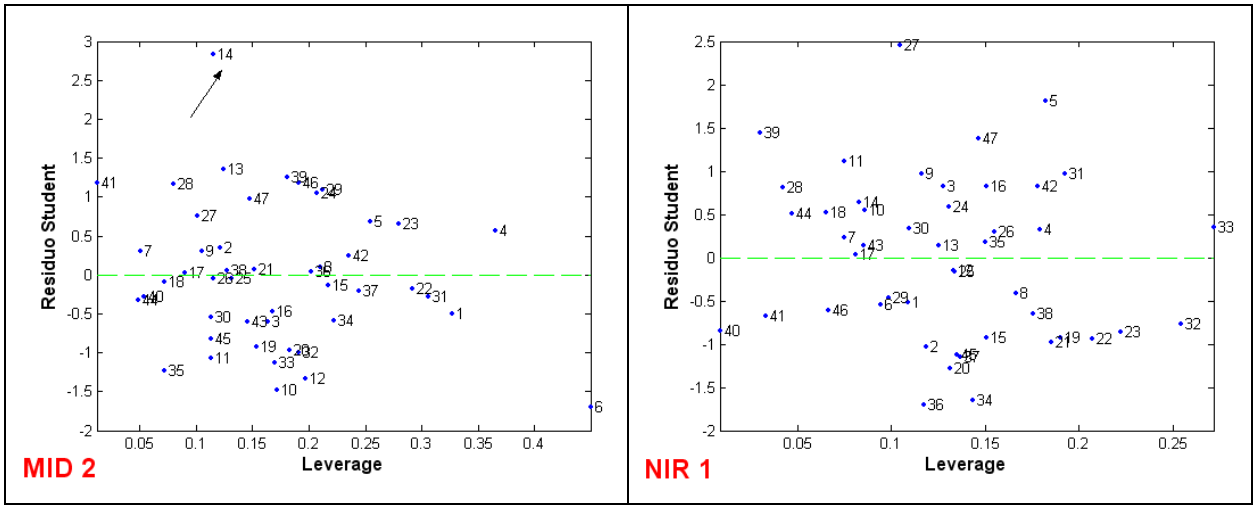


FIGURA 11 - Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para glucose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

Os modelos apresentaram boa correlação entre os valores experimentais, sendo que os coeficientes de correlação obtidos pelo MID 2, para os conjuntos de calibração (Rcal) e validação (Rval), foram de 0,98 e 0,99, respectivamente, e para a região do NIR 1 de 0,99 e 0,98. A Figura 12 comprova esta boa correlação, e evidencia uma pequena não linearidade do modelo MID 2, já que para as menores (amostras 1, 31 e 32) e maiores concentrações (amostras 33 e 34) de glucose, é possível observar que os valores experimentais são levemente menores que os valores previstos pelo modelo.

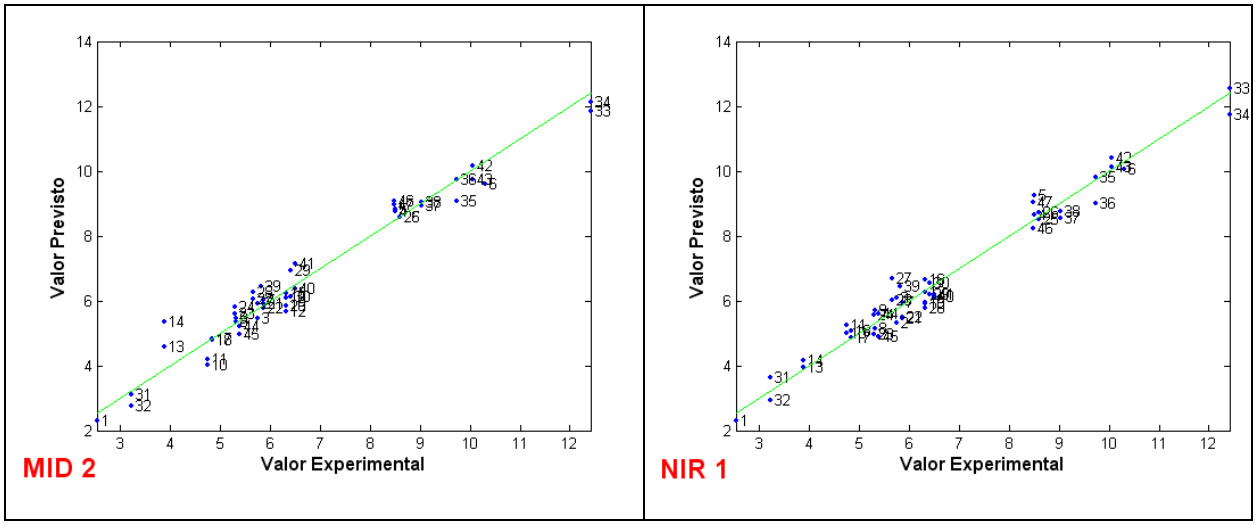


FIGURA 12 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de glucose.

Os valores previstos para a concentração de glucose das amostras do conjunto de validação externa estão apresentados na Tabela 11, conforme os modelos obtidos nas regiões do infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

TABELA 11 – Resultados da previsão da concentração de glucose para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

		Valores previstos (% m/m)		**Erro padrão relativo (%)**	
Amostras	**Valor Experimental (% m/m)**	**MID 2**	**NIR 1**	**MID 2**	**NIR 1**
1	2,5	2,7	2,8	7,1	9,5
2	10,3	9,3	9,6	-9,5	-6,7
3	5,9	6,0	6,8	4,1	16,1
4	6,3	6,5	6,6	2,5	3,8
5	5,8	6,3	5,9	8,8	0,9
Erro relativo médio (%)				**6,4**	**7,4**

A partir da visualização das médias de erro padrão relativo obtidas na região do MID 2 e NIR 1, percebe-se que o infravermelho médio oferece um menor erro, porém, analisando os outros parâmetros, tais como: número de Variáveis Latentes, porcentagens de variância capturada, coeficientes de correlação (Rcal e Rval) e linearidade, o melhor modelo de calibração para a previsão da concentração de glucose foi no NIR 1. Embora ele tenha um erro relativo médio maior, a utilização de um menor número de Variáveis Latentes produz um modelo mais

robusto, que descreve umas maior porcentagem da variância dos dados, bem como, apresenta melhores coeficientes de correlação para a calibração e validação.

5.3.2 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de frutose.

Para a determinação da concentração de frutose, foram utilizadas as regiões espectrais do infravermelho médio (MID), compreendida entre 4000 e 500 cm^{-1} e infravermelho próximo (NIR), entre 6000 e 4000 cm^{-1}, como também, trabalhou-se com alguns valores de corte no MID e no NIR, através do correlograma, que pode ser visualizado na Figura 13.

Na região do infravermelho médio foram desprezadas as regiões com valores de correlação entre 0,05 e -0,05, bem como, entre 0,1 e -0,1. Para o infravermelho próximo foram desprezadas as regiões com valores de correlação entre 0,05 e -0,05 ou com valores superiores a -0,1. A escolha por esses valores de corte deu-se pela visualização do correlograma, que mostra uma região com correlação muito próxima de zero (evidenciada na Figura 13) que não deve ser incluída na obtenção dos modelos multivariados.

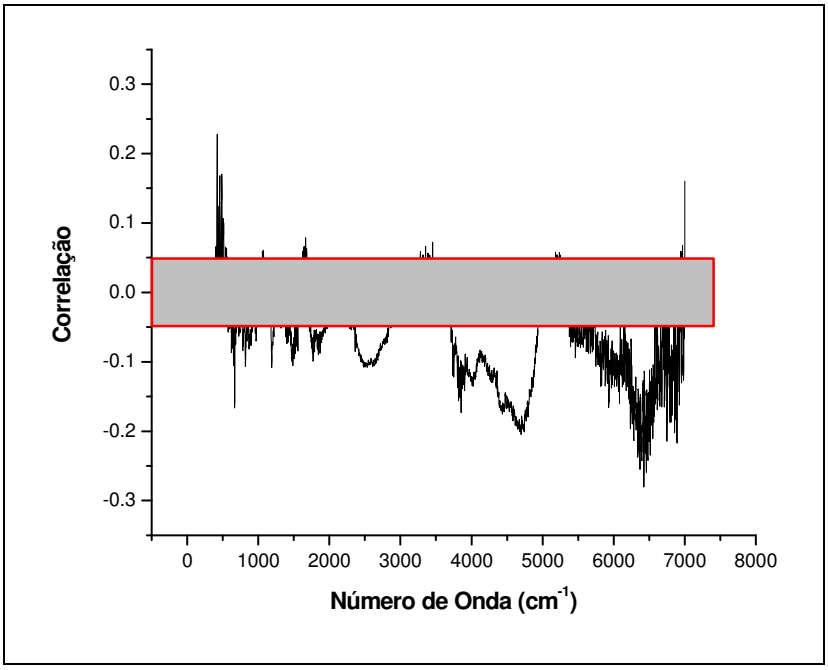


FIGURA 13 -Correlograma para frutose incluindo infravermelho médio e próximo

Os resultados da otimização dos modelos de regressão obtidos, com os respectivos valores de erros de previsão e coeficientes de correlação (Rcal e Rval), em um determinado número de Variáveis Latentes, estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 – Modelos de calibração para a determinação de frutose no MID e NIR.

Região	Transformação/ Pré-processamento	* Nº VLs	RMSEC/ RMSECV	**Rcal/ Rval	*** Erro padrão relativo (%)
MID 1	Alisamento e 1ª derivada	5	1,3 / 3,8	0,92 / 0,75	3,9
MID 2	**Alisamento, 1ª derivada e Autoescalamento**	**5**	**0,6 / 2,3**	**0,99 / 0,86**	**3,9**
MID 3	Alisamento e 1ª derivada	5	2,3 / 3,8	0,73 / 0,57	10,4
NIR 1	**Alisamento e 1ª derivada**	**4**	**1,2 / 3,6**	**0,94 / 0,86**	**6,8**
NIR 2	MSC e Dados Centrados na Média	4	1,0 / 2,8	0,96 / 0,26	9,9
NIR 3	MSC e Autoescalamento	4	1,4 / 2,9	0,91 / 0,60	10,1

* Número de Variáveis Latentes
** Coeficientes de correlação do conjunto de calibração (Rcal) e validação externa (Rval)
*** Média do erro padrão relativo do conjunto de validação externa

Legenda:
MID 1 – sem corte (4000 – 500 cm^{-1}) – 1815 números de onda
MID 2 – corte acima de 0,05 e abaixo de -0,05 (4000 – 500 cm^{-1}) – 758 números de onda
MID 3 – corte acima de 0,1 e abaixo de -0,1 (4000 – 500 cm^{-1}) – 195 números de onda

NIR 1 – sem corte (6000 – 4000 cm^{-1}) – 1037 números de onda
NIR 2 – corte acima de 0,05 e abaixo de -0,05 (6000 – 4000 cm^{-1}) – 759 números de onda
NIR 3 – corte abaixo de -0,1 (5996 – 4000 cm^{-1}) – 468 números de onda

O modelo que apresentou melhor capacidade de previsão na região do infravermelho médio foi o MID 2, utilizando Alisamento, 1ª derivada e Autoescalamento com 5 Variáveis Latentes. Este modelo prevê a concentração de frutose com erro padrão relativo de 3,9% e apresenta menores RMSEC e RMSECV quando comparado aos demais modelos no infravermelho médio.

Na região do infravermelho próximo, o modelo obtido no NIR 1 (sem cortes) com Alisamento e 1ª derivada, proporcionou melhores resultados, com média de erro padrão relativo de 6,8%, empregando-se 4 Variáveis Latentes para explicar a variabilidade dos dados. Os outros modelos obtidos no infravermelho próximo, empregando-se o correlograma, forneceram baixos coeficientes de correlação no conjunto de validação externa (Rval) e maiores porcentagens de erro padrão relativo.

Com relação à evolução dos valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes, a Figura 14 ilustra esta informação.

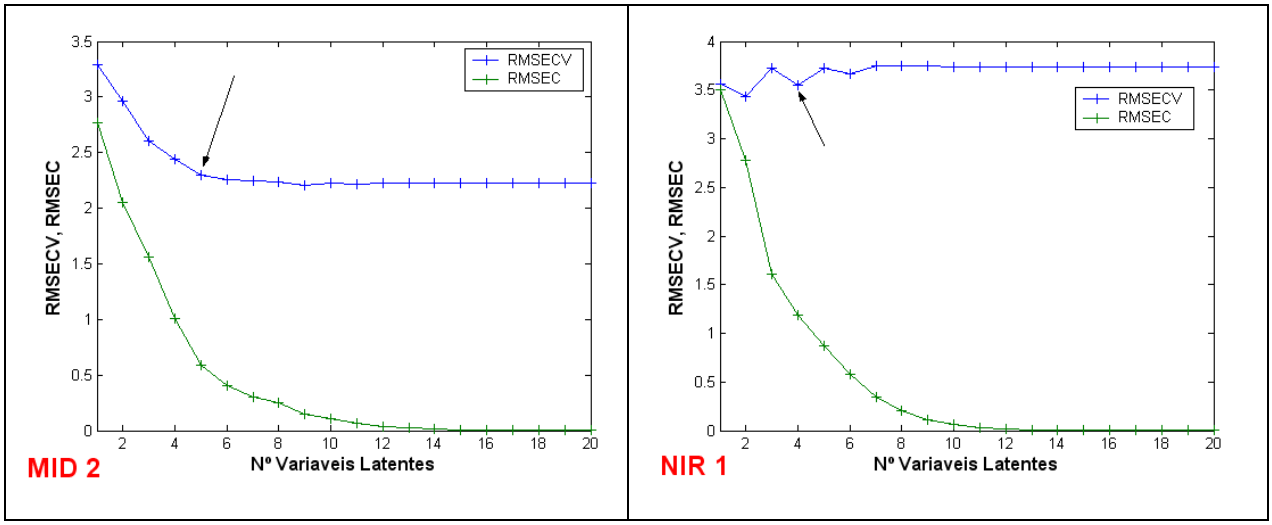


FIGURA 14 – Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para frutose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

A partir da visualização da Figura 14, percebe-se que o modelo no MID 2 não apresenta ganhos significativos em redução dos valores de RMSECV acima de 5 Variáveis Latentes. Sendo assim, considerar um número maior de Variáveis Latentes pode conduzir a superestimação durante a previsão da concentração de frutose, já que isso agregaria também ruídos ao modelo. Para o NIR 1, a Figura 14 não evidencia uma diminuição do erro de previsão (RMSECV) e, por este motivo, o melhor modelo foi escolhido, principalmente, pelo erro padrão relativo do conjunto de validação externa.

O modelo obtido no infravermelho médio (MID 2), com 5 Variáveis Latentes, descreve 70,0% da variabilidade dos dados espectrais (matriz X) e 96,0% da variabilidade dos dados de concentração de frutose (matriz Y). Já o modelo construído no infravermelho próximo (NIR 1), utilizando 4 Variáveis Latentes, explica 94,0% da variância espectral e 99,0% da concentração de frutose.

Não houve tendências de superestimar ou subestimar a concentração de frutose, pois as amostras do conjunto de calibração apresentaram-se bem distribuídas em relação ao resíduo (Figura 15), tanto no modelo obtido no infravermelho médio quanto no infravermelho próximo.

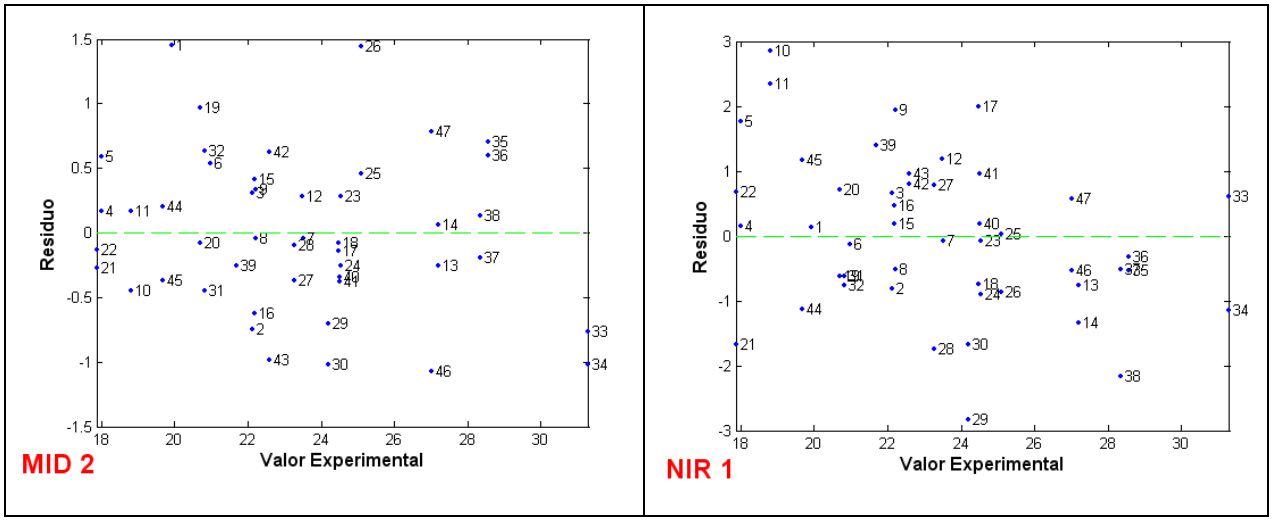


FIGURA 15 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para frutose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

Outra característica importante foi a ausência de amostras anômalas no conjunto de calibração. Os limites da *leverage* para a região no MID 2 foi de 0,32 e para o NIR 1 de 0,26, considerando um resíduo Student de ±2,5, com 95% de confiança. A Figura 16 mostra o gráfico da *leverage versus* resíduo Student das amostras do conjunto de calibração no infravermelho médio e próximo.

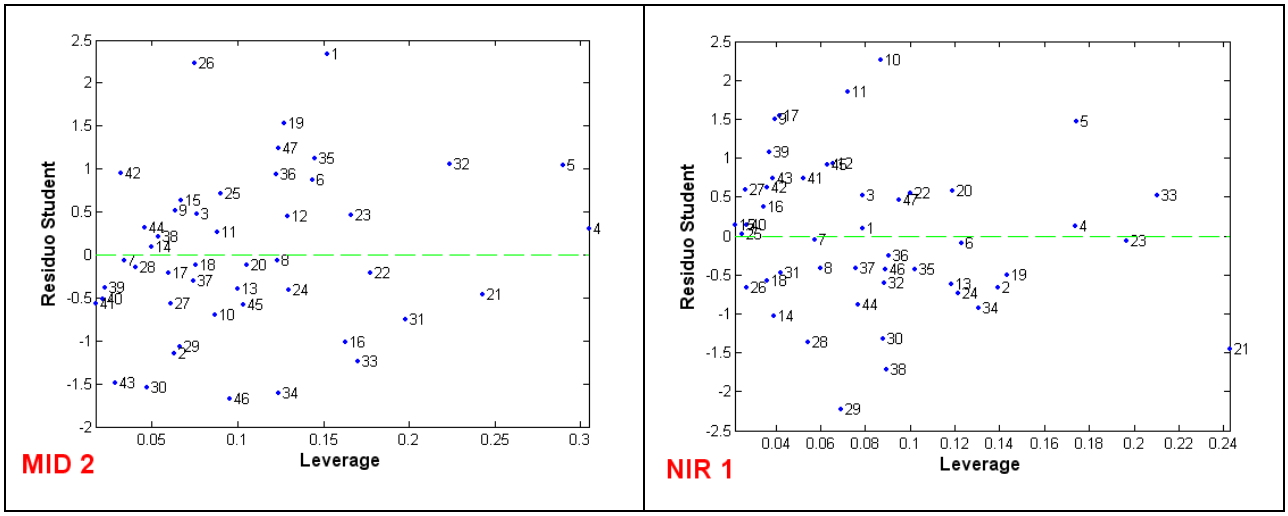


FIGURA 16 - Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para frutose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

Os modelos apresentaram boa correlação dos valores experimentais e previstos, sendo que os coeficientes de correlação para os conjuntos de calibração e validação externa no MID 2 foram

0,99 e 0,86, respectivamente, e para o NIR 1 esta correlação foi de 0,94 e 0,86. A Figura 17 ilustra o gráfico dos valores previstos *versus* valores experimentais obtidos pelos modelos de regressão.

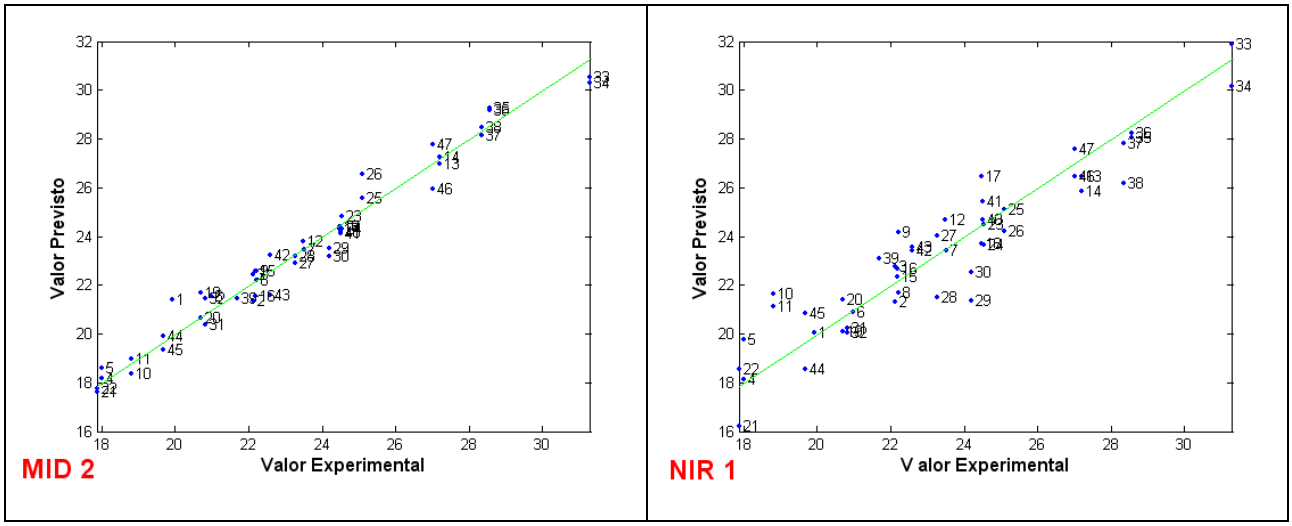


FIGURA 17 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de frutose.

A capacidade preditiva da concentração de frutose das amostras do conjunto de validação externa está representada na Tabela 13, com os valores experimental e previsto pelos modelos no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) e seus respectivos valores de erro padrão relativo.

TABELA 13 – Resultados da previsão da concentração de frutose para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

		Valores previstos (% m/m)		**Erro padrão relativo (%)**	
Amostras	**Valor Experimental (% m/m)**	**MID 2**	**NIR 1**	**MID 2**	**NIR 1**
1	19,9	20,8	21,9	4,5	10,0
2	21,0	19,6	23,7	-6,8	12,9
3	23,5	24,3	24,0	3,4	2,4
4	23,5	23,2	24,1	-1,2	2,6
5	21,7	20,9	23,0	-3,6	6,3
Erro relativo médio (%)				**3,9**	**6,8**

Avaliando-se os resultados dos modelos obtidos, a melhor previsão da concentração de frutose ocorre no infravermelho médio. Apesar do modelo MID 2 apresentar um maior número de Variáveis Latentes para obtenção de um menor erro de previsão, todos os parâmetros do modelo (RMSEC, RMSECV, Rcal e Erro Padrão Relativo) foram melhores. Além disso, na Figura 18, é possível observar, através do gráfico dos coeficientes de regressão, as regiões do espectro de infravermelho médio (MID 2) que apresentaram informação analítica relevantes para a quantificação de frutose. Essas regiões incluem as seguintes variáveis: (a) entre 135 a 125 (referente aos estiramentos C – O de álcool e C – O – C, próximos de 1220 a 1180 cm^{-1}) e (b) próximo a 230 (estiramento C = O de cetona, próximo de 1670 cm^{-1}).

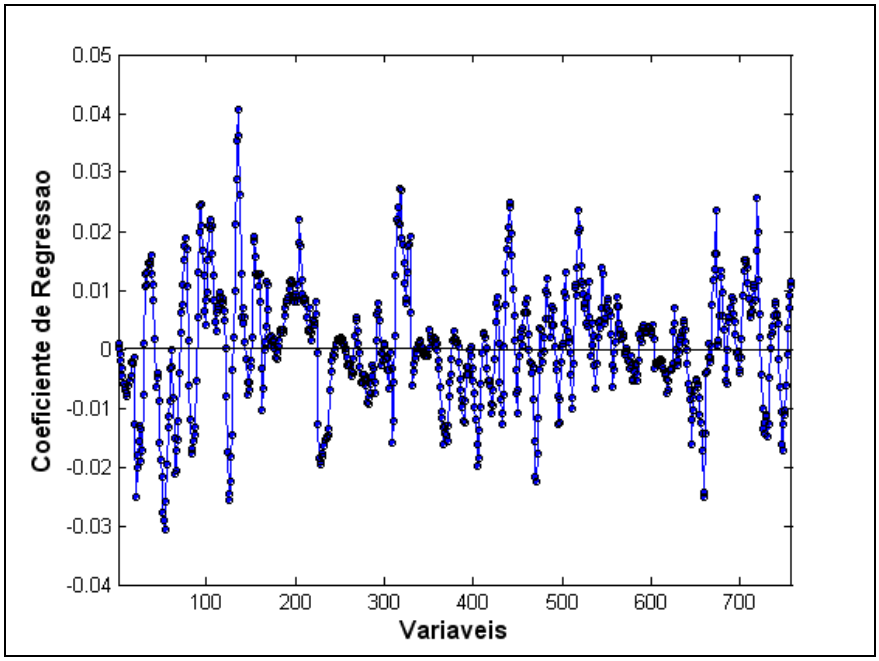


FIGURA 18 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para frutose no infravermelho médio (MID 2).

5.3.3 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de sacarose.

A determinação da concentração de sacarose, na farinha de bagaço de maçã, foi realizada pelas regiões espectrais entre 4000 e 500 cm^{-1} (infravermelho médio), entre 6000 e 4000 cm^{-1} (infravermelho próximo), e através do uso do correlograma (Figura 19) com os seguintes cortes: -0,45, -0,5 e -0,55 para o MID e -0,45 e -0,5 para o NIR. Esses valores de corte incluem os números de onda com correlação igual ou inferior ao valor de corte estabelecido.

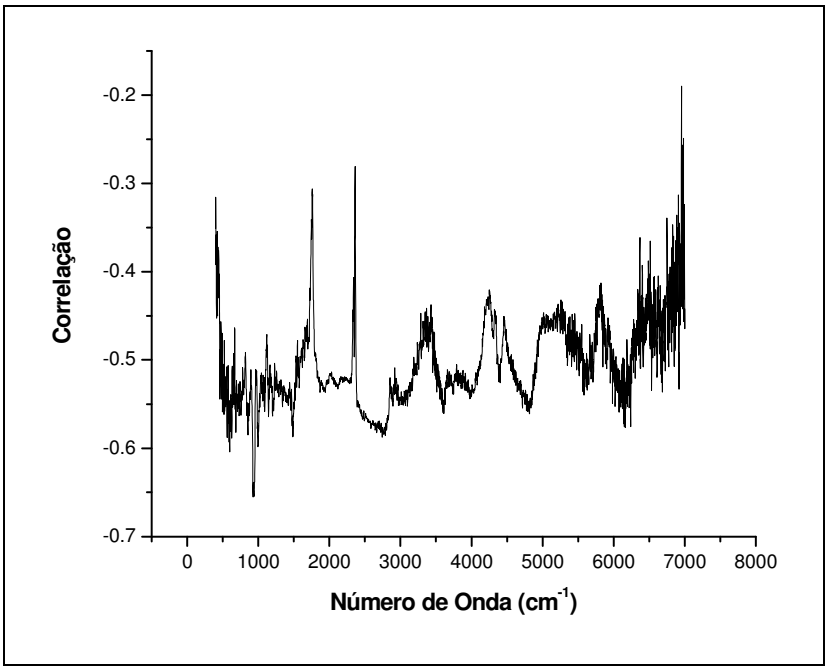


FIGURA 19 - Correlograma para sacarose incluindo infravermelho médio e próximo

Os resultados dos modelos de calibração multivariados, com os valores de erros de previsão (RMSEC / RMSECV e Erro padrão relativo), coeficientes de correlação para os conjuntos de calibração (Rcal) e validação externa (Rval) e o número de Variáveis Latentes estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 –Modelos de calibração para a determinação de sacarose no MID e NIR.

Região	Transformação/ Pré-processamento	* Nº VLs	RMSEC/ RMSECV	**Rcal/ Rval	*** Erro padrão relativo (%)
MID 1	Alisamento, 1ª derivada e Dados Centrados na Média	5	1,5 / 4,7	0,97 / 0,96	13,1
MID 2	**Alisamento, 1ª derivada e Dados Centrados na Média**	**5**	**1,7 / 3,4**	**0,97 / 0,96**	**6,6**
MID 3	MSC, Alisamento e 1ª derivada	5	1,9 / 3,3	0,95 / 0,98	7,1
MID 4	MSC e Autoescalamento	6	1,0 / 2,8	0,98 / 0,97	9,1
NIR 1	**Normalização e Autoescalamento**	**5**	**1,7 / 4,0**	**0,97 / 0,99**	**12,9**
NIR 2	Normalização e Autoescalamento	5	1,7 / 4,6	0,97 / 0,99	20,4
NIR 3	Normalização e Autoescalamento	5	2,1 / 6,0	0,94 / 0,77	24,4

* Número de Variáveis Latentes
** Coeficientes de correlação do conjunto de calibração (Rcal) e validação externa (Rval)
*** Média do Erro padrão relativo do conjunto de validação externa

Legenda:
MID 1 – sem corte (4000 – 500 cm^{-1}) – 1815 números de onda
MID 2 – corte -0,45 (4000 – 500 cm-1) – 1764 números de onda
MID 3 – corte -0,5 (4000 – 500 cm-1) – 1517 números de onda
MID 4 – corte -0,55 (3630 – 505 cm-1) – 404 números de onda

NIR 1 – sem corte (6000 – 4000 cm^{-1}) – 1037 números de onda
NIR 2 – corte abaixo de -0,45 (6000 – 4000 cm-1) – 897 números de onda
NIR 3 – corte abaixo de -0,5 (5996 – 4000 cm-1) – 384 números de onda

A melhor capacidade de previsão na região do infravermelho médio foi no MID 2, com as transformações de Alisamento seguida de 1ª derivada e o pré-processamento de Dados Centrados na Média. Este modelo permitiu prever a concentração de sacarose com média de erro padrão relativo de 6,6%, utilizando-se 5 Variáveis Latentes.

A região do infravermelho próximo com melhor capacidade preditiva é a NIR 1, com Normalização e Autoescalamento, sendo 5 Variáveis Latentes e média de erro padrão relativo de 12,9%. Os demais modelos obtidos no infravermelho próximo com uso do correlograma forneceram médias de erro padrão relativo acima de 20,0% e maiores RMSECV e, portanto, não são considerados bons modelos.

A evolução dos valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes, para os modelos no MID 2 e no NIR 1, está representada na Figura 20. No infravermelho médio (MID 2) e no próximo (NIR 1) pode-se notar que a partir da quinta Variável

Latente não há mudanças significativas na redução dos valores de RMSECV e, portanto, justifica-se a escolha de 5 Variáveis Latentes para o MID 2 e NIR 1.

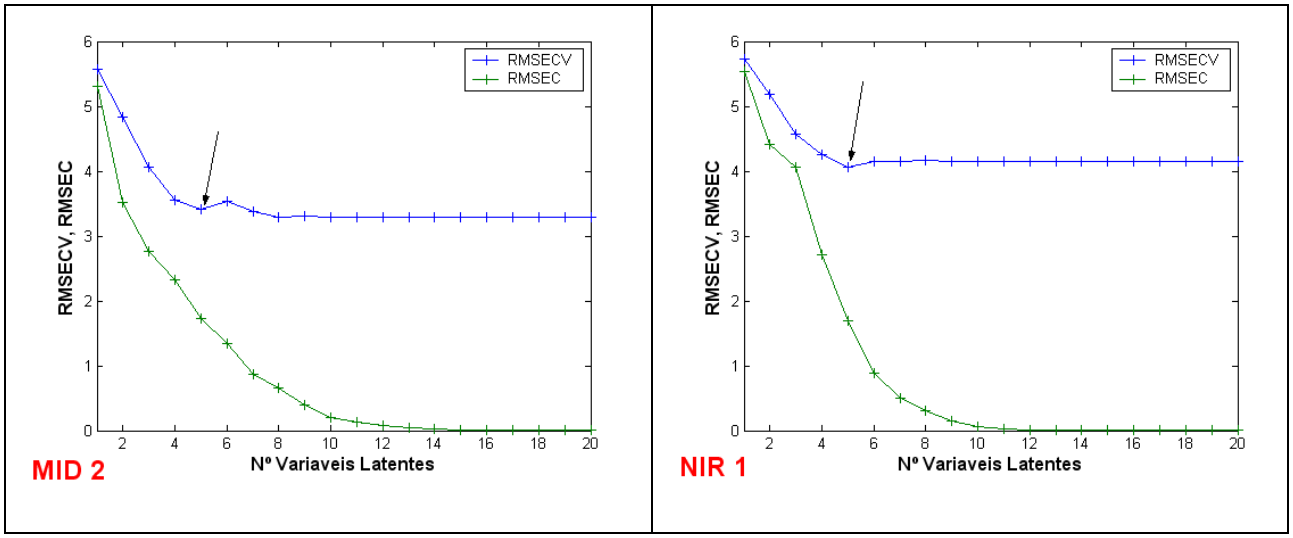


FIGURA 20 – Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

Com 5 Variáveis Latentes, as porcentagens de variância capturada pelo modelo no infravermelho médio (MID 2) foram de 80,0% para os dados espectrais e 93,0% para os dados de concentração de sacarose. No infravermelho próximo (NIR 1) estas porcentagens foram de 93,0%, para a variância espectral, e de 93,4% para a matriz de concentração de sacarose.

Os modelos construídos no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) não apresentaram comportamento tendencioso para previsão dos teores de sacarose e esta característica pode ser visualizada na Figura 21 que mostra os gráficos de resíduo *versus* valor experimental das amostras do conjunto de calibração.

Também não foi observado comportamento anômalo das amostras do conjunto de calibração, sendo que o limite da *leverage* com 5 Variáveis Latentes para os modelos no MID 2 e no NIR 1 foi de 0,32, considerando um resíduo Student de ±2,5, com 95% de confiança.. A Figura 22 ilustra o gráfico da *leverage versus* resíduo Student para os modelos construídos no MID 2 e no NIR 1.

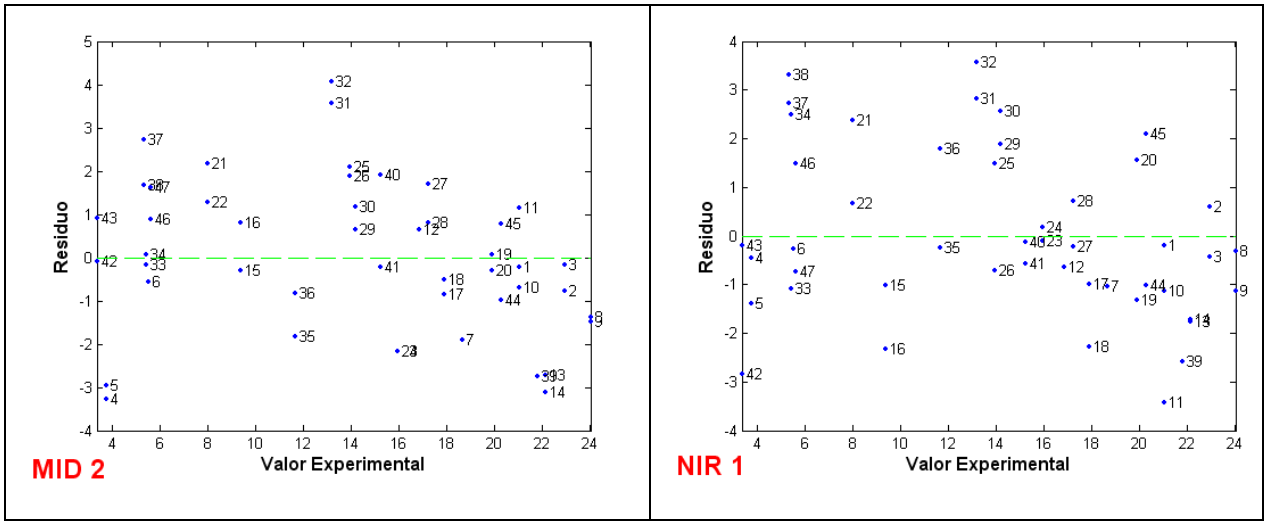


FIGURA 21 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

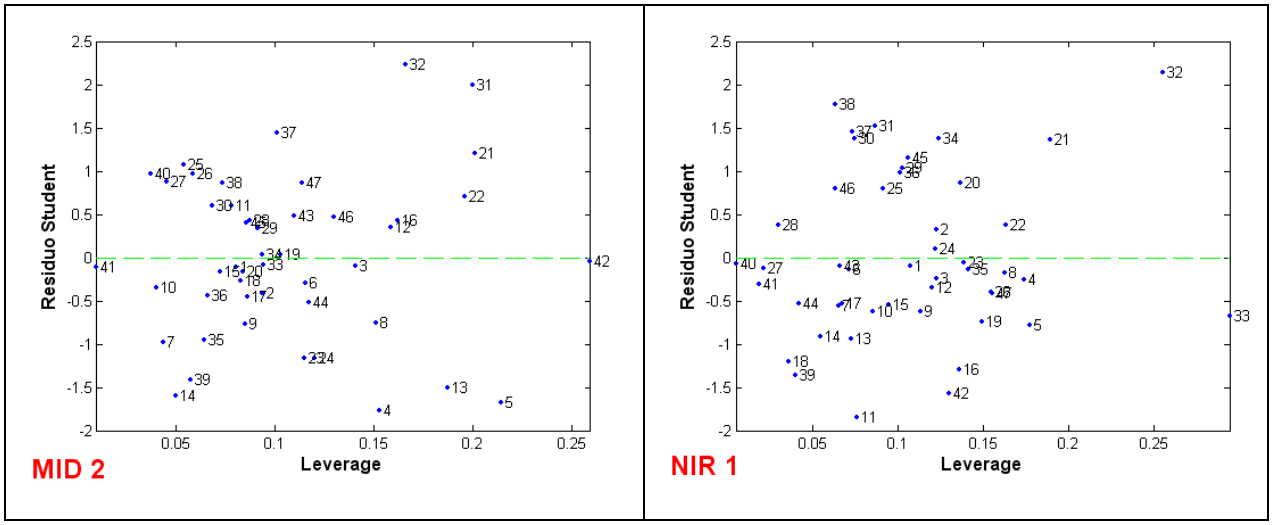


FIGURA 22- Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

A capacidade preditiva dos modelos no infravermelho médio e próximo foi avaliada pelos valores dos coeficientes de correlação, que demonstraram bom desempenho para prever a concentração de sacarose. O modelo construído no MID 2 forneceu um coeficiente de 0,97 para o conjunto de calibração e 0,96 para a validação externa. Já no NIR 1 estes coeficientes foram: 0,97 e 0,99, respectivamente. Nos gráficos de valor previsto *versus* valor experimental comprovam-se estas afirmativas (Figura 23). Outra característica passível de ser observada, em ambos os modelos para sacarose, é que tanto o modelo MID 2 quanto o modelo NIR 1, apresentam uma pequena não-linearidade. Para as menores concentrações de sacarose no MID (amostras 4, 5 e 42)

e NIR (amostras 4, 5, 42 e 43) e suas maiores concentrações (MID - 13, 14, 39, 8 e 9; NIR - 13, 14, 3 e 8), é possível observar que os valores experimentais são levemente menores que os valores previstos pelo modelo.

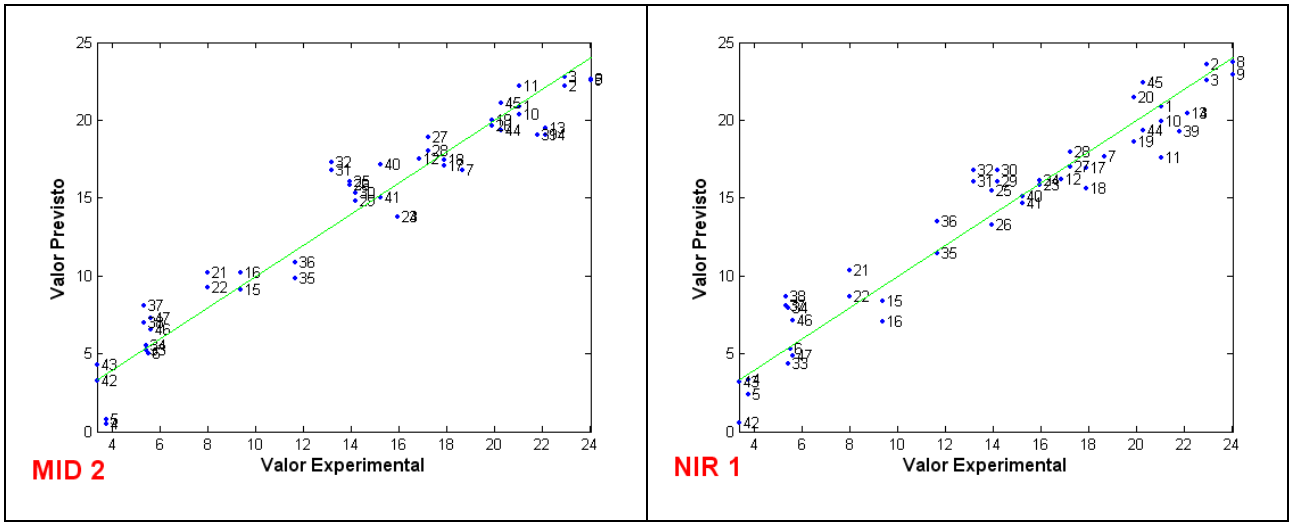


FIGURA 23 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de sacarose.

As concentrações de sacarose previstas pelos modelos no MID 2 e no NIR 1, das amostras do conjunto de validação externa, estão ilustradas na Tabela 15, juntamente com os valores de erro padrão relativo.

TABELA 15 – Resultados da previsão da concentração de sacarose para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID 2) e próximo (NIR 1).

		Valores previstos (% m/m)		**Erro padrão relativo (%)**	
Amostras	**Valor Experimental (% m/m)**	**MID 2**	**NIR 1**	**MID 2**	**NIR 1**
1	21,0	20,6	18,3	-1,9	-13,2
2	5,5	5,6	5,6	0,9	1,5
3	18,7	16,9	15,2	-9,6	-18,5
4	16,8	16,9	14,2	0,7	-15,5
5	21,8	17,4	18,3	-20,1	-16,0
Erro relativo médio (%)				**6,6**	**12,9**

Embora os modelos no MID 2 e no NIR 1 apresentem o mesmo número de Variáveis Latentes para explicar a variabilidade dos dados e uma pequena não-linearidade, a melhor capacidade de previsão para a concentração de sacarose é obtida no infravermelho médio (MID 2), pois este modelo de regressão oferece um menor RMSECV e apresenta menor média de erro padrão relativo.

A Figura 24 ilustra os coeficientes de regressão com as regiões do espectro de infravermelho médio (MID 2) que possuem informação analítica relevante para o controle quantitativo em questão. É possível observar que o modelo de calibração otimizado (MID 2) considera regiões espectrais que são relevantes para a determinação de sacarose: (a) entre 250 a 220 (referente a região de 980 a 920 cm^{-1} - sinais característicos da sacarose), (b) região próxima a 510 (deformação angular de CH_2 – 1470 cm^{-1}), (c) região próxima a 1170 (referente ao estiramento C – H de aldeído – 2840 cm^{-1}) e (d) próximo a 1560 (estiramento O – H de álcool – 3560 cm^{-1}).

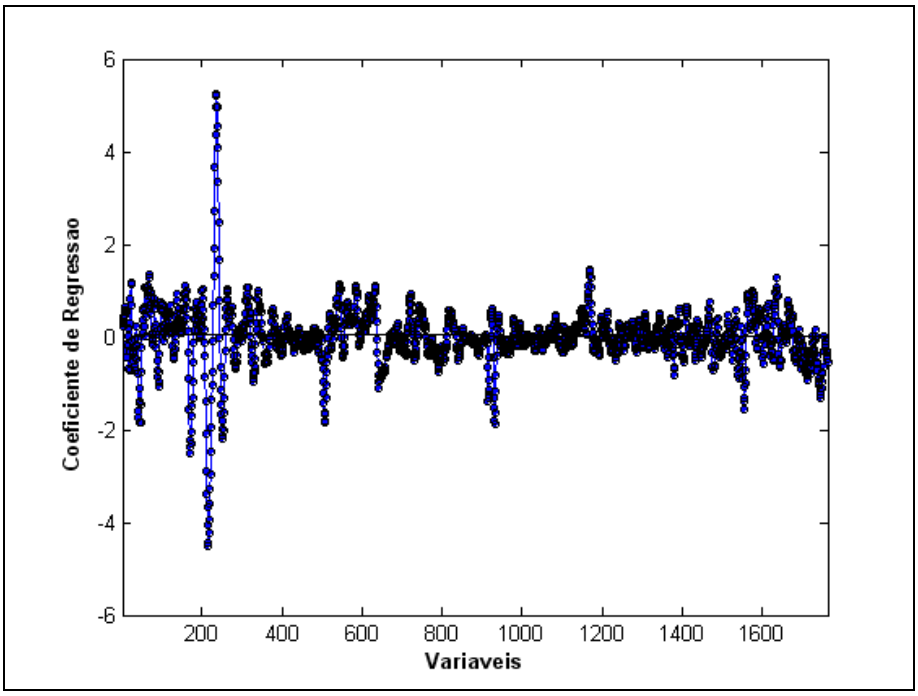


FIGURA 24 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para sacarose no infravermelho médio (MID 2).

5.3.4 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de compostos fenólicos totais.

O mesmo procedimento adotado para a construção dos modelos de regressão para previsão do teor de açúcares foi utilizado para a determinação dos compostos fenólicos.

O correlograma gerado para compostos fenólicos totais está apresentado na Figura 25. Os valores de corte incluem números de onda com correlação igual ou superior ao valor estabelecido, sendo que no infravermelho médio (MID) os cortes foram 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 e 0,35. Para o infravermelho próximo (NIR), trabalhou-se apenas com os valores de corte 0,15 e 0,2, pois não existem dados de refletância com correlação igual ou superior a 0,25.

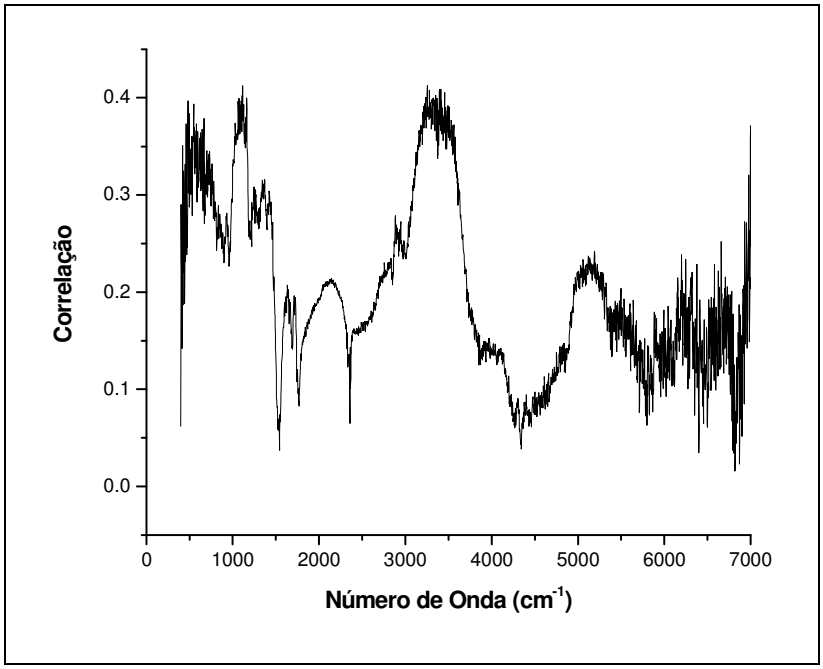


FIGURA 25 - Correlograma para compostos fenólicos totais incluindo infravermelho médio e próximo.

A Tabela 16 mostra os resultados dos modelos de calibração obtidos no infravermelho médio e próximo para a determinação de compostos fenólicos, com os respectivos valores de erros de previsão, em função do número de Variáveis Latentes, e os valores dos coeficientes de correlação para os conjuntos de calibração (Rcal) e de validação (Rval).

TABELA 16 – Modelos de calibração para a determinação de compostos fenólicos totais no MID e NIR.

Região	Transformação	* Nº VLs	RMSEC/ RMSECV	**Rcal/ Rval	*** Erro padrão relativo (%)
MID 1	Alisamento e 1ª derivada	4	513 / 1279	0,88 / 0,98	7,5
MID 2	Alisamento e 1ª derivada	4	334 / 1230	0,95 / 0,92	9,6
MID 3	**Alisamento e 1ª derivada**	**4**	**306 / 1226**	**0,96 / 0,93**	**6,4**
MID 4	Alisamento e 1ª derivada	4	441 / 1362	0,91 / 0,91	8,0
MID 5	Alisamento e 1ª derivada	4	887 / 1429	0,58 / 0,68	10,9
MID 6	Alisamento e 1ª derivada	4	919 / 1494	0,53 / 0,73	10,1
NIR 1	**Alisamento e 1ª derivada**	**4**	**357 / 1131**	**0,94 / 0,70**	**14,7**
NIR 2	Alisamento e 1ª derivada	4	572 / 1552	0,84 / 0,22	20,0
NIR 3	Alisamento e 1ª derivada	4	734 / 1401	0,73 / 0,20	20,4

* Número de Variáveis Latentes
** Coeficientes de correlação do conjunto de calibração (Rcal) e validação externa (Rval)
*** Média do Erro padrão relativo do conjunto de validação externa

Legenda:
MID 1 – sem corte (4000 – 500 cm^{-1}) – 1815 números de onda
MID 2 – corte 0,15 (3973 – 500 cm^{-1}) – 1618 números de onda
MID 3 – corte 0,2 (3720 – 500 cm^{-1}) – 1149 números de onda
MID 4 – corte 0,25 (3668 – 500 cm^{-1}) – 842 números de onda
MID 5 – corte 0,3 (3628 – 500 cm^{-1}) – 529 números de onda
MID 6 – corte 0,35 (3576 – 526 cm^{-1}) – 305 números de onda

NIR 1 – sem corte (6000 – 4000 cm^{-1}) – 1037 números de onda
NIR 2 – corte 0,15 (5996 – 4901 cm^{-1}) – 388 números de onda
NIR 3 – corte 0,2 (5947 – 4951 cm^{-1}) – 185 números de onda

Para a previsão do teor de compostos fenólicos totais na região do infravermelho médio, o modelo que apresentou melhor capacidade foi na região do MID 3, com valor de corte 0,2 empregando 1149 números de onda. Este modelo, fundamentado em sinais alisados e derivados, prevê a concentração destes compostos com erro padrão relativo médio de 6,4% empregando 4 Variáveis Latentes. Os demais modelos no infravermelho médio apresentaram maiores RMSEC, RMSECV e média de erro padrão relativo, embora utilizem o mesmo número de Variáveis Latentes para explicar a variabilidade dos dados.

Na região do infravermelho próximo, o melhor modelo de calibração foi o NIR 1 (sem cortes), que apresentou erro padrão relativo médio de 14,7%, empregando-se 4 Variáveis Latentes, através das transformações alisamento e derivação de dados.

Os valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes, para os modelos MID 3 e NIR 1, estão apresentados na Figura 26. Em ambos os gráficos, um comportamento diferenciado foi observado. No MID 3 ocorre, inicialmente, um aumento nos valores de RMSECV que, posteriormente, diminuem, sendo que seus menores valores foram obtidos utilizando-se 1 e 4 Variáveis Latentes, respectivamente. Para o NIR 1 os valores de RMSECV não apresentam grandes variações da primeira até a quarta Variável Latente, sendo que ocorre uma tendência de crescimento do erro de previsão após a quinta Variável Latente.

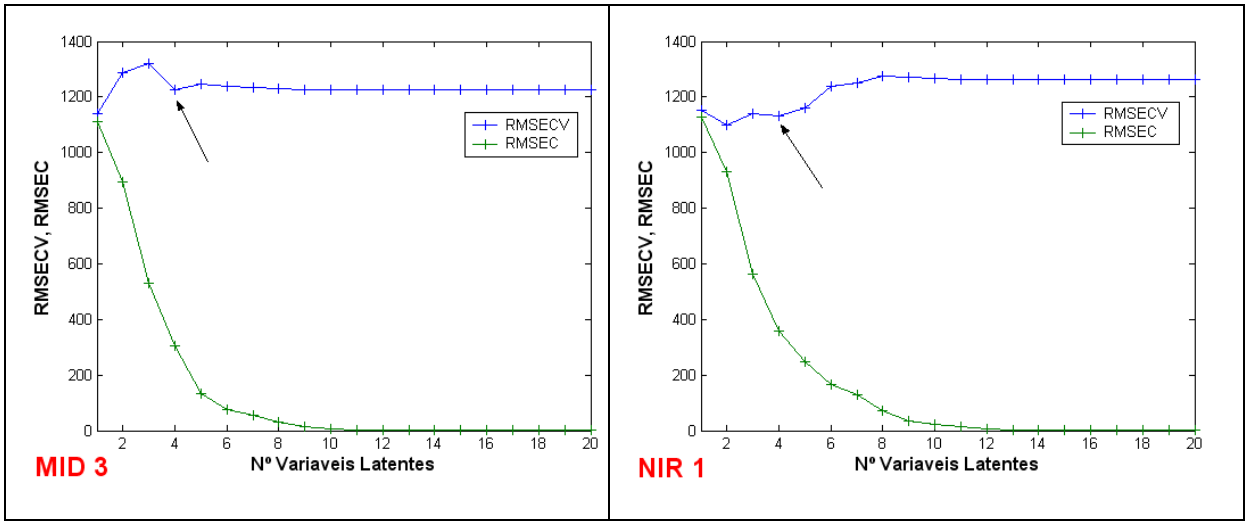


FIGURA 26 – Gráficos de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtidos pelos modelos de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1).

Com 4 Variáveis Latentes, o modelo obtido no MID 3 explica 97,0% da variabilidade dos dados espectrais (matriz X) e 99,5% dos dados de concentração de compostos fenólicos totais (matriz Y). As variâncias capturadas pelo modelo no NIR 1, referentes a matriz espectral e a matriz de concentração são: 95,0% e 99,0%, respectivamente.

As amostras do conjunto de calibração apresentaram-se bem distribuídas em relação ao resíduo e, com isso, não possuem tendências em subestimar ou superestimar a concentração de compostos fenólicos totais, conforme mostra a Figura 27 para os modelos obtidos na região do infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1).

Vale ressaltar que as amostras 19, 20 (variedade M11/01), bem como, 31 e 32 (variedade Eva), embora apresentem baixo resíduo, conforme ilustra a Figura 27, formam um grupo isolado das demais amostras. Este comportamento justifica-se, pois estas amostras apresentam as menores concentrações para compostos fenólicos totais em relação às demais.

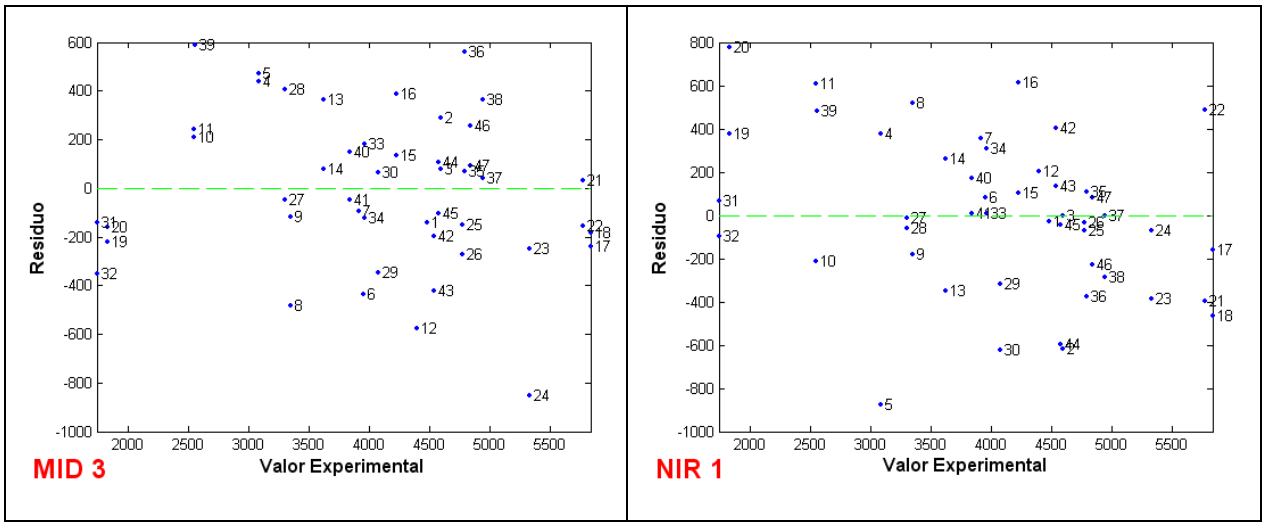


FIGURA 27 - Gráficos de Resíduos *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1).

O conjunto de calibração também não apresentou amostras com comportamento anômalo, sendo o valor limite da *leverage* para os modelos no MID 3 e no NIR 1 de 0,26, e o limite dos resíduos Student de ±2,5 com 95% de confiança. O modelo obtido no infravermelho médio apresentou uma amostra com *leverage* alta (amostra 31) e outra com resíduo Student superior a -2,5 (amostra 24). O primeiro procedimento foi retirar essas amostras, sendo uma de cada vez, para verificar se as características do modelo melhoravam. Em seguida, através da visualização da Figura 28, percebeu-se a necessidade de retirar as amostras 19 e 32, por formarem um grupo isolado das demais amostras no conjunto de calibração. Finalmente, as amostras 19, 24, 31 e 32 foram retiradas juntas e os resultados foram comparados.

Porém, os valores de erros de previsão (erro padrão relativo, RMSEC e RMSECV) não diminuíram após a retirada dessas amostras. A justificativa para isso, é que as amostras 19 (variedade M11/01), 31 e 32 (variedade Eva) apresentam as menores concentrações de fenóis totais (1.836 e 1.742 $mg.L^{-1}$, respectivamente) e a amostra 24 (variedade M2/01) possui a segunda maior concentração (5.329,4 $mg.L^{-1}$), considerando que a média desses compostos no

bagaço da maçã foi de 4.034 mg.L^{-1}. A Figura 28 traz o gráfico da *leverage versus* resíduos Student dos modelos nas regiões MID 3 e NIR 1.

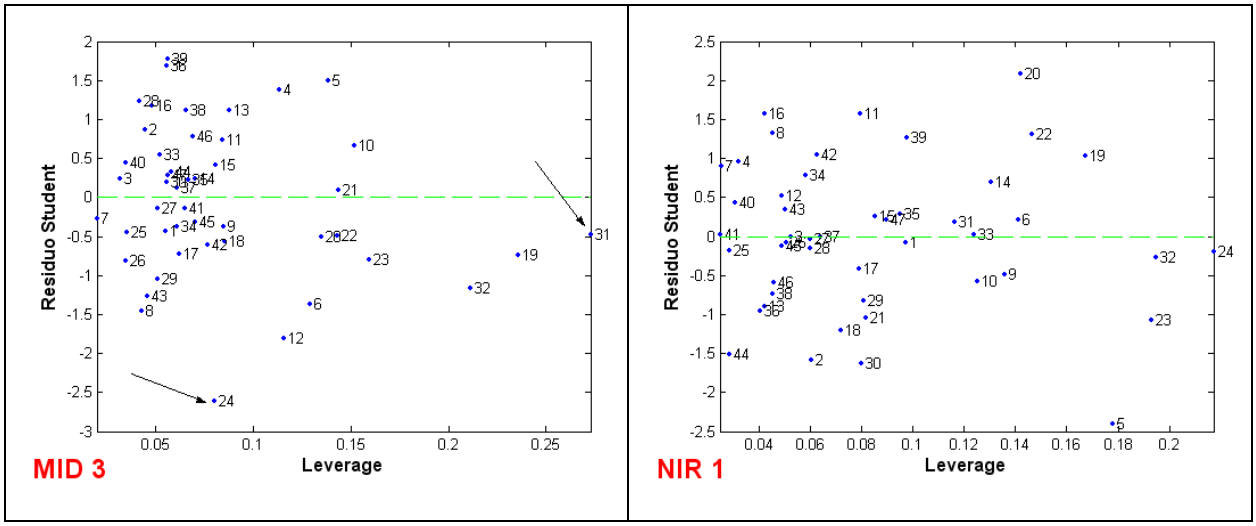


FIGURA 28 - Gráficos de Leverage *vs* Resíduo Student obtidos pelos modelos de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1).

Os coeficientes de correlação obtidos nos dois modelos (MID 3 e NIR 1) revelam a boa capacidade preditiva da concentração de compostos fenólicos totais, sendo 0,96 e 0,93 para amostras da calibração e da validação externa, respectivamente, na região do MID 3, e 0,94 e 0,70, para a região do NIR 1. Os gráficos de valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo estão representados na Figura 29, que além de comprovarem a boa correlação descrita anteriormente, evidenciam uma pequena não-linearidade do modelo MID 3, ou seja, as amostras com menor (amostras 19, 20, 31 e 32) e maior concentração de compostos fenólicos (amostras 17, 18, 22, 23 e 24) apresentam valores experimentais menores que os valores previstos pelo modelo.

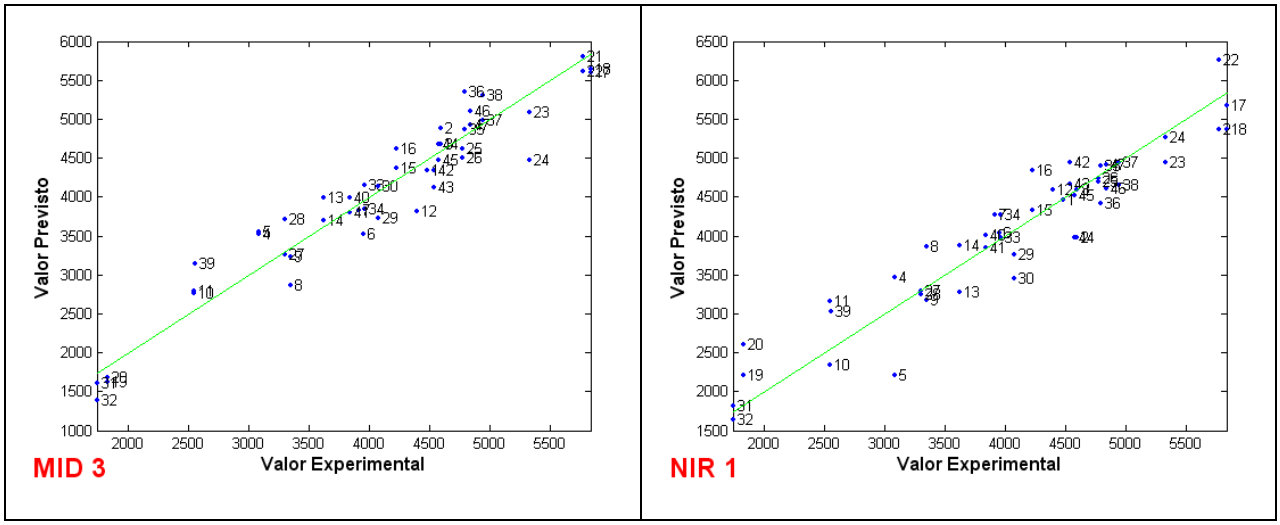


FIGURA 29 - Gráficos de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtidos pelos modelos de calibração no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1) para previsão da concentração de compostos fenólicos totais.

Os resultados dessa previsão, para cada amostra do conjunto de validação externa, estão ilustrados na Tabela 17, com os valores experimentais (análise convencional de Folin-Ciocalteau) e previstos nas regiões MID 3 e NIR 1, bem como, a porcentagem de erro padrão relativo.

TABELA 17 – Resultados da previsão da concentração de compostos fenólicos totais para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelos modelos no infravermelho médio (MID 3) e próximo (NIR 1).

		Valores previstos ($mg.L^{-1}$)		**Erro padrão relativo (%)**	
Amostras	**Valor Experimental ($mg.L^{-1}$)**	**MID 3**	**NIR 1**	**MID 3**	**NIR 1**
1	4.484	4.236	4.165	-5,5	-7,1
2	3.954	4.330	3.746	9,5	-5,3
3	3.915	3.783	3.418	-3,4	-12,7
4	4.394	4.617	3.808	5,0	-13,4
5	2.553	2.778	3.453	8,8	35,2
Erro relativo médio (%)				**6,4**	**14,7**

O modelo obtido no MID 3 apresenta as melhores características para previsão da concentração de compostos fenólicos totais. As justificativas para esta escolha são menores erros de previsão (RMSEC e erro padrão relativo), maiores porcentagens de variância capturada para

descrever os dados espectrais e de concentração de fenóis totais e os valores dos coeficientes de correlação dos conjuntos de calibração e validação externa foram maiores.

A Figura 30 ilustra o gráfico dos coeficientes de regressão com as informações analíticas que foram relevantes para a determinação dos compostos fenólicos totais. O modelo de calibração (MID 3) considera as seguintes regiões espectrais: (a) entre 260 a 80 (correspondente a região de 1000 a 660 cm^{-1}) - deformação angular de CH de aromático, (b) região próxima à 350 (referente ao estiramento C – O de fenol, entre 1250 a 1200 cm^{-1}), (c) região próxima à 500 (estiramento C = C de aromático, próximo de 1500 cm^{-1}) e (d) entre 1100 a 970 (referente a região de 3700 a 3300 cm^{-1}) – estiramento OH de fenol.

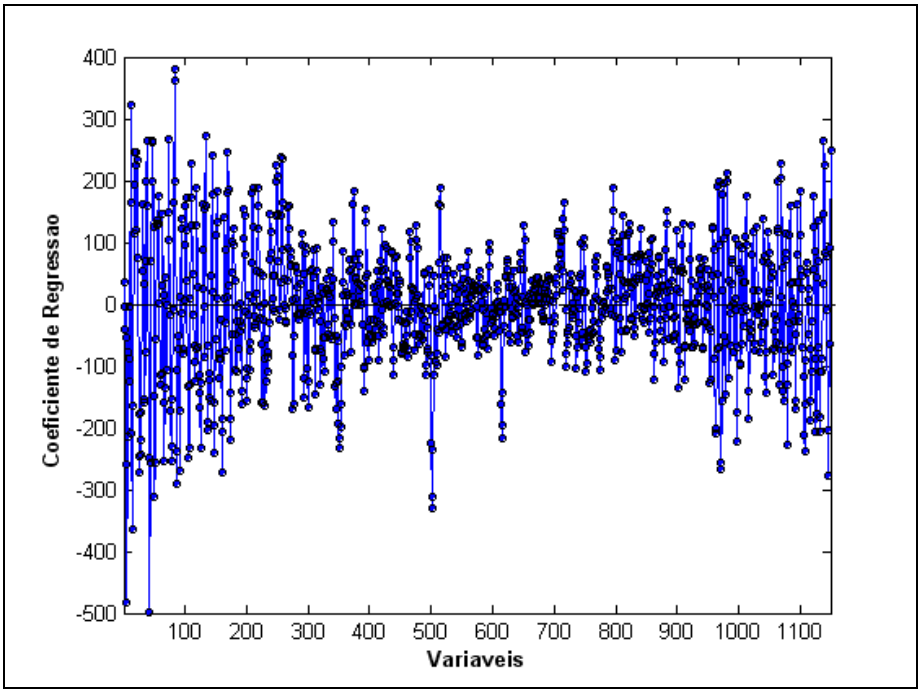


FIGURA 30 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para compostos fenólicos totais no infravermelho médio (MID 3).

5.3.5 Modelos de calibração multivariada para previsão da concentração de ácido málico.

Um maior número de modelos para a determinação da concentração de ácido málico foi obtido no infravermelho médio, visto que não houve possibilidade de cortes na região do infravermelho próximo. De acordo com o gráfico do correlograma (Figura 31) percebe-se que a informação analítica nesta região apresenta correlação zero. Sendo assim, trabalhou-se com o NIR sem cortes, o qual ofereceu média de erro padrão relativo maior que 20% e, por este motivo, melhores erros de previsão da concentração de ácido málico foram obtidos no MID.

Os valores de corte estabelecidos para o infravermelho médio excluíram as regiões com correlação entre 0,05 e -0,05, bem como, incluíram regiões com correlações igual ou inferior a -0,1, -0,15 e -0,2.

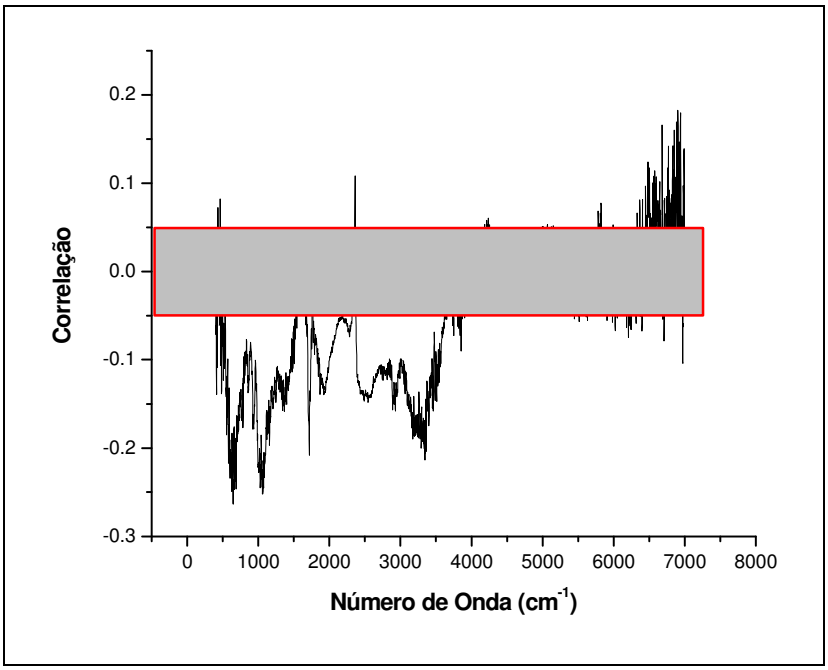


FIGURA 31 - Correlograma para ácido málico incluindo infravermelho médio e próximo

A Tabela 18 ilustra os resultados obtidos pelos modelos multivariados no infravermelho médio e próximo, com os valores de RMSEC e RMSECV, dados dos coeficientes de correlação (Rcal e Rval) e média de erro padrão relativo baseados no número de Variáveis Latentes.

TABELA 18 – Modelos de calibração para a determinação de ácido málico no MID e NIR.

Região	Transformação/ Pré-processamento	* Nº VLs	RMSEC/ RMSECV	**Rcal/ Rval	*** Erro padrão relativo (%)
MID 1	MSC e Dados Centrados na Média	6	0,005 / 0,009	0,98 / 0,98	7,6
MID 2	Normalização e Autoescalamento	5	0,009 / 0,017	0,92 / 0,91	9,9
MID 3	**Normalização, Alisamento e 1ª derivada**	**5**	**0,008 / 0,018**	**0,94 / 0,99**	**5,9**
MID 4	Normalização, Alisamento e 1ª derivada	5	0,015 / 0,032	0,80 / 0,73	16,9
MID 5	Normalização, Alisamento e 1ª derivada	5	0,023 / 0,037	0,40 / 0,30	29,3
NIR 1	Normalização	6	0,007 / 0,024	0,95 / 0,84	24,0

* Número de Variáveis Latentes
** Coeficientes de correlação do conjunto de calibração (Rcal) e validação externa (Rval)
*** Média do Erro padrão relativo do conjunto de validação externa

Legenda:
MID 1 – sem corte (4000 – 500 cm^{-1}) – 1815 números de onda
MID 2 – corte acima de 0,05 e abaixo de -0,05 (3903 – 500 cm^{-1}) – 1520 números de onda
MID 3 – abaixo de -0,1 (3568 – 507 cm^{-1}) – 1153 números de onda
MID 4 – abaixo de -0,15 (3464 – 551 cm^{-1}) – 374 números de onda
MID 5 – abaixo de -0,2 (3363 – 578 cm^{-1}) –107 números de onda

NIR 1 – sem corte (6000 – 4000 cm^{-1}) – 1037 números de onda

A melhor capacidade preditiva para ácido málico é obtida pelo modelo MID 3, que utiliza 1153 números de onda, com os dados otimizados por Normalização, Alisamento e 1ª derivada, empregando-se 5 Variáveis Latentes.

A evolução dos valores de RMSEC e RMSECV em função do número de Variáveis Latentes para o modelo MID 3 está ilustrada na Figura 32. O menor RMSECV é obtido com 7 Variáveis Latentes (RMSECV de 0,017), porém esta diferença é pequena quando comparada com o modelo obtido com 5 Variáveis Latentes. Além disso, modelos com um número maior de VLs podem se tornar superestimados e comprometer a previsão da concentração de ácido málico devido à inclusão de ruídos. Outra característica é que a média de erro padrão relativo com 7 VLs aumenta para 10,0% e, por estes motivos, optou-se pelo modelo com 5 VLs.

As porcentagens de variância capturada pelo MID 3, com 5 Variáveis Latentes, foram de 99,4% para os dados espectrais e 98,9% para os dados de concentração de ácido málico.

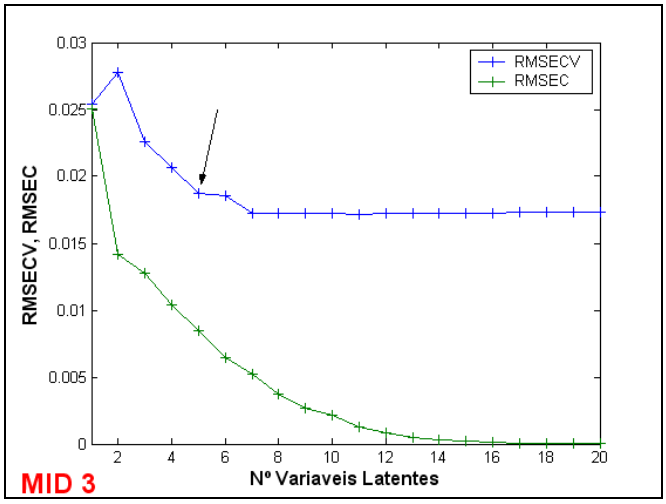


FIGURA 32 – Gráfico de RMSEC e RMSECV *vs* Número de Variáveis Latentes obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3).

As amostras do conjunto de calibração no MID 3 apresentaram boa distribuição em relação ao resíduo e, portanto, não há tendências em subestimar ou superestimar a concentração de ácido málico. No entanto, há duas amostras (amostra 1 – variedade Carícia e amostra 6 – variedade Granny Smith) que se apresentam isoladas das demais, conforme ilustra a Figura 33. Este comportamento justifica-se, pois as variedades Carícia e Granny Smith, possuem as duas maiores concentrações de ácido málico (0,19 e 0,15 % m/m) em relação às outras amostras do conjunto de calibração.

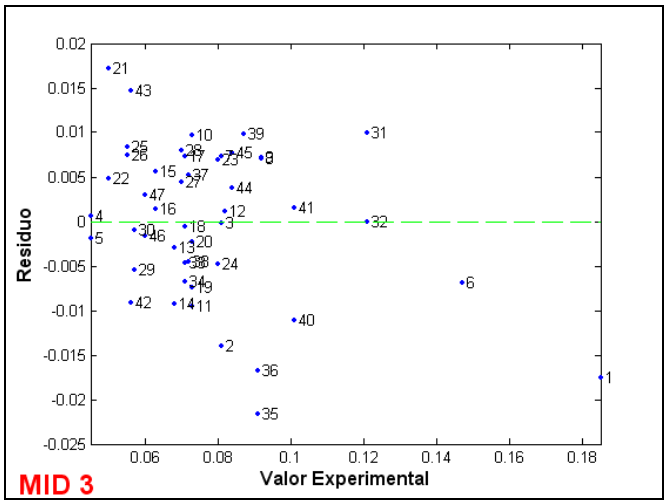


FIGURA 33 - Gráfico de Resíduos *vs* Valor Experimental obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3).

O modelo de calibração MID 3 não apresentou amostras com comportamento anômalo, sendo que apenas a amostra 1 (variedade Carícia) ultrapassou o limite da *leverage* (limite de 0,32 com 5 Variáveis Latentes). A retirada desta amostra no conjunto de calibração não alterou significativamente as características do modelo, tais como redução do número de Variáveis Latentes, RMSEC e RMSECV, sendo que a média de erro padrão relativo aumentou para 11,4%. A Figura 34 ilustra o gráfico de *leverage versus* resíduo Student para o modelo MID 3.

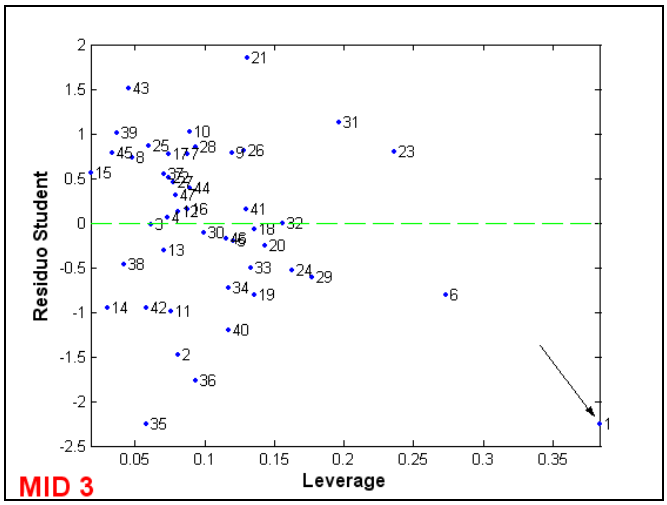


FIGURA 34 - Gráfico de Leverage *vs* Resíduo Student obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3).

Os coeficientes de correlação obtidos pelo modelo demonstram a boa capacidade preditiva da concentração de ácido málico, sendo 0,94 para o conjunto de calibração e 0,99 para o conjunto de validação externa. A Figura 35 mostra o gráfico de valor experimental *versus* valor previsto pelo modelo com 5 Variáveis Latentes. Nesta Figura, é perceptível a diferença de concentração entre as amostras 1 e 6, juntamente com a 31 e 32 (variedade Eva – com 0,12 % m/m de ácido málico). Como já foi mencionado, o comportamento destas amostras é justificado pela alta concentração de ácido málico presente nessas variedades, visto que a média de concentração encontrada no bagaço da maçã foi de 0,08 %.

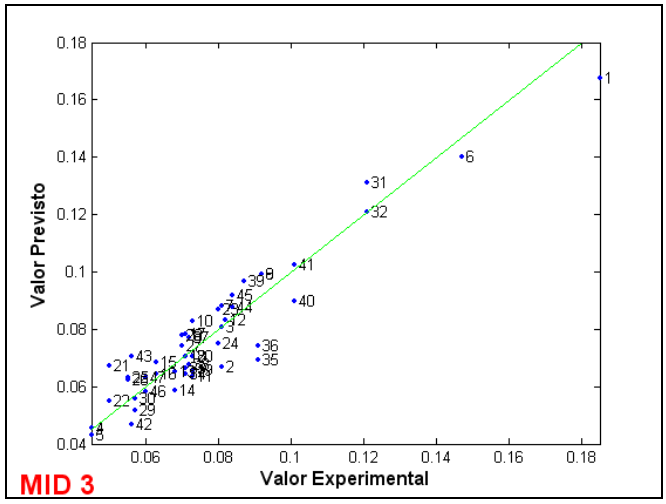


FIGURA 35 - Gráfico de Valor Previsto *vs* Valor Experimental obtido pelo modelo de calibração no infravermelho médio (MID 3) para previsão da concentração de ácido málico.

Os resultados da previsão estão ilustrados na Tabela 19, com os valores experimentais e previstos para ácido málico, a partir do modelo obtido no infravermelho médio (MID 3), com 5 Variáveis Latentes.

TABELA 19 – Resultados da previsão da concentração de ácido málico para as amostras do conjunto de validação externa, obtidos pelo modelo no infravermelho médio (MID 3).

Amostras	Valor Experimental (% m/m)	Valor Previsto (% m/m)	Erro padrão relativo (%)
1	0,19	0,16	-12,4
2	0,15	0,14	-6,9
3	0,08	0,079	-1,6
4	0,08	0,083	0,9
5	0,09	0,08	-7,7
Erro relativo médio (%)			**5,9**

No gráfico de coeficiente de regressão (Figura 36), percebe-se que o modelo MID 3 apresenta boa capacidade preditiva por incluir sinais de absorção específicos dos ácidos carboxílicos, tais como: (a) região entre 480 a 460 (que corresponde aos comprimentos de onda entre 1730 a 1700 cm^{-1}) - estiramentos C = O de ácido carboxílico e (b) região próxima a 570 (correspondente aos números de onda próximos a 2390 cm^{-1}) - estiramentos OH de ácido carboxílico.

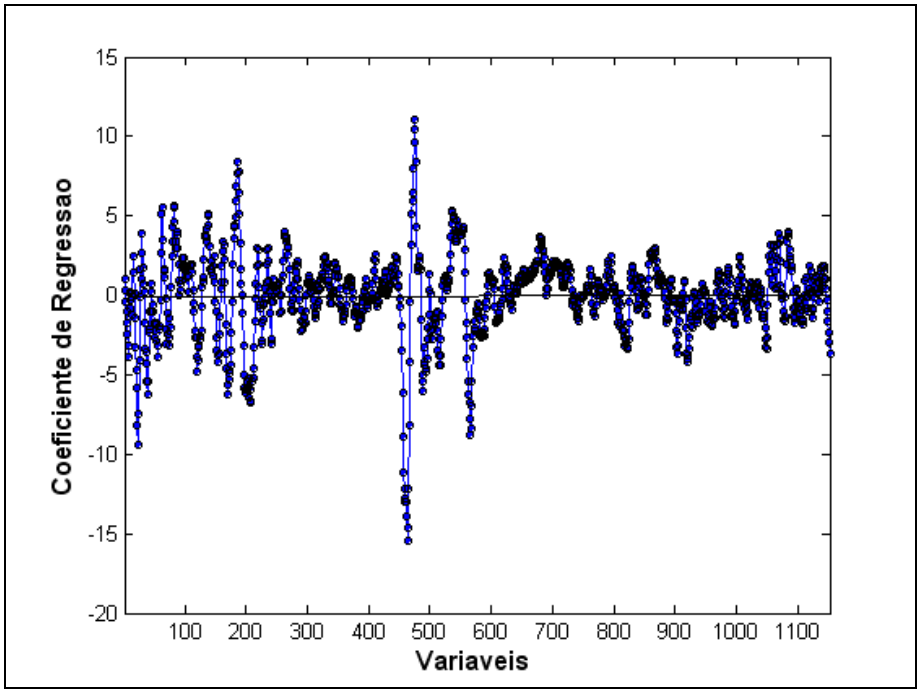


FIGURA 36 - Gráfico do coeficiente de regressão *vs* variáveis obtido pelo modelo de calibração para ácido málico no infravermelho médio (MID 3).

6 CONCLUSÕES

As metodologias convencionais para a quantificação de glucose, frutose, sacarose, acidez total titulável (expressa em % m/m de ácido málico) e compostos fenólicos totais no bagaço da maçã, foram essenciais para a formação dos conjuntos de calibração e validação, que por sua vez possibilitaram a obtenção dos modelos multivariados. A utilização da espectroscopia no infravermelho por refletância difusa, aliada ao método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), permitiu a obtenção de modelos de regressão multivariados com bons coeficientes de correlação e baixos erros de previsão.

Os métodos de transformação e pré-processamento de dados, bem como, a seleção de variáveis (correlograma), auxiliaram na otimização dos modelos, tornando-os mais exatos e robustos.

A região do infravermelho médio (MID) forneceu bons resultados para a previsão da concentração de frutose, sacarose, fenóis totais e ácido málico, onde as médias de erro padrão relativo foram de 3,9% (com 5 Variáveis Latentes), 6,6% (com 5 Variáveis Latentes), 6,4% (com 4 Variáveis Latentes) e 5,9% (com 5 Variáveis Latentes), respectivamente. Outra característica importante é que os dados fornecidos pelo correlograma auxiliaram na otimização dos modelos multivariados para frutose, sacarose, fenóis totais e ácido málico e as regiões do espectro com informação analítica relevante, para cada determinação, puderam ser visualizadas pelo coeficiente de regressão.

Para a previsão da concentração de glucose, o infravermelho próximo (NIR) ofereceu os melhores resultados, com bons coeficientes de correlação (Rcal e Rval) e maiores porcentagens de variância capturada pelos dados espectrais e de concentração. O NIR também apresentou um menor número de Variáveis Latentes para explicar a variabilidade dos dados. A média de erro padrão relativo para a previsão da concentração de glucose foi de 7,4%, empregando-se 6 Variáveis Latentes.

De uma forma geral, os resultados obtidos demonstraram a boa capacidade de previsão das concentrações de interesse a partir de modelos multivariados fundamentados em espectroscopia de infravermelho. Os erros médios de previsão foram menores que 8,0%, sendo um excelente indicativo das vantagens características entre a associação DRIFT-PLSR.

7 TRABALHOS FUTUROS

Em virtude das observações a respeito do estudo realizado sobre o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada, baseados em análises de espectroscopia no infravermelho, seguem-se algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Quantificação de açúcares simples em farinha de bagaço de maçã empregando-se metodologias cromatográficas para formar um conjunto de calibração mais consistente e que ofereça menores erros de previsão na determinação destes constituintes;

- Utilizar as técnicas cromatográficas para determinar ácidos orgânicos e fracionar os compostos fenólicos presentes no bagaço da maçã. Posteriormente, verificar a potencialidade dos modelos de regressão multivariados (PLSR), baseados em espectroscopia no infravermelho, para a determinação individual dos diversos ácidos orgânicos e compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã.** 2003. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ALMEIDA, G. V. B. de; ALVES, A. A. A maçã no mundo, no Brasil e no ETSP da CEAGESP: um pequeno panorama da maçã no mundo e no Brasil**. Toda Fruta**. Disponível em: http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=12448. Acesso em: 26 maio 2006.

AMARANTE, C. V. T.; CHAVES, D. V.; ERNANI, P. R. Composição mineral e severidade de "bitter pit" em maçãs 'Catarina'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 28, n.1, p. 51-54, Abril, 2006.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS**.** ***Official Method of Analysis*****.** Washington, 1965.

BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007.

BERGMEYER, H. U; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer HU, editor. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag-Academic Press, p.1205-1215, 1974.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e da producão de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais.** 1997. 112f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C. R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruity aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid cultures from agro-industrial wastes. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n.3, 1998.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1995.

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Efeito do carbaryl sobre o 'russeting' da maçã (*malus domestica* borkh.), cultivares 'Gala', 'Fuji' e 'Golden delicious'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.23, n.3, p. 580 – 583, Dez. 2001.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; LEITE, J. C. A.; DA SILVA, F. L. H. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

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

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio: determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. **Química Nova**, São Paulo - SP, v. 25, n.1, p. 46-52, Jan./Fev. 2002.

CZELUSNIAK, C.; OLIVEIRA, M. C. S.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; WOSIACKI, G. Qualidade de maças comerciais produzidas no Brasil: aspectos físico-químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas – SP, v. 6, n.1, p. 25-31, Jan/Jun. 2003.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Novas cultivares de macieira: proposta de nova composição de pomares com polinizadoras / produtoras. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis - SC, v.10, n. 2, p.25-30, Jun. 1997.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Colorimetric determination of reducing sugar in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 473-477, April 1994.

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

DUPUY, N.; MEURENS, M.; SOMBRET, B.; LEGRAND, P.; HUVENNE J. P. Determination of sugars and organic acids in fruit juices by FT-MID-IR investigation of dry extract. **Applied Spectroscopy,** v. 46, n. 5, p. 860-863, May 1992.

ENDREß, H. U. High quality resulting from product integrated environment protection – PIUS. **Fruit Processing**, Oberhonnerfeld, v.10, n.7, p. 273-276, 2000.

EPAGRI – EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. Disponível em: http://www.epagri.rct-sc.br. Acesso em: 14 abril 2006.

EPAGRI. EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. **A cultura da macieira**. Florianópolis, p. 743, 2002.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistical Databases**. Disponível em: http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp. Acesso em: 14 abril 2006.

FERRÃO, M. F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecnológica,** Santa Cruz do Sul - RS, v. 5, n. 1, p. 65-85, Jan./Jun. 2001.

FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MULLER, E. I.; DAVANZO, C. U. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIRR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v. 24, n.3, p. 333-340, Jul./Set. 2004.

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

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiomentria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo – SP, v. 22, n. 5, p. 724-731, Set./Out.1999.

FERREIRA L. S.; DE SOUZA, M. B. Jr; TRIERWEILER, J.O.; BROXTERMANN, O.; FOLLY, R. O. M.; HITZMANN, B. Aspects concerning the use of biosensors for process control: experimental and simulation investigations. **Computers & Chemical Engineering**, v. 27, n. 8-9, p. 1165-1173, Sep. 2003.

FERTONANI, H. C. R. **Estabelecimento de um modelo de extração acida de pectina de bagaço de maçã**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

FERTONANI, H. C. R.; SCABIO, A.; SCHEMIN, M. H. C.; CARNEIRO, E. B. B.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. **Seminário de Ciências Agrárias**, Londrina - PR, v. 27, n. 4, p. 599-612, Out./Dez. 2006.

FERTONANI, H. C. R.; SIMÕES, D. R. S.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Potencial da variedade Joaquina para o processamento de suco clarificado e vinho seco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v.26, n.2, p. 434-440, Abr./Jun. 2006.

GUCHARDI, R. **Espectroscopia no infravermelho próximo com o uso de filtro óptico-acústico sintonizável:** instrumentação e aplicações. 2000. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

GUTIERREZ-MICELI, F. A.; ARIAS-CASTRO, C.; DENDOOVEN, L.; MENDEZ-SALAS, R.; RODRIGUEZ-MENDIOLA, M. A.; OCHOA-ALEJO, N.; BELLO-PEREZ, L. A. Regulación enzimatica de la acumulación de sacarosa en plantas de cana de azucar (Saccharum ssp). **Agrociência**, v. 36, p. 411-419, 2002.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 365-377, Dec. 2003.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: IAL, v.1, 1985.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal:** banco de dados agregados do IBGE, sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em: http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t&o=10. Acesso em: 14 abril 2006.

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, Dec. 2003.

KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L. Y. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. **Modern methods of plant analysis**: analysis of plant waste materials. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, p. 75-119, 1999.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; GIMENO, E.; FITÓ, M.; CASTELLOTE, A. I.; COVAS, M. TORRE-BORONAT, C.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Interaction of olive oil phenol antioxidant components with low-density lipoprotein. **Biological Research**, Santiago - Chile, v. 37, n. 2, p. 247-252, 2004.

LEMONS e SILVA, C. F.; MILACH, S. C. K.; ANJOS e SILVA, S. D.; FEDERIZZI, L. C.; MONTERO, C. R.; FONTANELI, R. S. Frações de fibra em aveia e sua aplicação em programas de melhoramento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília – DF, v. 41, n. 6, p. 975-980, Jun. 2006.

LENDL, B.; KELLNER, R. Determination of sucrose by flow injection analysis with Fourier transform infrared detection. **Microchimica Acta**, v. 119, n. 1-2, p. 73-79, March 1995.

LI, W.; GOOVAERTS, P.; MEURENS, M. Quantitative analysis of individual sugars and acids in orange juices by near-infrared spectroscopy of dry extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 44, n. 8, p.2252-2259, 1996.

LU, Y.; FOO, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997.

MARASCHIN, R. P.; IANSSEN, C.; GONÇALVES, V. Z.; FERREIRA, H. N.; CARO, M. S. B.; MARASCHIN, M. Detecção de compostos fenólicos em vinhos tintos *Cabernet Sauvignon* por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. In: **Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 10**., 2003, Bento Golçalves. **Anais**... Bento Gonçalves: Embrapa – CNPUV, p.220-21, 2003.

McGHIE, T. K.; HUNT, M.; BARNETT, L. E. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3065 – 3070, 2005.

MESSERSCHMIDT, I. **Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de refletância e calibração multivariada.** 1999. Tese (Doutorado em Química), UNICAMP, Campinas, 1999.

MORGANO M. A.; CAMARGO C.; PAGEL A. P.; FERRÃO M. F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA M.M.C. Determinação simultânea dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru por análise multivariada (PLS) em dados de espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho próximo. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, **2.**, 2001, Vitória. **Anais**... Vitória: Embrapa - CENICAFE, p.1502-1510, 2001.

MORGANO, M. A., FARIA, C. G., FERRÃO, M. F., FERREIRA, M. M. C. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, São Paulo – SP, v. 30, n. 2, p. 346-350, Mar./Abril 2007.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRAO, M. F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v. 25, n.1, p. 25-31, Jan./Mar. 2005.

MORGANO, M. A.; MORIYA, C.; FERREIRA, M. M. C. Determinação quantitativa do teor de sacarose em açúcar cristal por espectroscopia FT-IR/ATR e regressão multivariada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n. 1, p. 77-83, Jan./Jun. 2003.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. Métodos matemáticos para a correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-X. **Química Nova**, São Paulo – SP, v. 24, n. 4, p. 531-539, Jul./Ago. 2001.

NASATO, D. S.; RIBEIRO, E. T. S.; FETT, R.; FERREIRA, S. R. S. Avaliação do conteúdo fenólico de extratos do subproduto do processamento de suco concentrado de maçã (*Mallus comunis*). In: **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência),** 2006, Florianópolis, SC, Jul./2006.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. **Seminário de Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 187-194, Abr./Jun. 2005.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; WIECHETECK, F. V. B.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Revista Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e de Engenharia**, v.3, n.9, p. 7-14, Dez. 2003.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001-2002). **Ciências Agrotecnológicas**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, Nov./Dez. 2004.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; WOSIACKI, G. Aproveitamento de bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. **Ciências Agrotecnológicas**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1231-1238, Nov./Dez. 2005.

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, May 1997.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v.25, n.4, p. 750-756, Out./Dez. 2005.

RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 911-914, Mai/Jun. 2007.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; FRY, F. S.; McLAUGHLIN, M. A.; CALVEY, E. M. Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 1, p. 63-74, Nov. 2001.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v. 27, n.1, p.53-60, Jan./Mar. 2007.

SALIBA, E. O. S.; GOTIJO NETO, M. M.; RODRIGUEZ, N. M.; MIRANDA, L. F.; OBEID, J. A.; TEIXEIRA, G. L.; OLIVEIRA, M. A. Predição da composição química do sorgo pela técnica de espectroscopia de refletância no infravermelho próximo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 357-360, Jun. 2003.

SCHEMIN, M. H. C. **Obtenção de pectina alimentícia a partir de bagaço de maçã**. 2003. 70f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SCHIEBER, A.; HILT, P.; STREKER, P.; ENDREß, H.U; RENTSCHLER, C.; CARLE, R. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds form apple pomace. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 4, n. 1, p. 99-107, Mar. 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. In: **Phenolics in food and nutraceuticals.** New York, Washington, D. C.: CRC Press, 2004.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v. 23, n.3, p. 337-341, Set./Dez. 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent**.** **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p.152-178, 1999.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. M. K.; KORACH, R. L. Detection of adulteration in apple juice using mid infrared spectroscopy. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 17, n. 6, p. 815-820, 2001.

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

SOARES, M. C.; WELTER, L.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Fenólicos totais e capacidade antioxidante de bagaço de maçã. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência),** 2006, Florianópolis, SC, Jul./2006.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n.1, p. 19-23, 1952.

STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica.** 2004. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, Dec. 2002.

TANNER, H.; BRUNNER, H. R. **Getränke analytik**: untersuchungsmethode für die Labor- und Betriebspraxis. Wädesnwill: Verlag Helles, 206p, 1985.

THOMAS, E. V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 15, p. 795 – 804, Aug.1994.

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

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G. Determinação de ácidos carboxílicos e fenólicos em café solúvel utilizando HPLS/DAD. **Revista Analytica**, ed. 27, p. 76-79, Fev./Mar. 2007.

VILLAS BOAS, S. G. **Conversão do bagaço da maçã por *Candida utilis* e *Pleurotus ostreatus* visando à produção de suplemento para ração animal**. 2001. 126f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

WAPA - *WORLD APPLE AND PEAR ASSOCIATION.* Disponível em: http://www.wapa-association.org. Acesso em : 14 abril 2006.

WIECHETECK, F. V. B.; NOGUEIRA, A.; DRILLEAU, J. F; WOSIACKI, G. Efeito da crioconcentração sobre o teor de compostos fenólicos em mostos industriais de maçã. **Revista Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e de Engenharia**, v.1, n.11, p. 27-34, Abr. 2005.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: **Tecnologia de bebidas**. VENTURINI FILHO, W. G. Edgard Blücher, cap. 12, p. 255-288, 2005.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Apple varieties growing in subtropical areas : the situation of Santa Catarina – Brazil. **Fruit Processing,** Schönborn, v.12, n.1, p.19-28, Jan. 2002.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C.; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas – SP, v. 24, n. 3, p. 347-352, Jul./Set. 2004.

WOSIACKI, G.; SATAQUE, E. Y.; MORAES, M. A. C.; SICHIERI,V. L. F. S.; CERIBELLI,M.I.P.F.; NAMIUCHI,N.N.; CESAR,E.O. Avaliação sensorial do suco de maçã Gala com atividade controlada de polifenoloxidase. **Alimentos & Tecnologia**, São Caetano do Sul - SP, v. 3, n. 22, p. 59-62, 1989.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo