

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

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN NO
MONITORAMENTO DOS CAROTENOIDES EM ALIMENTOS
PROCESSADOS**

TESE DE DOUTORADO

Juliano Antônio Sebben

Porto Alegre

2021

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

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN NO
MONITORAMENTO DOS CAROTENOIDES EM ALIMENTOS
PROCESSADOS**

Juliano Antônio Sebben

Tese de Doutorado (D.Sc) vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

Linha de Pesquisa: Projeto, Simulação, Modelagem, Controle e Otimização de Processo Químicos e Bioprocessos.

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler

Co-orientadora:

Prof^a.Dr^a. Juliana da Silveira Espindola

Porto Alegre

2021

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado *Aplicação de Espectroscopia Raman no Monitoramento dos Carotenoides em Alimentos Processados*, elaborada por Juliano Antônio Sebben, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão
Instituto de Química – UFRGS

Prof^a Dra. Naira Maria Balzaretto
Instituto de Física – UFRGS

Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin
Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos - UFSM

Resumo

A espectroscopia Raman tem ganhado cada vez mais importância em diversos ramos de pesquisa em processos industriais. Como uma técnica vibracional, é através de padrões espectrais específicos que substâncias podem ser identificadas e transformações moleculares podem ser observadas com alta especificidade. As principais vantagens da tecnologia Raman estão na análise rápida, não invasiva e não destrutiva, com o mínimo preparo da amostra. Contudo, a qualidade dos espectros resultantes limita-se a concentrações do analito e à intensidade da vibração molecular durante a incidência de radiação. Paralelamente a isso, no setor alimentício, os carotenoides são compostos bioativos de grande interesse devido aos benefícios que o seu consumo traz à saúde e ao perfil consumidor que deseja consumir produtos de maior qualidade nutricional. Nesse sentido, esses compostos vêm sendo amplamente estudados, a fim de elucidar suas propriedades físico-químicas, estabilidade durante estocagem e processamento, biodisponibilidade e implicações na saúde humana. Além disso, os carotenoides estão presentes em plantas como frutas e vegetais e não são sintetizados em animais. Assim, devido à instabilidade dos carotenoides, entende-se a importância em monitorar as suas perdas durante o processamento térmico. Essas perdas, por sua vez, ocorrem porque o aquecimento inativa as enzimas responsáveis pela carotenogênese e estimula a isomerização e a degradação oxidativa dos carotenoides. Assim, no contexto de aliar essas tecnologias não intrusivas com a preservação da qualidade dos produtos e sua ampliação do tempo de prateleira, esse trabalho investiga a espectroscopia Raman como um método analítico alternativo e potencial para monitoramento da degradação dos carotenoides presentes em alimentos suscetíveis a diferentes condições de processamento térmico. Neste trabalho, amostras de batata-doce de polpa alaranjada foram desidratadas através da secagem convectiva com ar quente e por micro-ondas com tambor rotativo e pressão reduzida. Também foram avaliadas amostras da polpa da fruta *Bunchosia glandulifera* secas nas temperaturas de 65 e 85 °C. O teor dos carotenos, que incluem o β -caroteno e o licopeno, durante diferentes tempos de secagem foi avaliado utilizando o espectrofotômetro Raman com frequência do laser de excitação em 532 nm. Para as análises quantitativas foi aderida a técnica proposta com e sem padrão interno de TiO_2 na fase rutilo. Além disso, foram realizadas a análise dos componentes principais (PCA) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), sendo esta técnica quimiométrica validada pelo método já consolidado de leitura da absorbância em espectrofotômetro visível do extrato em éter de petróleo. Como resultados, os melhores coeficientes de regressão para amostras de batata-doce foram $R^2=0,90$ para a secagem convectiva e $R^2=0,88$ para micro-ondas. Para ambas, a redução no teor de carotenos totais ao final da secagem foi de aproximadamente 50%. Já para as amostras de *B. glandulifera*, modelos com $R^2=0,96$ foram alcançados. A reprodutibilidade e homogeneidade das amostras também foram avaliadas. Além disso, estudos de filtros de suavização do sinal espectral no pré-processamento de dados foram realizados utilizando o conjunto global de amostras. Como resultado, a utilização do filtro digital chamado *filtfilt* implicou na remoção parcial do ruído espectral e proporcionou a construção de modelos de classificação supervisionados - análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e algoritmos de máquina supervisionados - com até 90 % de acurácia.

Abstract

Raman spectroscopy has gained increasing importance in several fields of research in industrial processes. As a vibrational technique, it is through specific spectral patterns that substances can be identified and molecular transformations can be observed with high specificity. The main advantages of Raman technology are fast, non-invasive and non-destructive analysis, with minimal sample preparation. However, the quality of the resulting spectra is limited to analyte concentrations and the intensity of molecular vibration during radiation incidence. At the same time, in the food sector, carotenoids are bioactive compounds of great interest due to the benefits that their consumption brings to health and to the consumer profile that wants to consume products with higher nutritional quality. In this sense, these compounds have been widely studied in order to elucidate their physicochemical properties, stability during storage and processing, bioavailability and implications for human health. Furthermore, carotenoids are present in plants such as fruits and vegetables and are not synthesized in animals. Thus, due to the instability of carotenoids, the importance of monitoring their losses during thermal processing is understood. These losses, in turn, occur because heating inactivates the enzymes responsible for carotenogenesis and stimulates the isomerization and oxidative degradation of carotenoids. Thus, in the context of combining these non-intrusive technologies with the preservation of product quality and its extension of shelf life, this work investigates Raman spectroscopy as an alternative analytical method and potential for monitoring the degradation of carotenoids present in foods susceptible to different thermal processing conditions. In this work, samples of orange-fleshed sweet potato were dehydrated by convective drying with hot air and microwaves with a rotating drum and reduced pressure. Samples of the fruit pulp of the *Bunchosia glandulifera* fruit dried at constant temperature at 65 and 85 °C were also evaluated. The content of carotenes, which include β -carotene and lycopene, during different drying times was evaluated using a Raman spectrophotometer with excitation laser frequency at 532 nm. For quantitative analysis, the proposed technique was used with and without an internal standard of TiO_2 in the rutile phase. In addition, principal component analysis (PCA) and partial least squares regression (PLS) were performed, and this chemometric technique was validated by the already consolidated method of absorbance reading in a visible spectrophotometer of the petroleum ether extract. As a result, the best regression coefficients for sweetpotato samples were $R^2=0.90$ for convective drying and $R^2=0.88$ for microwave. For both, the reduction in the content of total carotenes at the end of drying was approximately 50%. As for the samples of *B. glandulifera*, models with $R^2=0.96$ were achieved. The reproducibility and homogeneity of the samples were also evaluated. In addition, spectral signal smoothing filter evaluations in data pre-processing were performed using the global set of samples. As a result, the use of the digital filter *filtfilt* resulted in the partial removal of spectral noise and provided the construction of supervised classification models - discriminant analysis of partial least squares (PLS-DA) and supervised machine algorithms - with up to 90% accuracy.

“Ask the right questions, and nature will open the doors to her secrets”.
(C.V. Raman)

Agradecimentos

À CAPES, pelo indispensável suporte financeiro para a realização da pesquisa.

À minha família que sempre me apoiou com palavras de incentivo, acreditando na dignidade que existe em uma longa caminhada de estudos.

Aos meus colegas de GIMSCOP e amigos do doutorado que contribuíram nos momentos de auxílio, discussão, descontração e que, certamente, colaboraram para a construção desse trabalho.

Ao Professor Jorge, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e compartilhamento de experiências, pela disponibilidade e pelas competências tecnológicas do grupo de pesquisa que lidera.

À Professora Juliana, essencial para o desenvolvimento desse trabalho, pelo apoio técnico, pela colaboração entre universidades, pela parceria e diálogo.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	1
Motivação.....	1
Objetivos do trabalho.....	3
Estrutura do trabalho	3
Contribuições	4
Resumo Gráfico	4
Referências.....	5
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	8
Espectroscopia vibracional aplicada a alimentos.....	8
Espectroscopia Raman	10
2..1 O efeito Raman	10
2..2 Instrumentação básica de um sistema Raman	13
Aplicações da espectroscopia Raman	16
Espectroscopia Raman na análise de alimentos	19
Carotenoides	22
Métodos quimiométricos.....	27
2..1 Análise de componentes principais - PCA	27
2..2 Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS.....	29
2..3 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais – PLS-DA	30
2..4 Análise de agrupamento hierárquico – HCA	30
Referências.....	30
Capítulo 3 – Desenvolvimento de uma abordagem quantitativa utilizando espectroscopia Raman para determinação de carotenoides em batata-doce	35
Introdução.....	36
Materiais and Métodos	37
3..1 Amostras.....	37
3..2 Procedimento experimental.....	38
3..3 Quantificação de Carotenoides por Espectrometria na região do visível	38
3..4 Análises Raman.....	39
Resultados e discussão.....	41
Conclusões.....	48
Referências.....	49
Capítulo 4 – Espectroscopia Raman no monitoramento do perfil de degradação dos carotenoides em polpas processadas de <i>Bunchosia glandulifera</i>	51
Introdução.....	52
Materiais e Métodos	53
4..1 Amostras.....	53
4..2 Quantificação de carotenoides por espectrometria na região do visível.....	53
4..3 Análise Raman	54
4..4 Análise de dados espectrais.....	54
Resultados e discussão.....	55
Conclusões.....	62
Referências.....	62
Capítulo 5 – Avaliação de filtros de suavização em espectros Raman para a classificação de amostras fonte de carotenoides.....	67
Introdução.....	68
Materiais e métodos	70

5.1 Amostras.....	70
5.2 Procedimento experimental.....	70
5.3 Análise de dados.....	70
Resultados e discussão.....	72
Conclusões.....	77
Referências.....	78
Capítulo 6 – Considerações Finais	82
Conclusões.....	82
Capítulo 7 – Referências	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Resumo gráfico, indicando as conexões entre os objetivos, contribuições e capítulos deste trabalho.	5
Figura 2.1: Tipo de espalhamento da luz - visão clássica x visão quântica - Adaptado de PARSON (2007).	11
Figura 2.2: Esquema simplificado dos componentes de um seletor de comprimento de ondas em um espectrômetro Raman dispersivo.	15
Figura 2.3: Esquema de um espectrômetro Raman dispersivo utilizando um detector CCD. Adaptado de CHALMERS; EDWARDS; HARGREAVES (2012).	16
Figura 2.4: Apresentação esquemática dos campos de análise alimentar em que a espectroscopia Raman é aplicada. Adaptado de (BOYACI <i>et al.</i> , 2015).	20
Figura 2.5: Importantes características físicas, químicas e biológicas dos carotenoides. ..	23
Figura 2.6: Estruturas químicas dos principais carotenoides mostrando suas colorações naturais baseadas no espectro ultravioleta/visível.	25
Figura 2.7: Decomposição da matriz X. Fonte: (POMERANTSEV, 2014).	28
Figura 3.1: a) Esquema do sistema de tambor rotativo com aquecimento por micro-ondas e bomba de vácuo. b) Representação tridimensional do tambor: 1 - Flange; 2 - Parede; 3 - Chicanas; 4 - Tampa.	38
Figura 3.2: Espectro Raman para a mistura de OFSP e TiO ₂ . Espectro médio das amostras aquecidas com ar quente (a) e respectivas réplicas (a.1); Espectro médio das amostras aquecidas por micro-ondas (b) e respectivas réplicas (b.1); ambos após o pré-processamento de dados.	42
Figura 3.3: Gráficos dos escores da análise dos componentes principais (PC1 x PC2) das amostras de batata doce (A) quando aquecidas com ar quente a 85 °C e (B) quando aquecidas por micro-ondas no tambor rotativo.	43
Figura 3.4: Teor de carotenoides em batata doce seca com ar quente. Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível (triângulo) e pelo método Raman (círculo) em relação à área entre (A) 1520 e 447 cm ⁻¹ , (B) 1157 e 447 cm ⁻¹ e (C) 1006 e 447 cm ⁻¹ . Correlação entre a intensidade Raman relativa e o teor de carotenoides entre (D) 1520 e 447 cm ⁻¹ , (E) 1157 e 447 cm ⁻¹ e (F) 1006 e 447 cm ⁻¹	45
Figura 3.5: Teor de carotenoides em batata doce seca com micro-ondas. Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível (triângulo) ou pelo método Raman (círculo) em relação à área entre (A) 1520 e 447 cm ⁻¹ , (B) 1157 e 447 cm ⁻¹ e (C) 1006 e 447 cm ⁻¹ . Correlação entre a intensidade Raman relativa e o teor de carotenoides entre (A) 1520 e 447 cm ⁻¹ , (E) 1157 e 447 cm ⁻¹ e (F) 1006 e 447 cm ⁻¹	46
Figura 4.1: Espectro médio Raman para frutos de polpa de <i>B. glandulifera</i> : (A) mistura de polpa processada a 85 °C com TiO ₂ ; (B) mistura de polpa processada a 65 °C com TiO ₂ e polpa (C) processada a 85 °C pura (sem o uso de TiO ₂).	56
Figura 4.2: Teor de carotenoides em polpa pura de <i>B. glandulifera</i> seca com ar quente a 85 °C. (A) Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível (quadrado) ou pelo método da intensidade Raman relativa (losângo) em relação à área entre 1006, (B) 1157 e (C) 1520 cm ⁻¹ . (D) Correlação linear entre a intensidade Raman relativa em 1006, (E) 1157 e (F) 1520 cm ⁻¹ e o teor de carotenoides medido pelo método da espectrofotometria visível.	58
Figura 4.3: Teores de carotenoides na mistura contendo TiO ₂ e polpa de <i>B. glandulifera</i> secas com ar quente a 85 e 65 °C. (A) Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível ou pelo método da intensidade Raman relativa em relação à área entre 1006, (B) 1157 e (C) 1520 cm ⁻¹ . (D) Correlação linear entre a intensidade	

Raman relativa em 1006, (E) 1157 e (F) 1520 cm^{-1} e o teor de carotenoides medido pelo método da espectrofotometria visível.	59
Figura 4.4: Gráfico de PCA. A) Amostra pura seca a 85 ° C durante 10 min (1-6), 20 min (7-12), 30 min (13-18), 100 min (19-24) e, 220 min (25-30). B) amostra com TiO_2 e seca a 85°C durante 10 min (1-6), 20 min (7-11), 30 min (12-17), 100 min (18-23), 220 min (24-27) e 280 min (28-34). C) amostra com TiO_2 e seca a 65 ° C durante 10 min (1-5), 20 min (6-11), 100 min (12-17), 220 min (18-23) e 280 min (24-29).....	61
Figura 5.1: Fluxograma de tratamento de dados.	71
Figura 5.2: Espectros Raman de 115 amostras contendo carotenoides em sua matriz vegetal: espectros normalizados (A) e respectiva 1ª derivada (B); SG suavizado e seus espectros normalizados (C) e sua respectiva 1ª derivada (D); espectros <i>filtfilt</i> suavizados e normalizados (E) e sua respectiva 1ª derivada (F).	73
Figura 5.3: Gráficos bidimensionais dos pontos amostrais de <i>B. glandulifera</i> e OFSP no espaço das componentes principais para PC1 e PC2: amostras de <i>B. glandulifera</i> secas a 85 ° C (círculo azul) e secas a 65 ° C (triângulo vermelho); amostras de OFSP secas com ar quente (pentágono verde) e com micro-ondas (estrela roxa). Processamento de dados: sem tratamento(A), SG (B) e <i>filtfilt</i> (C).	74
Figura 5.4: Análise de agrupamento hierárquico: linhas verdes à esquerda (agrupamento de <i>B. glandulifera</i>) e linhas vermelhas à direita (agrupamento de OFSP).	75
Figura 5.5: Gráfico de classificação aplicando quatro estratégias de classificação de classes de entrada no PLS-DA. Pré-processamento: (a) sem, (b) SG e (c) <i>filtfilt</i> . As linhas tracejadas horizontais indicam os limites e as linhas tracejadas verticais indicam a separação entre as amostras de treinamento e teste. Símbolos: os triângulos azul claro e azul escuro representam as amostras de <i>B. glandulifera</i> secas a 85 e 65 ° C, respectivamente; e, os quadrados verde claro e verde escuro representam as amostras de OFSP secas com ar quente e micro-ondas, respectivamente.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Comparações dos diferentes processos ópticos.	9
Tabela 2.2: Lasers comerciais usados em espectrômetros Raman e aplicações. Adaptado de LI <i>et al.</i> (2014)	14
Tabela 2.3: Posições do número de onda dos modos v1, v2 e v3 dos carotenoides predominantes que ocorrem em vários tecidos vegetais e padrões nos espectros obtidos por espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman).	26
Tabela 3.1: Estatísticas de calibração para quantificação de carotenoides em batata-doce processada por validação cruzada de espectroscopia Raman e análise de espectroscopia visível.	47
Tabela 4.1: Carotenoides e conteúdo de umidade na polpa de <i>Bunchosia glandulifera</i> em diferentes tempos de secagem a 65 e 85 °C.	57
Tabela 4.2: Desempenho do modelo quantitativo para mínimos quadrados parciais (PLS).	62
Tabela 5.1: Valores das métricas de desempenho de qualidade do classificador PLSDA e SVM para espectros Raman.....	77

Capítulo 1 – Introdução

Motivação

O Rio Grande do Sul, ao longo de sua história, tem se destacado pela sua atuação no fornecimento de produtos alimentares, *in natura* e industrializados, devido à sua especialização relativa nesse segmento em nível nacional (ARAÚJO, 2004). Com o avanço do processamento industrial, no decorrer das décadas, a indústria tem explorado de forma crescente novos nichos de produtos, como os alimentos e bebidas funcionais e dietéticos. Todavia, ao mesmo tempo em que representam grandes oportunidades, o crescimento de produtos de maior valor agregado exige das empresas um maior nível tecnológico e de gestão, o que propicia um cenário de alta competitividade.

Entre uma série de restrições que podem estar relacionadas ao processamento e ao marketing no setor de alimentos estão: tecnologias rudimentares, as quais acarretam maiores restrições para a agregação de valor; pouca inovação para o desenvolvimento de novos produtos e métodos de processamento poucos especializados (BARCELLOS *et al.*, 2004; FAO/WHO, 2004). No entanto, o cenário atual evidencia que vários fatores socioeconômicos têm uma forte influência na composição da dieta. É notória a crescente consciência dos custos ambientais e sociais associados à origem e aos processos de produção de alimentos. Prova disso é que existe uma ampliação tanto pela demanda por produtos naturais, livres de agroquímicos ou pesticidas, quanto por alimentos e ingredientes frescos ou minimamente processados que estejam prontamente disponíveis e seguros para o consumo.

As novas tecnologias para automação de plantas industriais e processos têm contribuído muito para torná-los mais competitivos e seus produtos mais seguros e de qualidade. Nesse âmbito, o desenvolvimento de sistemas robóticos complexos para a indústria de alimentos, com base nas informações fornecidas pelos sensores, é a principal mudança tecnológica. Os sensores são parte de um sistema de controle de produção que podem fornecer informações da estrutura do alimento *on-line* ou permitir o controle de variáveis de processo *in loco* e sob diferentes condições operacionais. Assim, ao almejar um sistema de produção mais eficiente, acredita-se que os métodos de inteligência artificial poderão ser utilizados para a aquisição de dados e aplicação de sensores em rede, para monitorar flutuações de qualidade e segurança na cadeia de suprimentos.

Para alcançar os anseios básicos descritos acima, novos materiais detectores estão sendo desenvolvidos e fundidos uns com os outros, embora a composição requerida de uma matriz de sensores dependa fortemente das moléculas alvo selecionadas. Os sensores têm um campo potencial de aplicação que incluem a estocagem, o processamento e a distribuição de alimentos. Além disso, o monitoramento do amadurecimento de frutas e produtos frescos é outro campo em expansão. Não obstante, a quantidade de dados brutos gerados por esses instrumentos requer abordagens estatísticas, como análise de componentes principais, mínimos quadrados parciais e cálculo de redes neurais artificiais.

Faz-se importante destacar que no cenário atual, os métodos de sensoriamento existentes não atendem por completo as agências reguladoras e produtores de alimentos. No entanto, futuros testes em tempo real fornecerão valor aos produtores de alimentos, reduzindo os custos de tratamento. Pois, à medida que as exigências de segurança alimentar aumentam, crescem também os pedidos por tecnologia de sensoriamento rápido (LOUTFI *et al.*, 2015).

Em meio a esse contexto, a espectroscopia Raman vem ganhando popularidade como uma ferramenta analítica devido aos avanços no desenvolvimento da instrumentação e ferramentas computacionais. Devido às suas bandas estreitas e de alta resolução, essa técnica que detecta vibrações moleculares permite a extração não destrutiva das informações químicas e físicas das amostras e possibilita uma análise rápida, em linha e com o mínimo preparo amostral.

Assim como a absorção por infravermelho, a espectroscopia Raman tem sido amplamente usada para fornecer informações sobre a estrutura química e as formas físicas e para identificar substâncias a partir de padrões espectrais característicos (impressão digital), o que permite a determinação qualitativa, quantitativa ou semiquantitativa de uma determinada substância contida em amostra. Essas técnicas são amplas e fornecem soluções para uma série de problemas analíticos desafiadores. Na prática, a espectroscopia Raman moderna é simples, pois os parâmetros instrumentais são poucos e a manipulação espectral, assim como a interpretação dos dados, é consideravelmente acessível.

Por esses motivos, aplicações da espectroscopia Raman têm sido exploradas dentro dos vários campos dos produtos agrícolas e de alimentos, incluindo frutas e vegetais, grãos, carne, leite, óleos, bebidas, entre outros. Especialmente a detecção de uma classe de moléculas orgânicas específicas e vastamente presente em frutas e vegetais, os carotenoides, tem sido amplamente explorada por essa técnica. Isso se deve ao fato desses pigmentos constituírem moléculas como o β -caroteno e o licopeno, que são responsáveis por uma gama de funcionalidades do corpo humano, como a ação antioxidante, combate a doenças degenerativas, prevenção do câncer e precursores da vitamina A (KILLEEN *et al.*, 2013; NAGARAJAN *et al.*, 2017; NAVES, 1998; SCHULZ, 2016). Contudo, não se limitando a essas características, os carotenoides são estudados ainda como biomarcadores e estão presentes em muitos micro-organismos, que podem ser detectados em rochas terrestres ou extraterrestres, contribuindo para o estudo de

mecanismos de conservação de vida, questões chave nas áreas de geoquímica orgânica e astrobiologia.

Vislumbra-se o aperfeiçoamento das técnicas espectroscópicas para a análise de alimentos, frente a todas as vantagens e tendências de sensoriamento na cadeia produtiva do alimento comercializado; contudo, necessitam-se ainda mais estudos especificamente direcionados nas interações entre as fontes luminosas, as frequências dos *lasers* e os dispositivos de detecção com as moléculas alvo de controle e monitoramento. Assim, com o intuito de desenvolver um método simples de detecção de carotenoides em alimentos, aborda-se no método a aplicação de dióxido de titânio (TiO₂), um óxido metálico branco, cujas nanopartículas são amplamente usadas como aditivo alimentar incorporado em muitos alimentos para conferir coloração em produtos como queijos, molhos, leites e sorvetes ou revestimento de doces e gomas de mascar (ROPER *et al.*, 2017). Nesse contexto, o dióxido de titânio atua como um padrão interno para a realização das análises espectroscópicas, por ser um elemento inerte aos carotenoides que se pretendem analisar.

Objetivos do trabalho

O objetivo principal desse trabalho é avaliar as possibilidades da utilização da espectroscopia Raman para a análise qualitativa e quantitativa de carotenos totais em alimentos ricos em carotenoides submetidos a processamento térmico.

Os objetivos específicos são elencados na sequência:

- (1) Criar uma metodologia para determinação semiquantitativa de carotenos totais utilizando um padrão interno.
- (2) Avaliar a metodologia desenvolvida com o padrão interno para diferentes amostras de alimentos.
- (3) Utilizar a análise de componentes principais como uma ferramenta de classificação de amostras espectrais.
- (4) Utilizar de modelos de regressão por mínimos quadrados parciais como ferramenta para determinar quantitativamente o teor de carotenoides
- (5) Classificar em diferentes classes um determinado conjunto de amostras carotenadas de fontes vegetais diversas.
- (6) Potencializar o tratamento de dados espectrais, tanto pela inserção de funções matemáticas que aprimorem o sinal espectral, quanto pela reprodutibilidade dos métodos quimiométricos.

Estrutura do trabalho

Nesta breve introdução foi realizada a apresentação geral deste trabalho, juntamente com os principais objetivos e motivações para o seu desenvolvimento. O Capítulo 2, de revisão bibliográfica, contempla a fundamentação teórica dos assuntos imprescindíveis para o delineamento e concepção do escopo do trabalho, além de serem citadas as principais pesquisas referentes à temática do estudo.

Os Capítulos 3, 4 e 5 apresentam os estudos completos individuais apresentados em ordem cronológica de execução. Os respectivos capítulos são compostos por uma introdução, materiais e métodos, resultados e discussões, conclusão e as respectivas referências.

Por fim, o Capítulo 6 apresenta as considerações finais, revisitando os objetivos propostos através das conclusões obtidas após a realização do trabalho.

Contribuições

Podem-se listar como principais contribuições desta tese os seguintes pontos:

- (1) Registro do espectro vibracional de deslocamento Raman de batata-doce de polpa alaranjada.
- (2) Registro do espectro vibracional de deslocamento Raman de polpas da fruta *Bunchosia glandulifera*.
- (3) Uma metodologia alternativa para detectar a presença de carotenoides em vegetais.
- (4) Comprovação da degradação oxidativa dos carotenoides durante o processamento térmico.
- (5) Validação de métodos quimiométricos para a quantificação de carotenoides a partir de análises Raman.
- (6) Metodologias para classificação de amostras utilizando pacotes de códigos abertos em linguagem de programação *Python*.

Resumo Gráfico

A Figura 1.1 apresenta um resumo gráfico que relaciona os objetivos deste trabalho com as contribuições resultantes especificamente para cada capítulo desta tese. A partir destas interligações é possível identificar as correlações entre as diferentes etapas deste estudo.

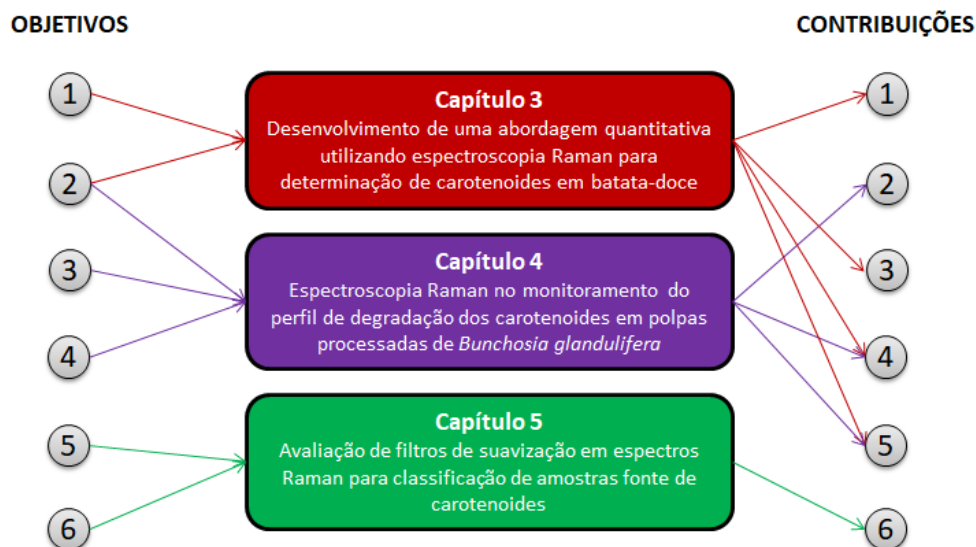


Figura 1.1: Resumo gráfico, indicando as conexões entre os objetivos, contribuições e capítulos deste trabalho.

Referências

- ARAÚJO, N. C. M. DE. Origens e evolução espacial da indústria de alimentos do Rio Grande do Sul. *PUC*, p. 83–111, 2004.
- BARCELLOS, J. O. J. *et al.* A bovinocultura de corte frente a agriculturização no sul do Brasil. 2004, Lages: [s.n.], 2004.
- FAO/WHO. *Technical Meeting on the Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System in Small and/or Less Developed Businesses (SLDBs)*. . Rome: [s.n.], 2004.
- KILLEEN, D. P. *et al.* Quantitative raman spectroscopy for the analysis of carrot bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 11, p. 2701–2708, 2013.
- LOUTFI, A. *et al.* Electronic noses for food quality : A review. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, v. 144, p. 103–111, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.019>>.
- NAGARAJAN, J. *et al.* Carotenoids. *Nutraceutical and Functional Food Components*. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 259–296. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128052570000089>>.
- NAVES, M. M. V. Beta - caroteno e câncer. *Revista de Nutrição*, v. 11, n. 2, p. 99–115, dez. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52731998000200001&lng=pt&tlng=pt>.
- ROPER, M.-H. *et al.* Titanium Dioxide as Food Additive. *Application of Titanium Dioxide*. [S.l.]: InTech, 2017. . Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/application-of-titanium-dioxide/titanium-dioxide-as-food-additive>>.
- SCHULZ, H. Carotenoid Bioavailability from the Food Matrix. *Carotenoids*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 191–216. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118622223.ch11>>.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Este capítulo é constituído por um levantamento bibliográfico dos principais assuntos necessários para o desenvolvimento desta tese. O capítulo está dividido em 7 subseções. Inicialmente serão abordados os fundamentos de espectroscopia vibracional. Logo após, define-se o efeito Raman, destacando seu amplo campo de aplicações, mecanismos, instrumentação e técnicas avançadas. Na sequência, são apresentados os principais estudos que associam a espectroscopia Raman com a análise de alimentos, priorizando o alvo principal de identificação deste trabalho, os carotenoides. Por fim, são apresentados os conceitos e o embasamento matemático para as técnicas de análise de dados multivariável.

Espectroscopia vibracional aplicada a alimentos

A interação entre fótons e a matéria é de extrema importância para escalas de comprimento que partem desde um nanômetro (fotônica) a uma escala astronômica (astronomia de raios-x). Apesar dessa relevância, os fótons têm somente três possibilidades de interagir com a matéria. A primeira é quando um fóton gera um par de partículas elementares se sua energia exceder um determinado valor. A segunda é quando fótons podem ser absorvidos pela matéria e excitam elétrons e ou ionizam o material. Por fim, na terceira, os fótons podem interagir com a matéria via espalhamento (TSCHIRNER; NATURWISSENSCHAFTEN, 2012).

A espectroscopia vibracional é uma técnica que mede a interação da radiação eletromagnética com os movimentos de vibração de um sistema molecular, proporcionando como resposta o espectro vibracional. Este, por sua vez, fornece uma informação rica da composição química da amostra e, portanto, tem sido aplicado para análises químicas diversas, como: qualidade de água e alimentos, ciências dos materiais, entre outras (LI *et al.*, 2014a).

Técnicas vibracionais utilizam espectros de absorção na região do infravermelho e técnicas de espalhamento inelástico da luz (espectroscopia Raman). O infravermelho médio (MIR) e o infravermelho próximo (NIR) são regiões do espectro eletromagnético nos quais ocorrem os modos vibracionais em sistemas moleculares e

cristalinos (WANG *et al.*, 2016). A Tabela 2.1 lista algumas características, instrumentações e aplicações dos processos ópticos citados anteriormente e da espectroscopia de fluorescência.

Tabela 2.1: Comparações dos diferentes processos ópticos.

Técnica	Características	Instrumentação	Aplicações
Espectroscopia de infravermelho médio (MIR)	Espectroscopia de absorção Modos fundamentais de vibração Restrição em amostra líquida	Fonte policromática, MIR Interferômetro, filtro Detector de infravermelho	Aplicações farmacêuticas e agrícolas, ciência dos alimentos, microbiologia, química médica e ciências dos materiais
Espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)	Espectroscopia de absorção Sobretons e combinações Quimiometria	Fonte policromática, NIR Interferômetro, grade CCD, PMT	Química médica, tomografia de infravermelho próximo, controle de processos industriais, qualidade da água e ciências dos materiais
Espectroscopia Raman	Espectroscopia de espalhamento Modos fundamentais de vibração Baixa intensidade	Fonte monocromática, UV, visível, NIR Grade, interferômetro CCD, PMT	Produtos farmacêuticos e cosméticos, geologia e mineralogia, caracterização de materiais semicondutores, ciências da vida, qualidade da água, química médica e ciência dos materiais
Espectroscopia de Fluorescência	Espectroscopia de emissão Presença de fluoróforos	Fonte monocromática, UV Grade, filtro PMT, APD, CCD, SPAD	Análise bioquímica e biomédica de amostras orgânicas, imagem do tempo de vida de fluorescência e ciência dos materiais

CCD: *charge-coupled device* (dispositivo de carga acoplada); PMT: *photomultiplier tube* (tubo fotomultiplicador); APD: *avalanche photodiode* (fotodiodo de avalanche); SPAD: *single photon avalanche diode* (diodo de avalanche de fóton único).

Além dos processos ópticos de absorção e espalhamento, respectivamente representados pelas técnicas de infravermelho e Raman, citados na Tabela 2.1, há o fenômeno de luminescência, um processo de emissão espontânea da luz por átomos em estados excitados. Esse processo, quando comparado ao infravermelho (IR), confere vantagem da óptica no visível em relação aos detectores e lentes. Lembrando que a luminescência geralmente não é utilizada para explorar modos vibracionais e que a espectroscopia Raman também utiliza a prática no visível. As técnicas de fotoluminescência e quimioluminescência também têm aplicações nos campos farmacêuticos, biológicos, ambiental e industrial.

Tanto a espectroscopia de infravermelho (IR) quanto a Raman podem fornecer informações importantes sobre a composição e a complexidade de amostras

biológicas. As primeiras aplicações de IR foram limitadas ao material vegetal seco e produtos relacionados, devido ao forte momento dipolar da água. Já com o desenvolvimento de métodos com transformada de Fourier (FT), o uso de ambas as técnicas foi impulsionado, pois houve o aprimoramento da relação sinal-ruído e a diminuição do tempo de aquisição espectral, possibilitando novas aplicações desses métodos. Em particular, a técnica de reflexão total atenuada (ATR) tem melhorado as medidas de IR para a maioria dos líquidos, como óleos comestíveis, óleos essenciais e extratos de vários tecidos vegetais. Os métodos de análise por infravermelho são mais utilizados para análise de matéria vegetal seca ou não aquosa. Por outro lado, a água tem fracas propriedades de espalhamento Raman, por consequência, esses métodos têm sido mais estudados para a matéria vegetal fresca *in-situ*. Nesse caso, as amostras podem ser analisadas diretamente úmidas ou secas e em muitos casos, não destrutivamente.

Embora o espalhamento Raman tenha menor intensidade que a absorção por infravermelho, há situações em que amostras contendo baixa concentração do analito conseguem ou não ser investigadas. Por isso, diferentes técnicas como a de ressonância Raman e a espectroscopia Raman de Superfície Ampliada (SERS) vêm sendo estudadas por resultarem em uma significativa melhora de sensibilidade (BARANSKA, 2014).

Espectroscopia Raman

2.1 O efeito Raman

A espectroscopia estuda as interações da radiação eletromagnética com a matéria e é, sem dúvidas, um campo que abrange uma ampla variedade de técnicas, das quais se destaca a Espectroscopia Raman. Esta, por sua vez, consiste do espalhamento inelástico da luz pela matéria e foi inicialmente previsto por Adolf Smekal em 1923 e primeiramente observado pelo físico indiano Sir Chandrasekhara V. Raman em 1928. O espalhamento Raman é, essencialmente, um grupo de processos de dois fótons em que um fóton é absorvido e outro é emitido (EMBER *et al.*, 2017; LONG, 2002; PARSON, 2007).

Quando um fóton de luz interage com os modos vibracionais do sistema, pode ocorrer uma transição de curta duração do estado eletrônico inicial para um estado de energia virtual. Este aumento temporário de energia significa que a molécula está em um estado energético mais elevado. Todavia, essa molécula pode relaxar de volta ao seu estado fundamental inicial em uma única etapa, liberando a mesma quantidade de energia do fóton excitado. Esse processo é conhecido como espalhamento elástico da luz ou espalhamento Rayleigh. Como a energia de um fóton é proporcional à sua frequência, e uma vez que não há a transferência de energia líquida para a molécula, a luz dispersa elasticamente não produz nenhuma informação sobre as moléculas de investigação. No entanto, o relaxamento também pode ocorrer de forma inelástica, isto é, quando uma molécula libera uma quantidade diferente de energia do fóton incidente. Nesse caso, existem dois tipos de espalhamento: Raman Stokes e Raman Anti-stokes. No caso do espalhamento Raman Stokes, a energia pode ser transferida para a molécula do fóton incidente, resultando em um fóton disperso de energia reduzida e, portanto, frequência reduzida. Por outro lado, no espalhamento Raman Anti-stokes uma pequena proporção

de energia é transferida da molécula, que está em um nível de energia mais elevado, para o fóton. Portanto, durante essa interação, fótons recebem (Anti-Stokes) ou transferem (Stokes) energia de/para moléculas com energia vibracional (BARANSKA, 2014; LI *et al.*, 2014a; LONG, 2002; PARSON, 2007; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009). A Figura 2.1 ilustra essas possibilidades de espalhamento da luz.

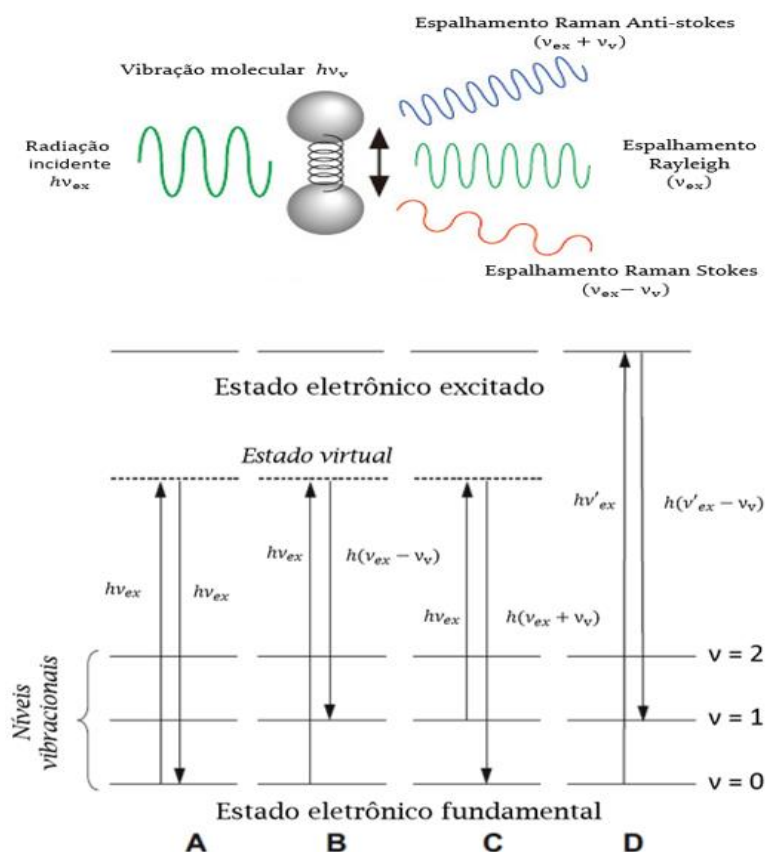


Figura 2.1: Tipo de espalhamento da luz - visão clássica x visão quântica - Adaptado de PARSON (2007).

A Figura 2.1 pode ser explicada da seguinte forma: na parte inferior, as três linhas sólidas horizontais representam os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental. No espalhamento Rayleigh (**A**) a molécula ou partícula absorve um fóton e emite um fóton com a mesma energia. No espalhamento Raman (**B-D**), um fóton com energia diferente é emitido, deixando a molécula em um nível vibracional maior ou menor (espalhamento Raman Stokes (**B**) e anti-stokes (**C**), respectivamente). No espalhamento Raman ressonante (**D**) o elétron é promovido a um estado eletrônico excitado seguido por uma imediata relaxação a um nível vibracional no estado eletrônico fundamental.

O espalhamento da luz pode ser assumido como o redirecionamento da luz que ocorre quando uma onda eletromagnética, ou seja, um feixe de luz incidente encontra um obstáculo ou não homogeneidade. Como a onda eletromagnética interage com a matéria, as órbitas eletrônicas das moléculas são perturbadas periodicamente com a mesma frequência (ν_{ex}) do campo elétrico da luz incidente. Assim, assumindo que um

feixe de radiação que possui frequência ν_{ex} , amplitude de onda E_0 e campo elétrico E , descrito pela Equação (2.1),

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_{ex}t) \quad (2.1)$$

incida sobre a matéria, ocorre a oscilação ou perturbação da nuvem de elétrons, resultando em uma separação periódica de carga dentro das moléculas, o que é então denominado por momento dipolo induzido. Esse momento dipolo m na ligação é dado por:

$$m = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_{ex}t) \quad (2.2)$$

onde α é uma constante de proporcionalidade chamada de *polarizabilidade* da ligação. Esta constante é uma medida do grau de deformação da ligação em um campo elétrico.

A polarizabilidade α varia em função da distância entre os núcleos, de acordo com a equação:

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq}) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \quad (2.3)$$

sendo α_0 a polarizabilidade da ligação na distância entre núcleos no instante de equilíbrio r_{eq} e r a separação internuclear em qualquer instante. A alteração na separação internuclear varia com a frequência natural de vibração do sistema ν_v e é dada por:

$$r - r_{eq} = r_m \cos(2\pi\nu_v t) \quad (2.4)$$

onde r_m é a separação internuclear máxima com relação à posição de equilíbrio.

Substituindo a Equação (2.4) na (2.3), tem-se:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) r_m \cos(2\pi\nu_v t) \quad (2.5)$$

Assim, pode-se obter uma nova expressão para o momento de dipolo induzido m substituindo a Equação (2.5) na (2.2). Logo,

$$m = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_{ex}t) + E_0 r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos(2\pi\nu_v t) \cos(2\pi\nu_{ex}t) \quad (2.6)$$

Utilizando a identidade trigonométrica para produto de dois cossenos, obtém-se a Equação (2.7):

$$m = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_{ex}t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_{ex} - \nu_v)t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_{ex} + \nu_v)t] \quad (2.7)$$

onde o primeiro termo nesta equação representa o espalhamento Rayleigh, o qual ocorre na frequência de excitação ν_{ex} . O segundo e o terceiro termos na mesma equação

correspondem, respectivamente, às frequências Stokes ($\nu_{ex} - \nu_v$) e anti-Stokes ($\nu_{ex} + \nu_v$). Além disso, é importante observar que as regras de seleção para o espalhamento Raman requerem que exista uma variação na polarizabilidade durante a vibração, isto é, $\frac{\partial\alpha}{\partial r} \neq 0$.

2..2 Instrumentação básica de um sistema Raman

A instrumentação para a medição de espectros Raman consiste em quatro componentes principais: (i) fonte de excitação, (ii) conjunto óptico com iluminação, (iii) unidade seletora de comprimento de onda e (iv) detector. Além disso, existem basicamente dois tipos de configurações do sistema coletor de luz, 90° e 180°. Na configuração de 90°, a luz espalhada é coletada a partir da direção perpendicular da direção de excitação. Já na configuração de 180°, o sinal espalhado é coletado na direção oposta da direção de excitação, sendo, portanto, nomeado de retroespalhamento. Nesse caso, instrumentos ópticos adicionais são necessários, assim como o uso de um espelho dicróico, o qual reflete o sinal do espalhamento de onda mais longo e transmite o sinal do comprimento de onda mais curto (LI *et al.*, 2014b).

Fonte de excitação

A fonte de excitação tem um papel importante no desempenho de um espectrômetro Raman, incluindo sua sensibilidade e estabilidade. Dentre os parâmetros mais importantes da fonte de excitação estão a sua largura de banda e potência, pois o deslocamento da frequência entre o sinal Raman e o sinal de excitação está relacionado com a frequência vibracional fundamental de uma molécula. Conseqüentemente, uma largura de banda estreita ou um feixe altamente monocromático com potência adequada para gerar uma boa relação sinal/ruído sem danificar a amostra são os indicados para proporcionar um espectro Raman com estabilidade e intensidade necessária. Na Tabela 2.2, os *lasers* comumente usados em espectrômetros Raman e suas aplicações são apresentados.

Tabela 2.2: Lasers comerciais usados em espectrômetros Raman e aplicações.
Adaptado de LI *et al.* (2014)

Fonte de excitação	Tipos de laser e comprimentos de onda	Técnicas de espectroscopia Raman	Aplicações
Região do infravermelho próximo	<ul style="list-style-type: none"> • Laser de diodo: 785, 830 nm • Laser no estado sólido: Nd-YAG (1064 nm), Ti-Sapphire 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectroscopia FT-Raman • Espectroscopia Raman normal • Espectroscopia Raman de Superfície Ampliada (SERS) 	<ul style="list-style-type: none"> Amostras biológicas Polímeros Propósitos gerais
Região do visível	<ul style="list-style-type: none"> • Laser de íons: He-Ne (633 nm), He-Cd (442 nm), Ar+ (488 nm, 514 nm) • Laser no estado sólido: Nd-YAG (532 nm), Ti-Sapphire 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectroscopia Raman normal • Espectroscopia Raman de Superfície Ampliada (SERS) • Espectroscopia Raman resolvida no tempo • Espectroscopia Raman de Ressonância 	<ul style="list-style-type: none"> Componentes orgânicos Arte, arqueologia e ciência forense Semicondutor, minerais e propósitos gerais
Região do ultravioleta	<ul style="list-style-type: none"> • Laser de íons: He-Cd (325 nm), Ar+ (244 nm, 257 nm) • Laser no estado sólido bombeado com laser de corante: Ti-Sapphire 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectroscopia Raman no Ultravioleta • Espectroscopia Raman de Ressonância • Espectroscopia Raman resolvido no tempo 	<ul style="list-style-type: none"> Proteína, DNA, Cromóforos naturais, Semicondutores

Nd-YAG: granada de ítrio e alumínio dopado com neodímio; Ti: Titânio; He-Ne: Hélio-Neônio; He-Cd: Hélio-Cádmio; Ar: Argônio; FT: Transformada de Fourier; UV: Ultravioleta; DNA: Ácido desoxirribonucleico.

Seletor de comprimento de onda

O seletor de comprimento de onda é o componente responsável por extrair as informações de intensidade das frequências individuais em um espectrômetro Raman. Basicamente, existem dois mecanismos de seleção de comprimento de onda, o dispersivo e o não dispersivo. Um espectrômetro dispersivo conta com componentes dispersivos para separar a luz espacialmente de acordo com o comprimento de onda, entre eles

estão a grade de difração e o prisma. Já em um espectrômetro não dispersivo, a luz pode ainda ser selecionada por um filtro óptico ou por um interferômetro, assim como o espectrômetro Raman com transformada de Fourier (LI *et al.*, 2014a; MATOUSEK; MORRIS, 2010).

Os componentes básicos de um espectrômetro dispersivo são a fenda de entrada, espelhos colimadores, grade de difração, espelho de focagem e fenda de saída. Como pode ser visto na Figura 2.2, a trajetória da luz consiste da sua entrada no espectrômetro através da fenda de entrada, passando pelo espelho colimador, onde ela é colimada e direcionada para a grade de difração. Após a separação, o feixe de difração é encaminhado para a fenda de saída pelo espelho de focagem. Os parâmetros mais importantes para um espectrômetro são a faixa de comprimento de onda e a resolução espectral. Além disso, filtros *edge* e *notch* têm sido usados para a atenuação e rejeição da luz Rayleigh em um monocromador de estágio único. Por outro lado, a rejeição da luz Rayleigh pode ser aumentada pela utilização de um monocromador multiestágio, o que tem sido amplamente usado em espectrômetros Raman dispersivos. Isso é realizado porque para detectar eficientemente o sinal Raman, a linha Rayleigh deve ser o primeiro sinal rejeitado e atenuado, processo conhecido como a rejeição dispersiva da luz em um espectrômetro (LI *et al.*, 2014a).

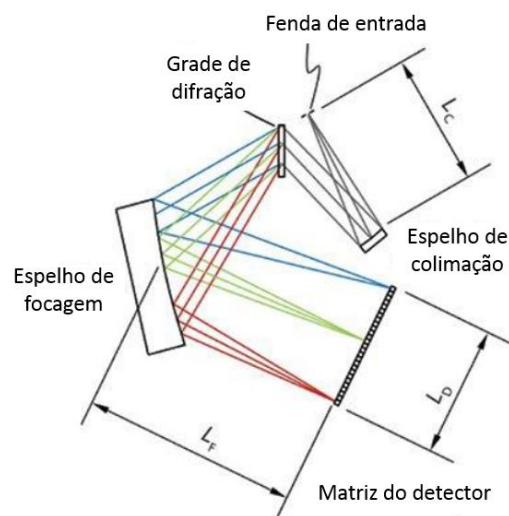


Figura 2.2: Esquema simplificado dos componentes de um seletor de comprimento de ondas em um espectrômetro Raman dispersivo.

Deteção

Os detectores exploram o efeito fotoelétrico que utiliza a energia luminosa recebida para gerar portadores de carga, os quais são separados e podem ser medidos, posteriormente, como uma corrente nos terminais. Dentre os principais tipos de detectores estão os tubos fotomultiplicadores (PMT), dispositivos acoplados de carga (CCDs), fotodiodo de avalanche de silício (APD) e detectores na região do infravermelho próximo (LI *et al.*, 2014a).

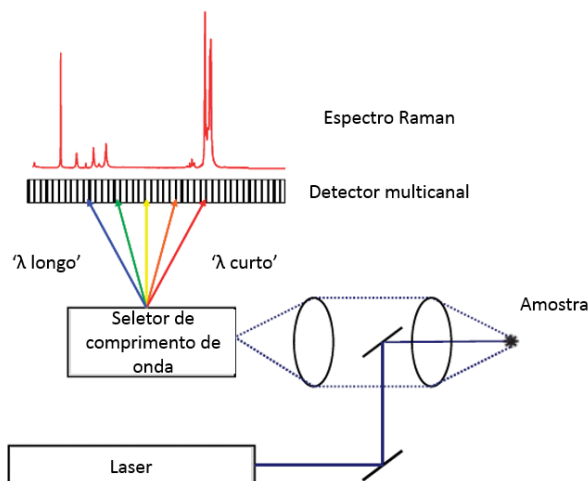


Figura 2.3: Esquema de um espectrômetro Raman dispersivo utilizando um detector CCD. Adaptado de CHALMERS; EDWARDS; HARGREAVES (2012).

Cada elemento (pixel) da matriz de detectores é um capacitor fotoativo que coleta e mantém a carga com base no número de fótons que o atingem. Assim, os CCDs operam deslocando simultaneamente a carga acumulada em cada pixel para os elementos de pixel adjacentes, até que eles alcancem o registrador de deslocamento inferior, onde são lidos individualmente. A função de um CCD é gerar dados de intensidade, em que cada pixel é um elemento de resolução específico em um dado comprimento de onda e uma quantidade variável de fótons. Conseqüentemente, diversos parâmetros chave podem ser inferidos a partir da forma de operação, como por exemplo: quanto distúrbio é associado com cada elemento do detector, quanto distúrbio é gerado durante o deslocamento/leitura, a eficiência da matriz em detectar fótons individuais e quão rápido o detector pode fazer a leitura (MATOUSEK; MORRIS, 2010).

O ruído associado aos elementos detectores (ruído escuro ou térmico) pode ser reduzido diminuindo a temperatura, tipicamente de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Embora o resfriamento para temperatura de nitrogênio líquido elimine essencialmente o ruído térmico, a sua aplicação fora do laboratório é normalmente impraticável (MATOUSEK; MORRIS, 2010).

Aplicações da espectroscopia Raman

Devido à versatilidade da espectroscopia Raman, este método vem sendo mundialmente utilizado como uma ferramenta para múltiplas aplicações científicas e industriais (TSCHIRNER, 2012). Essa técnica pode ser aplicada para diferentes amostras químicas ou biológicas para fins de caracterização do material. Algumas informações que podem ser obtidas são (DE LA CHAPELLE; PUCCI, 2013):

- transições de fase e identificação de compostos químicos;
- determinação da estrutura molecular;
- estudo de sistemas amorfos e cristalinos;

- determinação direta do progresso de reações químicas em um meio biológico;
- medida da cinética de diferentes reações envolvendo proteínas em um meio complexo;
- identificação de mudanças conformacionais de biomoléculas.

Uma das vantagens da espectroscopia Raman é a possibilidade de fornecer diferentes informações simultaneamente. Por exemplo, o espectro Raman de um composto indica tanto seus tipos de ligações, quanto a sua estrutura cristalina. Além disso, outras importantes características da espectroscopia Raman são (DE LA CHAPELLE; PUCCI, 2013):

- tecnologia fácil de ser implementada;
- não degrada a amostra. O método é não destrutivo e não intrusivo e pode ser aplicado para sistemas reais;
- pode ser utilizada para estudar uma variedade de amostras (materiais heterogêneos, amostras com estrutura orientada ou não);
- pode ser acoplada a outros métodos analíticos e realizar medições *in situ*;
- pode ser utilizada em amostras sólidas de dimensões muito pequenas;
- é sensível a estruturas pequenas, permitindo a identificação de sistemas amorfos e análise de filmes finos que por métodos de difração são de difícil aplicação;
- pode funcionar em um ambiente hostil, como em altas temperaturas, em um ambiente que é radiativo ou em atmosfera controlada.

Comparada com outras várias técnicas, a espectroscopia Raman tem muitas vantagens (TSCHIRNER, 2012):

- o efeito Raman é independente do comprimento de onda de excitação usado. Assim, permite-se remover certos fenômenos indesejados, como o decaimento por fluorescência ou decomposição de substâncias coloridas, pela seleção de um comprimento de onda;
- nenhuma polarização permanente de moléculas é requerida, o que a torna um método eficiente para medição de moléculas diatômicas homonucleares, em comparação à absorção no IR;
- a presença da água não é um problema porque a sua absorção no efeito Raman é muito fraca. Assim, a água pode ser usada como um solvente, diferentemente da absorção no infravermelho;
- as amostras podem ser utilizadas de qualquer forma, sem a necessidade de serem diluídas ou alteradas.

Contudo, essas vantagens são atenuadas devido aos seguintes fatores (DE LA CHAPELLE; PUCCI, 2013):

- a intensidade extremamente baixa do sinal Raman, o que exige eficiência na eliminação da influência do espalhamento Rayleigh e detectores com ótima sensibilidade;
- fluorescência, a qual é muito mais intensa que o efeito Raman, mas pode ser evitada pela mudança de comprimento de onda;
- reações multifóton;
- decomposição de amostras por aquecimento.

Um aspecto muito importante que pode ser estudado usando a espectroscopia Raman é a caracterização de estruturas biomoleculares. Adicionalmente, essa técnica fornece informação sobre a composição química, estrutura molecular, interações entre as biomoléculas em células e tecidos. Portanto, informação bioquímica relacionando proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos pode ser obtida, fornecendo informações de saúde e patologias de tecido. Além disso, a espectroscopia Raman polarizada pode render informação sobre o alinhamento e orientação de moléculas nos tecidos (DE LA CHAPELLE; PUCCI, 2013).

Os primeiros equipamentos portáteis foram originalmente planejados para o uso como detectores, em campo, de produtos químicos desconhecidos ou perigosos, como explosivos ou drogas. Por isso, eram especialmente utilizados no primeiro exame de aprovação de material probatório em cenas de crime por agências de segurança e forenses. Em contraste, a aplicação de instrumentos espectroscópicos Raman portáteis no campo da exploração geológica é relativamente recente (CULKA; JEHLIČKA; EDWARDS, 2010). Já no ramo dos alimentos, especificamente na ciência das carnes, as vantagens dos dispositivos Raman portáteis em comparação com os espectrômetros Raman de bancada, incluem a capacidade de realizar medições em campo (matadouro, varejo, etc.), design robusto e o manuseio geralmente simples. No entanto, os espectros de dispositivos portáteis são frequentemente menos replicáveis, menos precisos e mais afetados pelo ruído, o que pode ser considerado uma desvantagem significativa devido a complexidade das matrizes nos alimentos (BEGANOVIC *et al.*, 2019).

Ainda no contexto de aplicações de instrumentos Raman, um estudo gemológico para fins de identificação de imitações de pedras preciosas foi realizado por BARONE *et al.*, (2014). Nesse estudo foi testada uma abordagem não destrutiva para a análise de gemas azuis por meio da combinação de dois instrumentos Raman não destrutivos: um analisador portátil e um micro-espectrômetro confocal. Os diferentes comprimentos de onda usados nos dois instrumentos causaram principalmente mudanças nos fundos de fotoluminescência e no aparecimento ou desaparecimento de bandas de fotoluminescência de metais de transição. De qualquer forma, os resultados do estudo indicaram que o analisador portátil pode ser recomendado como um instrumento rápido e fácil para discriminar safiras de imitações. Esta classificação foi confirmada pelas subsequentes medições micro-Raman. Em suma, o trabalho concluiu que houve

concordância entre a composição e os conteúdos obtidos nas análises do sistema portátil com o de bancada.

Espectroscopia Raman na análise de alimentos

Com o passar dos anos, os consumidores têm estado mais preocupados com as informações nutricionais dos alimentos que consomem. Consequentemente, métodos analíticos que determinam a composição e qualidade dos alimentos vêm se tornando cada vez mais requisitados. Nesse contexto, todas as etapas na cadeia produtiva dos alimentos, suas origens e como eles foram manuseados, processados e estocados têm ganhado importância (BOYACI *et al.*, 2015).

Vários tipos de métodos, incluindo métodos microbiológicos, bioquímicos, físico-químicos e análise sensorial são utilizados na análise de alimentos. Contudo, métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC - do inglês *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (CG) têm se tornado muito populares para a separação e identificação de componentes, devido aos seus baixos limites de detecção e elevada reprodutibilidade (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006). Embora esses métodos sejam comumente utilizados, eles não conseguem satisfazer a demanda por uma análise rápida, múltipla e *in situ*. Por outro lado, os métodos espectrofotométricos têm demonstrado sucesso na capacidade de realizar análises com esses requerimentos. Circunstancialmente, a espectroscopia Raman é uma ferramenta potencial para avaliar sistemas de qualidade nutricional durante o manuseio, processamento e estocagem do alimento. Além disso, essa técnica apresenta vantagens para análise bioquímica, devido à capacidade de fornecer informações sobre a concentração, estrutura e interação de biomoléculas dentro das células e tecidos, não-destrutivamente. Outra vantagem da espectroscopia Raman refere-se à análise das amostras, cuja fase pode ser líquida ou sólida em temperatura ambiente e pressão atmosférica (BOYACI *et al.*, 2015; HERRERO, 2008; MARQUARDT; WOLD, 2004).

Existem diversos estudos publicados que abordam a aplicação da espectroscopia Raman na análise de alimentos, com foco em grupos alimentares específicos e componentes específicos encontrados nos alimentos. Como apresentado na Figura 2.10, destaca-se a espectroscopia Raman para a detecção de compostos alimentares, micro-organismos e substâncias químicas nos alimentos, aditivos alimentares, matéria-prima e adulterações. Além desses, vitaminas e minerais também têm sido alvo de investigação devido à importância desses compostos com propriedades funcionais indispensáveis para nutrição e saúde (BOYACI *et al.*, 2015; MARQUARDT; WOLD, 2004). Ademais, fatores ambientais e de processamento podem ter efeitos positivos e negativos sobre os componentes alimentares. Portanto, monitorar essas mudanças em cada etapa do processo de produção dos alimentos é de suma relevância (BOYACI *et al.*, 2015).

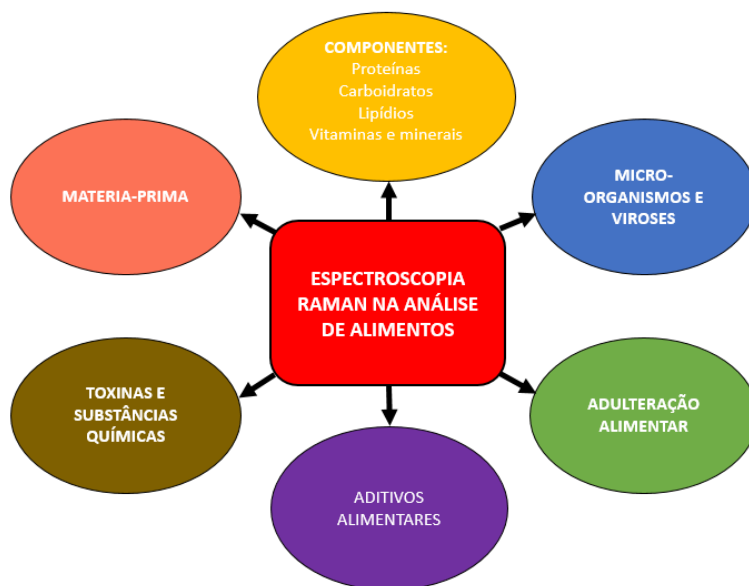


Figura 2.4: Apresentação esquemática dos campos de análise alimentar em que a espectroscopia Raman é aplicada. Adaptado de (BOYACI *et al.*, 2015).

Os espectros Raman e de infravermelho de macromoléculas biológicas são complexos e, por conseguinte, de difícil interpretação. Isso naturalmente ocorre com determinadas substâncias como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, membranas celulares e tecidos. Não obstante, muitos avanços têm sido realizados para a aplicação de ambas as técnicas em amostras biológicas. No entanto, a espectroscopia Raman tem uma significativa vantagem, visto que bandas de absorção devido à presença de água não representam um problema para a análise. Embora a fluorescência possa ser considerada o principal obstáculo para algumas amostras examinadas pela técnica Raman, as interações fotoquímicas devem também ser consideradas (SOCRATES, 2004).

Carboidratos são facilmente identificados e quantificados devido às características das bandas Raman representadas por mono-, di-, oligo- e polissacarídeos. Por exemplo, o teor de amilose de amostras de amido de milho e de mandioca foi quantificado utilizando um FT-Raman associado aos métodos quimiométricos de análise de componente principal (PCA) e de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). O pico característico em 480 cm^{-1} foi atribuído à vibração do anel do amido, o qual foi identificado e distinguido entre amostras de milho e de mandioca (ALMEIDA *et al.*, 2010). Já bandas de glicose, frutose e sacarose são identificadas na região espectral entre 600 e 1600 cm^{-1} (DELFINO *et al.*, 2011). Ilaslan *et al.* (2015) utilizou a espectroscopia Raman para quantificar o teor de glicose, frutose e sacarose em refrigerantes comerciais. Aditivos no conteúdo dos refrigerantes foram caracterizados pelas suas bandas, as quais foram atribuídas a compostos aromáticos e ao ácido cítrico na composição. Nesse mesmo estudo, curvas de calibração foram obtidas para cada componente aplicando a regressão PLS sobre o conjunto de dados espectrais e estudos de validação foram realizados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Nos estudos de Roman *et al.* (2011), componentes de raízes de cenoura selvagem, como amido, pectina, celulose, lignina e, ainda, poliacetilenos bioativos, foram medidos *in situ* e sem a necessidade de qualquer preparação da amostra. Em um estudo similar, componentes dos grãos de trigo e cevada

foram investigados utilizando microscopia Raman. As proteínas do trigo foram monitoradas através das bandas características do glúten, localizadas em torno de 1449 e 1659 cm^{-1} , as quais foram atribuídas ao modo de flexão do CH_2 dos aminoácidos e ao estiramento de $\text{C}=\text{O}$ das amidas, respectivamente. Os polissacarídeos, especificamente o arabinoxilano, o β -glucano e o amido apresentaram espectros Raman semelhantes. Além disso, bandas distintas entre 1095 e 1120 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de estiramento do $\text{C}=\text{O}=\text{C}$ de ligações glicosídicas. Novamente, o amido apresentou picos em 480 e 901 cm^{-1} , atribuídos às vibrações esqueléticas no anel de glucopiranosose e, por fim, o ácido fítico apresentou um espalhamento Raman relativamente fraco, com uma banda característica em 3420 cm^{-1} (estiramento do grupo OH) (JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 2013).

Mikkelsen *et al.* (2013) investigou propriedades estruturais e de composição de amostras de aveia e cevada através da análise multivariável dos dados adquiridos por FT-Raman, especialmente na região espectral entre 800 e 1800 cm^{-1} . Com os gráficos dos escores obtidos pelo método de PCA foram localizados os agrupamentos de celulose, curdlana (polímero de glicose utilizado como espessante e estabilizante de alimentos) e misturas celulose-curdiana, conforme a variação na estrutura do β -glucano. Não obstante, os teores de amido e β -glucano foram satisfatoriamente preditos utilizando a regressão PLS.

As modificações do amido, um dos efeitos do processamento de alimentos, têm sido analisadas por espectroscopia Raman (CHONG *et al.*, 2001). Dupuy (2002) classificou amostras de amido modificado, de acordo com as suas origens e tipos de modificação. Embora uma similaridade geral tenha sido observada para diferentes amostras de amido, notou-se o desaparecimento da banda em torno de 600 cm^{-1} para amostras pré-gelatinizadas. Similarmente, amostras mais cerosas foram monitoradas através de suas bandas características em 480, 870, 950 e 1468 cm^{-1} , as quais foram atribuídos às deformações de CH e CH_2 , à ligação α (1-4) e à deformação de CH_2 , respectivamente. Em outro estudo, o processo de hidrólise do amido foi monitorado por FT-Raman (SCHUSTER; URLAUB; GAPES, 2000). A avaliação do potencial da espectroscopia Raman para acompanhar as alterações químicas induzidas pela aplicação de radiação gama sobre alimentos também foi explorada. Amostras de frutose e mel foram analisadas, monitorando o estiramento da ligação C-H entre 2800 e 3000 cm^{-1} , o que possibilitou classificar as amostras de mel de acordo com a dose de irradiação aplicada sobre elas. Utilizando regiões espectrais abaixo de 700 cm^{-1} e entre 800 e 1500 cm^{-1} , alterações induzidas pela irradiação foram identificadas na estrutura conformacional e no anel da frutose (KIZIL; IRUDAYARAJ, 2007).

O triacilglicerol (TAG), que é formado pela esterificação da molécula de glicerol ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_8$) com três ácidos graxos, representa uma das principais formas de gordura presentes no leite e, portanto, a determinação dessa molécula em leite cru bovino utilizando a espectroscopia Raman foi estudada por MENDES *et al.* (2016). Nesse estudo, as magnitudes dos modos vibracionais Raman em 1440 cm^{-1} (dobramento), 2852 cm^{-1} (estiramento simétrico) e 2894 cm^{-1} (estiramento assimétrico) foram indicadas como as frequências mais significativas na quantificação da porcentagem de gordura no leite cru bovino. Segundo BOYACI *et al.* (2015), carboidrato e proteínas não demonstram uma influência significativa nos espectros Raman de leite bovino. Por outro lado, as alterações espectrais percebidas são diretamente atribuídas às variações de gordura nas amostras. Nesse caso, as bandas são principalmente associadas a ácidos graxos em: 1650 cm^{-1} (estiramento da ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ *cis* de $\text{RHC}=\text{CHR}$), 1140 cm^{-1} (dobramento angular

“tesoura” da ligação C-H de $-\text{CH}_2$), 1265 cm^{-1} (dobramento da ligação C-H), 1300 cm^{-1} (dobramento angular “tesoura” da ligação C-H do grupo CH_2) e, por fim, 1747 cm^{-1} (estiramento da ligação C=O de RC=OOR).

A espectroscopia Raman também foi utilizada para obter dados quantitativos de carotenoides, colágeno e teor de gorduras em amostras de músculo de peixe. As gorduras foram caracterizadas por bandas em 657 , 1440 , 1301 , 1267 , 1076 e 1064 cm^{-1} . Já os carotenoides foram monitorados nas frequências de 1159 e 1518 cm^{-1} , cabendo às bandas de baixa intensidade, 857 cm^{-1} (prolina) e 940 (estiramento C-C da cadeia peptídica estrutural), a atribuição da presença de colágeno nas amostras (MARQUARDT; WOLD, 2004). Outro trabalho avaliou o uso da espectroscopia Raman para o monitoramento de um processo de fermentação contínuo em tempo real (KRIEG, 2014). Nesse estudo os espectros Raman foram utilizados para monitorar o processo fermentativo e prever a concentração dos principais compostos de interesse, os quais foram a glicose e o etanol. Ao etanol foi considerado um pico de maior intensidade em 883 cm^{-1} , representando o estiramento da ligação C-C e, também, dois menores em torno de 1047 e 1084 cm^{-1} . Para a glicose, um pico principal foi localizado em torno de 1123 cm^{-1} . Verificou-se também que para um meio sintético com 60 g/L de glicose, os dados fornecidos pelos espectros Raman podem ser processados com precisão, fornecendo uma medida adequada das concentrações de substrato e produto.

Carotenoides

Carotenoides são encontrados em fungos, leveduras, bactérias e mais universalmente no reino vegetal. Embora não possam ser sintetizados naturalmente por animais ou seres humanos, os carotenoides estão frequentemente presentes em tecidos de animais e humanos. Isto ocorre porque eles são absorvidos, transportados e depositados no corpo através da ingestão de alimentos (SINGH; AHMAD; AHMAD, 2015). Sendo um pigmento atraente, os carotenoides foram originalmente sintetizados no plastídio através da adição gradual de unidades de isopentenil pirofosfato para formar um precursor de 20 carbonos conhecido como geranylgeranyl difosfato (GGPP). Quando duas moléculas de GGPP são combinadas, elas formam o fitoeno, o primeiro carotenoide na via biossintética. Após a dessaturação, o fitoeno forma 11 ligações duplas conjugadas, que se transformam em *all-trans* licopeno, o pigmento vermelho. O licopeno se torna então a estrutura fundamental na qual outros carotenoides são derivados através da ciclização, hidroxilação, epoxidação e rearranjo. A estrutura básica dos carotenoides são carbonos tetraterpenoides C_{40} construídos a partir de oito unidades de isopreno, unidas de maneira isoprenoide reversa no centro da molécula (NAGARAJAN *et al.*, 2017). As principais características e funções biológicas dos carotenoides são apresentadas na Figura 2.11.

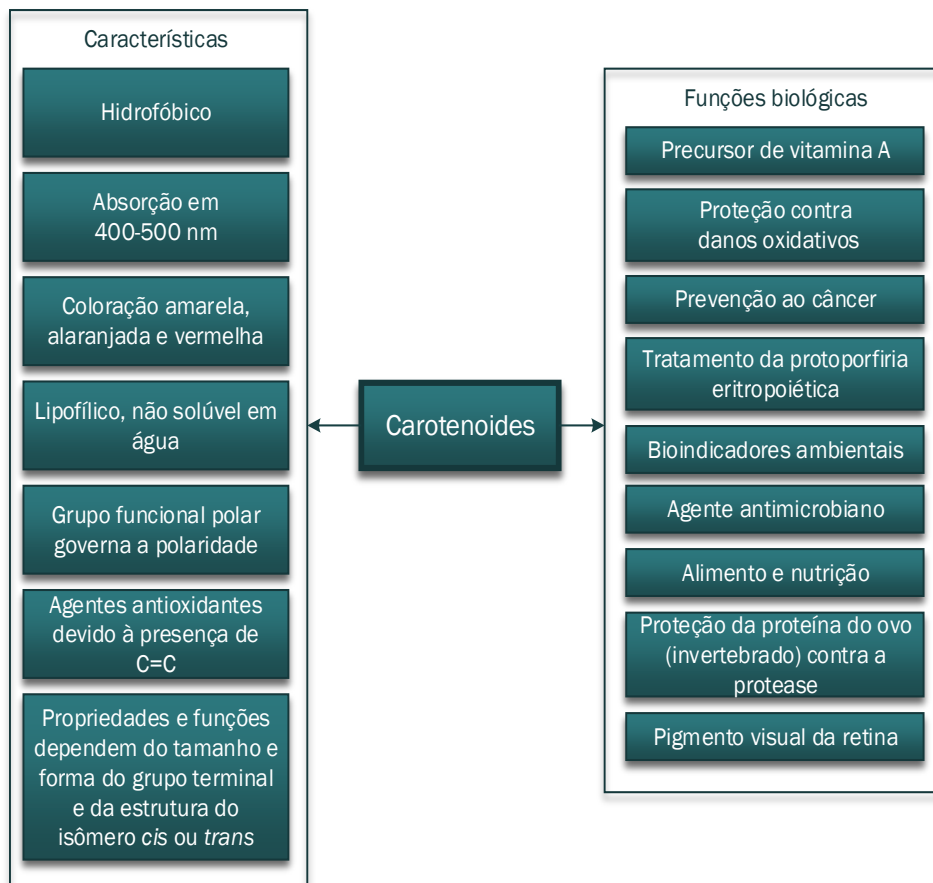


Figura 2.5: Importantes características físicas, químicas e biológicas dos carotenoides.

Os carotenoides também são conhecidos como moléculas poli-insaturadas devido à presença de 11 ligações duplas conjugadas em sua estrutura. À medida que o número de ligações duplas aumenta na cadeia polienica, a molécula se torna um sistema reativo rico em elétrons. Portanto, os carotenoides de cadeia longa são mais propensos à oxidação e à isomerização. O arranjo de ligações simples e duplas na estrutura determina a absorção de um determinado comprimento de onda no espectro visível, enquanto o comprimento de onda refletido determina a cor do próprio pigmento. Nesse contexto, os carotenoides exibem espectros distintos de absorção no espectro visível variando entre 430 e 480 nm (GALANAKIS, 2017). Notoriamente, quase todos os carotenoides são insolúveis em água e possuem alta solubilidade em um ambiente hidrofóbico. Assim, solventes como o hexano, acetona e clorofórmio são comumente utilizados para solubilizar e analisar a presença do pigmento. Ao analisar os carotenoides, diferentes solventes orgânicos causam mudanças espectrais devido a diferenças na natureza do solvente, como a polaridade. Em termos de estrutura, os carotenoides podem ser diferenciados por várias características (ESTEBAN *et al.*, 2015):

- presença de moléculas de oxigênio na estrutura;
- hidrogenação da cadeia do polieno;
- ciclização em uma ou ambas as extremidades da estrutura com anéis de β -ionona;
- comprimento da cadeia do polieno.

As formas isoméricas dos carotenoides determinam a forma e as alterações nas propriedades químicas de todas as moléculas, incluindo a solubilidade e a capacidade de absorção. A forma isomérica *trans* é conhecida como a mais termodinamicamente estável forma de carotenoide, sendo que todos os *trans*-carotenoides exibem uma maior tendência a sofrer ciclização e agregação do que as formas *cis*, além de modificações estruturais devido à oxidação e à isomerização. Por conseguinte, os isômeros *cis* são mais facilmente solubilizados, absorvidos e transportado no corpo do que todos da sua contraparte *trans* (KIRTI *et al.*, 2014).

Os carotenoides são classificados pela sua estrutura química e funcionalidade:

1. Estrutura química: baseados na estrutura química, os carotenoides que existem como hidrocarbonetos puros são denominados de carotenos, em que se enquadram o α -caroteno, o β -caroteno e o licopeno. Por outro lado, os carotenoides que contêm oxigênio como um grupo funcional em suas estruturas (β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, etc.) são referenciados como as xantofilas. Além disso, a presença de um grupo polar na estrutura (por exemplo: epóxi, hidroxila e cetona) afeta a polaridade e função biológica dos componentes (GALANAKIS, 2017).
2. Funcionalidade: os carotenoides podem ser classificados como primários ou secundários. Carotenoides primários são conhecidos como pigmentos fotossintéticos, os quais desempenham um papel fundamental na fotossíntese. Os carotenos que se enquadram no comprimento de onda do laranja e vermelho são responsáveis por transmitir a energia luminosa da luz solar absorvida pela clorofila. Eles também são conhecidos por atuarem como antioxidantes para a planta, pela absorção da energia do oxigênio singleto formado durante o processo de fotossíntese. Por outro lado, as moléculas de xantofila são encontradas abundantemente nas folhas das plantas, mas não agem diretamente durante a fotossíntese. As xantofilas absorvem o comprimento de onda da luz solar que não é absorvida pela clorofila. Assim, elas servem como um pigmento acessório ou carotenoides secundários para as plantas (GALANAKIS, 2017).

Os carotenoides são tetraprenoides sintetizados a partir de moléculas geranylgeranyl fosfato (C_{20}), como as clorofilas e o tocoferol. O ponto de partida da sua rota biossintética bioquímica é o fitoeno (C_{40}), que dá origem ao restante dos principais carotenoides dos tecidos fotossintéticos. As estruturas químicas dos principais carotenoides nessa rota são apresentadas na Figura 2.12, mostrando suas colorações naturais baseadas no espectro ultravioleta/visível (ESTEBAN *et al.*, 2015).

Tabela 2.3: Posições do número de onda dos modos v_1 , v_2 e v_3 dos carotenoides predominantes que ocorrem em vários tecidos vegetais e padrões nos espectros obtidos por espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman).

Nome da planta Nome científico	Amostra	v_1 (cm^{-1})	v_2 (cm^{-1})	v_3 (cm^{-1})	Carotenoides predominantes
Açafrão <i>Crocus sativus</i> L.	Estigma	1536	1165	1020	Crocetina
Calêndula <i>Calendula officinalis</i> L.	Pétala	1536	1157	1007	Auroxantina
Calêndula <i>Calendula officinalis</i> L.	Pétala/Pólen	1531- 1529	1157	1004	Flavoxantina, luteoxantina
Camomila <i>Chamomilla recutita</i> L.	Pólen	1529	1157	1006	Carotenoide
Calêndula <i>Calendula officinalis</i> L.	Pólen	1524	1157	1004	Luteína, anteraxantina
Nectarina <i>Prunus perica</i> L.	Fruta	1527	1157	1005	β -criptoxantina
Cenoura <i>Daucus carota</i> L.	Raiz amarela	1257	1157	1006	Luteína, anteraxantina
Cenoura <i>Daucus carota</i> L.	Folha	1526	1157	1004	Luteína, β -caroteno
Hera <i>Hedera helix</i> L.	Folha	1526	1157	1004	Luteína, β -caroteno
Manjericão <i>Ocimum basilicum</i> L.	Folha	1525	1158	1005	Luteína, β -caroteno
Brócolis <i>Brassica oleracea var. italica</i> L.	Flor	1524	1157	1005	Luteína, β -caroteno
Feijão francês <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Vagem verde	1524	1157	105	Luteína, β -caroteno
Milho <i>Zea mays</i> L.	Semente	1522	1157	1005	Zeaxantina
Abóbora <i>Cucurbita pepo</i> L.	Fruta	1524	1157	1009	β -caroteno
Damasco <i>Prunus armeniaca</i> L.	Fruta	1524	1156	1003	β -caroteno
Cenoura <i>Daucus carota</i> L.	Raiz alaranjada	1520	1156	1003	β -caroteno
Urucum <i>Bixa orellana</i> L.	Semente	1518 1523	1154 1155	1011 1008	cis-bixina, trans-bixina
Pimentão <i>Capsicum annuum</i> L.	Fruta vermelha	1517	1158	1004	Capsantina
Melancia <i>Citrullus lanatus</i> Thumb.	Fruta	1510	1158	1008	Licopeno
Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Fruta	1510	1156	1004	Licopeno
Padrão de Luteína	Pó	1522	1157	1008	Luteína
Padrão de α -caroteno	Pó	1521	1157	1006	α -caroteno
Padrão de β -caroteno	Pó	1515	1156	1007	β -caroteno

Métodos quimiométricos

Na química, muitos resultados analíticos são apresentados como um conjunto de dados medidos, que podem trazer a informação medida da amostra associada a ruídos gerados pela natureza da instrumentação. Em alguns casos, a magnitude do ruído é tão grande quanto a informação, o que dificulta encontrar os resultados interessantes em um conjunto de dados multidimensionais. As soluções de tais problemas são propostas por quimiometria, pois, por meio de técnicas quimiométricas, somos capazes de: excluir o máximo de ruído possível dos conjuntos de dados e de adquirir o máximo de informações possíveis dos dados multidimensionais. Portanto, a quimiometria é o campo da ciência que trata de extrair informações valiosas de um conjunto de dados multidimensionais por meio de métodos matemáticos e estatísticos (BARANSKA, 2014).

Dependendo de diferentes tipos de informações a serem exploradas, 2 tipos de análises podem ser consideradas: a primeira é uma análise exploratória dos dados, enquanto a outra é o reconhecimento de padrões (ZIEGEL, 2004).

Frequentemente a análise exploratória de dados é empregada para resumir os padrões de uma matriz de dados, a fim de avaliar suas características, bem como o relacionamento entre amostras e variáveis. A análise dos componentes principais (PCA), a análise fatorial e a projeção são três métodos amplamente utilizados na análise exploratória, cujos objetivos são (WANG *et al.*, 2016):

- extração de informações importantes relacionadas, reduzindo o número de variáveis latentes por meio de combinações lineares das variáveis originais seguindo um determinado critério;
- identificação de possíveis agrupamentos (*clusters*) explorando a diferença na variabilidade dos objetos;
- detecção de pontos discrepantes (*outliers*);
- identificação de tendências e agrupamentos nas amostras e variáveis.

Normalmente, a análise exploratória dos dados é o primeiro passo em um processo de classificação, que geralmente é realizado por métodos de reconhecimento de padrões. Assim, dependendo da classe que pertencem as amostras, podem ser realizados 2 tipos de métodos de classificação: os de reconhecimento de padrões não supervisionados e os supervisionados. Os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados não assumem qualquer conhecimento prévio dos dados, o que poderia fornecer uma visão imparcial dessa matriz, e são usados principalmente para descobrir o potencial de padronização em um conjunto de dados. Desses, os mais comumente utilizados são métodos que incluem PCA, PCA-robusto, análise hierárquica de grupos (HCA), *K-means*, etc. Entre eles, PCA e HCA são as abordagens não supervisionadas mais aplicadas (WANG *et al.*, 2016; ZIEGEL, 2004).

2..1 Análise de componentes principais - PCA

A análise de componentes principais (PCA) foi originalmente desenvolvida por Pearson em 1901 e é uma ferramenta utilizada para converter um espaço de dados multidimensional em um subespaço de menor dimensão (WANG *et al.*, 2016; ZIEGEL,

2004). Essa técnica corresponde a um procedimento matemático que utiliza uma transformação ortogonal, isto é, ortogonalização de vetores, para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de valores de variáveis linearmente não correlacionadas, as quais são denominadas de componentes principais (PCs). Cada PC é uma combinação linear das variáveis originais e cada sucessiva PC explica a máxima quantidade de variância, a qual não foi contabilizada pelas PCs anteriores. Assim, o PCA converte o conjunto de dados original em duas matrizes conhecidas como escores (*scores*) e pesos (*loadings*). Os escores são coordenadas recém-definidas para as amostras e o gráfico de escores fornece informação sobre a dessemelhança dos objetos, uma vez que os pontos que estão próximos um dos outros têm perfis semelhantes. Por outro lado, objetos que se encontram distantes são caracterizados por propriedades diversas. Já os pesos do PC descrevem como as variáveis originais são integradas linearmente em novas variáveis (PC) e mostram o quanto cada variável contribui para transformar outras variáveis (POMERANTSEV, 2014; WANG *et al.*, 2016; ZIEGEL, 2004).

Matematicamente, considerando que \mathbf{X} seja uma matriz ($I \times J$), onde I corresponde ao número de linhas (amostras) e J é o número de colunas (variáveis), que, por regra, são numerosas ($J \gg 1$). O método de componentes principais PCs utiliza novas variáveis formais t_a ($a = 1, \dots, A$), as quais são combinações lineares das variáveis originais x_j , ($j = 1, \dots, J$); isto é:

$$t_a = p_{a1}x_1 + \dots + p_{aJ}x_J \quad (2.8)$$

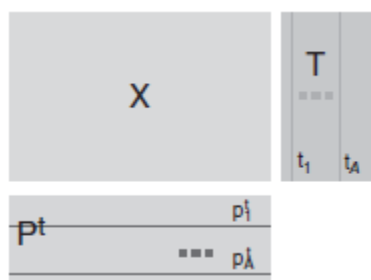


Figura 2.7: Decomposição da matriz \mathbf{X} . Fonte: (POMERANTSEV, 2014).

Usando essas novas variáveis, a matriz \mathbf{X} é decomposta no produto de duas matrizes \mathbf{T} e \mathbf{P} , como mostrado na Figura 2.7 e na equação 2.9.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^t + \mathbf{E} = \sum_{a=1}^A t_a p_a^t + \mathbf{E} \quad (2.9)$$

Portanto, a matriz \mathbf{T} é a matriz de escores de dimensões $I \times A$. Já a matriz \mathbf{P} é denominada de matriz de pesos com dimensões $J \times A$ e, por fim, \mathbf{E} é a matriz residual de dimensão $I \times J$. As novas variáveis t_a são as chamadas PCs, e o número de colunas t_a na matriz \mathbf{T} e o número de colunas p_a são iguais a A , o que é chamado de número de PCs. Esse valor é certamente menor que o número de variáveis J ou o número de amostras I (POMERANTSEV, 2014).

2..2 Regressão por mínimos quadrados parciais – PLS

PLS é um acrônimo que originalmente representa uma regressão parcial de mínimos quadrados, mas, com o passar dos anos, alguns autores preferiram desenvolver essa sigla como *projeção para estruturas latentes*. De qualquer forma, a regressão PLS combina características e generaliza a análise de componentes principais (PCA) e regressão linear múltipla. Além disso, seu objetivo é analisar ou prever um conjunto de variáveis dependentes a partir de um conjunto de variáveis independentes ou preditores. Essa predição é alcançada extraindo dos preditores um conjunto de fatores ortogonais chamados *variáveis latentes* (ABDI, 2010).

Desde a sua introdução, o PLS tornou-se o método de escolha para a calibração multivariada de dados espectrais devido à alta qualidade e robustez do modelo de calibração e à sua relativa facilidade de implementação (WOLTHUIS *et al.*, 2006).

A regressão PLS é particularmente empregada quando se precisa prever um conjunto de variáveis dependentes a partir de um extenso conjunto de variáveis independentes, isto é, preditores. Portanto, pode-se afirmar que o objetivo da regressão PLS é prever Y a partir de X e descrever sua estrutura comum. Especificamente, esse método busca um conjunto de componentes (vetores latentes) que executam uma decomposição simultânea de X e Y com restrição de que esses componentes expliquem o máximo possível da covariância entre X e Y . Esse método, além de generalizar o PCA, é seguido por uma regressão onde os vetores latentes obtidos a partir de X são utilizados para prever Y . Desse modo, a regressão PLS decompõe ambos X e Y como um produto de um conjunto comum de fatores ortogonais e um conjunto de pesos específicos. Assim, as variáveis independentes são decompostas como:

$$X = TP^T \quad \text{com} \quad T^T T = I \quad (2.10)$$

onde I é a matriz identidade. Pela analogia com o PCA, T é chamada de matriz de escores, enquanto P é matriz de pesos. Dessa forma, Y é estimado como:

$$Y = TBC^T \quad (2.11)$$

sendo B é a matriz diagonal com os “pesos de regressão” como elementos diagonais e C é a “matriz peso” das variáveis dependentes. Já as colunas de T são os vetores latentes (ABDI, 2010). A regressão PLS corresponde a um modelo randômico e, nesse caso, a quantidade da variância explanada por uma variável latente indica sua importância na predição de Y . Nesse contexto, uma variável latente é relevante apenas se ela melhora a predição de Y para novas observações.

A fim de estimar a capacidade de generalização da regressão PLS, abordagens paramétricas padrões não podem ser utilizadas e, portanto, a performance de um modelo de regressão PLS é avaliado com técnicas de re-amostragem com base computacional, assim como técnicas de validação cruzada e *bootstrap*, em que os dados são separados em dois conjuntos: *learning* (para construir o modelo) e *testing* (para testar o modelo) (ABDI, 2010).

2..3 *Análise discriminante por mínimos quadrados parciais – PLS-DA*

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é uma técnica supervisionada, pois utiliza uma matriz que contém as informações correspondentes às classes das amostras na etapa de construção do modelo (Y). O número de colunas de Y é igual a quantidade de classes das amostras, sendo que os casos pertencentes àquela classe recebem o valor 1 e os que não pertencem recebem o valor 0. Nesse caso, o PLS-DA tenta encontrar os melhores componentes que expliquem as variações das variáveis X que sejam relacionadas aos valores de Y (COSTA, 2016)

Assim como nas outras técnicas anteriormente descritas, na construção do modelo, duas matrizes são decompostas simultaneamente em matrizes escores e *loadings*. Na predição do modelo o que indicará se as amostras foram corretamente classificadas será o limiar adotado. Normalmente, o valor adotado é 0,5. Logo, amostras que com Y acima de 0,5 pertencem àquelas da classe 1.

2..4 *Análise de agrupamento hierárquico – HCA*

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é um processo hierárquico que tem como objetivo classificar indivíduos ou amostras em um pequeno número de grupos mutuamente excludentes, com base na similaridade entre eles. Em cada passo a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo. Assim, a distância entre esses pontos reflete as similaridades entre as suas propriedades. Por essa razão, pode-se afirmar que a técnica é utilizada para enfatizar os agrupamentos e padrões a partir da representação gráfica bidimensional, também chamada de dendrograma (ROSÁRIO, 2012).

Referências

ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, v. 2, n. 1, p. 97–106, 2010.

AGNIESZKA KACZOR, M. B. Carotenoids: nutrition, analysis and technology. [s.l.: s.n.].

ALMEIDA, M. R. *et al.* Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, n. 7, p. 2693–2701, 6 ago. 2010.

BARANSKA, M. *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*. [s.l.] Springer International Publishing, 2014.

BARONE, G. *et al.* A portable versus micro-Raman equipment comparison for gemmological purposes: The case of sapphires and their imitations. *Journal of Raman*

Spectroscopy, v. 45, n. 11–12, p. 1309–1317, 2014.

BEGANOVIC, A. *et al.* Critical review on the utilization of handheld and portable Raman spectrometry in meat science. *Foods*, v. 8, n. 2, 2019.

BOYACI, I. H. *et al.* Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis. *RSC Adv.*, v. 5, n. 70, p. 56606–56624, 2015.

CHALMERS, J.; EDWARDS, H.; HARGREAVES, M. Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science. [s.l.: s.n.].

CHONG, C. K. *et al.* Development of NMR and Raman Spectroscopic Methods for the Determination of the Degree of Substitution of Maleate in Modified Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 6, p. 2702–2708, jun. 2001.

CIALLA, D. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 403, p. 27–54, 2012.

COSTA, Tássia Brena Barroso Carneiro da. Metabonômica aplicada ao diagnóstico e estadiamento de doenças hepáticas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

CULKA, A.; JEHLIČKA, J.; EDWARDS, H. G. M. Acquisition of Raman spectra of amino acids using portable instruments: Outdoor measurements and comparison. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 77, n. 5, p. 978–983, 2010.

DE LA CHAPELLE, M. L.; PUCCI, A. Nanoantenna: plasmon-enhanced spectroscopies for biotechnological applications. [s.l.] CRC Press, 2013. v. 1

DELFINO, I. *et al.* Visible micro-Raman spectroscopy for determining glucose content in beverage industry. *Food Chemistry*, v. 127, n. 2, p. 735–742, 2011.

DUPUY, N. Recognition of starches by Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, n. 1, p. 83–90, 1 jul. 2002.

EMBER, K. J. I. *et al.* Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *npj Regenerative Medicine*, v. 2, n. 1, p. 12, 2017.

ESTEBAN, R. *et al.* Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany*, v. 119, p. 63–75, 2015.

GALANAKIS, C. M. Nutraceutical and Functional Food Components - Effects of Innovative Processing Techniques. [s.l.] Nikki Levy, 2017.

GUILLOT, N.; DE, M. L. Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer The electromagnetic effect in surface enhanced Raman scattering: Enhancement optimization using precisely controlled nanostructures. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, v. 113, p. 2321–2333, 2012.

HERRERO, A. M. Raman Spectroscopy for Monitoring Protein Structure in Muscle Food Systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, n. 6, p. 512–523, 28 maio

2008.

ILASLAN, K.; BOYACI, I. H.; TOPCU, A. Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy. *Food Control*, v. 48, p. 56–61, fev. 2015.

ISRAESEN, N. D.; HANSON, C.; VARGIS, E. Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction. *The Scientific World Journal*, v. 2015, p. 12 pages, 2015.

JÄÄSKELÄINEN, A.-S. *et al.* Endosperm and aleurone cell structure in barley and wheat as studied by optical and Raman microscopy. *Journal of Cereal Science*, v. 57, n. 3, p. 543–550, maio 2013.

KIRTI, K. *et al.* Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology*, v. 2014, p. 1–13, 2014.

KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J. Rapid evaluation and discrimination of γ -irradiated carbohydrates using FT-Raman spectroscopy and canonical discriminant analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 87, n. 7, p. 1244–1251, maio 2007.

KRIEG, T. Real-time monitoring of continuous fermentation by Raman spectroscopy. n. September, p. 30, 2014.

LEOPOLD, N.; LENDL, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *Journal of physical chemistry B*, v. 107, n. 24, p. 5723–5727, 2003.

LI, Z. *et al.* Raman Spectroscopy for In-Line Water Quality Monitoring — Instrumentation and Potential. *Sensors*, v. 14, p. 17275–17303, 2014.

LONG, D. A. The Raman Effect. [s.l: s.n.]. v. 8

MARQUARDT, B. J.; WOLD, J. P. Raman analysis of fish: A potential method for rapid quality screening. *LWT - Food Science and Technology*, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2004.

MATOUSEK, P.; MORRIS, M. D. (EDS.). *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

MENDES, T. O. *et al.* Vibrational spectroscopy for milk fat quantification: line shape analysis of the Raman and infrared spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 47, n. 6, p. 692–698, 2016.

MIKKELSEN, M. S. *et al.* Molecular structure of large-scale extracted β -glucan from barley and oat: Identification of a significantly changed block structure in a high β -glucan barley mutant. *Food Chemistry*, v. 136, n. 1, p. 130–138, jan. 2013.

- NAGARAJAN, J. *et al.* Carotenoids. In: Nutraceutical and Functional Food Components. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 259–296.
- PARSON, W. W. Modern Optical Spectroscopy. [s.l: s.n.]. v. 1
- POMERANTSEV, A. L. Chemometrics in Excel. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2014.
- PROCHAZKA, M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- RADZIUK, D.; MOEHWALD, H. Prospects for plasmonic hot spots in single molecule SERS towards the chemical imaging of live cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 17, p. 21072–21093, 2015.
- REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science and Technology*, v. 17, n. 7, p. 344–353, 2006.
- ROMAN, M. *et al.* Spectroscopic Studies on Bioactive Polyacetylenes and Other Plant Components in Wild Carrot Root. *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 8, p. 1757–1763, 26 ago. 2011.
- ROSÁRIO, C.R. do; KIPPLER, L. M.; FERRÃO, M. F. Modelo para aplicação de análise multivariada através de técnicas estatísticas PCA e HCA sobre questionário de avaliação da satisfação de clients: estudo de caso em uma empresa metalúrgica de embalagens metálicas. *Tecnológica*. Santa Cruz do Sul, v.16, n.1, pg 30-39, 2012.
- SCHUSTER, K. C.; URLAUB, E.; GAPES, J. R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *Journal of Microbiological Methods*, v. 42, n. 1, p. 29–38, set. 2000.
- SHALABAEVA, V. *et al.* Microelectronic Engineering Plasmonic microholes for SERS study of biomolecules in liquid. *MEE*, v. 158, p. 59–63, 2016.
- SHARMA, B. *et al.* SERS: Materials, applications, and the future Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a powerful vibrational. *Materials Today*, v. 15, n. 1–2, p. 16–25, 2012.
- SINGH, A.; AHMAD, S.; AHMAD, A. Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. *RSC Advances*, v. 5, n. 77, p. 62358–62393, 2015.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6a edição ed. [s.l.] Bookman, 2009.
- SOCRATES, G. Infrared and Raman characteristic group frequencies. [s.l: s.n.].
- TSCHIRNER, N. Raman spectroscopy of b-carotene and CdSe-based nanocrystals. *Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften*, v. Dr. rer. n, p. II, 109 S.: III., 2012.
- TSCHIRNER, N.; NATURWISSENSCHAFTEN, D. DER. Raman spectroscopy of β -carotene

and CdSe-based nanocrystals. 2012.

WANG, P. *et al.* Vibrational spectroscopic approaches for the quality evaluation and authentication of virgin olive oil. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 51, n. 10, p. 763–790, 2016.

WANG, Y.; IRUDAYARAJ, J.; IRUDAYARAJ, J. Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology. 2012.

WOLTHUIS, R. *et al.* Estimating the influence of experimental parameters on the prediction error of PLS calibration models based on Raman spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 37, n. 1–3, p. 447–466, 2006.

ZIEGEL, E. R. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. [s.l: s.n.]. v. 46

Capítulo 3 – Desenvolvimento de uma abordagem quantitativa utilizando espectroscopia Raman para determinação de carotenoides em batata-doce

Resumo¹: A batata-doce de polpa alaranjada é uma raiz tuberosa rica em carotenoides. O tratamento térmico para o processamento de batata-doce pode diminuir o conteúdo desses constituintes nos alimentos, diminuindo suas propriedades bioativas. Em paralelo, a espectroscopia Raman vem crescendo como uma ferramenta rápida para análise de alimentos, especialmente para detecção de baixas concentrações de carotenoides e para o monitoramento de seu perfil de degradação ao longo do tempo. Portanto, neste trabalho foram avaliados dois métodos de secagem, ar quente e micro-ondas com tambor rotativo, combinados com espectroscopia Raman quantitativa. Os resultados mostraram uma degradação de carotenoides em torno de 50% para os dois tipos de processos de secagem estudados. O gráfico de PCA comprovou o potencial de reprodutibilidade das análises para amostras de secagem em micro-ondas. Para amostras aquecidas com ar quente, a melhor correlação linear obtida foi igual a $R^2 = 0,90$ e por micro-ondas $R^2 = 0,88$. Também foram construídos modelos de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) obtendo-se um coeficiente de determinação satisfatório.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, carotenoides, batata-doce, ar quente, micro-ondas, PCA, PLS.

¹ Resultados do Capítulo 3 foram publicados na revista Food Chemistry, Volume 245, 15 April 2018, Pages 1224-1231. doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.086

Introdução

Os carotenoides são fitoquímicos e microconstituintes lipossolúveis presentes em muitos alimentos vegetais, localizados em organelas chamadas cromoplastos (BRACKMANN *et al.*, 2011; SCHULZ, 2016). Eles têm várias funções biológicas para os humanos, como a atividade da pró-vitamina A, propriedades antioxidantes e o aprimoramento das funções do sistema imunológico (ZAKYNTHINOS; VARZAKAS, 2016). Além disso, protegem contra o câncer, doenças cardiovasculares e degeneração macular (SCHULZ, 2016). Mais de 600 carotenoides foram detectados na natureza, e são comumente divididos em duas classes químicas: os carotenos (por exemplo, α -caroteno, β -caroteno e licopeno) e xantofilas, que representam a fração carotenoide oxigenada (zeaxantina, cantaxantina, astaxantina e luteína) (SCHULZ, 2016; TSCHIRNER, 2012). Particularmente, o β -caroteno atua como um precursor da vitamina A e chamou a atenção das organizações de saúde para sua importância no controle da deficiência de vitamina A, que ainda é um problema de saúde global. Entre as razões para essa deficiência está uma dieta cronicamente insuficiente em vitamina A que pode levar a menores reservas corporais e a não atender às necessidades fisiológicas (WHO, 2009). Consequentemente, vários estudos recentes mostraram a batata-doce de polpa alaranjada (OFSP), que é um vegetal fácil de cultivar, amplamente popularizado e com benefícios nutricionais, como fonte para elevar os níveis sanguíneos de vitamina A (BURRI, 2011). Além disso, uma alternativa para fornecer à população mundial acesso rápido a esse micronutriente é através do consumo de *snacks* de batata-doce ou farinha de batata doce, que pode ser consumido indiretamente em pão, macarrão e bolos (SEBBEN; TRIERWEILER; TRIERWEILER, 2016). No entanto, a biodisponibilidade de carotenoides depende de algumas variáveis, incluindo propriedades físico-químicas, matriz alimentar e condições de processamento (BRACKMANN *et al.*, 2011).

Algumas condições de processamento como tratamento térmico podem induzir a isomerização de carotenoides trans-cis (PROVESI; DIAS; AMANTE, 2011). Todo o trans- β -caroteno, que é altamente instável, sofre isomerização, oxidação química e térmica e fotossensibilização quando exposto a oxigênio, luz e alta temperatura durante o processamento (GUL *et al.*, 2015; SCHULZ, 2016). A perda de conteúdo de carotenoides pode ser atribuída à rápida oxidação durante a secagem (PROVESI; DIAS; AMANTE, 2011). De acordo com Chandler e Schwartz 1988, essa degradação oxidativa ocorre através de um processo de radicais livres, embora as mudanças no teor de caroteno sobre o tratamento de processamento térmico sejam mais prováveis de ocorrer por reações de isomerização do que a decomposição. No caso da isomerização, o all-trans- β -caroteno aquecido a temperaturas inferiores a 100 °C resulta principalmente na formação de 13 e 15-cis- β -caroteno, enquanto o isomero 9-cis é formado acima de 100 °C (MARX *et al.*, 2003).

Métodos como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria visível têm sido frequentemente utilizados para quantificação de carotenoides e outros componentes de alimentos (GUPTA; SREELAKSHMI; SHARMA, 2015). No entanto, essas técnicas não conseguem atender à demanda por análises *in situ*, rápidas e múltiplas. Por outro lado, técnicas analíticas modernas, como alguns métodos espectroscópicos, atendem a esses requisitos. Assim, melhorias para identificar e quantificar um analito de

interesse com requisitos mínimos para preparação de amostras estão sendo estudadas (BOYACI *et al.*, 2015; PROCHAZKA, 2016). Neste contexto, a espectroscopia Raman está começando a ser utilizada na análise de material vegetal (KILLEEN *et al.*, 2013). Essa técnica fornece informações químicas e estruturais e pode ser usada para fornecer análises rápidas em campo (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012; KILLEEN *et al.*, 2013). Além dessas vantagens, o método permite identificar as espécies, o conteúdo e a distribuição de carotenoides em um sistema biológico (HUO *et al.*, 2011). Fisicamente, o evento de espalhamento Raman ocorre como resultado das interações dos fótons incidentes com a polarizabilidade da molécula (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012) e o espectro Raman fornece informações moleculares específicas de impressões digitais (PROCHAZKA, 2016). A identificação de carotenoides em sistemas biológicos tem sido estudada através da análise das principais características das bandas Raman, que podem sofrer pequenos desvios nas frequências vibracionais devido ao comprimento da cadeia de poliéster, os grupos terminais de carotenoides e suas interações com outros constituintes da planta. (HUO *et al.*, 2011).

O uso da espectroscopia Raman como ferramenta para distinguir e identificar os isômeros geométricos da astaxantina foi estudado por Subramanian *et al.* 2014. Estudos mostram que a intensidade dos modos Raman pode ser afetada pela formação dos isômeros *cis* do β -caroteno (KOYAMA *et al.*, 1988; SUBRAMANIAN *et al.*, 2014). O licopeno e o β -caroteno são detectados simultaneamente e seus sinais Raman são caracterizados por linhas de Stokes intensas em 1160 e 1525 cm^{-1} (DARVIN *et al.*, 2005).

De acordo com Rodriguez-Amaya e Kimura 2004, o teor de β -caroteno nas batatas doces de polpa alaranjada e salmão pode ser quantificado extraído e determinando a concentração espectrofotometricamente, sem recorrer ao uso da cromatografia porque o 13-*cis*- β -caroteno e alguns outros carotenoides não identificados até são percebidos, mas em quantidades irrisórias. Os métodos convencionais para a quantificação do teor de carotenoides na batata-doce geralmente envolvem etapas de extração de carotenoides e geralmente são trabalhos intensivos. Assim, um método rápido e confiável é desejável. Neste trabalho, técnicas são desenvolvidas para quantificar carotenoides usando os espectros Raman de amostras de batata doce em diferentes estágios de secagem. Portanto, o objetivo deste capítulo é estudar o potencial da espectroscopia Raman para análise quantitativa de carotenoides em batata-doce processada. Os espectros foram submetidos a análises multivariadas, que foram utilizadas em conjunto com resultados de espectrofotometria visível para produzir modelos de quantificação dos carotenoides presentes na batata-doce.

Materiais and Métodos

3..1 Amostras

A variedade de batata-doce de polpa alaranjada (nome científico: *Ipomoea batatas* L., família: *Convolvulaceae*; cultivar: beauregard; cor da polpa: laranja e cor da pele: castanha clara) foi adquirida no mercado local do município de Porto Alegre-RS, Brasil. Para o procedimento experimental, as amostras frescas foram limpas, descascadas e cortadas em fatias de 2 milímetros de espessura.

3..2 Procedimento experimental

A secagem das amostras foi realizada por dois métodos diferentes: secagem convectiva e micro-ondas. A secagem convectiva foi realizada em estufa (Biomat, Brasil), utilizando ar quente a 85 °C. As amostras foram colocadas no interior da estufa pré-aquecida e mantidas na condição de secagem por 15, 45, 75, 125 minutos e até o peso constante (cerca de 300 minutos). As amostras foram mantidas sob condições de congelamento (-18 °C) até a posterior análise.

A secagem por micro-ondas foi realizada em um forno de micro-ondas personalizado, com um sistema de tambor rotativo hermético conectado a uma bomba de vácuo para operação em pressão reduzida. As amostras foram introduzidas dentro do tambor rotativo e processadas por 3, 6 ou 8 minutos. Para os experimentos, as condições de operação do micro-ondas foram fixadas em 25 rotações por minuto para o tambor rotativo e potência de aquecimento de 820 W. A remoção da umidade do tambor foi realizada por bomba externa de vácuo conectada às tampas do tambor rotativo. A Figura 3.1 mostra uma representação esquemática do aparato experimental. Este sistema consiste em um forno de micro-ondas (BRASTEMP, Brasil), equipado internamente com um tambor rotativo de polimetilmetacrilato, com 240 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento e com 6 chicanas retangulares. O sistema de rotação do tambor compreende um par de engrenagens cilíndricas retas, um motor e um painel de controle para ajustes de rotação. O equipamento descrito foi projetado e construído pelo próprio autor em projeto anterior, no grupo de pesquisa DEQUI/GIMSCOP.

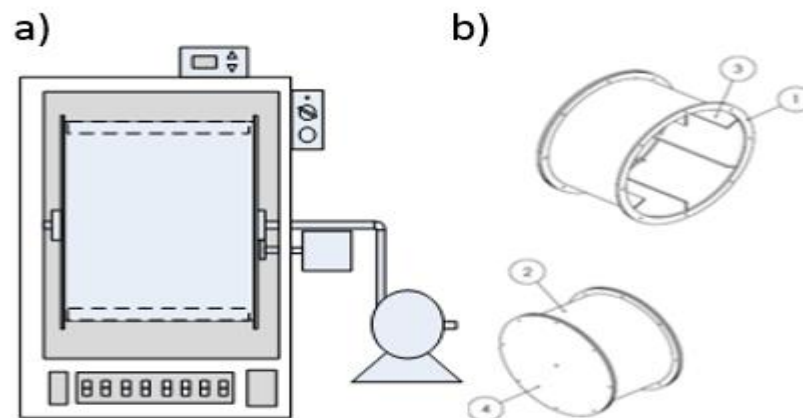


Figura 3.1: a) Esquema do sistema de tambor rotativo com aquecimento por micro-ondas e bomba de vácuo. b) Representação tridimensional do tambor: 1 - Flange; 2 - Parede; 3 - Chicanas; 4 - Tampa.

3..3 Quantificação de Carotenoides por Espectrometria na região do visível

O procedimento consiste na extração sólido-líquido, particionamento e a medição da absorbância do extrato em um espectrômetro de luz visível.

Primeiramente, 1 grama das amostras foi transferido para um almofariz e 3 gramas de Hyflosupercel (celite) foram adicionados. Esta mistura foi macerada com 50 mL de acetona e filtrada em um funil de Buchner com papel de filtro, para extração dos carotenoides. O procedimento de extração foi repetido até que a acetona filtrada estivesse destituída de cor. Depois disso, o extrato de acetona foi transferido para um funil de separação de 250 mL para partição com 5 mL de éter de petróleo (PE). A mistura foi então, vagorosamente agitada e para evitar a formação de uma emulsão, 100 mL de água destilada foram lentamente adicionados ao longo das paredes do funil.

Após este procedimento, ocorre a separação de duas fases: uma composta de água e acetona e a segunda com os pigmentos carotenoides em éter de petróleo. A fase aquosa foi descartada. O funil foi então lavado quatro vezes com água destilada para remover a acetona residual e a fase PE foi coletada em um balão volumétrico, após passar por um pequeno funil contendo sulfato de sódio anidro para remover a água restante. Finalmente, o volume do balão volumétrico foi completado com éter de petróleo. O método utilizado foi previamente validado por sua precisão e reprodutibilidade (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

Os extratos de batata doce obtidos pelo procedimento acima foram analisados por espectrofotometria visível nos 450 e 470 nm para o β -caroteno e licopeno, respectivamente. O Espectrofotômetro de Feixe Único UV-VIS (Halo SB-10, Dynamica Scientific Ltd., Reino Unido) foi utilizado para essas análises.

O teor total de carotenoides foi calculado pela equação 3.1 e todos os resultados foram corrigidos para a matéria seca:

$$\text{Teor de carotenoides total } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{A \cdot V(\text{mL}) \cdot 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot \text{massa de amostra (g)}} \quad (3.1)$$

onde: A = absorvância; V = volume do extrato total; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorção de β -caroteno em PE (2592) ou licopeno em PE (3450).

3.4 Análises Raman

Preparação das amostras

Uma fração de uma fatia de batata-doce de cada ponto de secagem foi separada e subsequentemente misturada com pó de TiO_2 (proporção 1 : 1 em massa). Essa mistura foi feita por maceração manual com pistilo e almofariz durante 10 minutos. Em seguida, gotas de água destilada foram adicionadas à mistura até formar uma textura pastosa que facilita a homogeneização da amostra. Na seqüência, uma pequena quantidade dessa pasta foi espalhada em uma lâmina de vidro para microscópio. Assim, a amostra estava pronta para receber o laser. O método de preparação de amostra, aqui descrito, necessita de aproximadamente um quinto do tempo necessário para o método convencional, de extração com solventes, descrito na seção 3.3.

O TiO_2 em pó na fase rutilo foi utilizado como padrão interno por possuir forte sinal Raman e quatro modos ativos aparecendo em 143, 236, 447 e 613 cm^{-1} (CASTREJÓN-

SÁNCHEZ; CAMPOS; CAMACHO-LÓPEZ, 2014), sendo que nenhum deles se sobrepõem aos picos característicos dos carotenoides entre 1005 e 1524 cm^{-1} a excitações de 532 nm (TSCHIRNER, 2012). Além disso, o dióxido de titânio é produzido em grandes quantidades; é uma partícula pouco tóxica e a forma rútilica é quimicamente inerte (AHLINDER, 2015).

Espectroscopia Raman

As análises Raman das amostras foram realizadas num espectrofotômetro iHR550 Raman (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Fran) acoplado a um detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) e uma fonte de laser de 532 nm. A potência de saída do *laser* foi ajustada para 50 mW, e o feixe de *laser* foi atenuado com um filtro de densidade neutra com 50% de transmitância. Depois disso, o feixe foi refletido pelos espelhos para um filtro de borda dielétrica e ainda direcionado para o microscópio equipado com uma objetiva de 50 X.

Na sequência, o feixe Raman retroespalhado foi refletido pelo prisma para uma grade de difração de 1800 ranhuras/mm e finalmente para a câmera CCD. Os dados espectrais foram registrados entre 250 e 2000 cm^{-1} com parâmetros de medição constantes. Três acumulações de um tempo de contagem de 10 s foram utilizadas. O software LabSpec 5 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., França) foi executado para a aquisição dos dados espectrais. Além disso, para cada amostra foram registrados 5 espectros. Por conseguinte, as réplicas representam estas medições em 5 áreas diferentes da amostra semissólida preparada para cada tempo de secagem. Por exemplo, no caso das amostras obtidas pelo processo de secagem por ar quente, foram totalizados 30 espectros, pois havia 6 períodos de secagem, já para as amostras derivadas da secagem com micro-ondas foram obtidos 20 espectros, pois havia 4 períodos da secagem.

Análise de dados

Pré-tratamentos foram usados para transformar os dados espectrais. Inicialmente, para realizar a correção de fundo espectral, foi ajustado um polinômio através de oito pontos tangentes à curva com as menores intensidades do espectro. Assim, a correção de fundo foi realizada subtraindo este polinômio do espectro de Raman. Na sequência, uma transformação de variação normal padrão (SNV) foi realizada para centralizar e dimensionar espectros. Já a análise de componentes principais (PCA) foi realizada para obter uma redução da dimensionalidade, para tentar identificar modificações moleculares durante o processo de aquecimento e para verificar o potencial de agrupamento de amostras de acordo com o tempo de secagem. Modelos de calibração entre medidas de referência e espectros Raman foram desenvolvidos usando mínimos quadrados parciais (PLS), uma vez que o PLS é o método de regressão mais utilizado. O objetivo da regressão PLS é prever Y de X e descrever sua estrutura comum. No PLS com uma variável de saída, os dados de entrada X e os dados de saída Y são decompostos da seguinte forma:

$$X = TP^T + E \quad (3.2)$$

$$= Tb + f \quad (3.3)$$

onde T é uma matriz de variáveis latentes cujas colunas são vetores latentes, P é uma matriz de carga de X , b é um vetor de carga de Y e E e f são erros.

Python 2.7 através do pacote *open-source scikit-learn* foi usado para os cálculos de PCA e PLS. Também foram montados modelos utilizando padrão interno, onde a intensidade relativa de Raman foi expressa como a razão entre as áreas das bandas características dos carotenoides 1520 cm^{-1} , 1157 cm^{-1} e 1006 cm^{-1} e a área da banda característica do padrão interno TiO_2 em 447 cm^{-1} .

Resultados e discussão

Os espectros Raman da mistura batata doce de polpa alaranjada (OFSP) com TiO_2 são mostrados na Figura 3.2. Ambos os tipos de aquecimento, ar quente (Figura 3.2-a) e micro-ondas (Figura 3.2-b) possuem bandas características de carotenoides e TiO_2 (fase rutilo). Em relação aos carotenoides como o β -caroteno e licopeno, apresentam o espectro Raman composto por três bandas vibracionais proeminentes a 1520 , 1157 e 1006 cm^{-1} , denominadas ν_1 , ν_2 e ν_3 , respectivamente. Os picos de alta intensidade nos números de onda em aproximadamente 1520 e 1157 cm^{-1} foram atribuídos, respectivamente, ao estiramento simétrico em fase das ligações C=C e C-C da cadeia de polienica dos carotenoides, já o pico espectral localizado em torno de 1006 cm^{-1} ocorre devido à deformação angular no plano (balanço) do grupo metil presente nos carotenoides (CINTÃ PINZARU *et al.*, 2015; HUO *et al.*, 2011; KILLEEN *et al.*, 2013a). Por fim, o dióxido de titânio (TiO_2) na fase rutilo, utilizado como padrão interno, apresenta os modos ativos no espectro em 447 e 613 cm^{-1} (Figura 3.2).

A Figura 3.2 apresenta o conjunto de espectros médios obtidos para cada tipo de amostra. Nesse caso, as amostras identificadas como *fresh*, fazem relação às amostras de batata-doce *in natura*, antes da aplicação dos métodos de secagem. Já a amostra *flour*, corresponde àquela cuja secagem foi praticamente completa, gerando uma farinha com menos de 5 % de umidade. Visualmente percebe-se tanto na Figura 3.2-a como na Figura 3.2-b, que os picos de deslocamento Raman estão sobpostos nos mesmos números de onda, para os diferentes períodos de secagem analisados: 15, 45, 75 e 125 minutos no aquecimento com ar quente e 3, 6 e 8 minutos com micro-ondas. Contudo, as intensidades são diferentes.

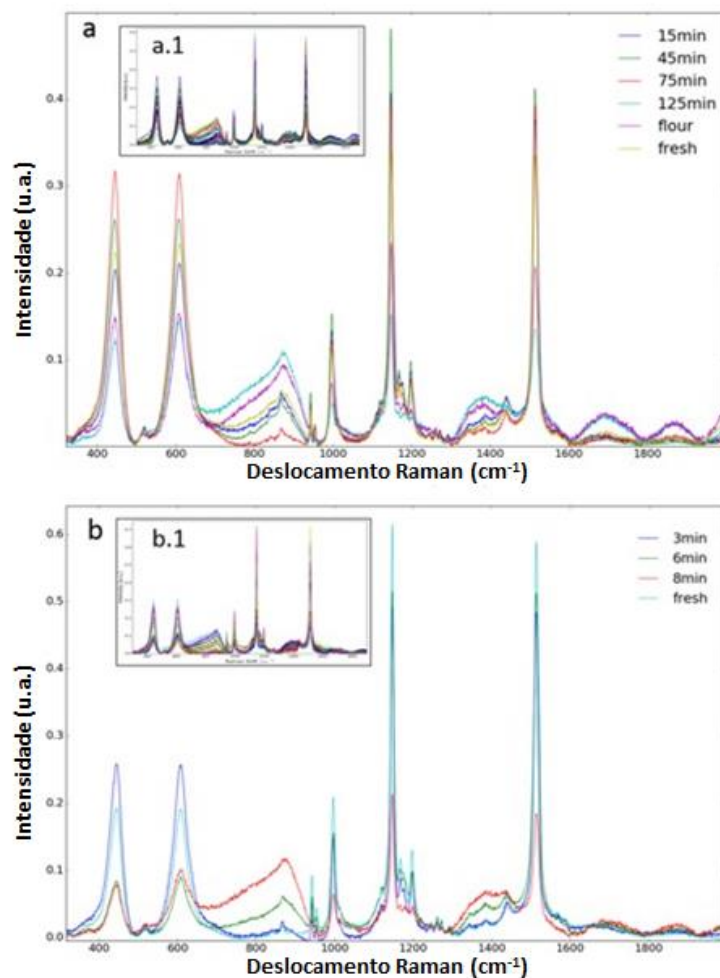


Figura 3.2: Espectro Raman para a mistura de OFSP e TiO_2 . Espectro médio das amostras aquecidas com ar quente (a) e respectivas réplicas (a.1); Espectro médio das amostras aquecidas por micro-ondas (b) e respectivas réplicas (b.1); ambos após o pré-processamento de dados.

A Figura 3.3 mostra os gráficos dos escores do primeiro e segundo componente principal no espaço PC. As amostras foram coloridas e moldadas de acordo com diferentes tipos. PC-1 e PC-2 juntos representam 82% da variabilidade nos espectros Raman de batata doce aquecida por ar quente a 85°C (Figura 3.3-A). Para o processo de micro-ondas, os dois primeiros componentes principais explicam 65% e 24% da variação total, respectivamente (Figura 3.3-B), totalizando 89% da variabilidade espectral.

Embora o PCA possa ser uma ferramenta de visualização de dados, com o conjunto de amostras processadas com micro-ondas (Figura 3.3-B), as quais, visualmente apresentavam maior homogeneidade de cor, foi possível agrupar as 5 replicatas das amostras, demonstrando o potencial de reprodutibilidade dessa análise. Além disso, os diferentes *clusters* indicam diferenças globais no perfil entre as amostras. O resultado na Figura 3.3-A, que só apresenta dois *clusters* (amostras de 75 e 300 minutos) não foi tão satisfatório quanto na Figura 3.3-B, possivelmente devido à heterogeneidade das amostras coletadas e analisadas (resultantes do tipo de secagem), o que, associado ao espalhamento irregular da luz, pode ter amplificado os desvios analíticos.

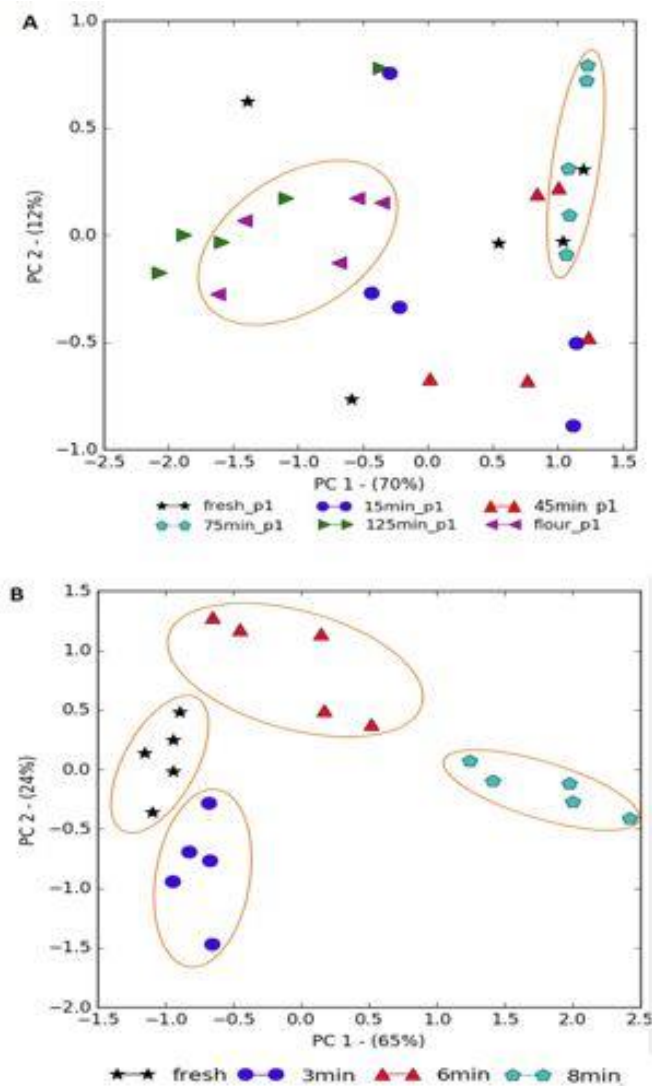


Figura 3.3: Gráficos dos escores da análise dos componentes principais (PC1 x PC2) das amostras de batata doce (A) quando aquecidas com ar quente a 85 °C e (B) quando aquecidas por micro-ondas no tambor rotativo.

Os resultados obtidos a partir da técnica espectrofotométrica mostram uma redução progressiva no teor total de carotenoides ao longo da secagem para ambos os processos de aquecimento por ar quente e micro-ondas. Essa redução é observada pela diminuição da área relativa dos picos característicos do caroteno e pelos picos do padrão interno, e está de acordo com o perfil esperado de carotenos nos processos de secagem. Como visto na Figura 3.4, inicialmente a amostra fresca tinha 59,5 miligramas de carotenoides por 100 g de batata-doce e após 125 min de aquecimento com ar quente a 85 °C, o conteúdo obtido foi de 31 miligramas/100g, o que representa uma perda de aproximadamente 50% no teor inicial de carotenoides. A amostra seca por 300 min, até peso constante, apresentou um teor de carotenoides ligeiramente maior que a amostra predecessora (120 min). Mesmo considerando que a partir de 120 min a remoção de umidade livre tende a permanecer constante, esse pequeno aumento no valor pode ser

justificado pelo fato dessa amostra ter sido exposta ao ar ambiente durante o processo de moagem para a produção de farinha, o que provavelmente resultou em leve aumento do teor de umidade da amostra. O aumento não calculado da umidade da amostra influenciou o cálculo do conteúdo de β -caroteno e licopeno.

Os teores de umidade inicial em base seca para as amostras de ar quente e micro-ondas foram de 461,8% e 407,6% - equivalente a 82,2% e 80,3% em base úmida - respectivamente. Uma diferença significativa na taxa de remoção de umidade pelo método de secagem é vista comparando as amostras quando elas atingem aproximadamente 15% de umidade em uma base seca. Porque com apenas 6 min de aquecimento por micro-ondas o teor de umidade foi de 15,7%, enquanto o aquecimento com ar quente precisou de 75 min para chegar a 14,8%.

A intensidade Raman relativa (definida pela relação entre a área de um dos três picos característicos dos carotenoides, 1520, 1157 ou 1006 cm^{-1} ; e a área do pico característico de 447 cm^{-1} do padrão interno TiO_2), mostrado na Figura 3.4 para amostras secas ao ar quente, apresenta o perfil esperado para o teor de carotenoides ao longo do processo de secagem, para os três pares analisados (Figura 3.4). Na Figura 3.4-A, a intensidade Raman relativa dos picos 1520 e 447 cm^{-1} ($A_{1520 \text{ cm}^{-1}} / A_{447 \text{ cm}^{-1}}$) foi apresentada contra o teor de carotenoides ($\text{mg}/100\text{g}$), mostrando um perfil similar. Note que os desvios nos pontos da curva Raman são relativamente grandes, o que pode ser explicado pela natureza da luz emitida pela amostra. Além disso, apesar da homogeneização da amostra, pontos de maior concentração de pigmentos podem ocorrer devido ao estado semissólido das amostras, que também possuem todo o conteúdo da matriz alimentar original.

Obteve-se a correlação linear equivalente a $R^2 = 0,86$ entre a intensidade Raman relativa ($A_{1520 \text{ cm}^{-1}} / A_{447 \text{ cm}^{-1}}$) e o teor de carotenoides da OFSP (Figura 3.4-B). A Figura 3.4-C mostra o perfil ao longo do tempo para o par 1157 e 447 cm^{-1} ($A_{1157 \text{ cm}^{-1}} / A_{447 \text{ cm}^{-1}}$). Apesar de apresentarem o mesmo perfil com a tendência de queda de concentração, os desvios nesse caso foram maiores, resultando em uma baixa correlação ($R^2 = 0,56$) entre o conteúdo de carotenoides e os dados espectrais de Raman (Figura 3.4-D). Da mesma forma, o Figura 3.4-E, apresenta os resultados para o par 1006 e 447 cm^{-1} ($A_{1006 \text{ cm}^{-1}} / A_{447 \text{ cm}^{-1}}$). Neste caso, os perfis estão intimamente relacionados e uma correlação linear de $R^2 = 0,90$ foi alcançada. Portanto, as bandas Raman de 1006 e 1520 cm^{-1} foram as que melhor demonstraram o perfil de degradação dos carotenoides da batata-doce para secagem ao ar quente. Para todas as situações, as perdas de conteúdo de carotenoides podem ser atribuídas à rápida degradação oxidativa durante a secagem.

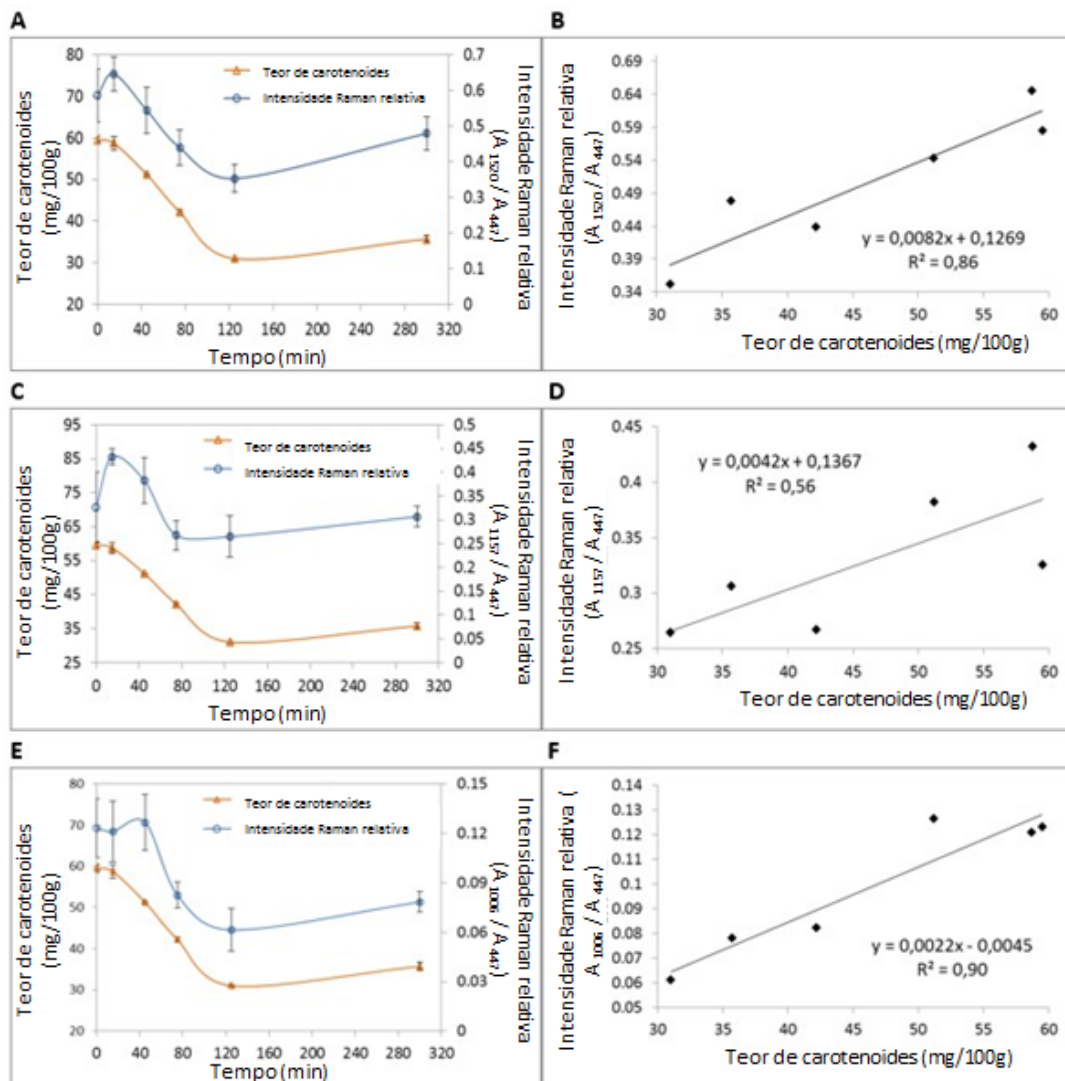


Figura 3.4: Teor de carotenoides em batata doce seca com ar quente. Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível (triângulo) e pelo método Raman (círculo) em relação à área entre (A) 1520 e 447 cm^{-1} , (B) 1157 e 447 cm^{-1} e (C) 1006 e 447 cm^{-1} . Correlação entre a intensidade Raman relativa e o teor de carotenoides entre (D) 1520 e 447 cm^{-1} , (E) 1157 e 447 cm^{-1} e (F) 1006 e 447 cm^{-1} .

A Figura 3.5 mostra os resultados do teor de carotenoides nos diferentes tempos de secagem em micro-ondas, utilizando o sistema de tambor rotativo. Inicialmente, a batata doce *in natura* continha 75,1 miligramas de carotenoides por 100 g de batata-doce. A diminuição no teor de carotenos foi mais rápida do que no conjunto anterior de amostras, com uma redução de 31,7% do conteúdo original em apenas 3 min. Aos 6 e 8 min, respectivamente, a concentração foi de 37,9 e 37,3 miligramas de carotenoides por 100 g de batata-doce. Esses valores similares podem ser explicados, pois as micro-ondas não atuam mais nos carotenoides, embora o teor de umidade continue diminuindo na amostra. Portanto, o tempo máximo de amostragem foi de 8 minutos, pois foi verificado que após 6 min a redução no valor inicial de carotenoides já era em torno de 50%. Perfis de amostragem realizados usando espectroscopia Raman também são apresentados na Figura 3.5. Note que para todas as curvas, o ponto em 6 min foi o que apresentou os maiores desvios. Além disso, o modelo mais representativo foi relacionado à faixa de

1520 cm^{-1} com $R^2 = 0,88$ (Figura 3.5-B), que fornece a maior correlação linear entre o conteúdo de carotenoides e intensidade Raman relativa. Os resultados obtidos são melhores que os apresentados por (FRATIANNI; CINQUANTA; PANFILI, 2010), os quais estudaram a resistência térmica dos carotenoides durante o aquecimento por micro-ondas através da degradação cinética desses pigmentos no suco de laranja, situação em que um decréscimo de cerca de 50% foi observado para quase todos os carotenoides após 1 min de aquecimento por micro-ondas a 85 °C.

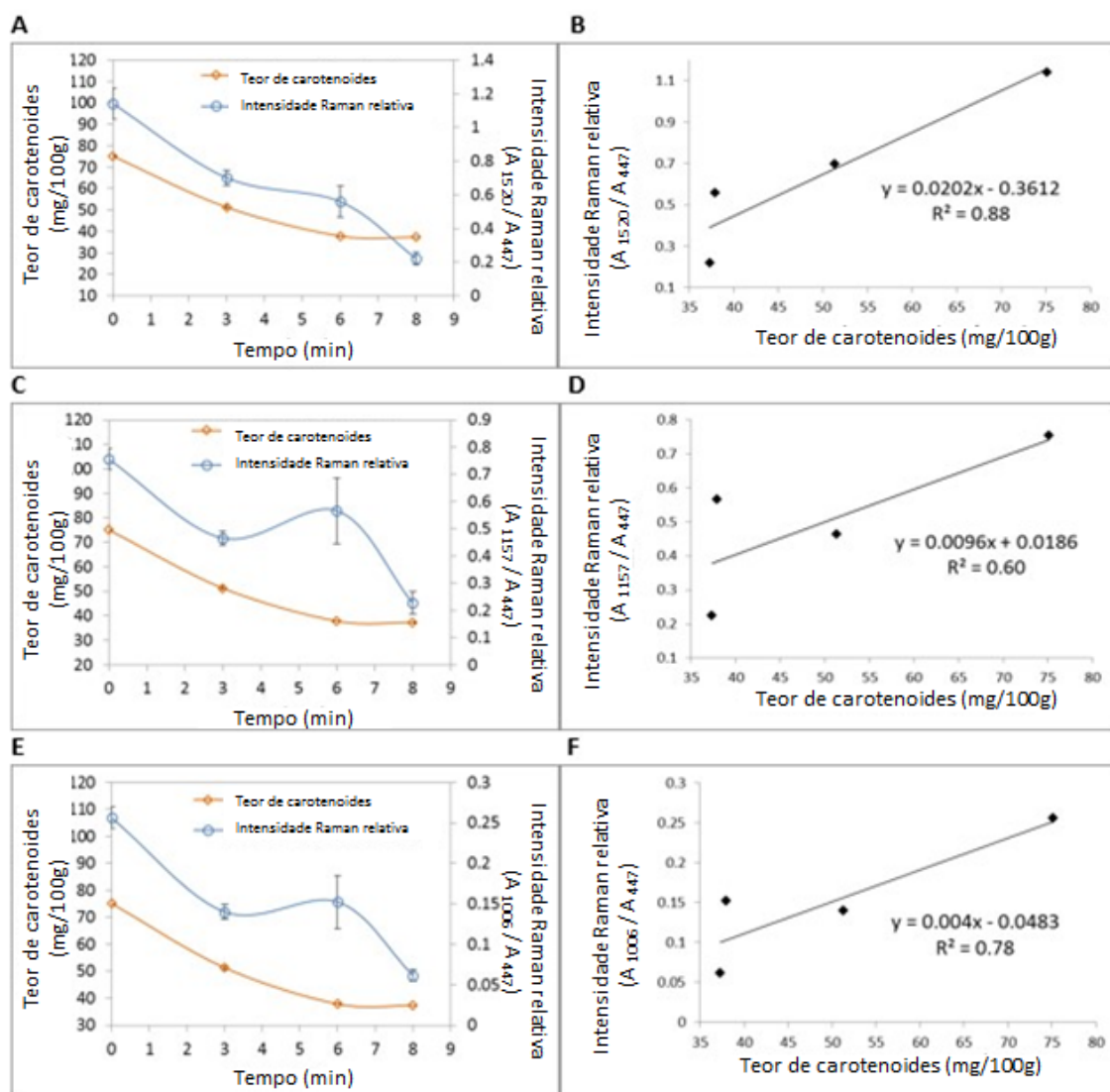


Figura 3.5: Teor de carotenoides em batata doce seca com micro-ondas. Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível (triângulo) ou pelo método Raman (círculo) em relação à área entre (A) 1520 e 447 cm^{-1} , (B) 1157 e 447 cm^{-1} e (C) 1006 e 447 cm^{-1} . Correlação entre a intensidade Raman relativa e o teor de carotenoides entre (A) 1520 e 447 cm^{-1} , (E) 1157 e 447 cm^{-1} e (F) 1006 e 447 cm^{-1} .

A isomerização de carotenoides *trans-para-cis* não foi avaliada pela metodologia proposta neste trabalho. Então, todas as mudanças nos dados espectrais dos carotenoides foram atribuídas à degradação dos carotenos. Os modelos de regressão PLS foram ajustados relacionando os espectros Raman completos centrados na média como

variáveis X e o conteúdo de carotenoides com o método espectrofotométrico como variáveis Y.

A Tabela 3.1 apresenta as faixas espectrais usadas para modelos de calibração. O intervalo entre 900 e 1600 cm^{-1} representa a faixa espectral compreendendo todas as frequências principais para a excitação de carotenoides. Já os demais intervalos estão relacionados individualmente com as intensidades das três bandas de carotenoides. A precisão da calibração é descrita pelo valor R^2 . O erro quadrático médio da calibração (RMSEC) e da predição (RMSEP), bem como, o número de variáveis latentes (LV) e amostras para cada faixa espectral também são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Estatísticas de calibração para quantificação de carotenoides em batata-doce processada por validação cruzada de espectroscopia Raman e análise de espectroscopia visível.

	Faixa espectral (cm^{-1})	R^2	LV	RMSEC [$\text{g}(100\text{g})^{-1}$]	RMSEP [$\text{g}(100\text{g})^{-1}$]	n	
Ar quente	900-1600	0,93	6	14,89	15,44	30	
		0,96	7	15,01	16,28	30	
	990-1010	0,9	6	14,1	15,5	30	
		0,94	7	14,25	16,54	30	
	1140-1165	0,95	4	15,8	12,67	30	
		0,97	5	15,98	13,47	30	
	1505-1525	0,93	5	14,24	22,39	30	
		0,96	6	14,33	26,03	30	
	Micro-ondas	900-1600	0,95	5	22,47	11,43	20
			0,99	6	22,7	11,27	20
990-1010		0,96	4	23,21	17,9	20	
		0,98	5	23,31	16,31	20	
1140-1165		0,92	4	21,94	17,08	20	
		0,98	5	22,26	16,97	20	
1505-1525		0,98	4	23,35	17,02	20	
		0,99	5	23,45	17,94	20	

Como pode ser visto na Tabela 3.1, para ambos os tipos de amostras processadas, foi possível obter correlações acima de 90% entre a espectroscopia Raman e a análise de espectroscopia visível. Isso é demonstrado pelos altos coeficientes de determinação (R^2) obtidos. Em geral, amostras da classe de micro-ondas exigiram um número menor de variáveis latentes para obter um melhor coeficiente de variância. Embora, o erro de calibração dessas amostras tenha sido maior que as amostras do grupo de ar quente. Além disso, a diferença entre os erros de predição (RMSEP) e calibração (RMSEC) nas amostras de micro-ondas foi maior porque tem um conjunto de amostras menor, o que pode diminuir a aleatoriedade da escolha da amostra dentro do conjunto de calibração e do conjunto de teste.

O valor do erro médio representa aproximadamente um terço da concentração média de carotenoides por espectroscopia visível. Apesar disso, os altos valores são comparáveis com outros estudos recentes que quantificam carotenoides em cenouras usando espectroscopia Raman (KRÄHMER *et al.*, 2016) e (KILLEEN *et al.*, 2013). O estudo feito por Killeen *et al.* (2013) apresentou resultados comparáveis para os carotenoides ($R^2 = 0,85$) aos obtidos nesse trabalho. Uma razão para os altos erros e coeficientes de determinação não apropriados pode ser a natureza heterogênea da amostra. Além disso, uma boa correlação foi obtida por Krähmer *et al.* (2016) para α -caroteno ($R^2 = 0,97$) e β -caroteno ($R^2 = 0,96$) usando apenas duas variáveis latentes no modelo. De acordo com BARANSKA; SCHÜTZE; SCHULZ (2006), cujo estudo foi a determinação do conteúdo de licopeno e β -caroteno em tomate, o modelo de calibração para a predição do teor de carotenoides não melhorou quando apenas bandas de carotenoides específicas foram escolhidas para o modelo PLS.

Conclusões

Neste trabalho, os carotenoides presentes na batata-doce de polpa alaranjada foram facilmente detectados pela espectroscopia Raman. Três picos característicos principais de carotenoides foram obtidos para todas as amostras em diferentes estágios de secagem. Além disso, a metodologia proposta com TiO_2 como padrão interno permitiu a correlação entre o perfil de concentração dos carotenoides com os dados espectrais obtidos pela espectroscopia Raman. A variabilidade da amostra foi comprovada com PCA mostrando diferentes aglomerados em relação às amostras de secagem em micro-ondas, no entanto, a separação do grupo não foi satisfatória para amostras de secagem por ar quente. Dos resultados apresentados, os dois tipos de secagem mostraram degradação de cerca de 50% do teor inicial de carotenoides. Conclui-se que a espectroscopia Raman em conjunto com quimiometria ou com o método com padrão interno apresenta potencial para a quantificação de determinadas moléculas em tempo real, no entanto resultados satisfatórios dependem da natureza da amostra.

Também não se pode esquecer a contribuição que o método analítico proposto neste trabalho fez para a química verde, uma vez que difere da cromatografia líquida ou métodos convencionais que geralmente necessita do consumo de grandes quantidades de solventes perigosos e não recicláveis. Nesse contexto da química verde, pode-se listar como métricas favoráveis em relação aos métodos convencionais: o tempo de análise até 5 vezes menor que em métodos convencionais e, conseqüentemente o aumento da frequência de análises no mesmo espaço de tempo, a massa de amostra necessária que pode ser inferior a 1 grama, o baixo número de etapas do procedimento que reduz as possibilidades de erro experimental e, por fim, a maior segurança de operação do método, por não trabalhar com produtos que exponham o técnico ao risco. Contudo, como fator negativo, passível de melhoria, o reaproveitamento do dióxido de titânio utilizado nas amostras não foi possível.

Referências

- ABBAS, O.; DARDENNE, P.; BAETEN, V. Near-Infrared, Mid-Infrared, and Raman Spectroscopy. [s.l.] Elsevier Inc., 2012.
- AHLINDER, L. Raman Spectroscopy and Hyperspectral Analysis of Living Cells Exposed to Nanoparticles. [s.l.] Uppsala University, 2015.
- BARANSKA, M.; SCHÜTZE, W.; SCHULZ, H. Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 24, p. 8456–8461, 2006.
- BOYACI, I. H. *et al.* Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis. *RSC Adv.*, v. 5, n. 70, p. 56606–56624, 2015.
- BRACKMANN, C. *et al.* Visualization of β -carotene and starch granules in plant cells using CARS and SHG microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 42, n. 4, p. 586–592, 2011.
- BURRI, B. J. Evaluating Sweet Potato as an Intervention Food to Prevent Vitamin A Deficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, n. 2, p. 118–130, mar. 2011.
- CASTREJÓN-SÁNCHEZ, V. H.; CAMPS, E.; CAMACHO-LÓPEZ, M. Quantification of phase content in TiO₂ thin films by Raman spectroscopy. *Superficies y Vacío*, v. 27, n. 3, p. 88–92, 2014.
- CHANDLER, L. A.; SCHWARTZ, S. J. Isomerization and losses of trans-betacarotene in sweet potatoes as affected by processing treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, n. 1, p. 129–133, jan. 1988.
- CINTĂ PINZARU, S. *et al.* New SERS feature of β -carotene: Consequences for quantitative SERS analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, p. 597–604, 2015.
- DARVIN, M. E. *et al.* Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 38, n. 15, p. 2696–2700, 2005.
- FRATIANNI, A.; CINQUANTA, L.; PANFILI, G. Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 6, p. 867–871, 2010.
- GUL, K. *et al.* Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene - A review. *Cogent Food & Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2015.
- GUPTA, P.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, v. 11, n. 1, p. 5, 2015.
- HUO, M. M. *et al.* Effect of end groups on the raman spectra of lycopene and β -carotene under high pressure. *Molecules*, v. 16, n. 3, p. 1973–1980, 2011.

- KILLEEN, D. P. *et al.* Quantitative raman spectroscopy for the analysis of carrot bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 11, p. 2701–2708, 2013.
- KOYAMA, Y. *et al.* Raman and Infrared Spectroscopy of the All-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis Isomers of β -Carotene: Key Bands Distinguishing Stretched or Terminal-Bent Configurations from Central-Bent Configurations. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 19, p. 37–49, 1988.
- KRÄHMER, A. *et al.* Quantifying biochemical quality parameters in carrots (*Daucus carota* L .) – FT-Raman spectroscopy as efficient tool for rapid metabolite profiling. *Food Chemistry*, v. 212, p. 495–502, 2016.
- MARX, M. *et al.* Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chemistry*, v. 83, n. 4, p. 609–617, 2003.
- PROCHAZKA, M. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- PROVESI, J. G.; DIAS, C. O.; AMANTE, E. R. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*, v. 128, n. 1, p. 195–202, 2011.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Technical Monographs, p. 59, 2004.
- SCHULZ, H. Carotenoid Bioavailability from the Food Matrix. In: *Carotenoids*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 191–216.
- SEBBEN, J. A.; TRIERWEILER, L. F.; TRIERWEILER, J. O. Orange-Fleshed Sweet Potato Flour Obtained by Drying in Microwave and Hot Air. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 0, p. 1–8, 2016.
- SUBRAMANIAN, B. B *et al.* Investigations on the geometrical isomers of astaxanthin: Raman spectroscopy of conjugated polyene chain with electronic and mechanical confinement. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 45, n. 4, p. 299–304, 2014.
- TSCHIRNER, N. Raman spectroscopy of β -carotene and CdSe-based nanocrystals. *Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften*, v. Dr. rer. n, p. II, 109 S.: Ill., 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency. *WHO Iris*, p. 55, 2009.
- ZAKYNTHINOS, G.; VARZAKAS, T. Carotenoids: From Plants to Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science*, v. 4, n. 1, p. 38–51, 2016.

Capítulo 4 – Espectroscopia Raman no monitoramento do perfil de degradação dos carotenoides em polpas processadas de *Bunchosia glandulifera*

Resumo²: A espectroscopia Raman é uma técnica analítica rápida e não destrutiva que tem encontrado um crescente interesse na caracterização e quantificação de microconstituintes em alimentos. Neste trabalho, a espectroscopia Raman foi utilizada para avaliar o teor de carotenoides da *Bunchosia glandulifera* processada, uma fruta nativa da Mata Atlântica brasileira. As polpas de *B. glandulifera* foram secas em ar quente a 65 e 85 °C, resultando em degradação de carotenoides de aproximadamente 75 e 80%, respectivamente. O perfil de degradação dos carotenoides ao longo do tempo foi analisado por espectroscopia Raman, com e sem o uso de um padrão interno (TiO₂). A reprodutibilidade das análises foi avaliada por PCA de dados espectrais. A regressão PLS foi aplicada para modelar os carotenoides totais em *B. glandulifera*. Os modelos resultantes mostram que os dados Raman se correlacionam com o teor de carotenoides nas amostras, resultando em um coeficiente de determinação satisfatório para todos os conjuntos de amostras.

Palavras-chave: Carotenoides, Espectroscopia Raman, *Bunchosia glandulifera*, quimiometria.

² Resultados do Capítulo 4 foram publicados na revista Food Chemistry, Volume 294, Pages 565-571,2019.

Introdução

Os carotenoides são uma classe de pigmentos naturais amplamente distribuídos em vegetais e frutas (VARGAS-MURGA *et al.*, 2016). O interesse nos carotenoides aumentou consideravelmente devido a seus benefícios essenciais à saúde (MURILLO *et al.*, 2013). São microconstituintes lipossolúveis localizados em organelas chamadas cromoplastos (BRACKMANN *et al.*, 2011; SCHULZ, 2016) com funções importantes, propriedades antioxidantes e ações fisiológicas, como proteção contra o câncer, degeneração macular e doenças cardiovasculares. No entanto, a função mais conhecida desses fitoquímicos está relacionada à atividade da pró-vitamina A (SCHULZ, 2016; VARGAS-MURGA *et al.*, 2016; ZAKYNTHINOS; VARZAKAS, 2016). Assim, o crescente interesse nos carotenoides aumentou a busca por novas fontes naturais, incluindo muitos vegetais e frutas silvestres subutilizados que podem servir como portadores biológicos de fitoquímicos com propriedades nutricionais que geram benefícios para a saúde (DELGADO-PELAYO; GALLARDO-GUERRERO; HORNERO-MÉNDEZ, 2016). Nesse contexto, muitas frutas tropicais podem ser consideradas um reservatório de substâncias bioativas com um interesse particular devido a suas possíveis propriedades promotoras de saúde (MURILLO *et al.*, 2013).

A *Bunchosia glandulifera* (Jacq.) Kunth (Malpighiaceae), conhecida como falso guaraná, é uma pequena fruta vermelha nativa do norte da América do Sul, mas também é encontrada no sul do continente (ANDERSON, 2002b). Habitantes da região de Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil, consomem a polpa dessa fruta ou seus produtos processados nos formatos de geleia e suco. Sementes torradas também são consumidas de forma semelhante ao pó de guaraná (*Paullinia cupana*). A polpa de *B. glandulifera* possui alto teor de compostos fenólicos, carotenoides e cafeína. Além disso, a polpa é rica em flavonóides como rutina, quercetina e vitexina, sendo a rutina a mais abundante, ela é responsável por cerca de 56% do total de flavonoides presentes na polpa de *B. glandulifera* (ANDERSON, 2002a; CRODA *et al.*, 2017; MENEZES PEIXOTO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016).

Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrofotometria visível são os métodos usuais para a determinação de carotenoides (GUPTA; SREELAKSHMI; SHARMA, 2015), embora novas técnicas analíticas tenham sido estudadas. Entre as técnicas mais modernas está a espectroscopia Raman, que é uma tecnologia analítica *in situ* e rápida, que fornece múltiplas análises, informações moleculares químicas e estruturais com requisitos mínimos para preparação de amostras (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012; BOYACI *et al.*, 2015; PROCHAZKA, 2016). Entre as principais aplicações da espectroscopia Raman na ciência de alimentos estão a identificação da origem e a caracterização de óleos vegetais, açúcares e alguns compostos bioativos, como os carotenoides (CHEN *et al.*, 2006). Além dessas vantagens, o método permite identificar espécies, conteúdo e distribuição de carotenoides em um sistema biológico (HUO *et al.*, 2011). Neste contexto, a espectroscopia Raman também está começando a se aplicar na quantificação de carotenoides em matrizes vegetais, como cenoura (KILLEEN *et al.*, 2013) e batata-doce de polpa alaranjada (SEBBEN *et al.*, 2018). Adicionalmente, as variações na composição de frutos de tomateiro em diferentes estágios de maturação foram monitoradas por espectroscopia Raman (TREBOLAZABALA *et al.*, 2017).

A identificação de carotenoides em sistemas biológicos tem sido estudada através da análise das principais bandas características Raman, caracterizada por picos intensos entre 1160 e 1525 cm^{-1} (DARVIN *et al.*, 2005). Tanto o licopeno como o β -caroteno, pigmentos da classe dos carotenoides, são detectados simultaneamente na espectroscopia Raman. Outro exemplo de análise altamente reprodutível por meio do retroespalhamento Raman ocorre na determinação de carotenoides presentes na pele humana (HATA *et al.*, 2000).

Para contribuir na determinação de carotenoides em amostras de alimentos, o presente trabalho objetivou avaliar a espectroscopia Raman como método analítico para caracterização e quantificação de carotenoides, utilizando a polpa de *B. glandulifera* como amostra. As correlações entre os resultados espectrais e o método de partição de extração convencional são apresentados. Além disso, ferramentas quimiométricas, como a análise de componentes principais, são aplicadas para classificação de amostras por temperatura e tempo de secagem. Já a abordagem quantitativa é avaliada por regressão de mínimos quadrados parciais.

Materiais e Métodos

4.1 Amostras

Os frutos de *Bunchosia glandulifera* foram coletados na cidade de Santo Antônio da Patrulha, RS. A polpa utilizada neste trabalho foi obtida manualmente, descascando e removendo as sementes dos frutos de *B. glandulifera*. Depois disso, a polpa foi armazenada sob condições de congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) para conservação. A degradação térmica controlada dos carotenoides foi realizada pela secagem da polpa da fruta em forno de circulação de ar, modelo Quimis RT, Brasil. O processo de secagem ocorreu à velocidade do ar de 2 metros por segundo, temperaturas de 65 e 85 $^{\circ}\text{C}$ durante 10, 20, 30, 100, 220, 280 e 400 minutos. Este estudo foi baseado em estudos de cinética de degradação, como o realizado por Blank; Bellaver; Fraga (2018).

4.2 Quantificação de carotenoides por espectrometria na região do visível

A quantificação dos carotenoides foi realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente no Capítulo 3 utilizando um protocolo proposto por Rodriguez-Amaya; Kimura (2004). Os reagentes utilizados para as duas obras foram acetona (Neon), éter de petróleo (Synth), celite (Dinâmica), sulfato de sódio anidro (Dinâmica) e água destilada. Resumidamente, o procedimento consistiu na extração de acetona de carotenoides de amostras de polpa de *B. glandulifera* maceradas, particionamento com éter de petróleo (PE) e medição da absorbância dos extratos da fase PE em um espectrofotômetro de feixe único UV-VIS (Halo SB-10, Dynamica Scientific Ltd.,UK). A absorbância foi utilizada para a determinação total de carotenoides, conforme a equação (4.1):

$$\text{Teor de carotenoides total} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{A \cdot V(\text{mL}) \cdot 10^3}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot \text{massa de amostra (g)}} \quad (4.1)$$

onde A é a absorbância, V é o volume do extrato total e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ é o coeficiente de absorção do β -caroteno no PE (2592) ou licopeno no PE (3450) (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA,

2004). Os extratos foram analisados em 450 e 470 nm para β -caroteno e licopeno, respectivamente. Os resultados para carotenoides totais foram corrigidos para a matéria seca e expressos em miligramas de carotenoides por 100 gramas de amostra em bases secas.

4.3 Análise Raman

Três conjuntos de amostras foram utilizados na análise Raman: um conjunto de amostras puras (secas a 85 ° C) e dois conjuntos de amostras preparadas com padrão interno, TiO₂ P.A (Dinâmica) (seco a 65 e 85 °C). O procedimento geral para preparação de amostras com padrão interno também foi descrito anteriormente no Capítulo 3. Resumidamente, as amostras foram maceradas com TiO₂ em pó (fase rutilo) numa proporção mássica de 1:1 para produzir uma pasta homogênea. Estas análises de espectroscopia Raman tomam aproximadamente um quinto do tempo requerido em comparação com o método de extração seguido por espectrofotometria visível.

A análise Raman foi realizada num espectrofotômetro iHR550 Raman (Horiba Jobin Yvon S.A.S., França) acoplado a um detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) e uma fonte de laser de 532 nm. O laser foi ajustado para 50 mW de potência e 50% de transmitância. A grade de difração de 1800 ranhuras/mm foi usada. Os dados espectrais foram adquiridos pelo pacote de software LabSpec 5 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., França) ajustado para registrar três acumulações com tempo de contagem de 10 segundos, entre 400 e 2000 cm⁻¹. Por fim, a reprodutibilidade foi estabelecida capturando seis espectros para cada amostra. Nesse caso, a objetiva do microscópio era movimentada delicadamente para a lateral, ajustado novamente o foco e efetuada a análise na amostra, em um local próximo ao anterior.

4.4 Análise de dados espectrais

O pré-processamento dos dados espectrais não foi realizado porque não houve melhora nos resultados. A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos dados espectrais de Raman para reduzir a dimensionalidade e extrair informações valiosas dos espectros. O software Unscrambler X (CAMO, Noruega) foi utilizado para o PCA. O principal objetivo desta análise é identificar as bandas espectrais que contêm as informações mais valiosas sobre o teor de carotenoides das amostras e verificar o potencial de agrupamento de amostras de acordo com o tempo de secagem.

A intensidade Raman relativa expressa como a área das bandas de deslocamento Raman em 1006, 1157 e 1520 cm⁻¹, característica dos carotenoides, foi utilizada para ajustar um modelo de concentração de carotenoides ao longo do tempo de secagem. Para modelar os carotenoides totais em amostras de *B. glandulifera* com base em seus espectros Raman, a regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS) foi aplicada. A descrição completa do método PLS foi publicada por Abdi (2010). Resumidamente, um conjunto aleatório contendo 60% dos dados foi usado para construir o modelo e os 40% restantes dos dados foram usados para testar esse modelo. A lógica para a escolha de variáveis latentes está nos resultados que, juntos, fornecem os maiores coeficientes calculados e preditivos de regressão linear, com os menores erros. As avaliações de PLS

foram realizadas usando o *Python 2.7* através do pacote de código aberto *scikit-learn* (PEDREGOSA; WEISS; BRUCHER, 2011).

Resultados e discussão

Os espectros Raman da polpa seca de *B. glandulifera* com TiO_2 , e na sua ausência, são mostrados na Figura 4.1. O sinal Raman do TiO_2 na fase rutilo aparece em 447 e 613 cm^{-1} (CASTREJÓN-SÁNCHEZ; CAMPS; CAMACHO-LÓPEZ, 2014) e não se sobrepõem aos picos característicos dos carotenoides (Figura 4.1-A e Figura 4.1-B). Para todos os espectros, os picos característicos dos carotenoides podem ser vistos entre 1005 e 1524 cm^{-1} na excitação de 532 nm (TSCHIRNER, 2012). O menor pico em aproximadamente 1006 cm^{-1} ocorre devido ao modo balanço da metila no plano. Já o alongamento simétrico em fase das ligações C=C e C-C do polieno são mostrados por bandas vibracionais proeminentes em aproximadamente 1520 e 1157 cm^{-1} , respectivamente (CINTĂ PINZARU *et al.*, 2015; HUO *et al.*, 2011; KILLEEN *et al.*, 2013; SEBBEN *et al.*, 2018).

Apesar de cada espectro representar a média de seis repetições, a tendência ascendente da linha de base, juntamente com o desvio Raman, para todos os espectros, pode estar associada ao forte sinal de fluorescência fornecido pela amostra quando interage com o laser. Segundo Camorani *et al.* (2014), os produtos do aquecimento afetam as características dos espectros Raman dos carotenoides, causando um deslocamento das frequências de vibrações para uma energia mais alta, aumento na linha de base espectral e intensidades de pico, bem como seu alargamento, provavelmente em relação à degradação térmica dos carotenoides mais longos e processo de isomerização. Embora a fluorescência atrapalhe a visualização de picos com baixa intensidade, este não foi um problema evidenciado neste trabalho, pois os picos característicos dos carotenoides e o padrão interno apresentam sinal relativamente forte. O teor de umidade, tamanho de partícula, volume da amostra iluminada pelo laser de excitação Raman foram alguns dos fatores não estabelecidos para cada amostra que podem influenciar a qualidade espectral (KIM; BYUN; LEE, 2017). Entretanto, o uso do padrão interno TiO_2 foi um fator avaliado e os resultados espectrais sugeriram vantagens em relação ao método de análise direta com amostras puras.

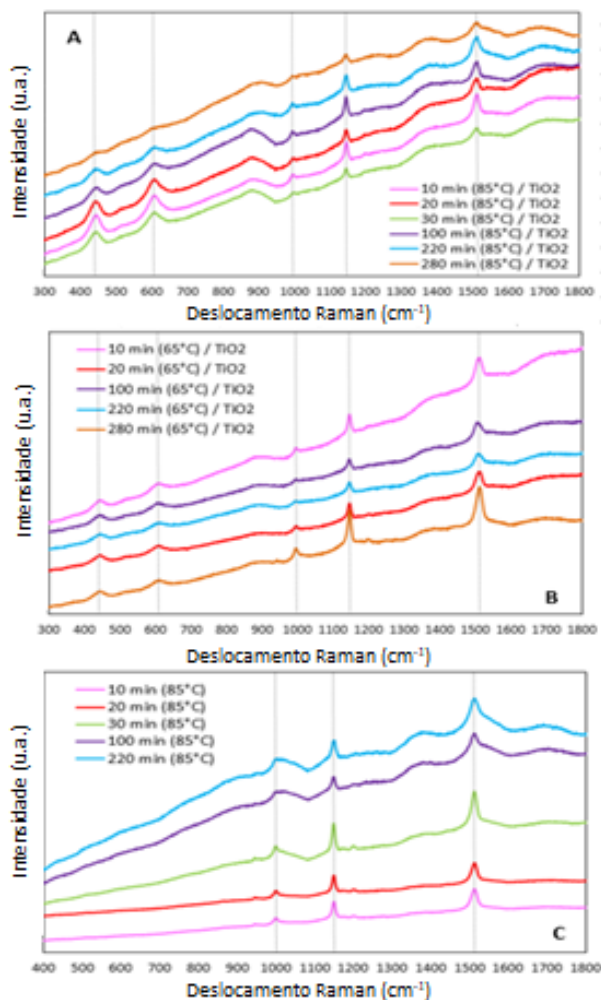


Figura 4.1: Espectro médio Raman para frutos de polpa de *B. glandulifera*: (A) mistura de polpa processada a 85 °C com TiO₂; (B) mistura de polpa processada a 65 °C com TiO₂ e polpa (C) processada a 85 °C pura (sem o uso de TiO₂).

Durante o processo de secagem, o teor de carotenoides foi gradualmente reduzido, como pode ser visto na Tabela 4.1. A polpa na natureza continha 155,17 miligramas de carotenoides por 100 gramas de polpa. Após 10 minutos de secagem, uma redução de 41% e 46% do conteúdo inicial de carotenoides foi verificada a 65 °C e 85 °C, respectivamente. Segundo Nóbrega *et al.* (2015), os tratamentos térmicos podem causar perdas no teor de carotenoides, sendo o tempo de processamento e a temperatura os fatores responsáveis por essa diminuição. Além disso, o aquecimento causa reações de escurecimento não enzimático, levando a perdas de carotenoides, açúcares e aminoácidos e formação de produtos da reação de Maillard (WANG *et al.*, 2006). A Tabela 4.1 também mostra a correspondência entre o teor de carotenoides e o teor de umidade em base seca. Neste caso, como esperado, a evaporação da água foi acelerada com a temperatura mais alta. Pode ser visto que em 220 min, a amostra seca a 85 °C tinha menos da metade da umidade que a amostra seca a 65 °C. Apesar disso, o conteúdo de carotenoides não difere notavelmente das amostras secas a 65 ou 85 °C.

Tabela 4.1: Carotenoides e conteúdo de umidade na polpa de *Bunchosia glandulifera* em diferentes tempos de secagem a 65 e 85 °C.

Tempo (min)	Teor de umidade (% b.s.)	Teor de carotenoides (mg/100g)
Temperatura de secagem: 65 °C		
10	137,14 ^a ±0,87	91,61 ^a ±2,91
20	112,77 ^d ±0,56	81,66 ^b ±3,22
30	103,58 ^d ±3,50	76,32 ^b ±0,43
100	40,59 ^b ±1,23	52,85 ^c ±0,31
220	20,66 ^c ±0,96	46,40 ^{cd} ±0,17
280	11,11 ^e ±0,54	43,72 ^{cd} ±0,19
400	10,38 ^e ±0,37	39,74 ^d ±0,25
Temperatura de secagem: 85 °C		
10	111,82 ^c ±2,15	84,47 ^b ±0,84
20	102,31 ^c ±1,70	80,30 ^b ±0,28
30	86,01 ^a ±1,34	70,27 ^a ±0,26
100	24,01 ^b ±1,58	44,24 ^c ±0,30
220	7,90 ^d ±0,92	43,09 ^{cd} ±3,11
280	4,56 ^{de} ±0,48	37,43 ^{de} ±0,04
400	2,53 ^f ±0,13	31,69 ^e ±0,07

Média ± desvio padrão. As médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O perfil de degradação de carotenoides durante a secagem a 85 °C medido por espectroscopia Raman diretamente em amostras puras de polpa de *B. glandulifera*, isto é, amostras em que não foi adicionado o padrão interno de dióxido de titânio, é mostrado na Figura 4.2. A intensidade relativa de Raman foi definida pela área correspondente dos três picos característicos de carotenoides, 1006, 1157 ou 1520 cm^{-1} , individualmente.

Como pode ser visto na Figura 4.2, uma correlação linear satisfatória (0,95 e 0,96) foi obtida ao serem comparadas as intensidades Raman relativas associada aos picos de 1006 e 1157 cm^{-1} , respectivamente, com o teor de carotenoides do método espectrofotométrico convencional. No entanto, tal ajuste não foi obtido para o último pico, a 1520 cm^{-1} , visto que o resultado do coeficiente de determinação foi 0,79. Esse resultado está possivelmente relacionado à dispersão da luz, que afeta não apenas a linha de base espectral de deslocamento Raman, mas também a intensidade dos picos, pois Segundo Camorani *et al.* (2014), a degradação dos carotenoides durante o tratamento térmico altera os dados espectrais Raman, ampliando a largura dos picos. Este alargamento pode ser visto na Figura 4.1c, para o terceiro pico (1520 cm^{-1}), nos tempos de secagem de 100 e 220 minutos. Nesse caso, ambos os efeitos combinados, dispersão de luz e alargamento dos picos, estão possivelmente relacionados aos resultados de correlação obtidos a 1520 cm^{-1} .

Apesar dos espectros Raman acompanharem o perfil de perdas no conteúdo de carotenoides, foram observados desvios médios elevados para os pontos até os 100 min (Figura 4.2). Estes altos desvios são normais nessa análise devido à dispersão de luz

proporcionada pela interação entre as moléculas distribuídas ao longo da superfície da amostra pura e do feixe de laser. Outra explicação sugerida é que as características de absorção óptica são muito diferentes em cada fruta ou vegetal, o que impede uma comparação direta dos níveis de carotenoides pela espectroscopia Raman, embora pareça razoável realizar tais comparações quantitativas em amostras dentro de uma mesma categoria particular de produtos agrícolas (BHOSALE *et al.*, 2004). Contudo, destaca-se que a homogeneização das amostras no seu preparo inicial foi cuidadosamente realizada, para tentar mitigar os erros que seriam gerados caso não fossem utilizadas as polpas de um conjunto de frutas misturadas.

Bhosale *et al.* (2004) também utilizou os valores de intensidade na banda espectral Raman em 1525 cm^{-1} para determinar o teor de carotenoides em tomates em diferentes estágios de maturação, validando com os resultados de cromatografia líquida. Os resultados foram semelhantes com o do presente trabalho, pois coeficientes de correlação linear de 0,96, 0,98 e 0,90 foram obtidos para amostras de tomates vermelhos completamente maduros, tomates parcialmente maduros e tomates verdes, respectivamente. Para o estudo de Bhosale *et al.* (2004), os autores suspeitam que a penetração deficiente do laser e a auto absorção da luz difundida Raman pelas concentrações extraordinariamente altas de licopeno e β -caroteno em tomates maduros intactos podem explicar as baixas respostas Raman em relação aos tomates verdes.

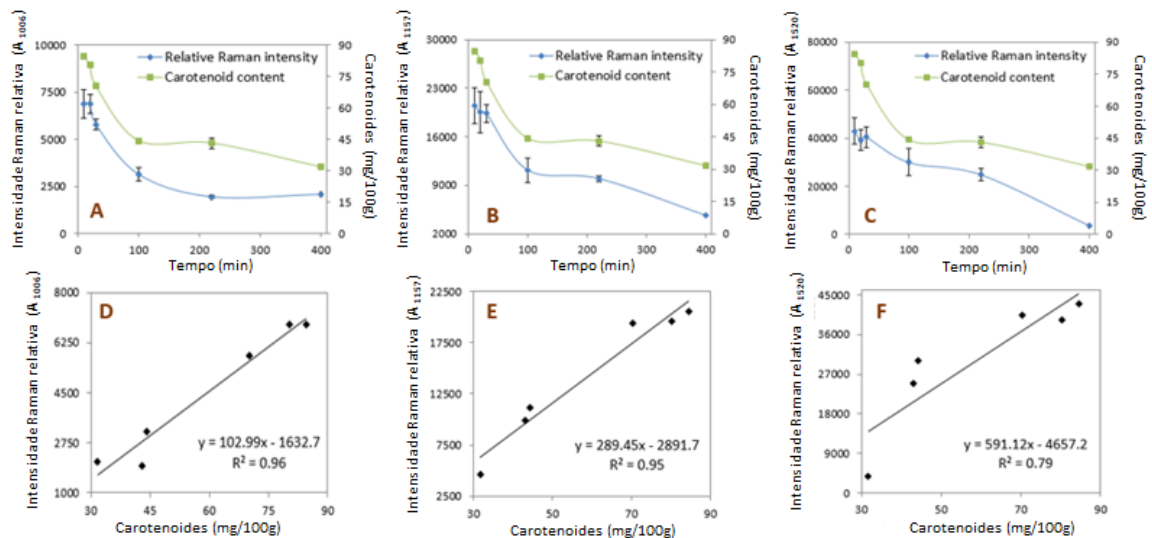


Figura 4.2: Teor de carotenoides em polpa pura de *B. glandulifera* seca com ar quente a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. (A) Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível (quadrado) ou pelo método da intensidade Raman relativa (losângo) em relação à área entre 1006, (B) 1157 e (C) 1520 cm^{-1} . (D) Correlação linear entre a intensidade Raman relativa em 1006, (E) 1157 e (F) 1520 cm^{-1} e o teor de carotenoides medido pelo método da espectrofotometria visível.

A Figura 4.3 mostra os resultados obtidos do perfil de concentração de carotenoides medido por espectrofotometria convencional e espectroscopia Raman. Nessa etapa, as

amostras foram analisadas na forma semissólida, as quais foram feitas misturando as amostras secas nas temperaturas de 85 e 65 °C com o TiO₂ em pó e algumas gotas de água destilada, de acordo com a metodologia proposta no Capítulo 3. Novamente, os desvios foram altos para a intensidade Raman relativa, especialmente para os pontos referentes a 65 °C e, mais especificamente, amostras secas por até 20 min (Figura 4.3). Além disso, ao comparar os resultados, percebe-se que a melhor correlação linear foi obtida para o valor médio das amostras secas a 65 °C, obtendo um R² igual 0,99. Para alcançar esse resultado foi realizada a remoção de um dos pontos, considerado um *outlier* (ponto que foge da normalidade), pois esse poderia comprometer a qualidade do ajuste.

De acordo com os valores de correlação linear mostrados na Figura 4.3, esta metodologia de análise com padrão de dióxido de titânio conduz a resultados que se opõem aos resultados obtidos para análise da amostra pura (sem adição do padrão interno). Enquanto os coeficientes de correlação para as amostras secas a 85 °C com o uso de TiO₂ foram menores (R² = 0,89 e R² = 0,83) para os picos respectivamente em 1006 e 1157 cm⁻¹, para as amostras puras eles foram melhores (R² = 0,96 e R² = 0,95) como mostra a Figura 4,2-D,E. O oposto ocorreu para o pico a 1520 cm⁻¹, onde a melhor correlação linear equivalente a 0,97 foi alcançada (Figura 4.3-F) diferentemente da pior correlação R² = 0,79 obtida com a amostra pura também a 85°C.

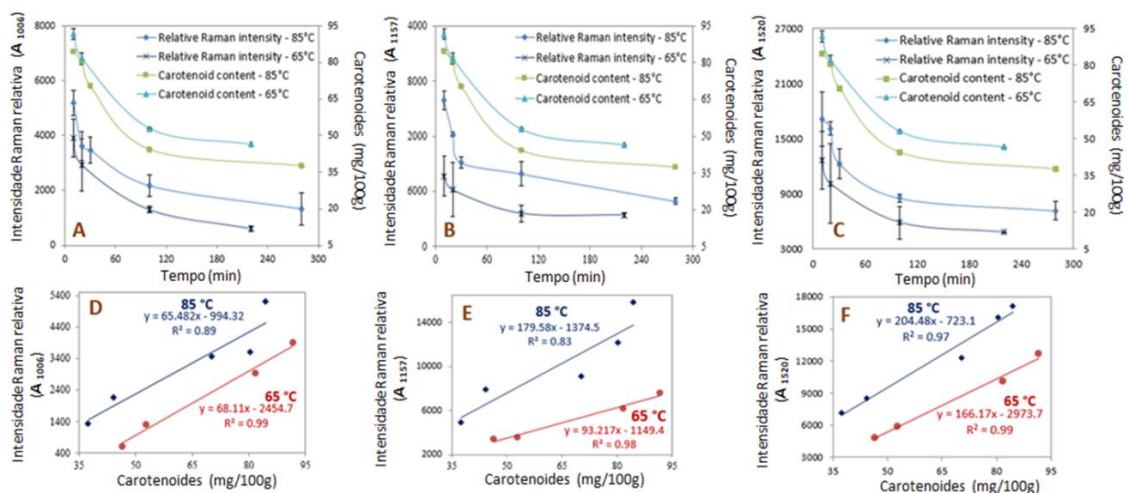


Figura 4.3: Teores de carotenoides na mistura contendo TiO₂ e polpa de *B. glandulifera* secas com ar quente a 85 e 65 °C. (A) Análise do teor de carotenoides pelo método da espectrofotometria visível ou pelo método da intensidade Raman relativa em relação à área entre 1006, (B) 1157 e (C) 1520 cm⁻¹. (D) Correlação linear entre a intensidade Raman relativa em 1006, (E) 1157 e (F) 1520 cm⁻¹ e o teor de carotenoides medido pelo método da espectrofotometria visível.

Para o PCA foi utilizada a faixa entre 900 e 1600 cm⁻¹. Como mostrado na Figura 4.4-A, os dois primeiros componentes principais PC1 e PC2 representam, respectivamente, a 99,82% e 0,16% da variabilidade nos espectros Raman de amostras secas a 85 °C. As amostras pelos Algarismos 1 a 6 são repetições espectrais da amostra seca durante 10 minutos. Já as amostras numeradas de 7 a 12 são as repetições da amostra seca por 20 minutos. Nos gráficos dos escores é possível observar que essas amostras estão na

mesma região formando aglomerados. Esse fato já era esperado, uma vez que essas amostras apresentam concentrações mais elevadas de carotenoides devido a sua fase inicial de secagem. Por outro lado, as repetições numeradas entre 25 e 30 estão bem separadas das demais, pois representam a amostra seca por 220 minutos, sendo o maior tempo de secagem e, conseqüentemente, a amostra com menor teor de carotenoides. Através dessa análise foi possível classificar as amostras, observando que elas são agrupadas de acordo com o tempo de secagem. Portanto, as replicatas das análises da amostra foram agrupadas no gráfico de PCA, demonstrando o potencial de reprodutibilidade das análises de acordo com o teor de carotenoides.

A PC1 é a componente que melhor explica a variabilidade dos dados. Como pode ser visto na Figura 4.4, o conteúdo de carotenoides tem relação direta com essa variável, pois há uma tendência de deslocamento para valores maiores de PC1 com a redução do teor de carotenoides. Os gráficos dos escores da análise de componentes principais também foram aplicados aos espectros Raman das amostras secas a 85 °C e 65 °C, homogêneas com TiO₂ (Fig. 4.4-B e Fig. 4.4-C, respectivamente). Para as amostras secas a 85 °C, os dois primeiros componentes principais representaram 99,86% da variabilidade explicada dos dados, enquanto para os secos a 65 °C, 98,93%. Ambos os conjuntos de amostras têm toda a variabilidade espectral explicada apenas pelos dois primeiros componentes do PCA. Comparando os resultados obtidos para as amostras secas a 85 °C, na presença (Fig. 4.4-B) e ausência de padrão interno (Fig. 4.4-A), verificou-se uma configuração de agrupamento mais ordenada das replicatas para essa última. Isto indica a potencialidade da técnica Raman para análise de amostras sem preparação adicional. A adição de partículas de dióxido de titânio resultou em maior dispersão de luz, o que causou uma perturbação do espectro, principalmente para números de onda elevados. Por esse motivo, a incorporação do padrão interno TiO₂ não foi adequada para essa análise na polpa de *Bunchosia glandulifera*. Esse resultado, contraria a metodologia proposta e apresentada no Capítulo 3 para a determinação de carotenoides utilizando como amostras batata-doce de polpa alaranjada.

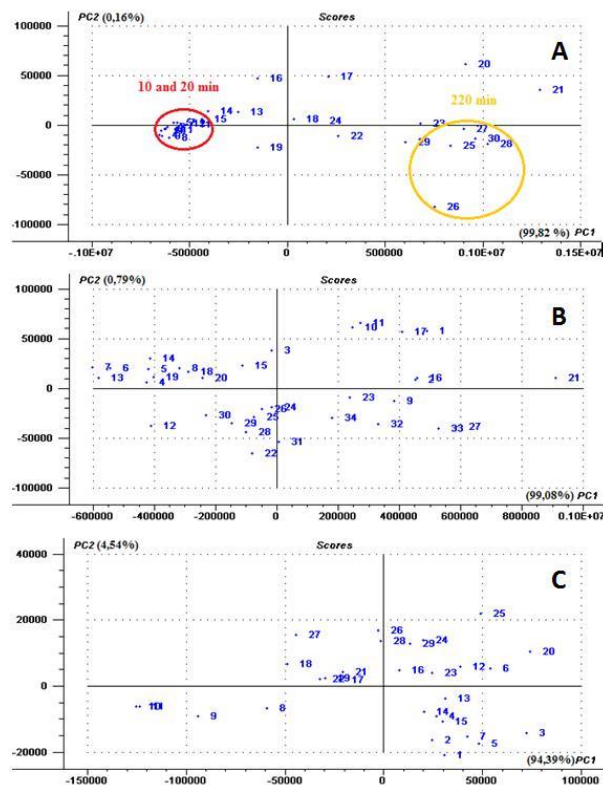


Figura 4.4: Gráfico de PCA. A) Amostra pura seca a 85 ° C durante 10 min (1-6), 20 min (7-12), 30 min (13-18), 100 min (19-24) e, 220 min (25-30). B) amostra com TiO₂ e seca a 85°C durante 10 min (1-6), 20 min (7-11), 30 min (12-17), 100 min (18-23), 220 min (24-27) e 280 min (28-34). C) amostra com TiO₂ e seca a 65 ° C durante 10 min (1-5), 20 min (6-11), 100 min (12-17), 220 min (18-23) e 280 min (24-29).

Os modelos de regressão PLS foram ajustados relacionando os espectros Raman centrados na média como variáveis X (todos os intervalos espectrais) e o teor de carotenoides como variáveis Y. O desempenho dos modelos resultantes foi resumido na Tabela 4.2. A exatidão da calibração e a precisão da previsão são descritas pelo R²Cal e R²Pred, respectivamente. O erro quadrático médio da calibração (RMSEC) e da previsão (RMSEP) também foram apresentados na Tabela 4.2, que apresenta os modelos para os 3 dados estudados até o momento: amostras secas a 85 ° C (puras e homogêneas com TiO₂) e amostras secas a 65 ° C homogêneas com TiO₂.

Como pode ser visto na Tabela 2, a qualidade da previsão para um modelo aleatório nem sempre aumenta com o número de variáveis latentes (LV) usadas no modelo. Por exemplo, nos resultados obtidos para o conjunto de dados de amostras puras, apenas 5 variáveis latentes foram necessárias para atingir o maior R²Pred (0,83 ± 0,03). Assumindo que um coeficiente de determinação de 0,96 ou superior é satisfatório para construir o modelo de calibração para carotenoides (BARANSKA; SCHÜTZTE; SCHULZ, 2006; KILLEEN *et al.*, 2013; KRÄHMER *et al.*, 2016; SEBEN *et al.*, 2018), é possível observar (Tabela 4.2) que este valor de R²Cal foi alcançado para todos os conjuntos de dados usando 4 a 6 variáveis latentes. No entanto, a média de erros para calibração e previsão de todas as amostras foi considerada alta, porque representa cerca de um terço da concentração média de carotenoides por espectroscopia visível (KRÄHMER *et al.*, 2016; KRIEG, 2014). Já a razão para o alcance do modelo mais preciso de previsão (0,83±0,03) ser da amostra

pura e seca a 85 °C, pode ser explicada pela semelhança das replicatas, que foi demonstrada pela formação de agrupamentos nos gráficos dos escores dos componentes principais.

Tabela 4.2: Desempenho do modelo quantitativo para mínimos quadrados parciais (PLS).

Amostras	LV	R ² _{Cal}	R ² _{Pred}	RMSEC [g(100) ⁻¹]	RMSEP [g(100) ⁻¹]	n
85 °C pura	4	0,90±0,03	0,79±0,03	23,06±0,5	24,74±0,67	30
	5	0,96±0,01	0,83±0,03	23,45±0,51	25,98±1,68	30
	6	0,99±0,01	0,78±0,08	23,61±0,47	27,02±3,10	30
85 °C / TiO ₂	4	0,88±0,01	0,64±0,10	25,41±1,06	24,64±0,48	34
	5	0,90±0,01	0,65±0,06	25,61±1,10	24,89±0,21	34
	6	0,96±0,01	0,72±0,05	25,97±1,02	24,71±0,69	34
65 °C / TiO ₂	4	0,96±0,01	0,58±0,21	28,12±0,51	25,06±1,87	29
	5	0,99±0,01	0,76±0,07	28,33±0,43	24,72±1,56	29
	6	0,99±0,01	0,70±0,10	28,39±0,44	24,86±1,59	29

Média ± desvio padrão.

Conclusões

Através deste estudo foi demonstrada a potencialidade da técnica Raman para a detecção e monitoramento do teor de carotenoides em amostras de *B. glandulifera*. Os resultados mostraram que a técnica pode ser usada para a determinação de carotenoides sem a necessidade de preparação de amostras ou uso de padrões internos, e existe correlação entre o teor desses pigmentos e a área dos seus três picos característicos no espectro Raman. Além disso, a análise do PCA indicou uma forte correlação da variância dos dados espectrais com o componente principal PC1. A partir dos gráficos de PCA, percebeu-se que a formação de aglomerados das amostras por tempos de secagem e, conseqüentemente, pela concentração de carotenoides, comprovou o potencial da técnica para o monitoramento desses compostos. Além disso, altos coeficientes de determinação foram obtidos comparando as áreas médias dos picos de caroteno e a concentração dessas moléculas nas amostras pela técnica convencional de extração. Portanto, a correlação entre as metodologias ocorreu. Pelo método de área de pico, a melhor correlação obtida para a amostra seca a 85 ° C e analisada sem a adição de qualquer elemento foi de 0,96 na frequência vibracional de 1006 cm⁻¹. Para as amostras homogeneizadas com o padrão interno, as melhores correlações foram 0,97 e 0,99 a 1520 cm⁻¹ para amostras secas a 85 °C e 65 °C, respectivamente. Em relação à regressão parcial de mínimos quadrados (PLS), para os três grupos de amostras, entre 4 e 5 variáveis latentes foram necessárias para construir um modelo com coeficientes de calibração satisfatórios. No entanto, os erros médios foram relativamente altos e os coeficientes de predição não atingiram os mesmos valores de calibração. As possíveis razões para isso são a natureza heterogênea da matriz vegetal, que pode interferir na qualidade do sinal espectral, e o fenômeno de luminescência que não é uniforme para todas as replicatas.

Referências

ABBAS, O.; DARDENNE, P.; BAETEN, V. *Near-Infrared, Mid-Infrared, and Raman*

Spectroscopy. [S.l.]: Elsevier Inc., 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00003-0>>.

ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, v. 2, n. 1, p. 97–106, 2010.

ANDERSON, W. R. *MALPIGHIACEAE (Malpighia Family)*. . [S.l.]: Memoirs of the New York Botanical Garden, 76, The New York Botanical Garden, New York, NY, USA. , 2002a

ANDERSON, W. R. OF THE NBWYORK BOTANICAL MALPIGHIACEAE (Malpighia Family). v. 76, 2002b.

BARANSKA, M.; SCHÜTZE, W.; SCHULZ, H. Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 24, p. 8456–8461, 2006.

BHOSALE, P. *et al.* Resonance Raman Quantification of Nutritionally Important Carotenoids in Fruits , Vegetables , and Their Juices in Comparison to High-Pressure Liquid Chromatography Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 3281–3285, 2004.

BLANK, D. E.; BELLAVER, M.; FRAGA, S. Drying kinetics and bioactive compounds of *Bunchosia glandulifera*. n. June 2017, 2018.

BOYACI, I. H. *et al.* Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis. *RSC Adv.*, v. 5, n. 70, p. 56606–56624, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA12463D>>.

BRACKMANN, C. *et al.* Visualization of β -carotene and starch granules in plant cells using CARS and SHG microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 42, n. 4, p. 586–592, 2011.

CAMORANI, P. *et al.* Raman spectroscopy application in frozen carrot cooked in different ways and the relationship with carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n. October, 2014.

CASTREJÓN-SÁNCHEZ, V. H.; CAMPS, E.; CAMACHO-LÓPEZ, M. Quantification of phase content in TiO₂ thin films by Raman spectroscopy. *Superficies y Vacío*, v. 27, n. 3, p. 88–92, 2014.

CHEN, Q. *et al.* Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy. *Microchemical Journal*, v. 83, n. 1, p. 42–47, 2006.

CINTĂ PINZARU, S. *et al.* New SERS feature of β -carotene: Consequences for quantitative SERS analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, p. 597–604, 2015.

CRODA, M. F. *et al.* Bioactive compounds in a mixed juice of *Euterpes edulis* and *Bunchosia glandulifera*. *Brazilian Journal os Food Technology*, v. 20, 2017.

DARVIN, M. E. *et al.* Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene

- and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 38, n. 15, p. 2696–2700, 2005. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0022-3727/38/i=15/a=023?key=crossref.da6bf2b1230b300f3d119056215c17f3>>.
- DELGADO-PELAYO, R.; GALLARDO-GUERRERO, L.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chemistry*, v. 199, p. 165–175, 2016.
- GUPTA, P.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, v. 11, n. 1, p. 5, 2015. Disponível em: <<http://www.plantmethods.com/content/11/1/5>>.
- HATA, T. R. *et al.* Non-Invasive Raman Spectroscopic Detection of Carotenoids in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 115, n. 3, p. 441–448, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00060.x>>.
- HUO, M. M. *et al.* Effect of end groups on the raman spectra of lycopene and β -carotene under high pressure. *Molecules*, v. 16, n. 3, p. 1973–1980, 2011.
- KILLEEN, D. P. *et al.* Quantitative Raman Spectroscopy for the Analysis of Carrot Bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 11, p. 2701–2708, 20 mar. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf3053669>>.
- KIM, S.; BYUN, K. M.; LEE, S. Y. Influence of water content on Raman spectroscopy characterization of skin sample. *Biomedical Optics Express*, v. 8, n. 2, p. 1130–1138, 2017.
- KRÄHMER, A. *et al.* Quantifying biochemical quality parameters in carrots (*Daucus carota* L.) – FT-Raman spectroscopy as efficient tool for rapid metabolite profiling. *Food Chemistry*, v. 212, p. 495–502, 2016.
- KRIEG, T. Real-time monitoring of continuous fermentation by Raman spectroscopy. n. September, p. 30, 2014. Disponível em: <[http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:753737/FULLTEXT01.pdf%5Cnhttp://files/798/2014_Krieg_Real-time monitoring of continuous fermentation by Raman spectroscopy.pdf](http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:753737/FULLTEXT01.pdf%5Cnhttp://files/798/2014_Krieg_Real-time%20monitoring%20of%20continuous%20fermentation%20by%20Raman%20spectroscopy.pdf)>.
- MENEZES PEIXOTO, C. R. DE *et al.* Voltammetric determination of total antioxidant capacity of *Bunchosia glandulifera* tree extracts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 799, n. July, p. 519–524, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.07.003>>.
- MURILLO, E. *et al.* Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry*, v. 140, n. 4, p. 825–836, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.014>>.
- NÓBREGA, E. M. *et al.* The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata*) residue. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 39, n. 2, p. 131–141,

2015.

PEDREGOSA, F.; WEISS, R.; BRUCHER, M. Scikit-learn : Machine Learning in Python. v. 12, p. 2825–2830, 2011.

PROCHAZKA, M. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Cham: Springer International Publishing, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-23992-7>>. (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering).

RODRIGUEZ-AMAYA, D. .; KIMURA, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. *HarvestPlus Technical Monographs*, p. 59, 2004.

SCHULZ, H. Carotenoid Bioavailability from the Food Matrix. *Carotenoids*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 191–216. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118622223.ch11>>.

SEBBEN, J. A. *et al.* Development of a quantitative approach using Raman spectroscopy for carotenoids determination in processed sweet potato. *Food Chemistry*, v. 245, p. 1224–1231, abr. 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617319052>>.

SILVA, S. DE F. *et al.* Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Bunchosia glandulifera*. *International Journal of Food Properties*, v. 19, n. 2, p. 467–473, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2015.1033547>>.

TREBOLAZABALA, J. *et al.* Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Portable Raman spectroscopy for an in-situ monitoring the ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 180, p. 138–143, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.03.024>>.

TSCHIRNER, N. Raman spectroscopy of b-carotene and CdSe-based nanocrystals. *Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften*, v. Dr. rer. n, p. II, 109 S.: III., 2012.

VARGAS-MURGA, L. *et al.* Fruits and vegetables in the Brazilian Household Budget Survey (2008-2009): Carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 50, p. 88–96, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.012>>.

WANG, H. Y. *et al.* Kinetic analysis of non-enzymatic browning in carrot juice concentrate during storage. *European Food Research and Technology*, v. 223, n. 2, p. 282–289, 2006.

ZAKYNTHINOS, G.; VARZAKAS, T. Carotenoids : From Plants to Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science*, v. 4, n. 1, p. 38–51, 2016.

Capítulo 5 – Avaliação de filtros de suavização em espectros Raman para a classificação de amostras fonte de carotenoides

Resumo: O uso da espectroscopia Raman no controle de qualidade e identificação de fraudes no setor agroalimentar está em franca expansão. No entanto, o sinal Raman costuma ser fraco e ruidoso, o que implica no uso de métodos matemáticos para melhorar a qualidade analítica dos resultados. Assim, um conjunto espectral de 115 amostras de fontes de carotenoides de 2 matrizes de plantas e 4 tipos de processamento térmico foi submetido à correção de linha de base, seguida por normalização padrão, suavização de filtro Savitzky-Golay (SG) e *filtfilt*. Na sequência, PCA, PLS-DA e SVM foram aplicados para avaliar o potencial de classificação das amostras. A partir dos resultados da 1ª derivada espectral, foi possível comprovar que o filtro digital *filtfilt* é eficaz na remoção do ruído, apresentando melhores resultados que o tradicional método SG. Quanto à classificação, o gráfico de PCA permitiu que as amostras fossem reconhecidas pela origem vegetal, distinguindo as amostras de *B. glandulifera* e batata-doce em dois grupos. Neste caso, a distinção das amostras pelo tratamento térmico ao qual foram submetidas no processamento, não foi eficiente. Por outro lado, a discriminação foi consistente para modelos de classificação supervisionados; pois tanto o PLS-DA quanto o SVM atingiram 90% de precisão para os modelos de calibração dos dados pré-processados com o filtro *filtfilt*. Esses resultados demonstram a vantagem da utilização de um filtro de suavização digital, ainda incomum em estudos de quimiometria, para a construção de modelos de classificação, corroborando com a proposta de inclusão e aprimoramento de outros tratamentos matemáticos para dados espectrais Raman.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, quimiometria, *filtfilt*, carotenoides, PLS-DA, PCA

Introdução

O sinal do espectro Raman dos carotenoides, resultante da análise em vegetais, é muito mais forte se comparado ao sinal de outros componentes bioquímicos da matriz vegetal. Assim, os espectros Raman desses componentes podem ser um excelente banco de dados para estudar a determinação de modelos de classificação. Porém, nessas análises de dados do espectro, a remoção do ruído espectral é muito importante, pois o processo de aquisição do espectro Raman é inevitavelmente perturbado por ruídos, de forma que a informação efetiva é enfraquecida ou mesmo abafada (MO *et al.*, 2018).

O ruído nos dados Raman se origina de quatro fontes principais: ruído de disparo, ruído de corrente escura, ruído de leitura e artefatos de raios cósmicos. O ruído de disparo é inerente a todos os sinais eletromagnéticos registrados e resulta da irradiação inconsistente de um pixel ao longo de períodos fixos consecutivos. O ruído da corrente escura resulta de efeitos térmicos na câmera. Já altos níveis dessa corrente resultam do resfriamento insuficiente da câmera ou dos longos tempos de aquisição. Outro ruído, o de leitura, é um ruído gaussiano distribuído independente do tempo adicionado pela câmera analógica para o conversor digital. Finalmente, os artefatos de raios cósmicos são pulsos de energia aleatórios que interagem com a câmera e geralmente se apresentam como intensas pontas estreitas (1 ou 2 píxeis) sobrepostas aos espectros (BARTON; WARD; HENNELLY, 2018). Portanto, tornar a remoção de ruído eficiente e confiável é uma necessidade em aplicações sensíveis, como classificação química ou diagnóstico. O ruído decidirá o limite de detecção do processo de registro, bem como o potencial de classificação da análise estatística multivariada que pode ser aplicada a um conjunto de dados registrado para fins de classificação (JESS *et al.*, 2007). Para melhorar a qualidade espectral, o pré-processamento dos dados é amplamente estudado para eliminar o ruído ou minimizar a variabilidade não relacionada à propriedade de interesse. O que permite que as mudanças possam ser modeladas de forma mais eficaz.

Vários métodos de pré-processamento espectral foram examinados individualmente ou em combinação. As derivadas estão entre os pré-tratamentos de sinal mais comuns aplicados aos dados espectrais. Elas são usadas principalmente para resolver a sobreposição de pico, melhorar a resolução, e eliminar o desvio da linha de base constante e linear entre as amostras. A primeira e a segunda derivada são mais comuns na prática do que as de ordem superior. Além disso, as derivadas espectrais podem ser calculadas pela obtenção das diferenças entre dois pontos consecutivos; pela suavização/diferenciação de uma distância de lacuna especificada; ou através de ajuste polinomial Savitzky-Golay (SAVITZKY; GOLAY, 1964). Algumas desvantagens comuns da aplicação de derivadas são o possível efeito contrário do desejado, aumentando o sinal do ruído, e a difícil interpretação espectral. Nesse caso, o filtro Savitzky-Golay (SG) é comumente usado para suavizar espectros a fim de reduzir o impacto do ruído na classificação estatística. Esta técnica de filtragem funciona ajustando dinamicamente um polinômio a janelas consecutivas de pontos de dados, isto é, ocorre a aproximação polinomial de mínimos quadrados locais para seguir a forma do espectro, mitigando assim o impacto de um sinal de ruído que varia aleatoriamente. Sob certas condições, isso pode prejudicar recursos espectrais; em particular, a aplicação em ruído elevado que requer altos níveis de suavização, o que pode afetar severamente características locais

nítidas (BARTON; WARD; HENNELLY, 2018). Como o objetivo deste trabalho é também aumentar as possibilidades de pré-processamento para uma melhor análise exploratória dos dados, será avaliada uma função matemática utilizada no processamento digital de sinais, mas raramente vista em trabalhos de espectroscopia. A função chamada *filtfilt* aplica um filtro digital linear duas vezes, uma vez para frente e outra para trás. O filtro combinado tem fases zero e uma ordem de filtro duas vezes maior que o original. Além disso, a função fornece opções para lidar com as bordas do sinal (JONES; OLIPHANT; PETERSON, 2001).

O uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos, que usa estatística multivariada para extrair informações de dados analíticos complexos, fornece ferramentas poderosas para métodos de regressão e reconhecimento de padrões, ajudando a identificar a classificação de alimentos (ESTEKI; SHAHSAVARI; SIMAL-GANDARA, 2018). A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma metodologia de análise exploratória usada para reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados. O PCA envolve o cálculo da decomposição do valor próprio da matriz de dados de covariância, geralmente após a centralização dos dados. O PCA também pode ser considerado como um processo de seleção do melhor sistema de coordenadas para projetar os dados (PORTARENA *et al.*, 2019). Por outro lado, um dendrograma é um tipo de gráfico de dados, em formato de árvore, obtido pela análise de agrupamento hierárquico (HCA), a qual organiza diferentes subcategorias de dados, que são subdivididas para atingir o nível de detalhe desejado. Os dendrogramas permitem que se examinem as relações de agrupamento entre os dados e as subdivisões sucessivas fornecem informações sobre os critérios de agrupamento (CALVO; MAGGIO; KAUFMAN, 2018). Além disso, ao contrário da maioria dos outros métodos de agrupamento, o agrupamento hierárquico não determina grupos únicos. Os relacionamentos entre os agrupamentos são essenciais ao estudar um grande conjunto de dados semelhantes (BAR-JOSEPH; GIFFORD; JAAKKOLA, 2001).

Em relação aos métodos supervisionados, a análise discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) é uma técnica clássica que combina as propriedades da regressão de mínimos quadrados parciais com o potencial de discriminação de uma técnica de classificação, a fim de aguçar a separação entre grupos de observações e entender quais variáveis carregam à classe informações de separação (BARKER; RAYENS, 2003). Essa técnica, assim como as máquinas de vetores de suporte (SVM), foram introduzidas como ferramentas quimiométricas para tarefas de classificação e regressão, identificação de materiais e discriminação de alimentos (DEVOS; DOWNEY; DUPONCHEL, 2014).

Neste trabalho, o filtro digital *filtfilt*, incomum na quimiometria, foi proposto para eliminar ou minimizar a variabilidade não relacionada à propriedade de interesse para a melhoria da qualidade espectral. Adicionalmente, este capítulo tem como objetivo investigar o poder de discriminação de uma abordagem multiespectroscópica em combinação com técnicas avançadas de avaliação de dados quimiométricos para a classificação de alimentos similares com conhecidos teores de carotenoides em sua matriz composicional.

Materiais e métodos

5..1 Amostras

Duas diferentes culturas vegetais ricas em carotenoides foram utilizadas como amostras experimentais. Polpas de *Bunchosia glandulifera*, provenientes do município de Santo Antônio da Patrulha - RS, Brasil e batata doce de polpa alaranjada (OFSP), adquirida no mercado público de Porto Alegre - RS, Brasil. As polpas de *B. glandulifera* analisadas foram previamente desidratadas com ar quente nas temperaturas de 65 e 85 °C conforme descrito no Capítulo 4. Por outro lado, o grupo de amostras de OFSP foi construído a partir de secagem por micro-ondas e por secagem convectiva com ar quente a 85 °C, conforme proposto no Capítulo 3.

5..2 Procedimento experimental

Os procedimentos gerais de preparação de amostras para análises Raman, como a quantificação de carotenoides por espectrofotometria no visível, foram detalhadamente descritos em nos Capítulos 3 e 4. A análise Raman foi realizada em um espectrômetro Raman iHR550 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., França) acoplado a um detector de dispositivo de acoplamento de carga resfriado (CCD) e uma fonte de laser 532 nm. A saída do laser foi ajustada para 50 mW de potência. O microscópio foi equipado com uma objetiva de 50 X. Foi utilizada a grade de difração de 1800 ranhuras/mm. Os dados espectrais foram adquiridos pelo pacote de software LabSpac 5 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., França) configurado para registrar três acumulações em um tempo de contagem de 10 segundos, entre 900 e 1600 cm^{-1} . A reprodutibilidade foi estabelecida capturando seis espectros para cada amostra de polpas de *B. glandulifera* e cinco espectros para cada amostra de OFSP.

5..3 Análise de dados

Inicialmente, os espectros de todas as amostras de *B. glandulifera* e OFSP foram compilados em um único conjunto de dados contendo 115 amostras. O tratamento inicial dos dados consistiu na correção da linha de base seguida pela transformação da variável normal padrão (SNV). Todo o espalhamento Raman foi substituído por seus valores normalizados, o que reduziu a influência das variáveis externas. Na sequência, três tarefas matemáticas foram estudadas para comparação entre elas. Na 1ª tarefa não foi aplicado qualquer procedimento de suavização, enquanto na 2ª e 3ª, sim. Para essas outras análises, o suavizador Savitzky-Golay de primeira ordem e o filtro digital *filtfilt* foram usados para minimizar problemas devido a mudanças de linha de base e para melhorar o sinal a partir da remoção de ruído. O *filtfilt* é a função que aplica um filtro linear digital duas vezes, uma para frente e outra para trás. O filtro combinado tem fase zero. Neste trabalho, diferentes frequências e ordens foram testadas, porém, apenas aquelas com os melhores resultados foram escolhidas. Portanto, um filtro *Lowpass Butterworth* com uma frequência de 100 Hz e oitava ordem foi criado e aplicado na matriz de dados.

Para a avaliação dessas matrizes de dados, principalmente para a comprovação da eficácia do *filtfilt*, foram realizados os seguintes testes estatísticos após o pré-processamento: PCA, HCA, PLS-DA e SVM. A análise de PCA, não supervisionada, foi

realizada para obter uma redução da dimensionalidade para verificar o potencial de agrupamento das amostras de acordo com as matrizes da planta e característica de processamento térmico. Em seguida, um modelo PLS-DA, supervisionado, foi construído correlacionando a matriz \mathbf{X} de variáveis independentes com um vetor \mathbf{y} de variáveis fictícias dependentes, o conjunto de dados foi dividido aleatoriamente em dois subconjuntos: treinamento (60% das amostras) e teste (40% de amostras). O vetor \mathbf{y} atribui os valores de 0, 1, 2 e 3, que podem ser interpretados como: (0) amostras de *B. glandulifera* secas a 85 ° C; (1) amostras de *B. glandulifera* secas a 65 ° C; (2) amostras de OFSP secas com ar quente e (3) amostras secas com micro-ondas. As métricas para avaliação dos modelos PLS-DA e SVM foram baseadas na matriz de confusão e a partir dela foram calculadas as figuras de mérito. Um esquema sequencial das tarefas quimiométricas utilizadas até alcançar as análises exploratórias para classificação é mostrado na Figura 5.1.

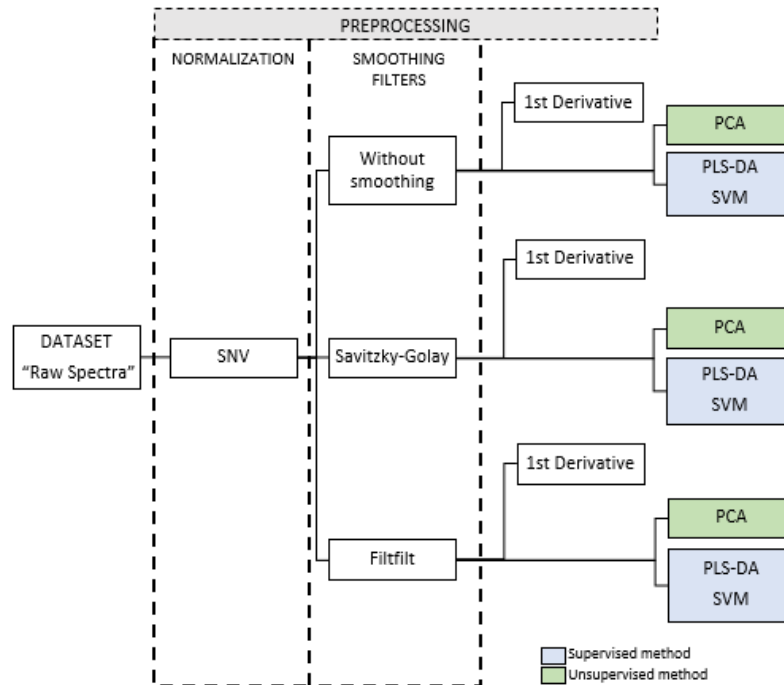


Figura 5.1: Fluxograma de tratamento de dados.

Para avaliar o desempenho da classificação do modelo desenvolvido, foram calculadas as métricas: acurácia, precisão, sensibilidade e o *F-score*. A acurácia representa a proporção de todas as amostras corretamente identificadas em relação ao total de amostras, ou seja, a exatidão ou alcance da meta. A precisão (também chamada de taxa de falsos positivos) carrega a probabilidade de que o modelo identifique incorretamente uma amostra negativa como uma amostra positiva, pois apesar de ela estar associada a menor dispersão dos dados, ela não garante a alcance do alvo. A sensibilidade é a métrica utilizada para indicar a relação entre as previsões positivas realizadas corretamente e todas as previsões que realmente são positivas. Por fim, o *F-score* é a média harmônica da precisão e sensibilidade. Esses parâmetros foram calculados conforme as equações (5.1) a (5.4):

$$Acurácia = \frac{TP + TN}{TP + FN + FP + FN} \tag{5.1}$$

$$Precisão = \frac{TP}{TP + FP} \quad (5.2)$$

$$Sensibilidade = \frac{TP}{TP + FN} \quad (5.3)$$

$$F - score = \frac{TP}{TP + \frac{1}{2}(FP + FN)} \quad (5.4)$$

onde verdadeiro positivo (TP), verdadeiro negativo (TN), falso positivo (FP) e falso-negativo (FN) representam os classificadores na matriz de confusão. Análises quimiométricas e tratamento de dados computacionais foram realizadas usando a biblioteca de código aberto *scikit-learn* e ferramentas *SciPy* (JONES; OLIPHANT; PETERSON, 2001) com linguagem de programação Python.

Resultados e discussão

Os espectros de espalhamento Raman obtidos mostram os três principais picos característicos das moléculas da classe dos carotenoides. O estiramento simétrico em fase de C=C e C-C da cadeia de polieno dos carotenoides é mostrado por faixas em torno de 1520 cm⁻¹ e 1157 cm⁻¹, respectivamente; além disso, o movimento de deformação angular no plano (balanço) do radical metil é indicado em torno de 1006 cm⁻¹ com intensidade mais fraca (CINTĂ PINZARU *et al.*, 2015; HUO *et al.*, 2011; KILLEEN *et al.*, 2013). No entanto, a qualidade dos espectros coletados é prejudicada pelo ruído intrínseco do sinal durante a operação do espectrômetro. A Figura 5.2 compara os espectros normalizados brutos (Figura 5.2-A) com os espectros gerados após aplicação de filtros de suavização. A melhoria do sinal espectral pelo filtro SG clássico (Figura 5.2-C) e o filtro digital sugerido (Figura 5.2-E) são confirmados a partir dos resultados obtidos com a primeira derivada.

Como pode ser visto na Figura 5.2, é possível visualizar o potencial do filtro *filtfilt* para a eliminação do ruído espectral. Além disso, foi perceptível que o filtro SG de primeira ordem, apesar de cumprir sua função, apresentou menor potencial de eliminação de ruído em comparação com o filtro *filtfilt*. A principal vantagem dos gráficos do perfil das derivadas está no discernimento visual das bandas características de deslocamento Raman pertinentes às moléculas de carotenoides. Porém, sem a aplicação dos filtros, isso não seria possível, como pode ser visto na Figura 5.2-B. Além disso, a banda de deslocamento Raman relacionada ao modo de rotação do metil, devido ao seu sinal mais fraco, foi melhor identificada usando a função *filtfilt*. Com essas informações claras, faz-se possível selecionar os comprimentos de onda ideais para uma possível construção de sensores ambientais para essa finalidade analítica.

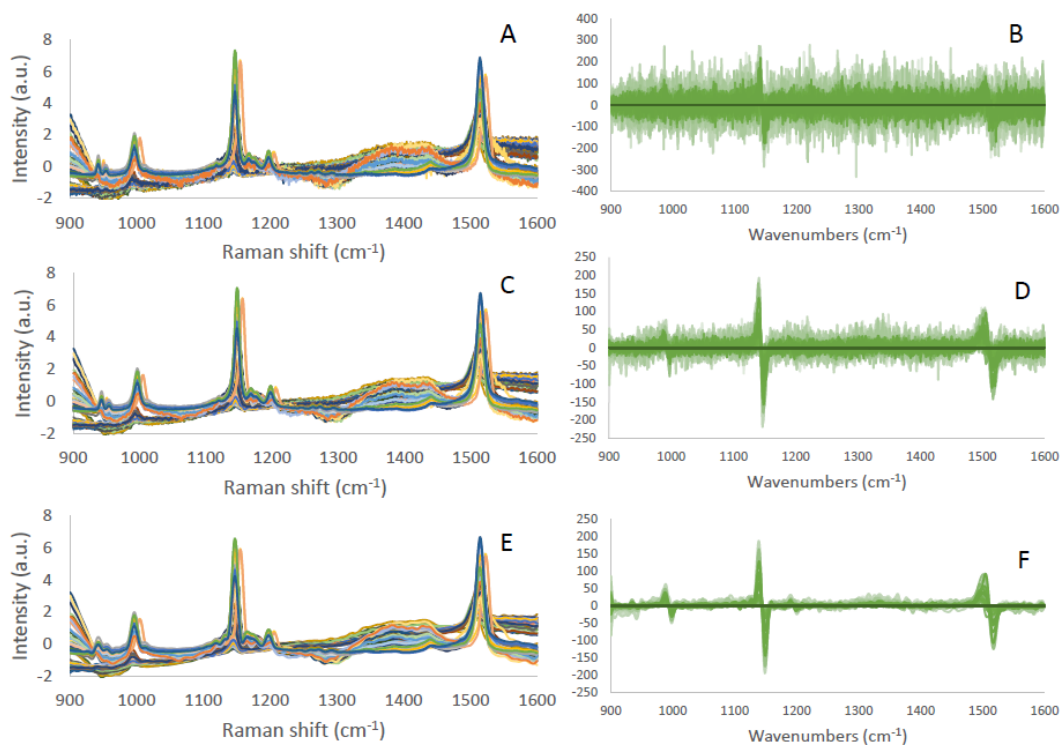


Figura 5.2: Espectros Raman de 115 amostras contendo carotenoides em sua matriz vegetal: espectros normalizados (A) e respectiva 1ª derivada (B); SG suavizado e seus espectros normalizados (C) e sua respectiva 1ª derivada (D); espectros *filtfilt* suavizados e normalizados (E) e sua respectiva 1ª derivada (F).

Inicialmente, a matriz de dados obtida a partir das intensidades Raman das amostras foi submetida a uma análise de componentes principais a fim de exploração dos dados. O PCA forneceu uma representação visual das relações entre variáveis e amostras, bem como informações sobre heterogeneidades delas. Conforme apresentado na Figura 5.3, as aplicações dos filtros de suavização não foram significativas para explicar a variabilidade do PCA, pois houve apenas alteração no valor do primeiro componente principal (PC1): sem filtro 83,8%, usando filtro SG 84,4% e filtro *filtfilt* 84,5%.

Em geral, o PC1 e o PC2 juntos foram responsáveis por cerca de 92% da variabilidade nos espectros Raman. Os escores plotados na Figura 5.3 ilustram a variância entre as medições agrupando quatro grupos de acordo com as características das amostras. Pode-se observar que as amostras de *B. glandulifera* e OFSP foram claramente diferenciadas entre si. O PC1 é o componente que melhor explica a variabilidade dos dados. Na escala negativa de PC1 estão os pontos relativos às amostras de *B. glandulifera*, enquanto as amostras de OFSP são representadas no lado positivo do primeiro componente. Esses resultados, que separaram duas matrizes vegetais distintas que geram espectros de alta intensidade e predominância de um mesmo sinal carotenoide, corroboram a ideia de utilizar o PCA como ferramenta de classificação para fontes de características semelhantes, mas de origens diferentes. Porém, as amostras diferenciadas apenas pelo processo térmico, submetido durante a secagem, não foram distinguidas de forma satisfatória. Como pode ser visto na Figura 5.3, a diferenciação entre essas amostras é bem representada ao longo do segundo componente, mesmo com pontos quase sobrepostos que impedem a formação de aglomerados totalmente isolados.

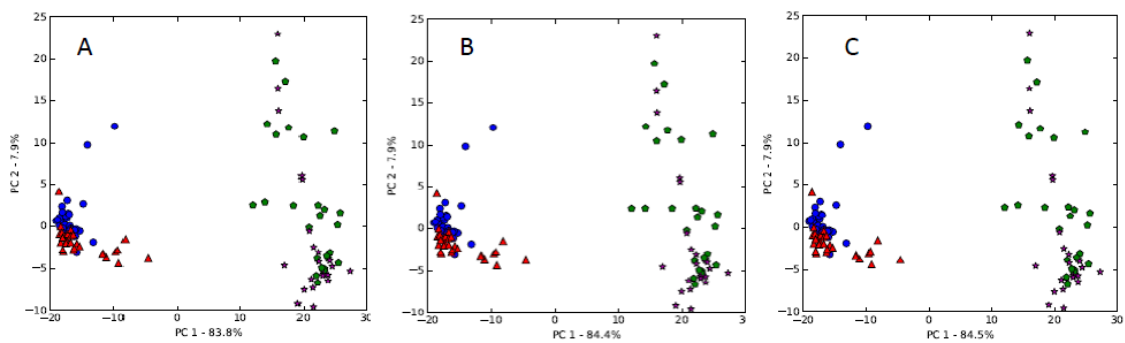


Figura 5.3: Gráficos bidimensionais dos pontos amostrais de *B. glandulifera* e OFSP no espaço das componentes principais para PC1 e PC2: amostras de *B. glandulifera* secas a 85 ° C (círculo azul) e secas a 65 ° C (triângulo vermelho); amostras de OFSP secas com ar quente (pentágono verde) e com micro-ondas (estrela roxa). Processamento de dados: sem tratamento (A), SG (B) e *filtfilt* (C).

Uma possível forma de discriminação entre essas amostras, considerando semelhanças entre a matriz vegetal e as condições de processamento, é sugerida pela análise de agrupamento hierárquico (HCA) mostrada na Figura 5.4. Com o dendrograma do HCA, é possível confirmar os resultados obtidos com PCA e visualizar claramente dois grandes *clusters* (agrupamentos). No diagrama de árvore, a distância entre os pontos de dados (amostras) representa as dissimilaridades, enquanto a altura dos blocos representa a distância entre os grupos. As linhas verdes representam as amostras que compõem o grupo da *B. glandulifera*, enquanto as linhas vermelhas são aquelas que compõem o grupo de OFSP. Observe que apenas um dendrograma será apresentado, porque todos os pré-processamentos de dados avaliados nesse estudo resultaram em árvores semelhantes, não sendo necessária a apresentação da totalidade dos resultados obtidos. Desse modo, o diagrama de árvore com os dados após a suavização com o filtro *filtfilt* é mostrado na Figura 5.4.

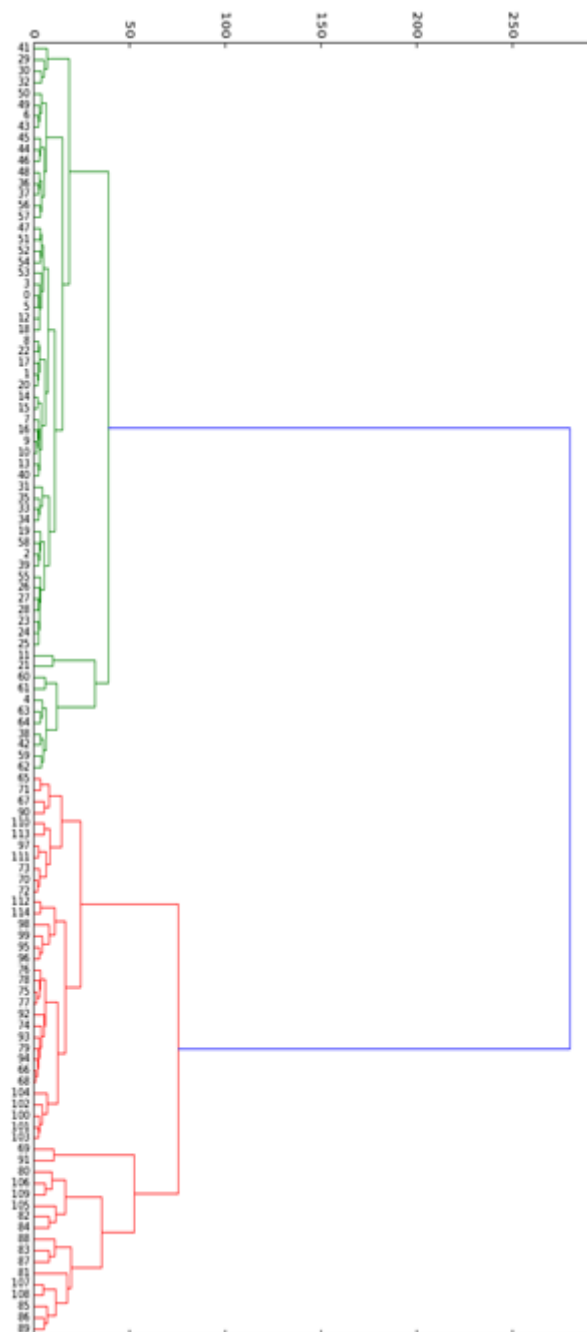


Figura 5.4: Análise de agrupamento hierárquico: linhas verdes à esquerda (agrupamento de *B. glandulifera*) e linhas vermelhas à direita (agrupamento de OFSP).

Na sequência será apresentado um modelo de classificação supervisionada PLS-DA. Para a construção desse modelo, as amostras espectrais de *B. glandulifera* secas a 85 e 65° C e OFSP secas com ar quente e com micro-ondas foram classificadas em quatro classes distintas: classe 0, classe 1, classe 2 e classe 3. Seguindo o objetivo desse trabalho, o modelo PLS-DA foi construído individualmente para a matriz de dados dos três pré-tratamentos propostos utilizando 5 variáveis latentes. Em geral, esses modelos forneceram padrões multivariados que discriminam as fontes naturais de amostras de carotenoides. Isso foi perceptível devido à separação de classes alcançada, que pode ser vista na Figura 5.5. Por conseguinte, afirma-se que a discriminação foi altamente

consistente tornando este método confiável para classificação de vegetais ricos em carotenoides.

Na Figura 5.5 os limites de uma classe são definidos como os extremos de uma unidade ao longo do eixo y e as amostras são identificadas na abscissa. Como pode ser visto na Figura 5.5-A, y prediz que as pontuações para a classe 1 do conjunto de teste estavam predominantemente fora ou em sobreposição aos limites superior e inferior de sua classe predefinida, o que inviabiliza o processo classificatório. Porém, percebe-se que esse comportamento foi suavemente ajustado com o uso de tratamentos matemáticos, como visto na Figura 5.5-B e Figura 5.5-C. Todavia, esses dois últimos modelos apresentaram um valor predito distante do limite superior da classe 2 do conjunto de treinamento, notoriamente na classe 3. Isso não havia ocorrido na abordagem sem tratamento.

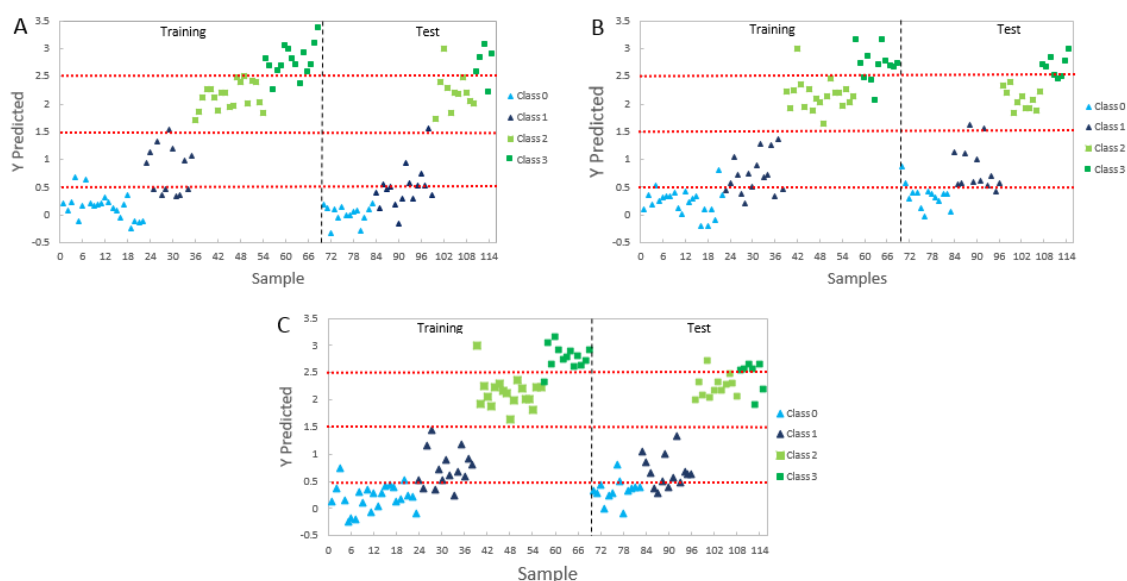


Figura 5.5: Gráfico de classificação aplicando quatro estratégias de classificação de classes de entrada no PLS-DA. Pré-processamento: (a) sem, (b) SG e (c) filtfilt. As linhas tracejadas horizontais indicam os limites e as linhas tracejadas verticais indicam a separação entre as amostras de treinamento e teste. Símbolos: os triângulos azul claro e azul escuro representam as amostras de *B. glandulifera* secas a 85 e 65 ° C, respectivamente; e, os quadrados verde claro e verde escuro representam as amostras de OFSP secas com ar quente e micro-ondas, respectivamente.

De qualquer forma, os gráficos de apresentação dos resultados obtidos pelo modelo PLS-DA são maneiras de identificação rápida e visual, para que de forma mais superficial possa se avaliar a ocorrência ou não da separação das amostras corretamente e, por consequência, seguir validando o método de classificação amostral. Nesse contexto, as análises estatísticas recomendadas foram realizadas e os resultados são apresentados na Tabela 5.1.

A Tabela 5.1 mostra métricas estatísticas como acurácia, precisão, sensibilidade e F-score para comparar os resultados entre o pré-processamento dos dados. A maior

precisão média de calibração alcançada para o modelo PLS-DA (90%) foi obtida ao aplicar o filtro digital *filtfilt*. Essa característica também foi observada para o modelo SVM-DA (não mostrado), que também alcançou 90% de precisão na calibração. Por outro lado, o modelo de validação PLS-DA também manteve índices satisfatórios acima de 80% para *filtfilt* e espectros suavizados por SG. No entanto, os melhores resultados de validação são obtidos ao aplicar o modelo SVM-DA. Su *et al.* (2019) também estabeleceram um modelo PLS-DA para classificar duas variedades de batata-doce, e a taxa de classificação correta chegou a 100%. No entanto, neste trabalho citado, os espectros foram obtidos por infravermelho próximo (NIR), considerada uma técnica com menor interferência de luz prejudicial em comparação à técnica Raman, o que justificaria o melhor resultado.

Tabela 5.1: Valores das métricas de desempenho de qualidade do classificador PLSDA e SVM para espectros Raman.

	calibração			validação		
	PLS-DA					
	--*	SG**	<i>Filtfilt</i> ***	--*	SG**	<i>Filtfilt</i> ***
Acurácia (%)	83	84	90	76	85	83
Precisão (%)	82	84	90	83	87	84
Sensibilidade (%)	83	84	90	76	85	83
F-score (%)	82	84	90	74	85	82
	SVM-DA					
Acurácia (%)	86	87	90	100	98	98
Precisão (%)	88	89	88	100	98	98
Sensibilidade (%)	86	87	88	100	98	98
F-score (%)	85	87	88	100	98	98

*sem aplicação de métodos de suavização

** modelo Savitzky-Golay de ordem 1

*** modelo com a aplicação da função *filtfilt*

Conclusões

Os carotenoides proporcionam um sinal Raman de intensidade muito forte em relação a outras classes de moléculas. E por isso, alguns espectros de diferentes matrizes vegetais, quando alocados todos no mesmo conjunto, poderiam ter um efeito de classificação ineficiente, devido à baixa similaridade dos espectros de carotenoides tanto por outras moléculas em bandas causando sobreposição quanto por baixa intensidade de sinal.

Neste trabalho, a utilização de dados após as derivadas matemáticas não foi necessária para fins de classificação da amostra; apenas para a avaliação do potencial do filtro de remoção de ruído proposto. Concluiu-se, portanto, que a aplicação do filtro digital da função *filtfilt* melhorou o sinal espectral, pois foi eficaz na remoção de ruído e, conseqüentemente, suavizou a linha. Além disso, neste trabalho foi possível mostrar como um método de suavização de sinal, por meio da remoção de ruído, atinge resultados positivos no processo de classificação de amostras.

O gráfico de PCA serviu parcialmente como ferramenta de classificação, pois não proporcionou a formação de quatro agrupamentos isolados, assim como o HCA que corroborou para distinguir apenas dois tipos de amostras: *B. glandulifera* e OFSP. No entanto, os métodos supervisionados foram mais eficientes na classificação das amostras por classes. Os modelos PLS-DA alcançaram 90% de acerto na melhor das situações, além de proporcionar uma nítida separação entre as quatro classes previstas.

De maneira global, este estudo contribuiu com resultados que ampliam a forma de trabalhar técnicas não convencionais de análise de alimentos. Pois não há dúvida de que a espectroscopia Raman abrirá perspectivas interessantes para sua futura aplicação em métodos de autenticação e controle de qualidade de alimentos.

Referências

BAR-JOSEPH, Z.; GIFFORD, D. K.; JAAKKOLA, T. S. Fast optimal leaf ordering for hierarchical clustering. *Bioinformatics*, v. 17, n. SUPPL. 1, 2001.

BARANSKA, M.; SCHÜTZE, W.; SCHULZ, H. Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 24, p. 8456–8461, 2006.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, v. 17, n. 3, p. 166–173, 2003.

BARTON, S. J.; WARD, T. E.; HENNELLY, B. M. Algorithm for optimal denoising of Raman spectra. *Analytical Methods*, v. 10, n. 30, p. 3759–3769, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8AY01089G>>.

BRACKMANN, C. *et al.* Visualization of β -carotene and starch granules in plant cells using CARS and SHG microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 42, n. 4, p. 586–592, 2011.

CALVO, N. L.; MAGGIO, R. M.; KAUFMAN, T. S. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 538–564, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.017>>.

CARVALHO, D. G. *et al.* Raman spectroscopy for monitoring carotenoids in processed *Bunchosia glandulifera* pulps. *Food Chemistry*, v. 294, n. December 2018, p. 565–571, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.120>>.

CINTĂ PINZARU, S. *et al.* New SERS feature of β -carotene: Consequences for quantitative SERS analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, p. 597–604, 2015.

DEVOS, O.; DOWNEY, G.; DUPONCHEL, L. Simultaneous data pre-processing and SVM classification model selection based on a parallel genetic algorithm applied to spectroscopic data of olive oils. *Food Chemistry*, v. 148, p. 124–130, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.020>>.

ESTEKI, M.; SHAHSAVARI, Z.; SIMAL-GANDARA, J. Use of spectroscopic methods in

combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. *Food Control*, v. 91, p. 100–112, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.031>>.

HARA, R. *et al.* Excitation wavelength selection for quantitative analysis of carotenoids in tomatoes using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 258, n. November 2017, p. 308–313, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.089>>.

HOEHSE, M. *et al.* Multivariate classification of pigments and inks using combined Raman spectroscopy and LIBS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 4, p. 1443–1450, 2012.

HUO, M. M. *et al.* Effect of end groups on the raman spectra of lycopene and β -carotene under high pressure. *Molecules*, v. 16, n. 3, p. 1973–1980, 2011.

JESS, P. R. T. *et al.* Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *International Journal of Cancer*, v. 121, n. 12, p. 2723–2728, 15 nov. 2007.

JIAO, X. *et al.* Rapid detection of adulterants in whey protein supplement by Raman spectroscopy combined with multivariate analysis. *Molecules*, v. 24, n. 10, 2019.

JONES, E.; OLIPHANT, T.; PETERSON, P. *SciPy: Open Source Scientific Tools for Python*. Disponível em: <<http://www.scipy.org>>.

KILLEEN, D. P. *et al.* Quantitative Raman Spectroscopy for the Analysis of Carrot Bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 11, p. 2701–2708, 20 mar. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf3053669>>.

KRÄHMER, A. *et al.* Quantifying biochemical quality parameters in carrots (*Daucus carota* L .) – FT-Raman spectroscopy as efficient tool for rapid metabolite profiling. *Food Chemistry*, v. 212, p. 495–502, 2016.

KUCHARSKA-AMBROŹEJ, K.; KARPINSKA, J. The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices. *Microchemical Journal*, 2019.

MAGWAZA, L. S.; OPARA, U. L. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products-A review. *Scientia Horticulturae*, v. 184, p. 179–192, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>>.

MO, J. *et al.* Raman spectroscopy denoising based on smoothing filter combined with EEMD algorithm. v. 1060704, n. February 2018, p. 5, 2018.

PORTARENA, S. *et al.* Cultivar discrimination, fatty acid profile and carotenoid characterization of monovarietal olive oils by Raman spectroscopy at a single glance. *Food Control*, v. 96, n. June 2018, p. 137–145, 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.011>>.

QIN, J. *et al.* Advances in Raman spectroscopy and imaging techniques for quality and safety inspection of horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*, v. 149, n.

July 2018, p. 101–117, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.004>>.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, v. 55, n. 3, p. 207–216, 2007.

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

SCHULZ, H. Carotenoid Bioavailability from the Food Matrix. *Carotenoids*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 191–216. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118622223.ch11>>.

SEBBEN, J. A. *et al.* Development of a quantitative approach using Raman spectroscopy for carotenoids determination in processed sweet potato. *Food Chemistry*, v. 245, n. August 2017, p. 1224–1231, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.086>>.

SU, W.; BAKALIS, S.; SUN, D. ScienceDirect Chemometrics in tandem with near infrared (NIR) hyperspectral imaging and Fourier transform mid infrared (FT-MIR) microspectroscopy for variety identification and cooking loss determination of sweet potato. *Biosystems Engineering*, v. 180, p. 70–86, 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2019.01.005>>.

ZAKYNTHINOS, G.; VARZAKAS, T. Carotenoids : From Plants to Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science*, v. 4, n. 1, p. 38–51, 2016.

Capítulo 6 – Considerações Finais

Conclusões

Os esforços necessários para a construção desse trabalho corresponderam aos objetivos inicialmente almejados e abriram caminhos para que novos estudos fossem realizados. No entanto, durante a execução de cada estudo que compõe os capítulos 3, 4 e 5, rotas metodológicas precisaram ser reajustadas a cada descoberta de uma limitação experimental. Inicialmente, os estudos teóricos das diversas aplicações da espectroscopia como um todo e, pontualmente da espectroscopia Raman, possibilitaram a comprovação dos resultados obtidos acerca das hipóteses sugeridas. Além disso, diversos trabalhos paralelos, que não estão contidos no corpo dessa tese, proporcionaram a ampliação de conhecimento sobre o tema, contribuindo para um amplo entendimento das possibilidades de aplicações dos equipamentos disponíveis nos laboratórios do DEQUI – UFRGS.

Os objetivos elencados foram respondidos da seguinte forma: (**objetivo 1**) a utilização do dióxido de titânio (TiO_2) na fase rutilo foi, sem dúvida, o principal diferencial para a aplicação de métodos semiquantitativos de amostras de origem vegetal. A proporção 1:1 entre TiO_2 em pó e a amostra de material vegetal foi a proporção ótima encontrada para que o padrão da mistura gerada proporcionasse espectros com detecção visual aceitável, tanto nas bandas principais do óxido, entre 400 e 700 cm^{-1} , quanto dos carotenoides, entre aproximadamente 980 e 1570 cm^{-1} . Aplicou-se o método de padrão interno com TiO_2 não só para as amostras de batata-doce de polpa alaranjada, mas também para as amostras de *Bunchosia glandulifera*, sendo perceptível, pelos espectros produzidos, que as amostras de batata-doce geraram resultados satisfatórios enquanto que para as amostra de *B. glandulifera* não se verificaram vantagens reais da aplicação desse método frente à análise com aplicação direta do *laser* sobre a amostra, sem que ela fosse submetida a qualquer tipo de pré-tratamento. Todavia, para essa última, os coeficientes de correlação entre a razão das áreas dos picos nos espectros e o teor de carotenos totais não foram inferiores a 83 %, alcançando valores em torno de 99 % para amostras secas a 65 °C. Já para as amostras de batata-doce, a maior correlação alcançada utilizando essa técnica foi de 90 % para as amostras processadas com circulação de ar quente (**objetivo 2**).

A partir dos escores plotados em um espaço-2D, a análise dos componentes principais (PCA) foi vista como uma ferramenta estatística que proporcionou uma série de debates e considerações a respeito da homogeneidade das amostras, da identificação de *outliers* (pontos totalmente fora do padrão desejado), do potencial de reprodutibilidade da técnica para amostras similares, ou até mesmo a necessidade de ampliar o número de repetições para cada ponto amostral. Tudo isso para os três trabalhos apresentados nesta tese. Não é de hoje que a análise gráfica tem papel significativo na interpretação de resultados, nesse sentido a transformação das multivariáveis de intensidade que compõem o espectro em componentes principais corroborou a formação de agrupamentos, isto é, “*clusters*” de cada ponto amostral, plotando-se as duas primeiras componentes principais. Isso ocorreu com significativa representação no trabalho desenvolvido no Capítulo 3. No Capítulo 4 foram apresentados os resultados obtidos por meio do *software* The Unscrambler, os quais foram comparados com aqueles gerados utilizando os códigos abertos na linguagem Python. Em suma, ambos os *softwares* forneceram os mesmos resultados (**objetivo 3**).

Vastamente utilizado como um método de análise quantitativa das técnicas de espectroscopia por infravermelho e Raman, regressões PLS foram bem aplicadas proporcionando modelos com excelentes coeficientes de calibração ($R^2=0,99$) utilizando até 6 variáveis latentes. Contudo, o coeficiente de predição $R^2=0,83$ foi o maior valor obtido para as amostras de *B. glandulifera*. Em ambos os Capítulos 3 e 4, foi avaliada a raiz quadrada dos erros médios de calibração e predição, os quais foram representativamente elevados. Apesar disso, esses valores, que apresentam potencial para serem reduzidos, não fugiram dos padrões encontrados na literatura para os modelos obtidos pela técnica Raman em amostras de origem vegetal ou animal, com moléculas não isoladas. Um ponto chave desse trabalho foi poder comparar duas formas de avaliar quantitativamente amostras com diferentes concentrações de carotenos totais com um conjunto de espectros Raman dessas amostras. Um modelo quimiométrico, como o PLS, mostrou-se eficaz perante a técnica de comparação entre razões entre áreas do método com padrão interno, por ser mais rápido, automático e randômico, necessitando de um esforço manual mínimo (**objetivo 4**).

Ponto comum de todos os trabalhos apresentados nos Capítulos 3 e 4, a secagem foi a operação unitária que delineou o estudo de monitoramento da degradação dos carotenoides das amostras estudadas, tanto para a batata-doce, quanto para a *B. glandulifera*. Com as atuais preocupações em segurança alimentar, vislumbra-se por produtos com maior tempo de prateleira e menor dependência da cadeia logística de transporte e armazenamento de refrigerados. Nesse contexto, estudar a influência de métodos de secagem na qualidade de um produto foi essencial. O Capítulo 3 comparou a degradação do teor de carotenos totais entre o tratamento térmico convectivo por ar quente e o aquecimento por micro-ondas com tambor rotativo. Em ambos os casos, a redução do valor inicial foi em torno de 50 %. No Capítulo 4, temperaturas diferentes (65 e 85 °C) de secagem convectiva foram comparadas e, como era de se esperar, a temperatura mais baixa (65 °C) foi a que menos favoreceu a degradação dos carotenoides.

Por fim, após a criação da metodologia analítica para o uso na análise instrumental Raman realizada no Capítulo 3, e novamente aplicada no Capítulo 4, constatou-se a necessidade de trabalhar mais minuciosamente o conjunto de dados espectrais coletados anteriormente, através de uma abordagem estritamente computacional.

Consequentemente, os resultados obtidos no Capítulo 5, corresponderam aos **objetivos 5 e 6** propostos. Pois foi perceptível a influência que filtros de suavização têm sobre a qualidade do sinal espectral, principalmente ao avaliar o gráfico da primeira derivada, onde os números de onda relevantes dos caratoneoides para o conjunto global de dados foram bem definidos. Além disso, a classificação supervisionada pelos métodos PLS-DA e SVM apresentaram acurácia de 90% na calibração. Nesse estudo, foi constatado que métodos de classificação não supervisionados, como o PCA e o HCA, demonstraram um potencial na tarefa de classificação das amostras inferior aos métodos supervisionados por classes (PLS-DA e SVM).

Capítulo 7 – Referências

ABBAS, O.; DARDENNE, P.; BAETEN, V. *Near-Infrared, Mid-Infrared, and Raman Spectroscopy*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00003-0>>.

ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, v. 2, n. 1, p. 97–106, 2010.

AGNIESZKA KACZOR, M. B. *Carotenoids : nutrition, analysis and technology*. [S.l.: s.n.], 2016.

AHLINDER, L. *Raman Spectroscopy and Hyperspectral Analysis of Living Cells Exposed to Nanoparticles*. [s.l.] Uppsala University, 2015.

ALMEIDA, M. R. *et al.* Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, n. 7, p. 2693–2701, 6 ago. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3566-2>>.

ANDERSON, W. R. *MALPIGHIACEAE (Malpighia Family)*. . [S.l.]: Memoirs of the New York Botanical Garden, 76, The New York Botanical Garden, New York, NY, USA. , 2002.

ARAÚJO, N. C. M. DE. Origens e evolução espacial da indústria de alimentos do Rio Grande do Sul. *PUC*, p. 83–111, 2004.

BAR-JOSEPH, Z.; GIFFORD, D. K.; JAAKKOLA, T. S. Fast optimal leaf ordering for hierarchical clustering. *Bioinformatics*, v. 17, n. SUPPL. 1, 2001.

BARANSKA, M. *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*. [S.l.]: Springer International Publishing, 2014.

BARANSKA, M.; SCHÜTZE, W.; SCHULZ, H. Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR

spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 24, p. 8456–8461, 2006.

BARCELLOS, J. O. J. *et al.* A bovinocultura de corte frente a agriculturização no sul do Brasil. 2004, Lages: [s.n.], 2004.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, v. 17, n. 3, p. 166–173, 2003.

BARONE, G. *et al.* A portable versus micro-Raman equipment comparison for gemmological purposes: The case of sapphires and their imitations. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 45, n. 11–12, p. 1309–1317, 2014.

BARTON, S. J.; WARD, T. E.; HENNELLY, B. M. Algorithm for optimal denoising of Raman spectra. *Analytical Methods*, v. 10, n. 30, p. 3759–3769, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8AY01089G>>.

BEGANOVIC, A. *et al.* Critical review on the utilization of handheld and portable Raman spectrometry in meat science. *Foods*, v. 8, n. 2, 2019.

BHOSALE, P. *et al.* Resonance Raman Quantification of Nutritionally Important Carotenoids in Fruits, Vegetables, and Their Juices in Comparison to High-Pressure Liquid Chromatography Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 3281–3285, 2004.

BLANK, D. E.; BELLAVER, M.; FRAGA, S. Drying kinetics and bioactive compounds of *Bunchosia glandulifera*. n. June 2017, 2018.

BOYACI, I. H. *et al.* Dispersive and FT-Raman spectroscopic methods in food analysis. *RSC Adv.*, v. 5, n. 70, p. 56606–56624, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA12463D>>.

BRACKMANN, C. *et al.* Visualization of β -carotene and starch granules in plant cells using CARS and SHG microscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 42, n. 4, p. 586–592, 2011.

BURRI, B. J. Evaluating Sweet Potato as an Intervention Food to Prevent Vitamin A Deficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, n. 2, p. 118–130, mar. 2011.

CALVO, N. L.; MAGGIO, R. M.; KAUFMAN, T. S. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 538–564, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.017>>.

CAMORANI, P. *et al.* Raman spectroscopy application in frozen carrot cooked in different ways and the relationship with carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n. October, 2014.

CARVALHO, D. G. *et al.* Raman spectroscopy for monitoring carotenoids in processed *Bunchosia glandulifera* pulps. *Food Chemistry*, v. 294, n. December 2018, p. 565–571, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.120>>.

CASTREJÓN-SÁNCHEZ, V. H.; CAMPS, E.; CAMACHO-LÓPEZ, M. Quantification of phase

content in TiO₂ thin films by Raman spectroscopy. *Superficies y Vacio*, v. 27, n. 3, p. 88–92, 2014.

CHALMERS, J.; EDWARDS, H.; HARGREAVES, M. *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. [S.l.: s.n.], 2012. Disponível em: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=CQiPliafQF8C&oi=fnd&pg=PR21&dq=Infrared+and+Raman+Spectroscopy+in+Forensic+Science&ots=GXY1pmxnyZ&sig=H1RofQ9Ka2gyouJbn_wqAg2xBMg%5Cnhttp://www.worldcat.org/oclc/775438798>.

CHANDLER, L. A.; SCHWARTZ, S. J. Isomerization and losses of trans- β -carotene in sweet potatoes as affected by processing treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, n. 1, p. 129–133, jan. 1988.

CHEN, Q. *et al.* Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy. *Microchemical Journal*, v. 83, n. 1, p. 42–47, 2006.

CHONG, C. K. *et al.* Development of NMR and Raman Spectroscopic Methods for the Determination of the Degree of Substitution of Maleate in Modified Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 6, p. 2702–2708, jun. 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0102160>>.

CINTĂ PINZARU, S. *et al.* New SERS feature of β -carotene: Consequences for quantitative SERS analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, p. 597–604, 2015.

COSTA, Tássia Brena Barroso Carneiro da. Metabonômica aplicada ao diagnóstico e estadiamento de doenças hepáticas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

CRODA, M. F. *et al.* Bioactive compounds in a mixed juice of *Euterpes edulis* and *Bunchosia glandulifera*. *Brazilian Journal os Food Technology*, v. 20, 2017.

CULKA, A.; JEHLIČKA, J.; EDWARDS, H. G. M. Acquisition of Raman spectra of amino acids using portable instruments: Outdoor measurements and comparison. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 77, n. 5, p. 978–983, 2010.

DARVIN, M. E. *et al.* Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 38, n. 15, p. 2696–2700, 2005. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0022-3727/38/i=15/a=023?key=crossref.da6bf2b1230b300f3d119056215c17f3>>.

DE LA CHAPELLE, M. L.; PUCCI, A. *Nanoantenna : plasmon-enhanced spectroscopies for biotechnological applications*. [S.l.]: CRC Press, 2013. v. 1.

DELFINO, I. *et al.* Visible micro-Raman spectroscopy for determining glucose content in beverage industry. *Food Chemistry*, v. 127, n. 2, p. 735–742, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.007>>.

DELGADO-PELAYO, R.; GALLARDO-GUERRERO, L.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chemistry*, v. 199, p. 165–175, 2016.

DEVOS, O.; DOWNEY, G.; DUPONCHEL, L. Simultaneous data pre-processing and SVM classification model selection based on a parallel genetic algorithm applied to spectroscopic data of olive oils. *Food Chemistry*, v. 148, p. 124–130, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.020>>.

DUPUY, N. Recognition of starches by Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, n. 1, p. 83–90, 1 jul. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861701003046>>.

EMBER, K. J. I. *et al.* Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *npj Regenerative Medicine*, v. 2, n. 1, p. 12, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41536-017-0014-3>>.

ESTEBAN, R. *et al.* Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany*, v. 119, p. 63–75, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.009>>.

ESTEKI, M.; SHAHSAVARI, Z.; SIMAL-GANDARA, J. Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. *Food Control*, v. 91, p. 100–112, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.031>>.

FAO/WHO. *Technical Meeting on the Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System in Small and/or Less Developed Businesses (SLDBs)*. . Rome: [s.n.], 2004.

FRATIANNI, A.; CINQUANTA, L.; PANFILI, G. Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 6, p. 867–871, 2010.

GALANAKIS, C. M. *Nutraceutical and Functional Food Components - Effects of Innovative Processing Techniques*. [S.l.]: Nikki Levy, 2017.

GUL, K. *et al.* Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene - A review. *Cogent Food & Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2015.

GUPTA, P.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, v. 11, n. 1, p. 5, 2015. Disponível em: <<http://www.plantmethods.com/content/11/1/5>>.

HARA, R. *et al.* Excitation wavelength selection for quantitative analysis of carotenoids in tomatoes using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 258, n. November 2017, p. 308–313, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.089>>.

HATA, T. R. *et al.* Non-Invasive Raman Spectroscopic Detection of Carotenoids in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 115, n. 3, p. 441–448, 2000. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00060.x>>.

HERRERO, A. M. Raman Spectroscopy for Monitoring Protein Structure in Muscle Food Systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 48, n. 6, p. 512–523, 28 maio 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701537385>>.

HOEHSE, M. *et al.* Multivariate classification of pigments and inks using combined Raman spectroscopy and LIBS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 4, p. 1443–1450, 2012.

HUO, M. M. *et al.* Effect of end groups on the raman spectra of lycopene and β -carotene under high pressure. *Molecules*, v. 16, n. 3, p. 1973–1980, 2011.

ILASLAN, K.; BOYACI, I. H.; TOPCU, A. Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy. *Food Control*, v. 48, p. 56–61, fev. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351400005X>>.

JÄÄSKELÄINEN, A.-S. *et al.* Endosperm and aleurone cell structure in barley and wheat as studied by optical and Raman microscopy. *Journal of Cereal Science*, v. 57, n. 3, p. 543–550, maio 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521013000398>>.

JESS, P. R. T. *et al.* Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *International Journal of Cancer*, v. 121, n. 12, p. 2723–2728, 15 nov. 2007.

JIAO, X. *et al.* Rapid detection of adulterants in whey protein supplement by Raman spectroscopy combined with multivariate analysis. *Molecules*, v. 24, n. 10, 2019.

JONES, E.; OLIPHANT, T.; PETERSON, P. *SciPy: Open Source Scientific Tools for Python*. Disponível em: <<http://www.scipy.org>>.

KILLEEN, D. P. *et al.* Quantitative raman spectroscopy for the analysis of carrot bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 11, p. 2701–2708, 2013.

KIM, S.; BYUN, K. M.; LEE, S. Y. Influence of water content on Raman spectroscopy characterization of skin sample. *Biomedical Optics Express*, v. 8, n. 2, p. 1130–1138, 2017.

KIRTI, K. *et al.* Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology*, v. 2014, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/archive/2014/837891/>>.

KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J. Rapid evaluation and discrimination of γ -irradiated carbohydrates using FT-Raman spectroscopy and canonical discriminant analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 87, n. 7, p. 1244–1251, maio 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2830>>.

KOYAMA, Y. et al. Raman and Infrared Spectroscopy of the All-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis Isomers of β -Carotene: Key Bands Distinguishing Stretched or Terminal-Bent Configurations from Central-Bent Configurations. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 19, p. 37–49, 1988.

KRÄHMER, A. et al. Quantifying biochemical quality parameters in carrots (*Daucus carota* L.) – FT-Raman spectroscopy as efficient tool for rapid metabolite profiling. *Food Chemistry*, v. 212, p. 495–502, 2016.

KRIEG, T. Real-time monitoring of continuous fermentation by Raman spectroscopy. n. September, p. 30, 2014. Disponível em: <[http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:753737/FULLTEXT01.pdf%5Cnhttp://files/798/2014_Krieg_Real-time monitoring of continuous fermentation by Raman spectroscopy.pdf](http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:753737/FULLTEXT01.pdf%5Cnhttp://files/798/2014_Krieg_Real-time%20monitoring%20of%20continuous%20fermentation%20by%20Raman%20spectroscopy.pdf)>.

KUCHARSKA-AMBROŹEJ, K.; KARPINSKA, J. The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices. *Microchemical Journal*, 2019.

LI, Z. et al. Raman Spectroscopy for In-Line Water Quality Monitoring — Instrumentation and Potential. *Sensors*, v. 14, p. 17275–17303, 2014.

LONG, D. A. *The Raman Effect*. [S.l.: s.n.], 2002. v. 8. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/0470845767>>.

LOUTFI, A. et al. Electronic noses for food quality: A review. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, v. 144, p. 103–111, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.019>>.

MAGWAZA, L. S.; OPARA, U. L. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products-A review. *Scientia Horticulturae*, v. 184, p. 179–192, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>>.

MARQUARDT, B. J.; WOLD, J. P. Raman analysis of fish: A potential method for rapid quality screening. *LWT - Food Science and Technology*, v. 37, n. 1, p. 1–8, 2004.

MARX, M. et al. Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chemistry*, v. 83, n. 4, p. 609–617, 2003.

MATOUSEK, P.; MORRIS, M. D. (Org.). *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02649-2>>. (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering).

MENDES, T. O. et al. Vibrational spectroscopy for milk fat quantification: line shape analysis of the Raman and infrared spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 47, n. 6, p. 692–698, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.4878>>.

MENEZES PEIXOTO, C. R. DE et al. Voltammetric determination of total antioxidant capacity of *Bunchosia glandulifera* tree extracts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 799, n. July, p. 519–524, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.07.003>>.

MIKKELSEN, M. S. *et al.* Molecular structure of large-scale extracted β -glucan from barley and oat: Identification of a significantly changed block structure in a high β -glucan barley mutant. *Food Chemistry*, v. 136, n. 1, p. 130–138, jan. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612012125>>.

MO, J. *et al.* Raman spectroscopy denoising based on smoothing filter combined with EEMD algorithm. v. 1060704, n. February 2018, p. 5, 2018.

MURILLO, E. *et al.* Native carotenoids composition of some tropical fruits. *Food Chemistry*, v. 140, n. 4, p. 825–836, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.014>>.

NAGARAJAN, J. *et al.* Carotenoids. *Nutraceutical and Functional Food Components*. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 259–296. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128052570000089>>.

NAVES, M. M. V. Beta - caroteno e câncer. *Revista de Nutrição*, v. 11, n. 2, p. 99–115, dez. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52731998000200001&lng=pt&tlng=pt>.

NÓBREGA, E. M. *et al.* The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata*) residue. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 39, n. 2, p. 131–141, 2015.

PARSON, W. W. *Modern Optical Spectroscopy*. [S.l.: s.n.], 2007. v. 1. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-37542-5>>.

PEDREGOSA, F.; WEISS, R.; BRUCHER, M. Scikit-learn : Machine Learning in Python. v. 12, p. 2825–2830, 2011.

POMERANTSEV, A. L. *Chemometrics in Excel*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2014.

PORTARENA, S. *et al.* Cultivar discrimination, fatty acid profile and carotenoid characterization of monovarietal olive oils by Raman spectroscopy at a single glance. *Food Control*, v. 96, n. June 2018, p. 137–145, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.011>>.

PROCHAZKA, M. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. Cham: Springer International Publishing, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-23992-7>>. (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering).

PROVESI, J. G.; DIAS, C. O.; AMANTE, E. R. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*, v. 128, n. 1, p. 195–202, 2011.

QIN, J. *et al.* Advances in Raman spectroscopy and imaging techniques for quality and safety inspection of horticultural products. *Postharvest Biology and Technology*, v. 149, n. July 2018, p. 101–117, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.004>>.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, v. 55, n. 3, p. 207–216, 2007.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science and Technology*, v. 17, n. 7, p. 344–353, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. .; KIMURA, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. *HarvestPlus Technical Monographs*, p. 59, 2004.

ROMAN, M. *et al.* Spectroscopic Studies on Bioactive Polyacetylenes and Other Plant Components in Wild Carrot Root. *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 8, p. 1757–1763, 26 ago. 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np200265d>>.

ROPER, M.-H. *et al.* Titanium Dioxide as Food Additive. *Application of Titanium Dioxide*. [S.l.]: InTech, 2017. . Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/application-of-titanium-dioxide/titanium-dioxide-as-food-additive>>.

ROSÁRIO, C.R. do; KIPPLER, L. M.; FERRÃO, M. F. Modelo para aplicação de análise multivariada através de técnicas estatísticas PCA e HCA sobre questionário de avaliação da satisfação de clientes: estudo de caso em uma empresa metalúrgica de embalagens metálicas. *Tecnológica*. Santa Cruz do Sul, v.16, n.1, pg 30-39, 2012.

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

SCHULZ, H. Carotenoid Bioavailability from the Food Matrix. *Carotenoids*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 191–216. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781118622223.ch11>>.

SCHUSTER, K. C.; URLAUB, E.; GAPES, J. R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *Journal of Microbiological Methods*, v. 42, n. 1, p. 29–38, set. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770120000169X>>.

SEBBEN, J. A.; TRIERWEILER, L. F.; TRIERWEILER, J. O. Orange-Fleshed Sweet Potato Flour Obtained by Drying in Microwave and Hot Air. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 0, p. 1–8, 2016.

SEBBEN, J. A. *et al.* Development of a quantitative approach using Raman spectroscopy for carotenoids determination in processed sweet potato. *Food Chemistry*, v. 245, p. 1224–1231, abr. 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617319052>>.

SINGH, A.; AHMAD, S.; AHMAD, A. Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. *RSC Advances*, v. 5, n. 77, p. 62358–62393, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA10243J>>.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6ª edição ed. [S.l.]: Bookman, 2009.

SILVA, S. DE F. *et al.* Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Bunchosia glandulifera*. *International Journal of Food Properties*, v. 19, n. 2, p. 467–473, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2015.1033547>>.

SOCRATES, G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies*. [S.l.: s.n.], 2004.

SU, W.; BAKALIS, S.; SUN, D. ScienceDirect Chemometrics in tandem with near infrared (NIR) hyperspectral imaging and Fourier transform mid infrared (FT-MIR) microspectroscopy for variety identification and cooking loss determination of sweet potato. *Biosystems Engineering*, v. 180, p. 70–86, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2019.01.005>>.

SUBRAMANIAN, B. B *et al.* Investigations on the geometrical isomers of astaxanthin: Raman spectroscopy of conjugated polyene chain with electronic and mechanical confinement. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 45, n. 4, p. 299–304, 2014.

TREBOLAZABALA, J. *et al.* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Portable Raman spectroscopy for an in-situ monitoring the ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 180, p. 138–143, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.03.024>>.

TSCHIRNER, N. Raman spectroscopy of b-carotene and CdSe-based nanocrystals. *Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften*, v. Dr. rer. n, p. II, 109 S.: Ill., 2012.

TSCHIRNER, N.; NATURWISSENSCHAFTEN, D. DER. Raman spectroscopy of β -carotene and CdSe-based nanocrystals. 2012.

VARGAS-MURGA, L. *et al.* Fruits and vegetables in the Brazilian Household Budget Survey (2008-2009): Carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 50, p. 88–96, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.012>>.

WANG, H. Y. *et al.* Kinetic analysis of non-enzymatic browning in carrot juice concentrate during storage. *European Food Research and Technology*, v. 223, n. 2, p. 282–289, 2006.

WANG, P. *et al.* Vibrational spectroscopic approaches for the quality evaluation and authentication of virgin olive oil. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 51, n. 10, p. 763–790, 2016.

WOLTHUIS, R. *et al.* Estimating the influence of experimental parameters on the prediction error of PLS calibration models based on Raman spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 37, n. 1–3, p. 447–466, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005 : WHO global database on vitamin A deficiency. WHO Iris, p. 55, 2009.

ZAKYNTHINOS, G.; VARZAKAS, T. Carotenoids : From Plants to Food Industry. *Current*

Research in Nutrition and Food Science, v. 4, n. 1, p. 38–51, 2016.

ZIEGEL, E. R. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. [S.l.: s.n.], 2004. v. 46.
Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1198/tech.2004.s248>>.