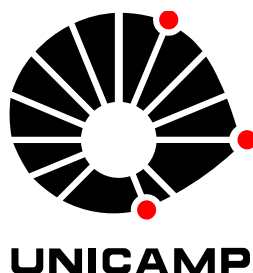


**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica**



**Análises de mel e própolis utilizando métodos Quimiométricos de
Classificação e Calibração**

Tese de Doutorado

Luiz Carlos Moutinho Pataca

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

**Campinas
Dezembro 2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

P27a	Pataca, Luiz Carlos Moutinho. Análises de mel e própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração / Luiz Carlos Moutinho Pataca. -- Campinas, SP: [s.n], 2006. Orientador: Ronei Jesus Poppi. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Quimiometria. 2. Mel. 3. Própolis. 4. <i>PLS</i>. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
------	--

Título em inglês: Própolis and honey analysis using calibration and clustering chemometric methods

Palavras-chaves em inglês: Chemometrics, Honey, Propolis, PLS (Partial Least Squares)

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (orientador), Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro, Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão, Profa. Dra. Solange Cadore, Profa. Dra. Susanne Rath

Data de defesa: 15/12/2006

*Àquele a quem sou
eternamente grato pela
confiança em mim depositada,
meu orientador, Ronei*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi pela orientação e oportunidade de execução deste trabalho e pela amizade que foi estabelecida durante nossa convivência.

A Prof. Dra. Maria Cristina Marcucci pela enorme ajuda, orientações e disponibilização dos recursos da Natural Labor sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Ildenize B. da Silva Cunha pelo fornecimento das amostras de própolis do Reconcavo Baiano e de abelha Jataí.

Agradeço ao Prof. Patrício Borges Maracajá da Escola Superior de Agricultura de Mossoró – RN pelas amostras de mel fornecidas provenientes do concurso do melhor mel ocorrido no congresso de apicultura de 2004 em Natal – RN.

Um agradecimento especial a pesquisadora Esther de Araújo Bastos da Fundação Ezequiel Dias pelo apoio e orientações fornecidas e ao Jorge Saffar do CETEC pela tradução do resumo.

Aos amigos do Laboratório de Quimiometria em Química Analítica – LAQQA. Pela ajuda nos momentos de dúvida e pelos trabalhos em conjunto realizados. Em especial ao Waldomiro, Marcelo Trevisan, Jez, Patrícia, PH, Gilmore, Alessandra, Danilo e Luciana que além da ajuda transformaram minha estada em Campinas em momentos muito felizes.

À Natural Labor Análises e Pesquisas LTDA pelo fornecimento de grande parte das amostras de própolis, pelo fornecimento das amostras de mel com os parâmetros de qualidade determinados e também pelo empréstimo do analisador de cor de mel.

À Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais pela execução das análises elementares na amostra de referência de própolis.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pela bolsa de doutorado concedida.

À Universidade Estadual de Campinas que forneceu muitos dos recursos humanos e materiais necessários a execução do projeto.

E a todos aqueles que de alguma forma ajudaram na elaboração deste trabalho.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica/Titulação

- 1994 – 1998 Mestrado em Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Título: Desenvolvimento e Aperfeiçoamento de Métodos de Extração de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Material Particulado em Suspensão no Ar Ambiente. Orientador: Zenilda de Lurdes Cardeal.
- 1982 – 1986 Graduação em Química. Departamento de Química, UFMG.

Atuação Profissional

- 1989 - 1989 Universidade Federal de Ouro Preto. Professor substituto.
- 1989 - Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. Pesquisador. Carga horária: 40.

Produção Científica/Tecnológica

- CARVALHO, C. R., PATACA, Luiz C. M., NUNES, H. M. T. Correlação entre poluentes atmosféricos, velocidade e direção dos ventos em Ouro Preto In: 8º Encontro Regional da SBQ, 1994, Belo Horizonte.
- PATACA, Luiz C. M., CARVALHO, C. R., CARDEAL, Z. L. Análise de aldeídos atmosféricos por CLAE: escolha do método de preparação das soluções de 21,4-dinitrofenilidrazina In: 9º Encontro Regional da SBQ, 1995, Juiz de Fora.
- PATACA, Luiz C. M., CARDEAL, Z. L. Determinação das condições de análise por CG dos 16 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos indicadores de poluição pela US-EPA e identificação dos mesmos por CG/EM In: 9º Encontro Regional da SBQ, 1995, Juiz de Fora.
- BARONCELLI, F., AFONSO, R. J. C. F., OLIVEIRA, L. S., PATACA, Luiz C. M. Avaliação da Potencialidade Carcinogênica das Partículas Inaláveis na Atmosfera da Região Central de Belo Horizonte. *Automação e Instrumentação Aplicadas ao Meio Ambiente/99*. Belo Horizonte: ISA, 1999. p.48 – 57.
- BORTOLETO, G. G., PATACA, Luiz C. M., HOEHR, N. F., BUENO, M. I. M. S. Método alternativo para determinação da razão Ca/P em urina de pacientes de hemodiálise utilizando fluorescência de raios X (FRX) In: 26ª Reunião Anual da SBQ, 2003, Poços de Caldas.
- AZEVEDO, M. W. D., CARVALHO, C. R., CARDOSO, J. A., PATACA, Luiz C. M., ROCHA, O. G. F., OLIVEIRA, I. M. F., MAGALHAES, W. F., FRANCA, L. R. G. A organização para o desenvolvimento da metrologia em química em Minas Gerais In: International Conference, Industrial Business and a Measuring Instruments Exhibition on Advanced Metrology, 2000, São Paulo.
- SOUZA, A. M., PATACA, Luiz C. M., BUENO, M. I. M. S. Otimização das condições para análise de pêlos de cães por fluorescência de raios X In: 26ª Reunião Anual da SBQ, 2003, Poços de Caldas.
- PATACA, Luiz C. M., ASHIDANI, L., GODA, S. T. T., MARCUCCI, M. C., BUENO, M. I.

- M. S. Determinação dos principais constituintes inorgânicos em méis por fluorescência de raios X In: 27ª Reunião Anual da SBQ, 2004, Salvador.
- LOPES, A., PATACA, Luiz C. M., BUENO, M. I. M. S. FRX na avaliação química elementar da qualidade do ar em área de lixão, usando filtro coletor de baixo custo In: 27ª Reunião Anual da SBQ, 2004, Salvador.
- PATACA, Luiz C. M., BORTOLETO, G. G., BUENO, M. I. M. S. Determinação de As em águas contaminadas usando EDXRF In: 12º ENQA, 2004, São Luís.
- BORTOLETO, G. G., BUENO, M. I. M. S., PATACA, Luiz C. M. A New Application of X-Ray Scattering - Classification of Oils In: IX Seminario Latinoamericano de Análises por Técnicas de Rayos X, 2004, Villa Giardino.
- SOUZA, A. M., CASTRO, M. T. P. O., PATACA, Luiz C. M., LOPES, A., BUENO, M. I. M. S. Biomonitoramento Ambiental e Alterações no Metabolismo Utilizando FRX e PCA como Método de Classificação Não Supervisionado Aplicado a Cães In: Terceira Escola de Verão em Quimiometria, 2004, Rio de Janeiro.
- PATACA, Luiz C. M., BORTOLETO, G. G., BUENO, M. I. M. S. Determinação de arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-x por energia dispersiva. *Química Nova*. São Paulo: , v.28, n.4, p.579 - 582, 2005.
- BORTOLETO, G. G., PATACA, Luiz C. M., BUENO, M. I. M. S. A new application of X-ray scattering using principal component analysis - classification of vegetable oils. *Analytica Chimica Acta*. Amsterdam: , v.539, n.1-2, p.283 - 287, 2005.
- PATACA, Luiz C. M., BORGES NETO, W., MARCUCCI, M. C., POPPI, R. J. Determinação de cor de mel de abelhas utilizando análise multivariada de imagens In: 28ª Reunião Anual da SBQ, 2005, Poços de Caldas – MG.
- PATACA, Luiz C. M., BORGES NETO, W., MARCUCCI, M. C., POPPI, R. J. Determinação do teor de açúcares redutores em mel de abelhas por Espectroscopia no Infravermelho Médio e iPLS In: 28ª Reunião Anual da SBQ, 2005, Poços de Caldas – MG.
- PATACA, Luiz C. M., TREVISAN, M. G., BORTOLETO, G. G., LIMA, A. G., ASHIDANI, L., MARCUCCI, M. C., BUENO, M. I. M. S., POPPI, R. J. Classificação de Amostras de Própolis Utilizando Fluorescência de Raios X com Luz Síncrotron e PLS-DA In: 13º ENQA, 2005. Niterói.
- PATACA, Luiz C. M., BORGES NETO, W., MARCUCCI, M. C. Determinação do Teor de Acidez e Umidade em Mel de Abelhas por Espectroscopia no Infravermelho e Calibração Multivariada In: 13º ENQA, 2005, Niterói.
- BORIN, A., PATACA, Luiz C. M., CORDI, L., DURAN, N., POPPI, R. J. Quantificação de *Lactobacillus* em Leite Fermentado Utilizando Imagens e Calibração Multivariada In: 13º ENQA, 2005, Niterói
- PATACA, Luiz C. M., LEAL, L. H. Q., MARCUCCI, M. C., POPPI, R. J. Determinação da tipagem da própolis utilizando Espectroscopia no Infravermelho e PLS-DA In: 29ª Reunião Anual da SBQ, 2006, Águas de Lindóia – SP.

Processos ou técnicas com registro ou patente

- BUENO, M. I. M. S., BORTOLETO, G. G., PATACA, Luiz C. M. Espalhamento de raios X e quimiometria para classificação de óleos vegetais, minerais e/ou sintéticos, 2005

Resumo

No presente trabalho estão descritos quatro estudos utilizando métodos quimiométricos para caracterização de amostras de mel e própolis. No primeiro estudo foram determinados parâmetros de qualidade do mel – acidez, umidade e açúcares redutores – utilizando espectroscopia no infravermelho médio medidas por reflectância total atenuada e calibração multivariada por mínimos quadrados parciais. Os resultados apresentados mostram a viabilidade de utilização destas técnicas para determinação dos três parâmetros de qualidade. O segundo estudo teve como objetivo a determinação da cor do mel através de imagens obtidas utilizando dispositivo de acoplamento de carga – CCD. As imagens obtidas, utilizando um *scanner* de mesa, foram processadas e transformadas em um histograma de frequência de cores. Os histogramas foram utilizados para construção de um modelo de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais. Para esta aplicação o método desenvolvido se mostrou viável para determinação da cor em mel e também foi mais robusto quando comparado com o método utilizado como referência. No terceiro estudo foram realizadas determinações semi-quantitativas de metais em amostras de própolis utilizando fluorescência de raios X com luz síncrotron. Os resultados obtidos foram correlacionados com a procedência geográfica das amostras utilizando análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais. Os modelos de classificação foram capazes de prever a origem geográfica de todas as amostras utilizadas na validação. O quarto e último estudo objetivou a determinação da tipagem da própolis utilizando espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier e análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais. Neste caso, vários modelos criados foram capazes de prever corretamente a tipagem de todas as amostras de validação. O desenvolvimento dos estudos, descritos a seguir, foram norteados pelo objetivo de se obter metodologias analíticas que apresentassem desempenhos de custo, tempo de execução, facilidade de operação e produção de resíduos melhores e/ou menores que os métodos atualmente utilizados para caracterização de amostras de mel e própolis.

Abstract

This research work describes four studies of chemometrical methods employed for the characterisation of honey and propolis. In the first study honey quality parameters, that is, acidity, humidity, and reducing sugars, were measured with the aid of mid-infrared spectroscopy by attenuated total reflectance and partial least squares multivariate calibration. The obtained results show the viability of the employed techniques for the determination of the three quality parameters. The second study aimed at the determination of honey colour, through the analysis of images obtained with a desktop scanner with a coupled charge device – CCD. The images thus obtained were processed and transformed into colour frequency histograms which were subsequently applied to a partial least squares multivariate calibration model. For this application, the developed method has shown to be appropriate for the determination of honey colour and also more robust, when compared to the reference method. In the third study propolis samples were semi-quantitatively analysed for metals using synchrotron X-ray fluorescence. The results were evaluated for their correlation with geographical origin using partial least squares discriminating analysis. The classification models were capable of identifying the geographical origin of all samples employed in the validation process. The fourth and last study aimed at the classification of propolis samples using mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy with Fourier transform and partial least squares discriminating analysis. In this case, several developed models were capable of correctly classifying all validation samples. The guiding principle for the development of the studies herein described was the need for analytical methodologies with cost, execution time, ease of operation, and residue output better – or lower – than present day methods employed for the characterisation of honey and propolis samples.

Lista de Abreviaturas ou Siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CAC	Codex Alimentarius Commission da FAO/ONU
CG	cromatografia gasosa
CHN	análise elementar de Carbono Hidrogênio e Nitrogênio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DRIFT	espectroscopia no infravermelho médio com Transformada de Fourier e reflectância difusa
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
FP	parâmetros fundamentais
GA	algoritmo genético
GA-iPLS	calibração multivariada por mínimos quadrados parciais com seleção de variáveis por intervalos seguida de seleção de variáveis por algoritmo genético
GA-PLS	calibração multivariada por mínimos quadrados parciais com seleção de variáveis por algoritmo genético
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
ICP OES	espectrometria de emissão ótica em plasma com acoplamento indutivo
iPLS	calibração multivariada por mínimos quadrados parciais com seleção de variáveis por intervalos
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MIR	espectroscopia no infravermelho médio
MPS	material particulado em suspensão no ar ambiente
NIR	espectroscopia no infravermelho próximo
PCA	análise de componentes principais
PCR	regressão em componentes principais

PLS	calibração multivariada por mínimos quadrados parciais
PLS-DA	análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais
RMSECV	raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada
RMSEP	raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão
RSD	desvio padrão relativo
SXRF	fluorescência de raios X com luz síncrotron
UV	ultravioleta
VL	variáveis latentes

Lista de tabelas

Tabela 1 - Composição média de 490 amostras de mel floral e 14 de mel de melato.....	6
Tabela 2 - Concentração dos principais elementos químicos inorgânicos encontrados em amostras de mel da França.....	6
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa 11 do Ministério da Agricultura e Abastecimento.....	8
Tabela 4 - Compostos característicos em própolis de diferentes origens geográficas....	12
Tabela 5 - Classificação das própolis brasileiras de abelhas <i>Apis mellifera</i> segundo Yong Park.....	13
Tabela 6 - Indicadores estatísticos para os modelos de calibração para acidez.....	26
Tabela 7 - Valores de referência e valores previstos de acidez utilizando o modelo PLS para as amostras de validação do modelo PLS.....	28
Tabela 8 - Indicadores estatísticos dos modelos de calibração para o parâmetro açúcares redutores.....	31
Tabela 9 - Valores de referência e valores previstos de açúcares redutores utilizando o modelo iPLS para amostras de validação.....	32
Tabela 10 - Indicadores estatísticos dos modelos de calibração para o parâmetro umidade.....	34
Tabela 11 - Valores de referência e valores previstos de umidade para amostras de validação.....	35
Tabela 12 - Escalas de cores de mel.....	40
Tabela 13 - Métodos com capacidade de produzir imagens multivariáveis 2D (superfície)	43
Tabela 14 - Métodos com capacidade de produzir imagens multivariáveis 3D (volume).....	43
Tabela 15 - Valores de referência de cor de mel e valores previstos pelos modelos calibração.....	54
Tabela 16 - Indicadores estatísticos dos modelos de calibração de cor em mel.....	54
Tabela 17 - Valores de concentrações elementares na amostra de própolis de referência determinadas por ICP OES, CHN e calculadas utilizando parâmetros fundamentais....	64
Tabela 18 - Concentrações em $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dos elementos presentes em amostras de própolis determinadas utilizando FP.....	65

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema do delimitador de área para obtenção dos espectros de infravermelho de mel.....	22
Figura 2 - Espectro de infravermelho de mel na região de 4000-750 cm^{-1}	23
Figura 3 - Erros de previsão por validação cruzada (RMSECV) dos 16 (barras) intervalos para determinação de acidez e espectro do mel (linha).....	26
Figura 4 - Erros de previsão por validação cruzada (RMSECV) dos 24 (barras) intervalos para determinação de açúcares redutores e espectro do mel (linha).....	30
Figura 5 - Erros de previsão por validação cruzada (RMSECV) dos 5 (barras) intervalos para determinação de umidade e espectro do mel (linha).....	33
Figura 6 - Exemplo de imagem obtida utilizando montagem construída com scanner, suporte e cubeta.....	48
Figura 7 - Esquema da construção do colorgrama a partir da imagem RGB.....	50
Figura 8 - Exemplos de imagens obtidas de amostras de mel e respectivas imagens de 100 x 100 pixels selecionadas.....	52
Figura 9 - Vetor de distribuição de frequências (colorgrama) típico de uma amostra de mel.....	53
Figura 10 - Gráfico de Valores Previstos versus Valores de Referência para o modelo PLS utilizando amostras límpidas.....	55
Figura 11 - Gráfico de Valores Previstos versus Valores de Referência do modelo PLS para amostras não límpidas.....	55
Figura 12 - Espectro de fluorescência de raios X de uma amostra de própolis com as principais raiais de emissão dos elementos identificados.....	63
Figura 13 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA para amostras de própolis.....	66
Figura 14 - Probabilidade de classificação na classe PR das amostras de própolis.....	67
Figura 15 - Gráfico de scores da VL1 pelos scores da VL2 do modelo PLS-DA.....	68
Figura 16 - Gráfico de energias pelos loadings da primeira variável latente do modelo PLS-DA.....	69
Figura 17 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA utilizando os principais elementos identificados.....	70
Figura 18 - Probabilidade de classificação na classe PR das amostras de própolis utilizando o modelo com os principais elementos identificados.....	70
Figura 19 - Espectros de reflectância difusa de própolis na região de 5980,8 a 426,3 cm^{-1}	77
Figura 20 - Espectros de amostras de própolis, alisados e com a primeira derivada, na região de 5980,8 a 426,3 cm^{-1}	78
Figura 21 - Valores previstos para amostras do PR utilizando PLS-DA com PLS2.....	80
Figura 22 - Valores previstos para amostras da BA utilizando PLS-DA com PLS2.....	81

Figura 23 - Valores previstos para amostras de MG utilizando PLS-DA com PLS1.....	82
Figura 24 - Probabilidade de classificação na tipagem da BA utilizando PLS-DA com PLS2.....	83
Figura 25 - Probabilidade de classificação na tipagem da BA utilizando PLS-DA com PLS1.....	84

Sumário

1 Introdução.....	1
1.1 Mel.....	4
1.2 Própolis.....	9
2 Determinação dos parâmetros de qualidade acidez, umidade e açúcares redutores em mel.....	15
2.1 Calibração multivariada por mínimos quadrados parciais.....	17
2.2 Calibração multivariada por mínimos quadrados parciais com seleção de variáveis.....	19
2.3 Espectroscopia de infravermelho médio.....	20
2.4 Parte experimental.....	21
2.4.1 Acidez.....	24
2.4.2 Açúcares redutores.....	28
2.4.3 Umidade.....	32
2.5 Conclusões da primeira aplicação.....	35
3 Determinação de cor em amostras de mel.....	37
3.1 Análise multivariada de imagens.....	40
3.1.1 Cor.....	46
3.2 Parte experimental.....	47
3.3 Conclusões da segunda aplicação.....	56
4 Classificação de própolis utilizando fluorescência de raios X com luz síncrotron e PLS-DA.....	57
4.1 Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais – PLS-DA.....	59
4.2 Fluorescência de raios X com luz síncrotron.....	60
4.3 Parte experimental.....	61
4.4 Conclusões da terceira aplicação.....	71
5 Determinação da tipagem da própolis utilizando espectroscopia no infravermelho e PLS-DA.....	73
5.1 Parte experimental.....	75
5.2 Conclusões quarta aplicação.....	84
6 Conclusões gerais.....	87
Bibliografia.....	91

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

No Brasil, assim como no resto do mundo, o consumo do mel como alimento e produto terapêutico tem crescido ao longo dos anos levando a uma maior comercialização e demanda por serviços de análise e certificação do produto. O desenvolvimento de novas metodologias de análise com custos menores, menor consumo de reagentes, e resultados mais rápidos estão entre as necessidades dos profissionais que atuam na área. Apesar de sua grande extensão territorial, presença de vegetação e clima favoráveis, o Brasil ainda não tem uma participação na produção mundial de mel que expresse o seu potencial para a atividade. Entretanto, nos últimos quinze anos, têm havido um expressivo crescimento e a produção brasileira saltou de 16180 toneladas em 1990 para 24500 toneladas em 2004 segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação [1].

A própolis tem um grande potencial para uso na medicina humana e veterinária, entretanto, suas propriedades físicas e químicas dependem muito da vegetação usada pelas abelhas para produzi-la e a vegetação, por sua vez, depende da região geográfica. A variabilidade das propriedades físicas e químicas da própolis cria dificuldades para o controle de qualidade, a grande parte destas dificuldades estão relacionadas à ausência de controle da origem da própolis. Esta informação é crucial para determinação da composição química e, conseqüentemente, sua atividade farmacológica [2]. A procedência da própolis define um perfil químico específico (tipagem) que é normalmente determinado por técnicas de separação como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG). Estes métodos são geralmente laboriosos e exigem a utilização de solventes durante a extração dos compostos. Para um eficiente controle de qualidade, é desejável determinar a tipagem da própolis a qual irá permitir à indústria farmacêutica e cosmética fazer um uso mais específico dos seus derivados.

Este trabalho de tese de doutorado teve como objetivo principal a análise de mel e própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. Foram desenvolvidas quatro aplicações analíticas utilizando métodos quimiométricos, duas

aplicações para amostras de mel e duas para amostras de própolis. A primeira aplicação objetivou a determinação dos parâmetros de qualidade acidez, umidade e açúcares redutores em mel utilizando espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho médio. Nesta aplicação utilizou-se calibração multivariada por mínimos quadrados parciais como ferramenta quimiométrica para tratamento dos dados. Foram utilizadas, também, técnicas de seleção de variáveis para melhoria dos resultados obtidos. A segunda aplicação teve como objetivo a determinação da cor do mel através de imagens CCD. Os dados foram tratados utilizando a mesma ferramenta quimiométrica da primeira aplicação. Na terceira aplicação foi utilizada a técnica de fluorescência de raios X com luz síncrotron para determinar-se a procedência geográfica de amostras de própolis. Neste caso foi utilizada a análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais como ferramenta quimiométrica. E a quarta e última aplicação, teve como objetivo determinar a tipagem da própolis. Para este caso utilizou-se espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho médio como técnica analítica e análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais como ferramenta quimiométrica.

1.1 Mel

Mel é um produto natural processado pelas abelhas a partir do néctar das plantas (mel floral), de outras secreções das plantas ou excreções de insetos sugadores de partes vivas de plantas (mel de melato), fluídos de plantas, como exsudação da cana de açúcar madura ou cortada, ou ainda por qualquer outra solução açucarada por elas recolhida. Estas secreções são coletadas pelas abelhas, combinadas com enzimas produzidas pelas mesmas e desidratadas para posterior armazenamento [3]. O mel floral é normalmente o mais consumido e o que possui o maior número de estudos já realizados. A composição do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução açucarada que a abelha coletou para produzi-lo. O mel é constituído principalmente de glicose e frutose dissolvidos em uma solução aquosa. Glicose e frutose são os únicos monossacarídeos encontrados no mel sendo que os di-, tri- e polissacarídeos presentes possuem estes dois como unidades monoméricas [4,5].

O mel de melato possui um menor teor de glicose e frutose que o mel floral e um maior teor de oligossacarídeos e de compostos inorgânicos, um menor teor de acidez e um teor maior de proteínas. No mel são encontrados também substâncias como ácidos orgânicos, enzimas e compostos inorgânicos ($\approx 0,5\%$). Na Tabela 1 são apresentados resultados de análise de açúcares em amostras de mel floral e mel de melato produzidos nos Estados Unidos da América [4].

Muitos estudos descritos na literatura apresentam trabalhos relativos a concentração de constituintes inorgânicos no mel. Destes estudos, alguns têm como objetivo o estudo dos efeitos da poluição ambiental sobre a qualidade do mel e seu papel como marcador da poluição [6-12]. Nestes trabalhos é dada ênfase principalmente à determinação de elementos tóxicos como chumbo, cádmio, cromo, zinco e arsênio. Outro objeto de estudo frequente é a determinação geográfica e floral de amostras de mel através da análise de metais e ferramentas quimiométricas de classificação [13-16]. Nestes trabalhos são determinados o maior número possível de elementos desde os maiores constituintes como potássio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre, até elementos com baixa concentração como, por exemplo, níquel, molibdênio, lítio, estrôncio e outros. Alguns destes trabalhos também utilizam parâmetros de qualidade como cor, umidade, etc, para buscar uma correlação com a origem do mel. As técnicas normalmente utilizadas para determinação de metais em mel são a absorção atômica com forno de grafite e a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado. Normalmente, a cor do mel está relacionada com o teor de cinzas totais. Méis de cores mais escuras tendem a ter um teor maior de cinzas [17]. Na Tabela 2 estão mostrados valores de concentração de elementos químicos inorgânicos encontrados em 86 amostras de mel comercializadas na França e provenientes de doze países [13].

Tabela 1 - Composição média de 490 amostras de mel floral e 14 de mel de melato

	Média / %	Desvio padrão	Faixa / %
<i>Mel floral</i>			
Umidade	17,20	1,46	13,4 – 22,9
Frutose	38,19	2,07	27,25 – 44,26
Glicose	31,28	3,03	22,03 – 40,75
Sacarose	1,31	0,95	0,25 – 7,57
Maltose	7,31	2,09	2,74 – 15,98
Açúcares superiores	1,50	1,03	0,13 – 8,49
Indeterminados	3,10	1,97	0,0 – 13,2
<i>Mel de melato</i>			
Umidade	16,30	1,74	12,2 – 18,2
Frutose	31,80	4,16	23,91 – 38,12
Glicose	26,08	3,04	19,23 – 31,86
Sacarose	0,80	0,22	0,44 – 1,14
Maltose	8,80	2,51	5,11 – 12,48
Açúcares superiores	4,70	1,01	1,28 – 11,50
Indeterminados	10,10	4,91	2,70 – 22,04

Nota: dados referem-se a amostras produzidas nos Estados Unidos da América

Fonte: Doner, 1977 [4].

Tabela 2 - Concentração dos principais elementos químicos inorgânicos encontrados em amostras de mel da França

Elemento	Concentração média mg.kg⁻¹	Elemento	Concentração média mg.kg⁻¹
<i>Prata</i>	<i>0,127</i>	<i>Fosforo</i>	<i>129,3</i>
<i>Cálcio</i>	<i>54,06</i>	<i>Enxofre</i>	<i>41,88</i>
<i>Cromo</i>	<i>0,203</i>	<i>Zinco</i>	<i>1,343</i>
<i>Cobalto</i>	<i>0,149</i>	<i>Alumínio</i>	<i>2,329</i>
<i>Cobre</i>	<i>0,305</i>	<i>Cádmio</i>	<i>0,152</i>
<i>Ferro</i>	<i>11,03</i>	<i>Níquel</i>	<i>0,198</i>
<i>Magnésio</i>	<i>19,16</i>	<i>Chumbo</i>	<i>0,793</i>
<i>Manganês</i>	<i>3,685</i>	<i>Lítio</i>	<i>0,04</i>
<i>Molibdênio</i>	<i>0,264</i>		

Fonte: Devillers et al. 2002 [13].

Para se atestar a qualidade do mel são utilizados vários parâmetros físico-químicos, tais como: umidade, teor de hidroximetilfurfural – HMF, condutividade, acidez livre, cor, frutose, glicose, sacarose, sólidos insolúveis em água e atividade diastásica.

No Brasil os parâmetros de qualidade do mel estão regulamentados pela Instrução Normativa N 11, de 20 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Esta normalização é baseada nas normas e diretivas do Mercosul (Resolução MERCOSUL GMC, N 15/94) e que estão descritas na Portaria N 367 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Na Tabela 3 estão apresentados alguns dos parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa N 11 com os respectivos métodos de análise a serem utilizados.

Internacionalmente é comum utilizar-se os valores estabelecidos pela norma do Codex Alimentarius para o mel (Codex Stan 12-1981, Rev. 1987, Roma 1990) [3].

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa 11 do Ministério da Agricultura e Abastecimento

Parâmetro	Valores estabelecidos	Métodos de análise
<i>Açúcares redutores</i>	<i>Mel floral: mínimo 65%. Melato ou Mel de Melato: mínimo 60%.</i>	<i>CAC/VOL. III, Supl. 2, 1990, 7.1</i>
<i>Umidade</i>	<i>Máximo 20%.</i>	<i>A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 969.38 B</i>
<i>Sacarose aparente</i>	<i>Mel floral: máximo 6%. Melato ou Mel de Melato: máximo 15%.</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.2</i>
<i>Sólidos insolúveis em água</i>	<i>Máximo 0,1%. Para mel prensado: máximo 0,5%.</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.4.</i>
<i>Minerais (cinzas)</i>	<i>Máximo 0,6%. Melato ou mel de melato: máximo 1,2%.</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.5</i>
<i>Acidez</i>	<i>Máximo de 50 meq·kg⁻¹.</i>	<i>A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 962.19</i>
<i>Hidroximetilfurfural</i>	<i>Máximo de 60 mg·kg⁻¹</i>	<i>A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 980.23</i>
<i>Atividade diastásica</i>	<i>Mínimo 8 na escala de Göthe</i>	<i>CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.7</i>

Notas: (a) Codex Alimentarius Commission – CAC. Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação - FAO e da Organização Mundial da Saúde – OMS
(b) A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemists

Na literatura, está descrita a utilização de parâmetros de qualidade, em conjunto com outros, como por exemplo, teores de metais, para determinação da origem floral ou geográfica do mel [18-22]. Para obter a correlação dos parâmetros físico-químicos com a origem floral são utilizadas ferramentas quimiométricas de agrupamento como análise discriminante linear [18,20-22] e análise de componentes principais [19].

O mel é um produto alimentício de alto valor comercial e isto o torna sujeito a adulterações através de adição de açúcares durante as etapas de produção e/ou processamento. Vários estudos encontrados na literatura objetivam criar métodos de detecção de adulterações no mel. Dentre as técnicas já utilizadas, e descritas, para detecção de adulterações estão a espectroscopia de ressonância nuclear magnética, a cromatografia de alta eficiência, a análise da razão isotópica de carbono, entre outras

[23]. As técnicas espectrométricas na região do infravermelho combinadas com ferramentas quimiométricas de classificação também aparecem em vários trabalhos publicados como ferramenta para detecção de adulterações. Sivakesava e Irudayaraj apresentaram em 2001 estudo onde foi utilizado espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR com um acessório de reflexão total atenuada – ATR e análise discriminante linear para determinar adulteração de amostras de mel com açúcar invertido de cana. Os resultados mostram que 88 a 96% das amostras de validação do modelo foram corretamente classificadas como adulteradas. No estudo também foram construídos modelos de calibração para determinação da quantidade de açúcar adicionado [24]. Estes mesmos autores apresentam mais três trabalhos utilizando novamente FTIR com ATR para detecção de adulteração de amostras de mel com xarope de milho [25], açúcar invertido de beterraba [26] e glicose, frutose e sacarose [27]. Nos três casos, foram encontrados resultados semelhantes aos do primeiro estudo e que demonstram a validade do método para identificar a adulteração e quantificar o adulterante adicionado às amostras de mel. Entretanto, devido a grande variabilidade das amostras, os autores reconhecem que é necessário estender os estudos para um universo maior de amostras.

1.2 *Própolis*

Própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas através da mistura de resinas coletadas da flora regional, enzimas salivares, cera, pólen e materiais inorgânicos. A palavra "própolis" vem do grego "pro", em favor de, e "polis", cidade, isto é, em defesa da cidade, no caso, a colméia. A própolis é utilizada pela abelha para reparar, bloquear buracos e rachaduras, reforçar as bordas finas e para construir a entrada da colméia. Outro uso da própolis pelas abelhas é durante o processo de embalsamamento de invasores que foram mortos dentro da colméia e não puderam ser transportados para fora. A própolis serve também como agente bactericida diminuindo a presença de bactérias e outros microorganismos dentro da colméia [28].

O homem tem utilizado a própolis desde o antigo Egito onde fazia parte,

juntamente com outras substâncias, do embalsamamento dos mortos. Existem, registros de uso da própolis pelos gregos, romanos, árabes, na Idade Média e entre os incas. Ela tem sido muito empregada pela medicina popular no tratamento de feridas e infecções das vias orais, também como anti-micótico e cicatrizante. Hoje em dia a própolis é comercializada no varejo em várias formas tais como: cápsulas, extratos alcoólicos, cremes, ou em pó para gargarejos e uso interno após dissolução na água [29].

Apesar de terem sido realizados alguns estudos no início do Século XX, o estudo da própolis se intensificou somente a partir dos anos sessenta principalmente em países do leste europeu e teve um aumento quase exponencial nas décadas de oitenta e noventa do século passado quando outros países, em especial o Japão que é um grande consumidor de própolis, aumentaram muito sua produção científica na área [30].

Em relação a suas propriedades farmacológicas, estudos científicos mostraram sua atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra bactérias Gram-positivo (*Staphylococci* e *Streptococci* spp.) e Gram-negativo (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*), protozoários (*T. cruzi*), fungos (*Candida albicans*) e vírus (HIV, vírus do herpes e vírus influenza). A própolis apresenta também efeitos anti-inflamatórios em episódios agudos e crônicos, efeitos, *in vitro*, imunoestimulatórios e imunomodulatórios, efeitos hepato-protetores e ação contra radicais livres. Além desses, a própolis apresenta efeito anestésico similar ao da cocaína e efeito regenerativo nos tecidos. Vários estudos estabelecem propriedades anti-tumorais para a própolis. Entretanto, efeitos adversos aparecem em doses maiores que $15 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$ como por exemplo reações alérgicas e irritação das mucosas e da pele. Deste modo, a própolis deve ser utilizada com precauções em tratamentos de pacientes asmáticos ou com eczema devido a presença de cafeato de fenilcetila – CAP que é reconhecido como um alergênico [29].

A composição da própolis é complexa e dependente da vegetação de onde foi retirada a matéria prima para sua elaboração além de fatores genéticos e sazonais. É constituída principalmente de resinas e bálsamos ($\approx 55\%$), cera ($\approx 5\text{-}10\%$), compostos voláteis ($\approx 10\%$), pólen e outros compostos inorgânicos ($\approx 5\%$). A literatura cita mais de

180 compostos já identificados na própolis. Destes, a grande maioria são polifenóis, tais como flavonóides, ácidos e ésteres fenólicos [29]. São encontrados, também, álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos e ésteres aromáticos, chalconas, álcoois, cetonas e ácidos graxos, esteróides, açúcares e terpenóides [31].

A cera encontrada na própolis pode ser extraída utilizando-se clorofórmio à quente. Em sua composição aparecem, principalmente, alcanos, alquenos, alcadienos, monoésteres, diésteres, ésteres aromáticos, cetonas e ácidos graxos. As diferenças de composição nas amostras de cera provenientes de diferentes regiões pode ser explicada por fatores genéticos uma vez que ela é produzida pela própria abelha [32].

Como a vegetação muda dependendo da localização geográfica, a composição da própolis apresenta grandes variações em função da região de produção. Deste modo, enquanto as amostras provenientes da Europa e China contém, principalmente, ácido benzóico e seus ésteres, os ácidos e ésteres fenólicos substituídos, flavonóides, carboidratos, ácidos graxos, terpenos e outros [31], na própolis proveniente do Brasil os principais constituintes são ácidos fenólicos prenilados, lignanas, terpenos e álcoois terpênicos e pequenas quantidades de flavonóides [2]. Na Tabela 4 estão mostrados alguns compostos característicos encontrados em amostras de própolis provenientes de diferentes origens geográficas.

Tabela 4 - Compostos característicos em própolis de diferentes origens geográficas

Origem geográfica	Planta de origem	Principais constituintes
Europa, Ásia, América do Norte	<i>Populus spp.</i> (choupo)	pinocembrina, pinobanksina, pinobanksina-3-O-acetato, crisina, galangina, cafeatos (benzil, feniletil, prenil)
Norte da Rússia	<i>Betula verrucosa</i> (bétula)	acacetina, apigenina, ermanina, ramnocitrina, canferida, α -acetoxibetulenol
Brasil	<i>Baccharis angustifolia</i> . (alecrim do campo); <i>Araucaria angustifolia</i> . ()	ácidos p-cumárico prenilados acetofenonas preniladas, ácidos diterpênicos
Ilhas Canárias	desconhecido	lignanós furoruranos

Fonte: Bankova *et al.*, 2000 [2]

A própolis brasileira é uma das mais estudadas e de maior valor comercial no mundo especialmente para os japoneses sendo que 80% da própolis consumida no Japão provém do Brasil [30]. A própolis brasileira, devido a grande diversidade vegetal, é encontrada em várias tipagens com características farmacológicas variando de um tipo para outro [33-35]. A tipagem influencia muito o preço de mercado da própolis, por exemplo a própolis produzida em Minas Gerais é a que alcança o maior valor comercial no Japão chegando a custar US\$200,00 o quilo [30].

Yong K. Park se baseou nas propriedades físico-químicas para classificar a própolis brasileira (excetuando-se a região norte) em 12 grupos: cinco provenientes da região sul, um proveniente do sudeste e centro-oeste, e seis provenientes do nordeste (Tabela 5) [33,34]. Esta classificação conflita com uma publicada recentemente por Maria Cristina Marcucci que identificou quatro grupos de própolis nas regiões sul e sudeste do Brasil [36]. Segundo Marcucci a própolis brasileira das regiões sul e sudeste podem ser do tipo BRG que é encontrada nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, BRP que é produzida nos estados do sudeste (São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro), BRPG que é uma mescla dos dois tipos anteriores (BRP e BPG) e, finalmente, o tipo BRP(PR) que é encontrada no Paraná. As tipagens são definidas em

função dos principais compostos químicos presentes que foram nomeados como marcadores. A própolis do tipo BRG apresenta como marcadores os compostos vanilina (G1), 3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído (G2), 2-[1-hidroximetil]-vinil-6-acetil-5-hidroxycumarano (I). O tipo BRP(PR) caracteriza-se por apresentar os compostos ácido 3-prenil-4-hidro-xicinâmico (PHCA), 9-E- e 9-Z-2,2-dimetil-6-carbo-xietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DCBEN) e ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (DPB). A própolis da tipagem BRP(SP/MG) apresenta como marcadores principais os compostos ácido cafeíco (CAF), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA) e o ácido p-cumárico (p-CUM). E, finalmente, a tipagem BRPG forma a interface entre os tipos BRP(PR) e BRG e caracteriza-se por apresentar os compostos destes dois grupos [36].

Tabela 5 - Classificação das própolis brasileiras de abelhas Apis mellifera segundo Yong Park

Grupos	Extrato Etanólico de Própolis		Origem da própolis
	Cor	Substâncias Solúveis (%)	
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	"
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	"
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	"
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	"
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	"
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	"
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	"
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	"
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	"
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Fonte: Park *et al.* 2000 [33]

A determinação da tipagem da própolis brasileira para um melhor controle das qualidades farmacológicas de seus produtos já é uma necessidade de quem trabalha na área (produtores e indústria) e recentemente a ANVISA divulgou uma nota técnica

sobre o Registro de Produtos à base de própolis (Nota Técnica de 14 de setembro de 2005) que descreve como um dos requisitos mínimos para registro a evidência da presença de marcadores que comprovem a origem da própolis.

Apesar dos estudos descritos na literatura terem se concentrado sobre a própolis produzida pela espécie *Apis mellifera*, são conhecidas, aproximadamente, 20000 espécies de abelha. Destas, em torno de 1000 produzem própolis. No Brasil estima-se que existam de 350 a 600 espécies nativas. Pereira *et al.* apresentaram, em 2003, uma comparação entre amostras de própolis, provenientes de Brotas, São Paulo, produzidas por *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula*. Os resultados mostram que os dois grupos de própolis apresentam atividade antimicrobiana semelhante. A composição química dos dois grupos de amostras se mostrou muito similar indicando que as espécies coletam a matéria prima da mesma flora disponível. Algumas diferenças nas composições foram encontradas nos aminoácidos, em alguns carboidratos e nos polióis [37].

Capítulo 2

Determinação dos parâmetros de
qualidade acidez, umidade e açúcares
redutores em mel

2. Determinação dos parâmetros de qualidade acidez, umidade e açúcares redutores em mel

Nesta aplicação foram criados modelos de calibração utilizando espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e reflectância total atenuada e calibração multivariada por mínimos quadrados parciais para determinação dos parâmetros de qualidade do mel: acidez, açúcares redutores e umidade.

2.1 Calibração multivariada por mínimos quadrados parciais

A calibração multivariada é normalmente utilizada para correlacionar informação espectral com a propriedade sendo estudada (concentração dos analitos). Uma das técnicas de calibração multivariada mais utilizada para se obter esta correlação é a calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares*) – PLS. O método PLS é análogo ao método de regressão em componentes principais (*Principal Component Regression*) – PCR. No método PCR as componentes principais são determinadas objetivando descrever, o melhor possível, a variância na variável independente. No método PLS, além da variância das variáveis independentes, a correlação entre as variáveis latentes e as variáveis dependentes é computada. Para isto, no método PLS dois modelos são construídos, um para as variáveis independentes x e outro para as variáveis dependentes y .

$$X = T P^T + E_X \quad \sum t_h p_h^T + E_X \quad (1)$$

$$Y = U Q^T + E_Y \quad \sum u_h q_h^T + E_Y \quad (2)$$

$$u_h = b_h t_h \quad (3)$$

Onde: X é a matriz de dados onde cada linha corresponde a uma amostra e as

colunas as variáveis, $\mathbf{Y}$ é a matriz de respostas (por exemplo concentração do analito), $\mathbf{T}$ e $\mathbf{U}$ são os *scores* para as matrizes de dados e respostas, respectivamente, $\mathbf{P}$ e $\mathbf{Q}$ são os *loadings*, $\mathbf{E}_X$ e $\mathbf{E}_Y$ são os respectivos resíduos e, b_n é o coeficiente do modelo linear para cada componente principal.

O modelo PLS é obtido através de um processo iterativo, no qual se otimiza ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre o(s) *loadings*, para a determinação dos *scores*, e o ajuste por uma função linear dos *scores* da matriz X aos *scores* da matriz Y de modo a minimizar os desvios. Essa otimização simultânea ocasiona pequenas distorções nas direções dos *loadings*, de modo que, rigorosamente eles perdem a ortogonalidade, levando a pequenas redundâncias de informação. Porém, são essas pequenas redundâncias que otimizam a relação linear entre os *scores* [38,39]. Existem dois modelos PLS, o PLS1, onde a variável dependente é um vetor, e o PLS2 onde a variável dependente é uma matriz de dados [40].

O PLS tem sido uma das técnicas de calibração multivariada mais utilizada em química analítica. Vários trabalhos descritos na literatura utilizam esta ferramenta em conjunto com espectroscopia vibracional para realizar estudos em amostras de mel. Dentre estes trabalhos podemos citar o artigo de Kelly et al. [23] onde foi realizado um estudo, utilizando infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada, para detecção de adulterações realizadas usando D-frutose e D-glicose em amostras de mel. Em estudo publicado no International Journal of Food Science and Technology, Sivakesava e Irudayaraj [27] apresentam um estudo para identificação de amostras de mel adulterado utilizando espectroscopia no infravermelho médio e análise discriminante linear. Neste estudo o PLS foi utilizado como ferramenta para redução das variáveis (espectro). Em trabalho publicado em 2002, García-Alvarez et al. [41] determinam parâmetros polarimétricos de amostras de mel utilizando espectrometria de infravermelho próximo e PLS. Além desses, podemos citar vários outros trabalhos descritos na literatura onde são utilizada espectroscopia vibracional e PLS para caracterização de amostras de mel [24-26,42-44]

2.2 Calibração multivariada por mínimos quadrados parciais com seleção de variáveis

Modelos de calibração podem ser melhorados significativamente através de um processo de seleção de variáveis. Com este objetivo, métodos de seleção de variáveis por intervalos iPLS [45] e algoritmo genético (Genetic Algorithm) – GA [46] são utilizados em modelos de calibração PLS criados.

O método iPLS é baseado na divisão do espectro em intervalos menores seguido pela obtenção dos modelos de regressão PLS para cada intervalo usando o mesmo número de variáveis latentes. A raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation*) – RMSECV (Equação 4) é calculada para cada modelo e comparada com o valor obtido para o espectro inteiro. A região apresentando o menor valor de RMSECV é então escolhida [45].

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (4)$$

Na equação acima (Equação 4) n é o número de amostras, y_i e $\hat{y}_i$ são os valores da variável dependente para as amostras utilizadas na criação do modelo de calibração (amostras de calibração).

O método GA é baseado na teoria da evolução das espécies de Darwin e é usado para processos de otimização. Cada indivíduo é composto de um grupo de genes [variáveis] que são expressas em código binário. Cada variável pode ter o valor binário "1" ou "0" (selecionado ou não selecionado). Os grupos de variáveis que produzem modelos de calibração com os menores valores de RMSECV são selecionados em cada geração e representam os indivíduos mais adaptados. Novas gerações são produzidas através de cruzamentos entre os indivíduos mais adaptados da geração anterior e/ou mutações. As mutações são utilizadas para produzir nova

informação genética à população e também para prevenir sua saturação com grupos similares de genes (convergência prematura). As desvantagens da seleção de variáveis através de GA são: a possibilidade de ocorrer sobre-ajuste do modelo de calibração (devido ao número de gerações ou dimensões da matriz), a falta de reprodutibilidade devido à natureza probabilística, e tempo de computação. O último está se tornando menos relevante devido ao avanço dos computadores [46]. Com o objetivo de evitar o sobre-ajuste do modelo de calibração ou mesmo obter um modelo de calibração com melhor habilidade de previsão, as variáveis selecionadas pelo método iPLS podem ser usadas como dados de entrada para o método GA (GA-iPLS).

2.3 Espectroscopia de infravermelho médio

A região espectral do infravermelho está situada antes da região do visível no espectro eletromagnético e abrange a radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} ou comprimento de onda de 780 a 100000 nm. O espectro no infravermelho médio compreende a radiação com números de onda de 4000 a 200 cm^{-1} [47]. A espectroscopia no infravermelho apresenta a impressão digital para algumas substâncias orgânicas. A absorvância em uma frequência particular é característica de um grupo funcional presente no composto químico. Além disso ela oferece oportunidades analíticas quase que ilimitadas para muitas áreas de produção e controle de qualidade e vem ganhando muito espaço nos laboratórios analíticos e em análises de controle de qualidade nos processos industriais, como indústrias farmacêuticas, de alimentos, têxteis, etc. Isso ocorre devido à velocidade, a facilidade, ao fato da amostra não necessitar de tratamento prévio, a pequena quantidade de amostra utilizada, além de ser uma técnica não-destrutiva e com alta seletividade que pode ser utilizada para determinações qualitativas e quantitativas. O aparecimento dos espectrômetros com transformada de Fourier (FTIR) relativamente baratos aumentou notavelmente o número e o tipo de aplicações da radiação no infravermelho em consequência do aumento de uma ordem de magnitude ou mais nas relações sinal-ruído e limites de detecção em comparação aos que podem ser obtidos com instrumentos interferométricos. A partir daí, a espectroscopia no infravermelho médio

passa a ser usada também para análise quantitativa de amostras complexas, tanto por absorção quanto por emissão [47]. A utilização de métodos quimiométricos que consistem na aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal, tem permitido a obtenção de informações qualitativas e quantitativas a partir dos complexos espectros no infravermelho. Técnicas matemáticas desenvolvidas e disponibilizadas em softwares vêm promovendo a popularização da utilização da espectroscopia no infravermelho.

Nos últimos anos têm surgido vários trabalhos na literatura especializada onde a espectroscopia no infravermelho é utilizada para determinação de propriedades de amostras de mel. Grande parte dos trabalhos tem como objetivo a identificação de adulterações [23,24,27] e a origem geográfica e botânica [42,48] das amostras de mel através da utilização de ferramentas quimiométricas de classificação e análise de agrupamento. Em menor quantidade, alguns trabalhos publicados objetivam a determinação de parâmetros físico-químicos e de qualidade do mel através de calibração multivariada [41,43].

2.4 Parte experimental

Foram utilizadas 48 amostras de mel floral fornecidas pela Natural Labor Análises e Pesquisas Ltda, Campinas, Brasil. Os valores de referência dos parâmetros acidez, umidade e açúcares redutores foram determinados pela Natural Labor utilizando métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [49]. O parâmetro açúcares redutores foi determinado segundo o método *AOAC Official Method 920.183 – Sugars (Reducing) in Honey*, o qual é baseado numa titulação de oxi-redução. A acidez foi determinada utilizando o método de titulação ácido-base *AOAC Official Method 962.19 – Acidity (Free, Lactone, and Total) of Honey*. E a umidade foi determinada pelo método refratométrico *AOAC Official Method 969.38B – Moisture in Honey*. A preparação das amostras para obtenção dos espectros de infravermelho consistiu somente em aquece-las num banho de água quente à temperatura de 40 °C para dissolver qualquer cristalização existente.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em triplicata usando um espectrômetro marca ABB Bomem Inc, modelo MB100, com um detector DTGS e um acessório de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe. O espectrômetro foi operado com resolução de 4 cm^{-1} , ganho de 2 e 64 varreduras para cada espectro. Inicialmente, os espectros foram obtidos com o acessório totalmente preenchido com a amostra de mel. Entretanto, devido à alta concentração de açúcares no mel, os espectros apresentavam muito ruído com valores de absorvância chegando até 3 unidades. Objetivando diminuir os valores de absorvância, foi construído um delimitador de área constituído de um tubo de plástico de 7,0 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento. O delimitador foi colocado em pé sobre a superfície de ZnSe em uma posição fixa (Figura 1).

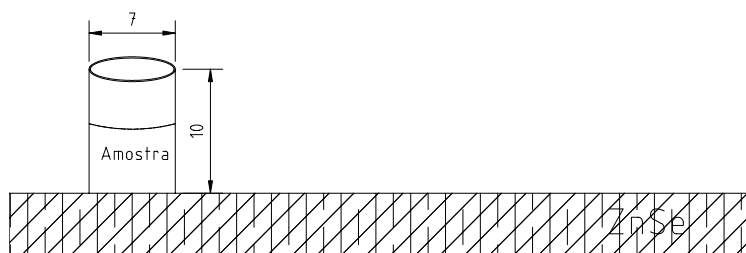


Figura 1 - Esquema do delimitador de área para obtenção dos espectros de infravermelho de mel

Os espectros de mel passaram a ser obtidos com as amostras posicionadas dentro do delimitador. Antes da obtenção de cada triplicata foi tomado um espectro de referência com o acessório na posição, com somente o delimitador instalado e sem a amostra. A Figura 2 apresenta um espectro típico de uma amostra de mel com as atribuições das bandas de absorções. Como o mel consiste basicamente de uma solução aquosa de diferentes açúcares, predominantemente frutose e glicose, o espectro do mel é dominado pelas absorções dos açúcares e da água. As principais absorções dos açúcares ocorrem na região de 1500 a 800 cm^{-1} [50]. Bandas aparecendo entre 1470 e 1150 cm^{-1} são devidas aos modos de dobramento das ligações C-C-H, C-O-H e O-C-H. Os picos mais intensos na região de 1150 a 900 cm^{-1} são devido aos estiramentos das ligações C-O e C-C, com um pico em torno de 1060 - 1020 cm^{-1} devido à vibração da ligação O-H [51]. As absorções devido aos modos de estiramento e dobramento da água aparecem a 3336 e 1635 cm^{-1} , respectivamente

[52].

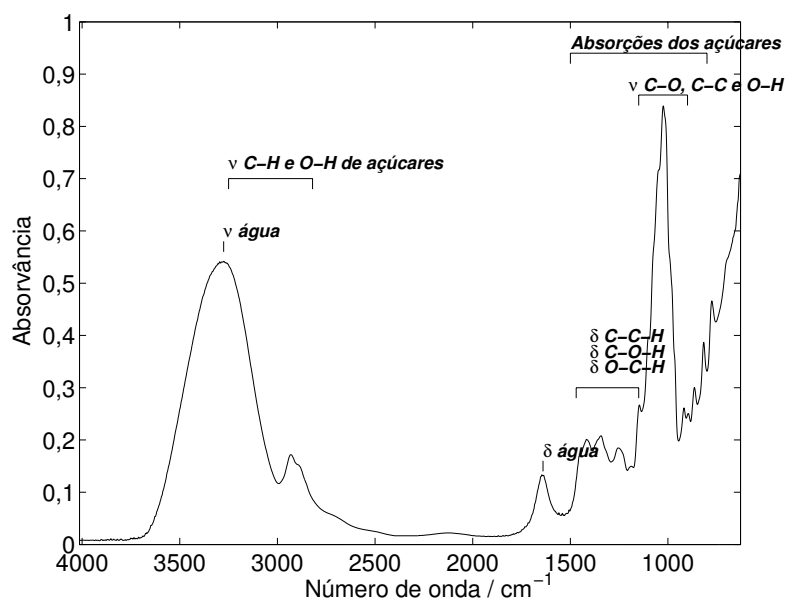


Figura 2 - Espectro de infravermelho de mel na região de 4000-750 cm^{-1}

Os tratamentos quimiométricos dos dados foram realizados usando a região de 630 a 4000 cm^{-1} e a média das triplicatas dos espectros obtidos. Antes da definição dos grupos de amostras, os espectros foram alisados utilizando o algoritmo de Savitzky-Golay [53] com 15 pontos no filtro e um polinômio de ordem um. As amostras foram divididas em dois grupos, um grupo de calibração e um grupo de validação com o primeiro contendo 2/3 das amostras e o restante 1/3 constituindo o grupo de validação. Os grupos foram separados segundo o algoritmo de Kennard-Stone onde as amostras são escolhidas sequencialmente, igualmente espaçadas no domínio definido pelas variáveis. A primeira amostra escolhida pelo algoritmo é a mais afastada das outras baseada na distância Euclidiana. Para cada nova amostra a ser selecionada é calculada a distância em relação às escolhidas previamente e o algoritmo sempre escolherá, entre as remanescentes, a amostra mais distante das amostras já selecionadas [54]. Todos os tratamentos dos dados foram realizados utilizando o programa Matlab versão 6.5 da Mathworks [55]. Os modelos de calibração multivariada por mínimos quadrados parciais foram realizados utilizando o PLS_Toolbox versão 3.5 para Matlab da Eigenvector_Research Inc [56]. A seleção de variáveis por intervalos foi

realizada utilizando o iToolbox versão de julho 2004, criado por L. Norgaard da The Royal Veterinary and Agricultural University [57]. O algoritmo genético foi executado utilizando-se o pacote nativo do Matlab versão 6.5.

A avaliação da performance dos modelos foi realizada através da determinação dos valores previstos, ou estimados, pelo modelo e dos respectivos erros relativos de previsão que foram calculados através da Equação 5 usando os valores das amostras de validação. Utilizou-se, também, na avaliação dos modelos o valor da raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (*Root Mean Square Error of Prediction*) – RMSEP (Equação 6) que também é calculado utilizando as amostras de previsão e, finalmente, os valores dos coeficientes de regressão das curvas de valores previstos versus valores de referência para as amostras de validação.

$$\text{Erro relativo} = \sqrt{\frac{(\text{Estimado} - \text{Referência})^2}{\text{Referência}^2}} \cdot 100 \quad (5)$$

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (6)$$

2.4.1 Acidez

A acidez é um excelente indicador de processos de fermentação em amostras de mel uma vez que há um aumento da acidez em amostras que sofrem este processo. Os valores de acidez nas 48 amostras variaram entre 20,8 a 59,9 mleequivalentes-grama por quilograma de amostra (meq·kg⁻¹). As amostras foram separadas em um grupo de calibração e validação com 32 e 16 amostras, respectivamente, utilizando o algoritmo de Kennard-Stone [54]. O modelo PLS construído com todo o espectro não apresentou bons resultados de previsão. Foi construído assim um modelo PLS utilizando todas as 48 amostras e, então, foi realizado um estudo da presença de amostras anômalas através de uma análise de resíduos utilizando a metodologia descrita por Martens e

Naes [58]. As amostras anômalas foram retiradas da matriz de dados e as remanescentes foram novamente separadas, usando o algoritmo de Kennard-Stone em um grupo de calibração com 31 amostras e um grupo de validação com 9 amostras. Foi criado um novo modelo PLS e usando-se as amostras de previsão calculou-se para cada amostra o erro relativo de previsão seguindo a Equação 5.

Para execução da seleção de variáveis por intervalos foram testadas várias divisões do espectro em sub-intervalos, desde 5 divisões até 40 divisões. O melhor resultado foi obtido quando o espectro foi dividido em 16 sub-intervalos. Na Figura 3 as barras indicam a raiz quadrada do quadrado do erro médio de previsão por validação cruzada (RMSECV) para o modelo PLS criado com cada intervalo. A linha tracejada corresponde ao RMSECV do modelo PLS para o espectro inteiro o qual foi construído com cinco variáveis latentes (VL). Os números dentro de cada barra indicam o número de VL para o modelo PLS do intervalo. O intervalo correspondente aos números de onda 956,6 a 738,7 cm^{-1} (décimo quinto intervalo na Figura 3) apresentou o menor valor de RMSECV, sendo este menor que o RMSECV para o modelo do espectro inteiro. O modelo PLS construído com este intervalo de variáveis não apresentou um valor de RMSEP menor que o modelo PLS para o espectro inteiro (Tabela 6). Outras combinações de intervalos foram testadas mas em nenhum caso se obteve valores de previsão melhores. É possível que a informação da acidez esteja distribuída em todo o espectro e uma seleção de variáveis por intervalos irá reduzir a informação e, conseqüentemente, aumentar os valores de RMSEP comparados com o modelo do espectro inteiro.

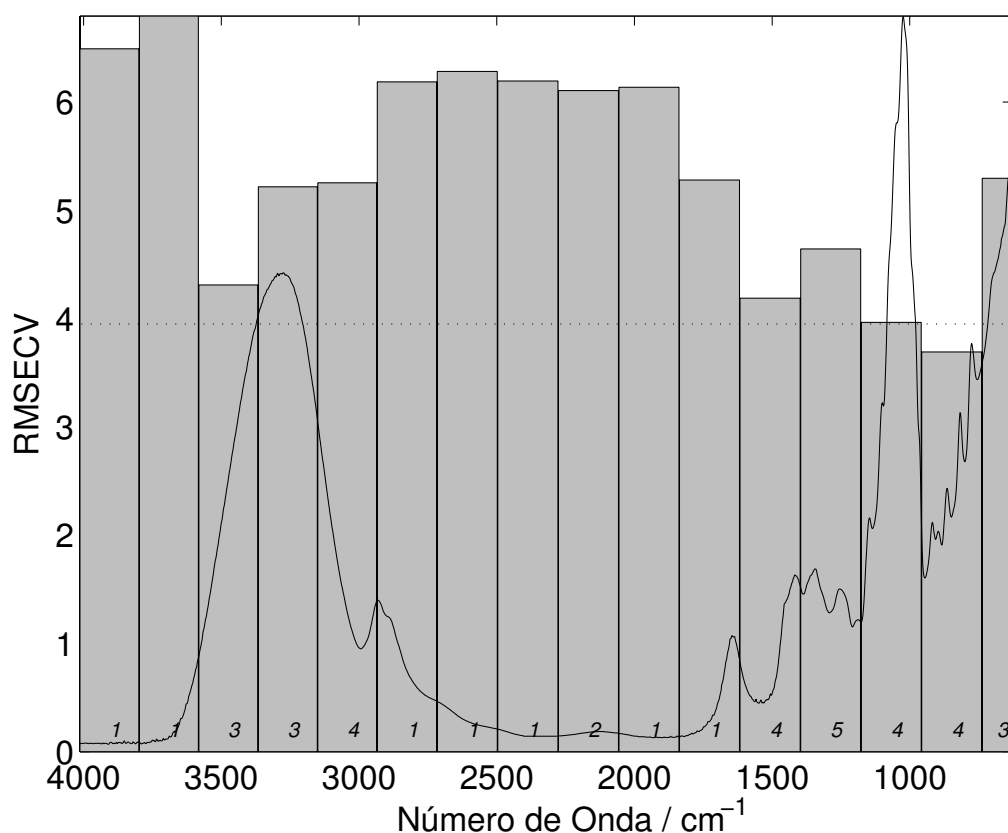


Figura 3 - Erros de previsão por validação cruzada (RMSECV) dos 16 (barras) intervalos para determinação de acidez e espectro do mel (linha)

Tabela 6 - Indicadores estatísticos para os modelos de calibração para acidez

Indicador	PLS	iPLS	GA-PLS	GA-iPLS
Variáveis Latentes	5	4	4	4
RMSEP (meq kg ⁻¹)	2,20	3,35	2,62	3,21
Nº variáveis selecionadas	1756	114	398	14
Erro relativo mínimo (%)	0,37	1,45	0,55	2,07
Erro relativo máximo (%)	15,9	16,8	24,9	16,5
Erro relativo médio (%)	5,99	8,68	6,81	8,48
R ²	0,893	0,839	0,826	0,839

O algoritmo genético (GA) foi aplicado no espectro inteiro (GA-PLS) e na região de 956,6 a 738,7 cm⁻¹ que corresponde ao intervalo de menor RMSECV determinado pelo procedimento iPLS (GA-iPLS). O menor RMSEP foi obtido usando o espectro inteiro como entrada para o GA (Tabela 6). Os coeficientes de correlação (R²) na Tabela 6 foram calculados, conforme descrito por J. C. Miller e J. N. Miller [59], através

da regressão linear obtida entre os valores previstos pelos modelos PLS e os valores de referência determinados pelo método oficial da AOAC. Apesar do uso do espectro inteiro ter apresentado o menor valor de RMSEP e erro relativo médio, não existe diferença significativa entre este modelo e os outros modelos estudados quando se compara os valores de RMSEP usando um teste F com 95% de confiança. Consequentemente, nenhuma melhora nos resultados é observada quando se utiliza os métodos de seleção de variáveis por intervalo e por algoritmo genético. Somente foi possível encontrar uma estreita região espectral (usando iPLS) relacionada com a absorção de açúcares (Figura 2) que pode ser usada para determinação de acidez em açúcares.

Dos três parâmetros estudados (acidez, açúcares redutores e umidade), a acidez apresentou os maiores erros de previsão usando os modelos de calibração desenvolvidos. Isto pode ser explicado pela incerteza dos dados nos valores de referência. Para a acidez, os valores de referência apresentavam incertezas com um desvio padrão relativo de até 9%. O método de referência *AOAC Official Method 962.19 – Acidity (Free, Lactone, and Total) of Honey*, consiste na dissolução de 10 g de mel em 75 mL de água livre de CO₂, e titulação com NaOH 0,05 mol·L⁻¹ a uma velocidade de 5,0 mL·min⁻¹. A adição de NaOH é realizada a pH = 8,50. Imediatamente, são adicionados 10 mL de NaOH 0,05 mol·L⁻¹ e é realizada uma titulação de retorno com HCl 0,05 mol·L⁻¹ em bureta de 10 mL até pH = 8,30. Mudanças na velocidade de adição do NaOH podem afetar o resultado final da determinação. A utilização de uma bureta automática, onde se tem um melhor controle da velocidade de adição do titulante, poderia melhorar a precisão do método. Entretanto, a Natural Labor e o nosso laboratório não possuíam tal equipamento quando da realização dos experimentos. A baixa precisão nos valores de referência da acidez levaram a um alto valor de RMSEP. Na Tabela 7 estão mostrados os valores de referência determinados pelo método da AOAC e os valores previstos de acidez pelo modelo PLS para as amostras de validação.

Tabela 7 - Valores de referência e valores previstos de acidez utilizando o modelo PLS para as amostras de validação do modelo PLS

Referência^a / meq.kg⁻¹	RSD^b / %	Previsto / meq.kg⁻¹	Erro relativo / %
20,8 ± 0,9	4,3	24,1	16,0
32,2 ± 0,6	1,9	31,0	3,8
38,2 ± 1,3	3,4	33,8	11,0
29,3 ± 1,2	4,1	27,4	6,6
33,3 ± 0,6	1,8	32,5	2,3
26,9 ± 0,8	3,0	27,6	2,7
32,7 ± 0,9	2,8	32,6	0,4
31,8 ± 0,6	1,9	29,3	7,8
32,7 ± 1,4	4,3	31,7	3,0

Notas: (a) valores de referência com a estimativa dos desvios padrões. Valores determinados em triplicata

(b) Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*) – RSD

2.4.2 Açúcares redutores

Açúcares redutores representam a grande maioria dos açúcares presentes em amostras de mel. Um açúcar redutor é um tipo de açúcar com um grupo aldeído. A presença deste grupo permite que o açúcar se comporte como um agente redutor, por exemplo, no teste de Benedict, o qual é usado como método de determinação da presença de açúcares redutores, ou mais genericamente, da presença de aldeídos, numa solução. O reagente de Benedict contém sulfato de cobre(II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) que é reduzido para cobre(I) (Cu_2O) pelo aldeído. O aldeído por sua vez é oxidado para ácido carboxílico. O óxido de cobre(I) é insolúvel em água e assim precipita. Durante a reação a solução muda da cor azul para verde a vermelho escuro dependendo da quantidade de íons cobre(II) presentes. Em amostras de mel de melato os níveis de açúcares redutores é geralmente menor do que os encontrados em mel floral. A determinação deste parâmetro é um dos indicadores usados para diferenciar mel floral de mel de melato [3].

Modelos de calibração PLS para açúcares redutores foram construídos de modo semelhante ao parâmetro acidez. Entretanto, a análise dos resíduos dos modelos PLS

construídos com todo o espectro não mostrou nenhuma amostra anômala. Assim, foram utilizadas todas as amostras nos grupos de calibração e validação, determinados através do algoritmo de Kennard-Stone, com 32 e 16 amostras respectivamente. Os valores de referência dos açúcares redutores variavam de 61,1 a 79,0% no conjunto das amostras. Nas amostras de validação os valores variavam de 69,9 a 77,1%.

Para execução do procedimento de seleção de variáveis por intervalo, o espectro foi reduzido para a região de 1784 a 630 cm^{-1} que corresponde a região das principais bandas de absorção dos açúcares presentes no mel. Este procedimento foi realizado para facilitar a execução da seleção de variáveis e também porque a região acima de 1800 cm^{-1} não estava apresentando nenhum intervalo que mostrasse valores de RMSECV menor que o valor obtido para o espectro inteiro. Os melhores resultados de RMSECV, quando da utilização do método de seleção de variáveis por intervalos, foram obtidos quando o espectro reduzido foi dividido em 24 sub-intervalos. O intervalo contendo a faixa de números de onda de 916,1 a 869,8 cm^{-1} , que corresponde ao décimo nono intervalo na Figura 4 foi o que apresentou o menor valor de RMSECV. Outras divisões em sub-intervalos e combinações de sub-intervalos foram executadas mas nenhuma apresentou resultados melhores que o procedimento com 24 sub-intervalos.

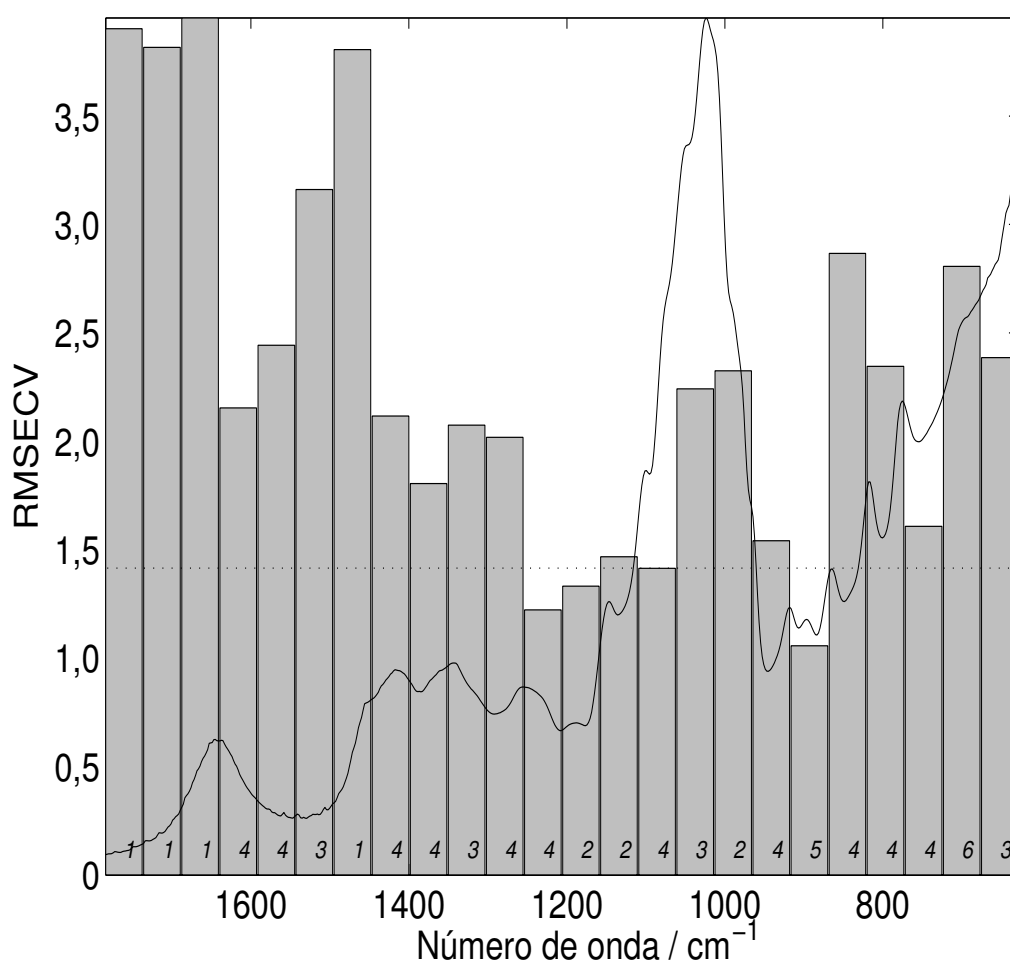


Figura 4 - Erros de previsão por validação cruzada (RMSECV) dos 24 (barras) intervalos para determinação de açúcares redutores e espectro do mel (linha)

O modelo PLS criado utilizando o décimo nono intervalo apresentou resultados de previsão melhores que o modelo com o espectro inteiro. Entretanto, um teste F, com nível de confiança de 95%, não mostrou diferença entre os valores de RMSEP para os modelos PLS criados com este intervalo e com o espectro inteiro. A utilização do algoritmo genético, assim como no caso da acidez, não levou a uma melhora nos modelos PLS de espectro inteiro (GA-PLS) e do intervalo (GA-iPLS). A Tabela 8 mostra os indicadores estatísticos para os modelos de calibração PLS criados para o parâmetro açúcares redutores. Para o modelo iPLS, os resultados indicam uma boa correlação entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,920. Novamente, usando iPLS foi possível encontrar uma região, relacionada com absorção de açúcar, que apresentou um valor de

RMSECV menor que o modelo do espectro inteiro (Figura 4).

Tabela 8 - Indicadores estatísticos dos modelos de calibração para o parâmetro açúcares redutores

Indicador	PLS	iPLS	GA-PLS	GA-iPLS
<i>Variáveis latentes</i>	7	5	5	4
<i>RMSEP (%)</i>	1,28	1,04	1,31	1,03
<i>Nº variáveis selecionadas</i>	1756	241	469	5
<i>Erro relativo mínimo (%)</i>	0,26	0,0019	0,093	0,093
<i>Erro relativo máximo (%)</i>	3,60	2,47	3,89	2,21
<i>Erro relativo médio (%)</i>	1,44	1,18	1,37	1,24
<i>R²</i>	0,762	0,846	0,755	0,843

Na Tabela 9 estão mostrados os valores de referência que foram determinados pelo método *AOAC Official Method 920.183*, em triplicata e os valores previstos pelo modelo iPLS para açúcares redutores.

Tabela 9 - Valores de referência e valores previstos de açúcares redutores utilizando o modelo iPLS para amostras de validação

Referência^a / %	RSD^b / %	Previsto / %	Erro relativo / %
79,0 ± 0,3	0,38	78,7	0,40
74,6 ± 0,9	1,20	76,1	2,06
71,9 ± 0,9	1,25	72,7	1,16
74,2 ± 0,3	0,40	74,9	0,98
74,2 ± 0,3	0,40	74,6	0,61
74,4 ± 0,3	0,40	74,2	0,20
73,7 ± 0,3	0,41	73,7	0,00
75,0 ± 0,3	0,40	76,9	2,47
73,7 ± 0,3	0,41	72,7	1,39
74,2 ± 0,3	0,40	73,6	0,82
77,1 ± 0,3	0,39	76,0	1,47
74,6 ± 0,1	0,13	76,0	1,88
67,1 ± 0,1	0,15	68,3	1,74
74,6 ± 0,9	1,20	73,6	1,30
71,4 ± 0,1	0,14	73,1	2,38
76,3 ± 0,1	0,13	76,3	0,04

Notas: (a) valores de referência com a estimativa dos desvios padrões. Valores determinados em triplicata

(b) Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*) – RSD

2.4.3 Umidade

Méis com altos níveis de água tendem a fermentar mais facilmente, o que torna este parâmetro de grande importância na especificação da qualidade do mel.

Assim como os açúcares redutores, não foram encontradas amostras anômalas para o parâmetro umidade. Do mesmo modo, as amostras foram divididas em um grupo de calibração com 32 amostras e um de validação com 16 amostras utilizando o algoritmo de Kennard-Stone. Foram criados os modelos de calibração PLS, iPLS, GA-PLS e GA-iPLS.

Para este parâmetro os melhores resultados para o modelo iPLS foram encontrados quando o espectro foi dividido em cinco intervalos como mostrado na Figura 5.

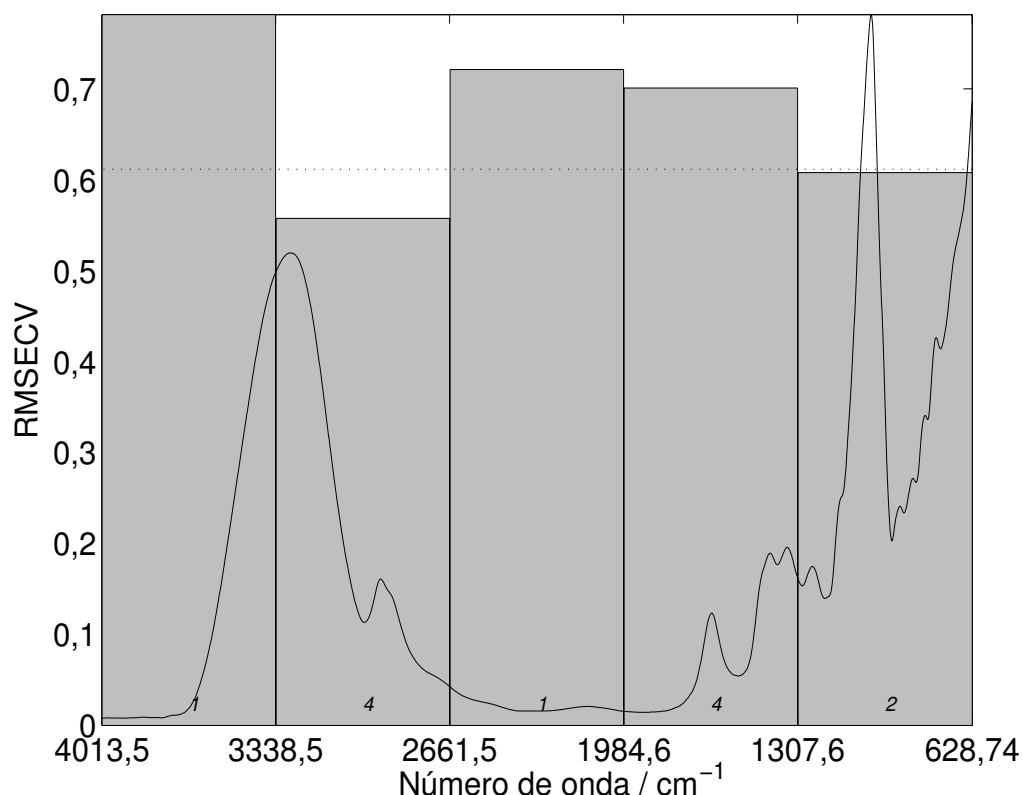


Figura 5 - Erros de previsão por validação cruzada (RMSECV) dos 5 (barras) intervalos para determinação de umidade e espectro do mel (linha)

Os indicadores estatísticos mostrados na Tabela 10 para os modelos de calibração PLS do GA-PLS do espectro inteiro não foram satisfatórios, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) entre os valores de previsão e os valores de referência de 0,450 e 0,163, respectivamente. A seleção de variáveis por intervalo e algoritmo genético levou a uma melhora significativa do coeficiente de correlação que passou a ser de 0,823 para o modelo GA-iPLS. A metodologia de seleção de variáveis por intervalo selecionou a faixa de frequências entre 3338,5 e 2665,4 cm^{-1} (quarto intervalo na Figura 5), que corresponde ao início da banda de estiramento O-H da água. A Tabela 10 apresenta os indicadores estatísticos para os modelos de calibração PLS criados para o parâmetro umidade. À primeira vista, parece que o algoritmo genético é

dispensável devido a pequena melhora nos resultados quando este é utilizado. Entretanto, como a variação da umidade é relativamente pequena no mel (15,6 a 19,3% para as amostras deste estudo), esta pequena melhora torna-se essencial para a viabilidade do modelo de calibração. Um teste F realizado a um nível de confiança de 95% indica que os resultados para o modelo GA-iPLS são significativamente diferentes do modelo iPLS, mostrando assim uma melhora quando variáveis selecionadas pelo iPLS são utilizadas como entrada para o algoritmo genético. Para este parâmetro, o procedimento GA-iPLS selecionou somente 15 variáveis. Na Tabela 11 estão apresentados os valores de referência determinados pelo método da AOAC 969.38B, em triplicata, e os valores previstos pelo modelo de calibração GA-iPLS para o parâmetro umidade.

Tabela 10 - Indicadores estatísticos dos modelos de calibração para o parâmetro umidade

Indicador	PLS	iPLS	GA-PLS	GA-iPLS
<i>Variáveis latentes</i>	3	4	7	7
<i>RMSEP (%)</i>	0,52	0,41	0,61	0,32
<i>Nº variáveis selecionadas</i>	1756	350	1224	8
<i>Erro relativo mínimo (%)</i>	0,49	0,029	0,25	0,17
<i>Erro relativo máximo (%)</i>	4,87	3,77	6,98	4,24
<i>Erro relativo médio (%)</i>	2,50	1,98	3,01	1,45
<i>R²</i>	0,450	0,796	0,163	0,823

Tabela 11 - Valores de referência e valores previstos de umidade para amostras de validação

Referência^a / %	RSD^b / %	Previsto / %	Erro relativo / %
17,6 ± 0,1	0,57	17,5	0,71
17,2 ± 0,3	1,74	17,4	1,31
16,9 ± 0,2	1,18	16,9	0,17
17,2 ± 0,1	0,58	17,6	2,61
17,1 ± 0,1	0,58	17,5	2,39
17,2 ± 0,1	0,58	17,4	0,96
17,7 ± 0,1	0,56	17,6	0,79
18,1 ± 0,1	0,55	17,8	1,55
17,7 ± 0,1	0,56	17,5	1,03
17,5 ± 0,1	0,57	17,3	1,25
18,3 ± 0,1	0,55	18,2	0,51
18,6 ± 0,2	1,08	18,2	2,20
17,2 ± 0,2	1,16	17,5	1,59
18,4 ± 0,2	1,09	18,3	0,27
19,0 ± 0,1	0,53	18,2	4,24
18,8 ± 0,1	0,53	18,5	1,66

Notas: (a) valores de referência com a estimativa dos desvios padrões. Valores determinados em triplicata

(b) Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*) – RSD

2.5 Conclusões da primeira aplicação

No caso desta aplicação desenvolvida para determinação dos parâmetros de qualidade do mel, acidez, açúcares redutores e umidade podemos concluir:

- a utilização da espectroscopia de infravermelho médio com calibração multivariada baseada em mínimos quadrados parciais com técnicas de seleção de variáveis tornou possível o desenvolvimento de modelos de calibração que apresentaram valores de previsão satisfatórios para os parâmetros de

qualidade do mel, acidez, açúcares redutores e umidade;

- as técnicas de seleção de variáveis estudadas produziram resultados irrelevantes para o caso da acidez e dos açúcares redutores, uma vez que para estes parâmetros a informação está distribuída sobre toda a faixa do espectro. Entretanto, para a umidade, foi necessário utilizar as duas técnicas de seleção de variáveis (por intervalo e algoritmo genético), concomitantemente, para se obter um modelo de calibração satisfatório.

Capítulo 3

Determinação de cor em amostras de mel

3. Determinação de cor em amostras de mel

A cor é uma propriedade, nos produtos alimentícios, que tem grande influência na decisão do consumidor na hora da compra. Com o mel isto não é diferente. Este parâmetro é normalmente determinado devido a uma demanda do mercado consumidor e é regulamentado pela legislação de vários países. Méis de cores mais claras geralmente tem sabores mais moderados e os com cores mais escuras tendem a ter sabores mais fortes. O método de referência de determinação de cor baseia-se na comparação visual da amostra de mel com um padrão de cor âmbar construído de vidro em forma de cunha, denominado método Pfund [61,62]. No método Pfund, a amostra é deslocada ao longo do padrão de cor até o ponto onde a cor da amostra iguala-se a cor do padrão. A cor do mel é expressa como a distância em milímetros ao longo do padrão de cor, mm Pfund. A cor do mel pode ser determinada através de outros métodos como por exemplo o método adotado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [49], AOAC Official Method 985.25 – Color Classification of Honey, que utiliza o comparador de cor Lovibond 2000 (The Tintometer Co., Busch Corporate Center, 309A McLaury Circle, Williamsburg, VA 23185). Existe ainda o método que se baseia na medida de transmitância em comprimentos de onda selecionados [62]. Neste último método, apesar da vantagem de ser um método instrumental que não está sujeito a subjetividade de um olho humano, bolhas e materiais em suspensão nas amostras interferem nos resultados da medida. Na Tabela 12 podemos ver as escalas de cores de mel segundo a legislação dos Estados Unidos da América.

Tabela 12 - Escalas de cores de mel

Nome da Cor	Escala Pfund	Densidade Ótica
Branco água	< 8	0,0945
Branco extra	9-17	0,189
Branco	18-34	0,378
Ambar extra claro	35-50	0,595
Ambar claro	51-85	1,389
Ambar	86-114	3,008
Ambar escuro	>114	-

Nota: densidade ótica = absorvância a 560 nm para uma solução de caramelo em glicerina com 3,15 cm de caminho ótico utilizando glicerina pura como branco.

Fonte: USDA – United States Standards for Grades of Extracted Honey, 1985 [61]

3.1 *Análise multivariada de imagens*

Segundo definido por Geladi e Grahn (1996), imagem é uma reprodução de um objeto real ou cena, preservada em um meio. Podemos citar como exemplos de imagens: uma pintura a óleo, uma aquarela, uma fotografia, uma escultura. Para propósitos científicos, as imagens sempre são realizadas com o objetivo de expressar algumas propriedades do objeto ou cena de interesse [63]. Para que uma imagem seja utilizada em trabalhos científicos esta deve ser expressa como uma função matemática, no entanto, esta função matemática é, em geral, extremamente complexa para uma imagem contínua o que torna sua obtenção e tratamento tarefas de difícil execução. Deste modo, a função matemática contínua que descreve a imagem é convertida em uma função discreta através da digitalização da imagem. No processo de digitalização uma imagem contínua é transformada em uma imagem digital que consiste em uma estrutura quadriculada onde cada quadrado recebe o nome de *pixel* o qual possui um valor de intensidade correspondente. Os *pixels* podem ter perfil quadrado, retangular ou qualquer outro formato, mas, normalmente são utilizados *pixels* quadrados. As imagens digitais podem ter duas dimensões (2D) mas podem ter três ou mais dimensões (3D e 4D), por exemplo, imagens de ressonância magnética nuclear ou imagens 3D evoluindo ao longo do tempo. O número de *pixels* de que é formada a imagem digital define a resolução espacial desta. Normalmente são utilizados valores de resolução espacial de

256x256, 512x512, 1024x1024, 2046x2046 pixels. Quando o valor de resolução espacial é muito reduzido, em torno de 32x32 pixels, as imagens perdem muito da definição e se transformam em uma coleção de quadrados. A resolução da intensidade de um *pixel* numa imagem digital pode ter vários valores dependendo da área de aplicação. Por exemplo: para imagens radiológicas na área médica, historicamente, tem-se utilizado valores inteiros de intensidade variando de 0 a 4095; para imagens químicas são utilizados valores reais com precisão decimal de até 8 dígitos; para imagens fotográficas são utilizados valores inteiros de 0 a 255. Deve-se ter em mente que quanto maiores forem as resoluções espacial e de intensidade de uma imagem digital, maiores serão os recursos computacionais necessários para seu processamento.

No processo de aquisição das imagens científicas são utilizadas uma das três técnicas: projeção, varredura ou tomografia. Alguns métodos são uma combinação de projeção e varredura. A projeção é a técnica normalmente usada na obtenção das fotografias e consiste na projeção da cena, através de uma objetiva, num material sensível a radiação ou detector. Os métodos que utilizam a projeção possuem a desvantagem de produzir imagens com aberrações provenientes da objetiva. Estas aberrações podem ser conhecidas e controladas mas nunca eliminadas completamente. Na técnica de escaneamento o objeto a ser estudado é colocado entre a fonte de radiação e o detector. O objeto (ou detector, ou então a fonte de radiação) é movido ao longo da região que se deseja estudar. A imagem é construída registrando-se a resposta do detector e a respectiva posição do objeto. Nesta técnica pode ser utilizado um único detector ou então múltiplos detectores. As vantagens desta técnica em relação à projeção são a eliminação das aberrações da objetiva e um controle melhor da radiação incidente (iluminação). A terceira técnica de obtenção de imagens é a tomografia. Nesta técnica é medida a atenuação linear da radiação proveniente da fonte pelo objeto. Mudando-se o caminho que a radiação percorre ao longo do objeto obtêm-se várias medidas de atenuação que são utilizadas na construção da imagem do volume. Nesta técnica é possível a obtenção de imagens tridimensionais. A tomografia pode ser baseada, também, na radiação emitida pelo interior do objeto ou então nos gradientes do campo magnético no interior do objeto. Pode ser utilizado um detector único ou múltiplos detectores. Exemplos de aplicações da tomografia são: a de raios X

e a por ressonância magnética nuclear [63].

O conceito de imagem multivariada está ligado a presença de vários canais (respostas) para o valor de intensidade do *pixel* [64,65] e seu desenvolvimento surgiu com o uso de imagens coloridas na microscopia ótica e continuou com a introdução de imagens espectrais nas várias áreas da ciência. Uma imagem multivariada consiste no empilhamento de imagens onde cada uma é medida a um diferente comprimento de onda ou energia. Desta maneira, uma imagem multivariada 2D é, normalmente, apresentada como matriz de terceira ordem e é o caso mais simples de imagem multivariada. Para imagens tridimensionais, a matriz passa a ser de quarta ordem. Se o experimento é realizado com acompanhamento ao longo do tempo, a matriz que descreve o sistema passa a ser de quinta ordem. Na representação da matriz de uma imagem multivariada utiliza-se letra maiúscula sublinhada, por exemplo G. As dimensões horizontal e vertical da matriz são representadas pelas letras i e j , respectivamente. A letra k é, normalmente, utilizada para representar a dimensão das variáveis de intensidade. Em imagens multi-temporais – com acompanhamento ao longo do tempo – utiliza-se a letra m para a dimensão do tempo. Em imagens tridimensionais, é utilizada a letra h , além das letras i e j , para representar a terceira dimensão. Uma característica básica de uma imagem multivariada é a congruência – um *pixel* em uma posição da cena na imagem de um dado canal deve-se encontrar na mesma posição para todos os outros canais [64]. Vários métodos podem ser utilizados para produzir imagens multivariadas. Nas Tabelas 13 e 14 estão listados métodos capazes de produzir imagens multivariadas 2D e 3D.

Tabela 13 - Métodos com capacidade de produzir imagens multivariáveis 2D (superfície)

Variável	Método	Variável	Método
Radiação eletromagnética		Ultrassom	Imagens de ultrassom
Visível e UV	Microscopia		Microscopia acústica
	Fluorescência (microscopia)	Massa atômica	Microscopia iônica (SIMS)
	Macroscopia	Energia eletrônica	Microscopia eletrônica (EELS)
	Astronomia	Gravidade	Mapeamento geofísico de MPS ^a
	Imagens de satélite	Campo magnético	Mapeamento geofísico de MPS ^a
MID e NIR	Macroscopia		
	Microscopia		
	Imagem de satélites		
	Astronomia		
Ondas de rádio	Radar		
	Astronomia		
Raios X	Microscopia eletrônica		
	PIXE		
	Microscopia de raios X		

^aMaterial particulado em suspensão no ar ambiente

Fonte: Geladi et al., 1996 [63]

Tabela 14 - Métodos com capacidade de produzir imagens multivariáveis 3D (volume)

Variável	Método
Eletromagnética	
Raios X	Tomografia de raios X
Ondas de rádio	Imagens de ressonância nuclear magnética
Visível e UV	Microscopia confocal
Marcadores químicos	Tomografia de emissão de prótons
	Tomografia computadorizada de emissão de fótons simples
Contraste químico	Imagens de ressonância nuclear magnética

Fonte: Geladi et al., 1996 [63]

Várias operações podem ser realizadas durante o processo de análise de imagens multivariadas. Quando as operações levam à formação de uma nova imagem, a transformação é chamada de processamento de imagem. Se as operações levam a

redução dos dados para chegar-se a conclusões sobre o sistema, dá-se o nome de análise de imagens. Por exemplo, em imagens médicas o resultado final da análise não é uma imagem e sim o diagnóstico do mal que aflige o paciente.

Um processamento normalmente utilizado nas imagens multivariadas é o escalamento linear ou então o escalamento não linear. O escalamento é, normalmente, conhecido como operações de pré-tratamento dos dados. Exemplos de escalamento linear são: centrar na média, escalamento pelo desvio padrão, escalamento pela variância. O escalamento não linear geralmente é aplicado quando se tem um modelo físico que apresenta uma resposta não linear. Por exemplo, muitos equipamentos medem a transmissão da energia, a transformação da resposta para absorvância seguindo a lei de Beer-Lambert, através de um escalamento logarítmico, pode ser útil se o objetivo for correlacionar os dados com a concentração de constituintes. Outra aplicação do escalamento não linear é quando a imagem apresenta um histograma assimétrico. Nestes casos, a aplicação de um logaritmo, raiz quadrada ou outros expoentes, pode levar a resultados visuais mais objetivos.

Embora imagens multivariadas sejam matrizes de no mínimo terceira ordem, devemos lembrar que pelo menos uma das dimensões é diferente das restantes. Para o caso de uma imagem 2D, por exemplo, duas das dimensões da matriz são usadas para descrever a imagem (chamadas variáveis geométricas ou variável de pixel) e a terceira é utilizada para a variável intensidade que pode ser comprimento de onda, energia do elétron, massa, etc. Isto deve ser levado em conta quando se realiza operações com as imagens. Deste modo, pode-se definir operadores ao longo da variável de intensidade ou ao longo das variáveis geométricas. Por exemplo para a média e desvio padrão calculados ao longo da variável de intensidade de uma imagem 2D temos:

$$m_k = \bar{g}_k = \frac{1}{IJ} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J g_{ijk} \quad (7)$$

$$s_k = \left(\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (g_{ijk} - \bar{g}_k)^2 \right)^{\frac{1}{2}} (IJ - 1)^{-\frac{1}{2}} \quad (8)$$

O resultado das Equações 7 e 8 é um escalar para cada imagem. Para um conjunto de imagens temos os vetores **m** e **s**. Para o caso da média e desvio padrão calculados ao longo das variáveis geométricas temos:

$$\bar{g}_{ij} = (1/K) \sum_{k=1}^K g_{ijk} \quad \text{média para o pixel [i,j]} \quad (9)$$

$$s_{ij} = \frac{1}{(K-1)} \sum_{k=1}^K (g_{ijk} - \bar{g}_{ij})^2 \quad \text{desvio padrão para o pixel [i,j]} \quad (10)$$

Juntando os resultados das Equações 9 e 10 para todos os $I \times J$ temos como resultado as matrizes **M** e **S**, que são a imagem média e a imagem de desvio padrão, respectivamente.

Quando o interesse recai sobre a variável de intensidade, e as variáveis geométricas podem ser ignoradas, a imagem pode ser reorganizada em uma matriz com dimensões menores. Por exemplo, para o caso de uma imagem multivariada, descrita por uma matriz de terceira ordem **G** de dimensões, I, J e K, pode-se rearranjar a matriz em uma nova matriz de dimensões $[I \times J]$ e K. Para a maior parte dos casos $I \times J$ é extremamente grande e K é relativamente pequeno.

$$\underline{\mathbf{G}}^{\circledast} \rightarrow \mathbf{G} \quad \text{ou o inverso} \quad \mathbf{G}^{\circledast^{-1}} \rightarrow \underline{\mathbf{G}} \quad (11)$$

Onde o símbolo $\circledast \rightarrow$ significa “reorganização” e o seu inverso $\circledast^{-1} \rightarrow$

Uma das ferramentas mais importantes no estudo de imagens multivariadas é a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*) – PCA. O cálculo do PCA de uma matriz de imagens 2D, **G**, é feito calculando-se primeiramente os *loadings* da matriz. Os *loadings* são calculados a partir do produto cruzado da matriz **G** pela inversa de **G**.

$$\mathbf{Z} = \mathbf{G}'\mathbf{G} \quad (12)$$

A matriz quadrada $\mathbf{Z}$ pode ser decomposta no produto da matriz de *loadings* $\mathbf{P}$ e uma matriz diagonal $\mathbf{D}$.

$$\mathbf{Z} = \mathbf{P}\mathbf{D}\mathbf{P}' \quad (13)$$

Os *scores* do PCA são, assim, calculados a partir dos *loadings* e a matriz reorganizada $\mathbf{G}$.

$$\mathbf{t}_a = \mathbf{G}\mathbf{p}_a \quad a = 1, \dots, A \quad (14)$$

Onde $\mathbf{p}_a$ é um vetor de tamanho $K \times 1$, e $\mathbf{t}_a$ é um vetor de dimensões $[I \times J] \times 1$. O vetor $\mathbf{t}_a$ pode ser reorganizado numa matriz $\mathbf{T}_a$ de dimensões $I \times J$, que são as dimensões da imagem original. Assim, temos uma imagem de *scores*.

$$\mathbf{t}_a \otimes^{-1} \rightarrow \mathbf{T}_a \quad (15)$$

3.1.1 Cor

A cor é uma propriedade de grande importância nas indústrias alimentícias, têxtil, fotografia, em publicações, na propaganda, e muitas outras aplicações. As cores podem ser simuladas através da mistura de três cores, chamadas primárias. Para o caso da televisão são utilizadas as cores: vermelha, verde e azul (RGB). Nos processos de impressão são, normalmente, utilizadas as cores: ciano, o carmim e o amarelo. Nas telas de computador, as cores são, normalmente, representadas pela combinação de três imagens univariadas. Uma para o vermelho, uma para o verde e uma para o azul. Isto significa que cada *pixel* é representado por três *bytes* de oito *bits* cada, totalizando 24 *bits*. Como um *byte* pode expressar inteiros entre 0 e 255, teremos um total de $256 \times 256 \times 256$, ou seja, $16\,777\,216 \times 10^6$ combinações possíveis de cor. Na análise de

imagens, geralmente, é realizada a decomposição da imagem colorida em imagens de cores primárias gerando três imagens que serão processadas como uma imagem multivariada.

3.2 Parte experimental

Para realização desta aplicação utilizou-se 54 amostras de mel com cores variando em toda a extensão da escala de cores Pfund. Foram obtidas imagens, das 54 amostras de mel, no formato Target Image File Format (tiff) de 24 bits e resolução de 600 x 600 dpi, por meio de um equipamento de *scanner* de mesa marca Canon, modelo CanoScan D646U. A obtenção das imagens foi realizada utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico que foi preenchida com a amostra de mel e posicionada sobre o *scanner* dentro de um suporte de cor branca. O suporte teve como funções: manter a cubeta em uma posição fixa sobre o *scanner*, impedir a entrada de iluminação de outras fontes de luz que não fossem proveniente do *scanner* e homogeneizar a iluminação da amostra pelo *scanner*. O suporte foi construído esculpindo-se uma cavidade do tamanho da cubeta em um bloco de isopor de aproximadamente 10 x 5 x 5 cm. Em seguida, revestiu-se o suporte com papel branco para homogeneizar a superfície deste. A Figura 6 mostra um exemplo de imagem obtida com o sistema construído.

De cada imagem obtida foram selecionadas duas regiões de 100 x 100 pixels. A primeira região foi escolhida de um local da imagem onde a amostra estivesse límpida, sem ocorrência de bolhas, cristalizações ou material em suspensão. A segunda região foi escolhida onde a amostra estivesse com aparência não límpida, com ocorrência de bolhas ou materiais em suspensão. Deste modo foram construídos dois novos grupos de imagens com 100 x 100 pixels: o primeiro com imagens de regiões límpidas das amostras e o segundo com imagens de regiões não límpidas com ocorrência, principalmente, de bolhas. A partir de cada grupo foi construída uma matriz de dados para construção do modelo de calibração. A seleção de duas regiões distintas para cada amostra teve como objetivo verificar a viabilidade de utilização do método para

amostras com presença de bolhas e materiais em suspensão. A seleção das regiões foi realizada utilizando-se o programa de edição de imagens GIMP versão 2.2.6 [65].



Figura 6 - Exemplo de imagem obtida utilizando montagem construída com scanner, suporte e cubeta

Para construção da matriz de dados cada imagem de 100 x 100 pixels foi importada para o ambiente de trabalho do Matlab versão 6.5 [55] gerando um tensor de dimensões {100,100,3} – o número 3 corresponde as variáveis R (vermelho), G (verde) e B (azul). Os dados na matriz podendo assumir valores inteiros entre 0 e 255 (imagem de 24 bits). Este tensor foi desdobrado numa matriz com dimensões {(100x100),3}. A partir desta matriz foram criadas novas variáveis descritas a seguir, utilizando-se procedimentos algébricos, seguindo a metodologia de A. Antonelli et al. [66]. Primeiramente determinou-se a luminosidade (L) que é a soma de R, G e B ($R+G+B$). Em seguida, determinou-se as cores relativas (RR, RG e RB) dividindo-se o correspondente valor (R, G ou B) pela luminosidade. A cor relativa é uma variável que indica mais fortemente a presença de uma cor em um *pixel* do que o valor absoluto desta. Por exemplo, a variável vermelho pode ter um valor absoluto de 255 quando se têm a cor vermelha ($R=255, G=0, B=0$), a branca ($R=255, G=255, B=255$), a amarela ($R=255, G=255, B=0$), etc. Deste modo, um alto valor de R não significa necessariamente que o pixel será vermelho. No caso das cores relativas, quanto maior o valor de RR maior será a proximidade da cor do pixel com o vermelho. As próximas variáveis calculadas foram a cor, a saturação e a intensidade (HSI) obtidas através da

função `rgb2hsv` do Matlab. A intensidade é calculada como o valor máximo entre R, G e B e a saturação é a relação da diferença entre o máximo e mínimo de RGB e o máximo de RGB.

$$I = \max(R, G, B) \quad (16)$$

$$S = \frac{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)}{\max(R, G, B)} \quad (17)$$

O valor de H é definido por um algoritmo complexo de difícil representação analítica. H varia de 0 a 1 com a cor correspondente indo do vermelho, passando pelo amarelo, verde, ciano, azul, magenta e voltando novamente ao vermelho.

Na sequência foram obtidos os scores do PCA da matriz RGB (SC1RAW, SC2RAW, SC3RAW), os scores do PCA da matriz RGB centrada na média (SC1MC, SC2MC, SC3MC), e os scores do PCA da matriz RGB auto-escalada (SC1AS, SC2AS, SC3AS). Após obtenção das novas variáveis descritas acima, criou-se um vetor com comprimento 256, contendo os valores de frequência de cada uma dessas variáveis. Para isto identificou-se a faixa de valores possíveis para cada variável; por exemplo, a faixa de 0 a 255 foi utilizada para a variável R, mesmo que os valores 0 e 255 não estivessem ocorrendo. Finalmente, alinhou-se os vetores de frequências para obtenção de um vetor de distribuição de frequências obtendo-se assim o chamado colorgrama (Figura 7) de comprimento igual a $(256 \times 19) = 4864$ pontos.

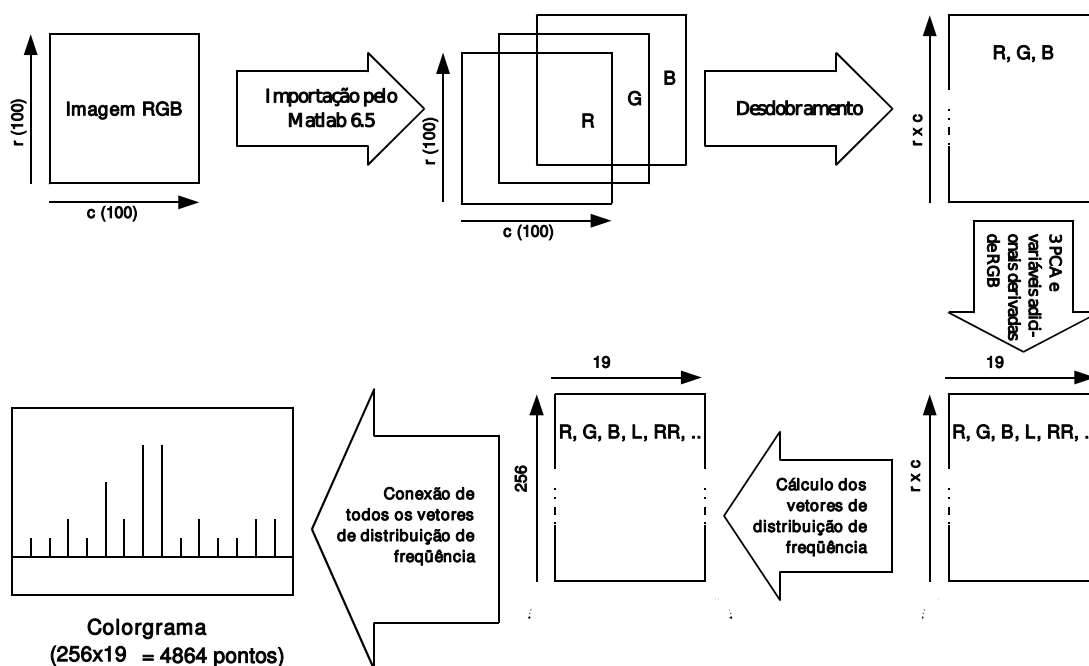


Figura 7 - Esquema da construção do colorograma a partir da imagem RGB

Fonte: A. Antonelli et al, 2004. [66]

Após a criação das duas matrizes de dados composta com os colorogramas de cada imagem 100 x 100 pixels, a primeira matriz referente às imagens das regiões límpidas das amostras e a segunda referente às regiões não límpidas, fez-se uma calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS) dos vetores de distribuição de frequência obtidos contra os valores de referência de cor de mel para cada matriz de dados. Foram obtidos, assim, dois modelos de calibração, um para imagens de regiões límpidas e outro para imagens de regiões não límpidas. Para construção de cada modelo de calibração foram utilizados 41 colorogramas. Cada modelo foi validado com um grupo de 13 colorogramas. A separação dos colorogramas em grupos de calibração e validação foi realizada retirando-se um colorograma a cada grupo de três na seqüência do valor de referência de cor. Para criação dos modelos de calibração utilizou-se o PLS Toolbox versão 3.5 para Matlab da Eigenvector Research Inc. [56]. Foram criados, também, modelos com seleção de variáveis por intervalo – iPLS. Várias combinações de divisões do colorograma foram experimentadas, sempre dividindo em intervalos apresentando um número de variáveis múltiplos de 256. Foram experimentados também combinações de intervalos não seqüenciais dentro do colorograma. A criação dos modelos iPLS foi realizada utilizando o iToolbox versão de

julho 2004, criado por L. Norgaard da The Royal Veterinary and Agricultural University [57]. Os modelos foram avaliados através do erro relativo de previsão (Equação 5), do RMSEP (Equação 6) e dos coeficientes de regressão das curvas de valores previsto versus valores de referência.

Os valores de referência de cor de mel foram obtidos, em triplicata, num Analisador de Cor de Mel, marca: Hanna Instruments, modelo: C221 Honey Color Analyser de propriedade da Natural Labor Labor Análises e Pesquisas LTDA. Segundo informações do fabricante, o analisador opera medindo a percentagem de luz transmitida pela amostra de mel comparada com glicerina líquida pura. As análises de cor foram realizadas conforme o procedimento da Natural Labor onde as leituras são realizadas em amostras límpidas, desprovidas de bolhas, materiais em suspensão ou cristalização.

O processo de obtenção das imagens das amostras foi simples e rápido. Como o equipamento utilizado não foi construído especificamente para este tipo de aplicação, foram necessárias algumas adaptações simples e de fácil execução como por exemplo a confecção do suporte para a cubeta e a disposição do *scanner* em posição vertical para que não ocorresse derramamento das amostras. Na Figura 8 estão mostrados seis das imagens obtidas (cubetas) e as respectivas imagens 100 x 100 pixels de regiões límpidas e não límpidas para criação dos modelos de calibração.

A criação do vetor de distribuição de frequências diminuiu consideravelmente a quantidade de variáveis utilizadas para descrever as amostras. De um sistema tridimensional com 30000 (100 x 100 x 3) variáveis para cada amostra obteve-se um vetor de apenas 4864 variáveis. Neste processo de transformação de variáveis é perdido a informação de geometria da imagem (x,y). Entretanto, a informação relativa a cor, que é a informação utilizada nesta aplicação, não é perdida. A Figura 9 apresenta um exemplo do vetor de distribuição frequências para uma imagem 100 x 100 pixels de uma amostra de mel.



Figura 8 - Exemplos de imagens obtidas de amostras de mel e respectivas imagens de 100 x 100 pixels selecionadas

As imagens de 100 x 100 pixels (quadrados) superiores correspondem as regiões límpidas e as inferiores as regiões não límpidas

Os modelos PLS criados apresentaram bons resultados de previsão durante o processo de validação. Verifica-se pela Tabela 15 que o maior erro relativo de previsão foi de 10,2% para o modelo utilizando amostras límpidas e 16,3% para o modelo das amostras não límpidas. Para o parâmetro sendo determinado, este erro é aceitável, uma vez que a cor do mel é definida em intervalos de várias unidade de cor. Este erro pode ser significativamente melhorado com a construção de um equipamento específico para esta aplicação onde o controle da iluminação seja mais efetivo e o suporte da amostra possua uma superfície mais homogênea.

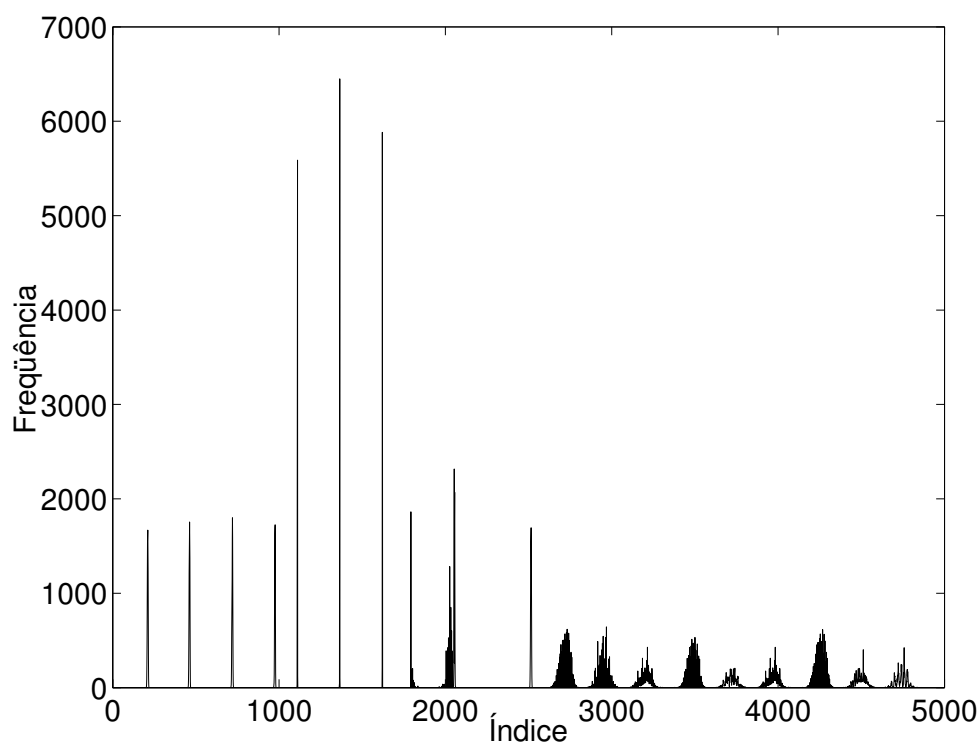


Figura 9 - Vetor de distribuição de frequências (colorograma) típico de uma amostra de mel

Na Tabela 16 apresentamos os indicadores estatísticos dos modelos de calibração criados. Verifica-se pelos resultados que os métodos apresentam um desempenho semelhante. Este fato evidencia a possibilidade de realizar-se as amostragens em amostras que possuam bolhas e quantidades pequenas de materiais em suspensão. Isto torna o método mais rápido e fácil e mostra que é mais robusto que o método de absorção da luz que não pode ser aplicado para amostras nestas condições.

Tabela 15 - Valores de referência de cor de mel e valores previstos pelos modelos calibração

Referência mmPfund	Modelo PLS amostras límpidas		Modelo PLS amostras não límpidas	
	Previsto mmPfund	Erro relativo %	Previsto mmPfund	Erro relativo %
72	76	6,3	75	3,6
88	89	1,3	87	0,6
104	100	4,3	98	5,7
116	119	3,0	120	3,4
36	39	9,4	34	4,4
34	36	4,5	31	8,5
51	48	5,8	49	4,5
62	58	7,5	52	16,3
76	80	5,9	76	0,2
77	79	2,4	78	1,6
83	83	0,3	83	0,1
131	118	10,2	123	6,2
130	129	0,6	128	1,3

Tabela 16 - Indicadores estatísticos dos modelos de calibração de cor em mel

Indicator	PLS amostras límpidas	PLS amostras não límpidas
Número de variáveis latentes	5	4
RMSEP (mmPfund)	4,82	4,36
Erro relativo mínimo (%)	0,29	0,13
Erro relativo máximo (%)	10,2	16,3
Erro relativo médio (%)	4,7	4,3
R^2	0,977	0,984

As figuras a seguir (Figuras 10 e 11) apresentam os gráficos de valores previstos versus valores de referência obtidos para cada um dos modelos. Verifica-se pelas figuras que ocorreu boa correlação entre os valores de referência e de previsão e que

os dados estão pouco dispersos mostrando que o método apresenta boa precisão.

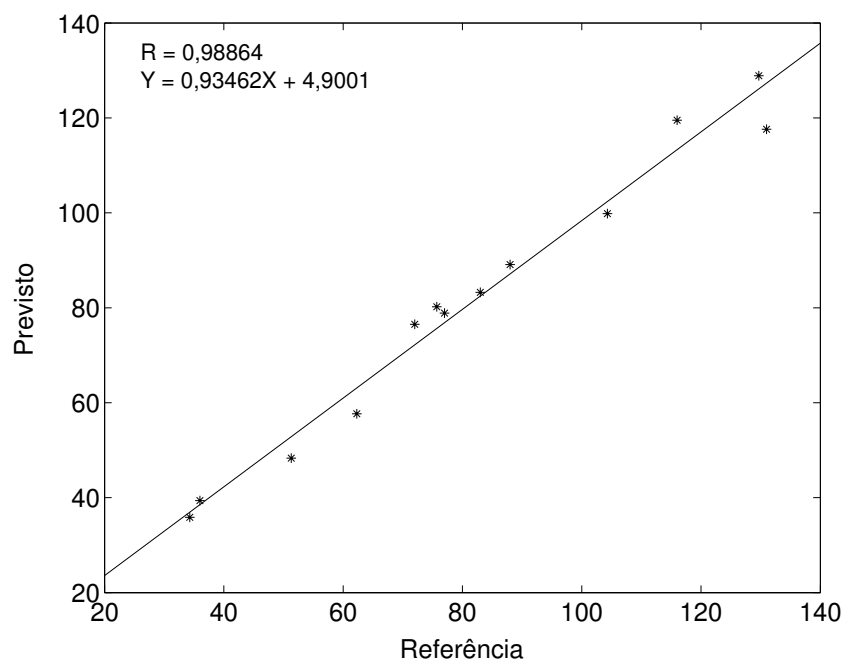


Figura 10 - Gráfico de Valores Previstos versus Valores de Referência para o modelo PLS utilizando amostras límpidas

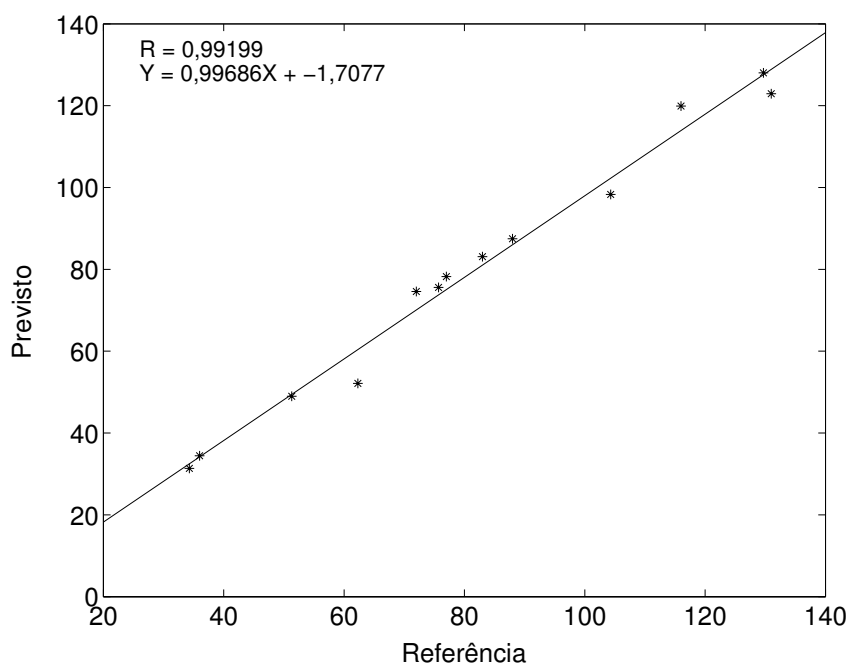


Figura 11 - Gráfico de Valores Previstos versus Valores de Referência do modelo PLS para amostras não límpidas

3.3 Conclusões da segunda aplicação

Os resultados obtidos nesta aplicação nos permitem concluir:

- a utilização da análise multivariada de imagens junto com iPLS para a quantificação do índice de cor do mel apresentou resultados satisfatórios mostrando-se como uma ferramenta viável para determinação deste parâmetro;
- o método foi aplicável a amostras com presença de bolhas apresentando o mesmo desempenho de quando é utilizado em amostras límpidas;
- o método mostrou-se mais robusto quando comparado com o método que utiliza o princípio de absorção de luz a um dado comprimento de onda já que este último não pode ser utilizado com amostras apresentando bolhas;
- a precisão do método deve melhorar com o uso de um equipamento especialmente desenvolvido para o fim a que se destina, com melhoramentos na iluminação, suporte da amostra e utilização de um melhor sistema ótico;
- em estudos futuros é aconselhável testar o desempenho do método para amostras contendo teores maiores de impurezas em suspensão;
- seria aconselhável, também, a comparação do método desenvolvido com métodos de determinação de cor que procedam comparação entre cores como, por exemplo, o método Pfund.

Capítulo 4

Classificação de própolis utilizando fluorescência de raios X com luz síncrotron e PLS-DA

4. Classificação de própolis utilizando fluorescência de raios X com luz síncrotron e PLS-DA

Nesta aplicação foi desenvolvido um método analítico para determinar a concentração elementar semi-quantitativa em amostras de própolis e a identificação da tipagem usando fluorescência de raios X com luz síncrotron (*Synchrotron X-ray Fluorescence*) – SXRF, parâmetros fundamentais (FP) e análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais – PLS-DA. Comparada com as técnicas cromatográficas normalmente utilizadas para determinação da tipagem da própolis bruta, esta metodologia é mais rápida, menos laboriosa e não exige a utilização de solvente. Apesar do custo e disponibilidade da SXRF ser elevado e pouco disponível é demonstrado pelos resultados obtidos que a metodologia pode ser executada utilizando um equipamento de raios X comum de bancada por energia dispersiva o que torna a técnica de custo e disponibilidade semelhante ao custo das técnicas de cromatografia.

4.1 Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais – PLS-DA

O método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) [67] tem tido um considerável sucesso como ferramenta de classificação. Isto se deve principalmente porque, para a grande maioria dos casos, a variabilidade entre os grupos é maior que a variabilidade dentro dos grupos. Quando a variabilidade dentro do grupo é maior que a variabilidade entre grupos o método SIMCA não conseguirá distinguir entre os grupos. Para estes casos o método de análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) – PLS-DA tem sido uma alternativa. O método PLS-DA [68] é um método multivariado utilizado para classificação de amostras onde é necessário redução de variáveis e não está claro se as diferenças entre grupos irão dominar a variabilidade total das amostras. O bloco y num modelo PLS-DA indica a classe ao qual a amostra pertence. Quando se têm duas classes a serem discriminadas utiliza-se o método PLS1. Neste caso existe uma

variável independente y que pode assumir os valores 0 ou 1. Para o caso onde três ou mais classes estão presentes utiliza-se o método PLS2. A variável dependente é uma matriz com um número de colunas igual ao número de classes e assumindo valores iguais a 0 ou 1 indicando se a amostra pertence ou não a classe. Por exemplo, no caso de quatro classes e a amostra pertencendo à classe 2 o valor de y para esta amostra será $y = \{0 \ 1 \ 0 \ 0\}$ [38]. Os valores previstos pelo modelo PLS-DA serão idealmente os valores zero e um, entretanto, na prática estes valores se aproximam destes. É calculado um valor limite entre os valores previstos onde valores acima deste valor limite indicam que a amostra pertence à classe modelada. Valores previstos abaixo deste limite indicam que a amostra não pertence à classe modelada. O modelo permite ainda o cálculo da probabilidade da amostra pertencer à classe que está sendo modelada.

4.2 Fluorescência de raios X com luz síncrotron

A fluorescência de raios X é classificada como uma técnica de emissão atômica. A técnica baseia-se na retirada (ionização) de elétrons das camadas internas da nuvem eletrônica dos átomos, por meio da incidência de raios X ou partículas com alta energia. Isto irá criar vacâncias de elétrons nestas camadas que serão preenchidas através de decaimento dos elétrons das camadas mais externas, com a conseqüente emissão de energia eletromagnética na região dos raios X. As energias dos raios X emitidos são características para cada átomo. Assim, através da medida de radiação emitida, é possível a identificação e quantificação dos elementos presentes na amostra. A técnica de fluorescência de raios X possui inúmeras vantagens quando comparada com outras técnicas analíticas. O procedimento normalmente é não destrutivo, encontrando assim aplicações em várias áreas onde os objetos têm um grande valor comercial ou histórico, como por exemplo, em artes e arqueologia. A análise é completada em alguns minutos e é multi-elementar. As principais desvantagens da técnica estão relacionadas aos custos dos equipamentos e à baixa sensibilidade quando comparada a outros métodos concorrentes. Apesar de já existirem métodos utilizando fluorescência de raios X que alcançam limites de detecção comparáveis com outras técnicas espectrométricas - por

exemplo a fluorescência de raios X utilizando reflexão total - a maior parte dos procedimentos trabalham com uma faixa de concentração de 0,01 a 100% [69]. Na técnica de fluorescência de raios X com Luz Síncrotron, é utilizado uma fonte de luz síncrotron como meio de ionização dos átomos (fonte de raios X incidente). A principal característica dessa fonte está na alta intensidade do feixe possibilitando assim um grande aumento de sensibilidade.

4.3 Parte experimental

Nesta aplicação foram utilizadas um total de 126 amostras de própolis bruta coletadas de colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera*. As amostras foram produzidas nos estados brasileiros do Paraná e Minas Gerais e consistiam de duas tipagens distintas. As amostras do Paraná eram provenientes da cidade de Cruz Machado e foram produzidas pelo mesmo produtor. As amostras de Minas Gerais eram originárias de várias cidades espalhadas pelo estado e foram recolhidas por dois distribuidores distintos. A tipagem das amostras de própolis utilizadas foi previamente determinada por Marcucci [70] utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e análise estatística multivariada.

A preparação das amostras consistiu de moagem criogênica em nitrogênio líquido seguido de separação granulométrica entre 100 e 200 mesh utilizando peneiras de aço inoxidável. Entre cada preparação de amostra, o material utilizado foi limpo, primeiramente, através de um enxague com álcool comercial, seguido de lavagem com detergente e finalmente enxague com água destilada e secagem no ambiente. De cada amostra foi pesado exatamente, cerca de 0,5000 g que foram prensados em um pastilhador de aço inoxidável para formar uma pastilha de 13 mm de diâmetro. Os espectros de fluorescência de raios X foram obtidos na linha D09B – XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS. Cada amostra foi irradiada em triplicata em três posições diferentes com um feixe de luz síncrotron com dimensões de 1x1 mm. Foi utilizada a geometria de excitação convencional de 45° um detector de Ge ultra-puro e um tempo de aquisição de 200 s para cada espectro. Como as amostras de

própolis apresentam uma alta concentração de elementos leves, foi instalado um filtro de alumínio entre a fonte de luz síncrotron e a amostra. Este procedimento teve como objetivo diminuir a intensidade do feixe de luz síncrotron para comprimentos de onda maiores e, conseqüentemente, a radiação espalhada pela amostra.

Os espectros obtidos foram tratados utilizando o programa Quantitative X-ray Analysis System - QXAS da Agência Internacional de Energia Atômica (*International Atomic Energy Agency*) – IAEA [71]. As determinações semi-quantitativas foram feitas usando o módulo de parâmetros fundamentais do QXAS. O modelo de parâmetros fundamentais construído foi calibrado utilizando-se uma amostra de referência de própolis que foi preparada misturando-se alíquotas iguais de todas as amostras de própolis utilizadas no experimento. Com isto, buscou-se ter uma matriz representativa do conjunto completo das amostras. As concentrações elementares da amostra de referência foram previamente determinadas por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) – ICP OES e por análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN). Para análise por ICP OES um grama de amostra foi digerida com 20 mL de HNO_3 concentrado com aquecimento. Durante o processo de digestão foi adicionado H_2SO_4 e HNO_3 1:1 a medida do necessário sempre antes da secagem da solução até a destruição completa da parte orgânica. Finalmente a solução foi levada à seco e foi completada para balão de 10,0 mL com HNO_3 . As análises de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um analisador CHN da Perkin Elmer. Todas as análises elementares foram realizadas nos laboratórios da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais.

O tratamento quimiométrico dos dados foi realizado utilizando-se o Matlab 6.5 da Mathworks [55] e o PLS-Toolbox 3.5 da Eigenvector Research Inc [56]. A análise qualitativa dos espectros de SXRF mostrou a presença dos elementos químicos fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, titânio, vanádio, cromo, manganês, ferro, níquel, cobre, zinco, bromo, rubídio, estrôncio, ítrio e bário. A Figura 12 mostra um espectro de fluorescência representativo dos espectros obtidos das amostras de própolis com a atribuição das emissões dos elementos identificados.

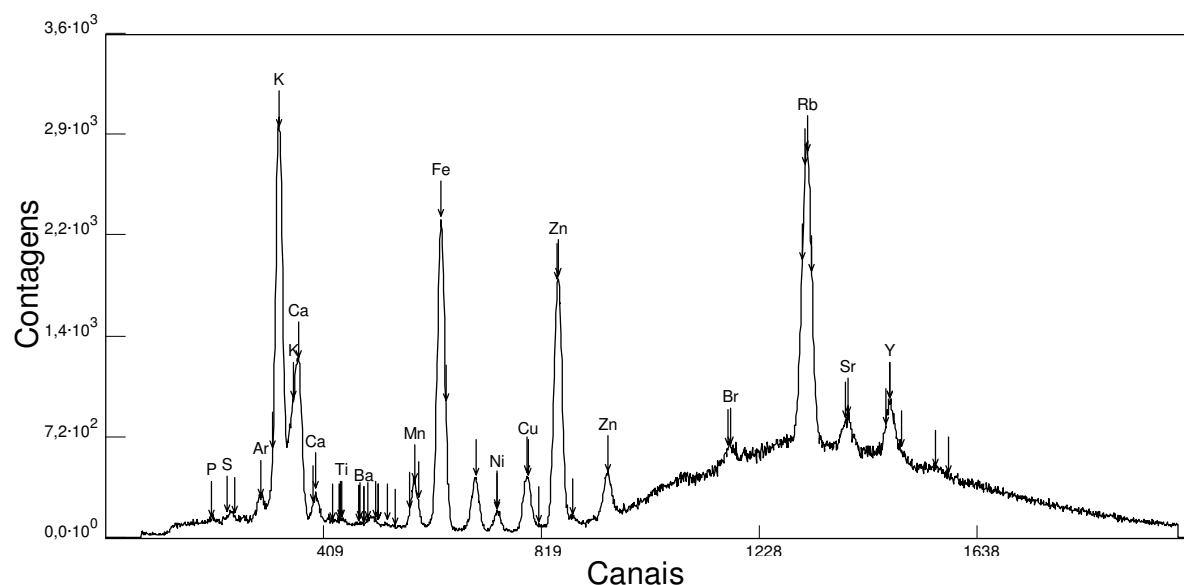


Figura 12 - Espectro de fluorescência de raios X de uma amostra de própolis com as principais raias de emissão dos elementos identificados

Após identificação dos elementos foi construído o modelo de parâmetros fundamentais para a análise semi-quantitativa. O modelo foi calibrado utilizando-se os valores de concentração da amostra de referência. Os resultados da análise semi-quantitativa para a amostra de referência estão mostrados na Tabela 17 junto com os valores determinados utilizando ICP OES e CHN. Para os elementos mais leves o limite de detecção da técnica de fluorescência de raios X não foi adequado. Deste modo não foi possível fazer uma análise semi-quantitativa. Para os elementos enxofre, bromo, rubídio e bário que não possuíam valores de referência o método de parâmetros fundamentais executa o cálculo usando as respostas dos outros elementos, apresentam uma incerteza maior.

Pelos dados mostrados na Tabela 17 verifica-se que existe uma grande concordância entre os dados determinados pelos parâmetros fundamentais e os valores de referência determinados por ICP OES e análise elemental, mostrando a validade do modelo para determinação semi-quantitativa. Após a criação do modelo fez-se a determinação semi-quantitativa de todas as amostras de própolis. Na Tabela 18 são apresentados os valores de concentrações em mg kg^{-1} determinados utilizando-se parâmetros fundamentais. Para alguns elementos mostrados na tabela, algumas

amostras apresentaram valores de concentração abaixo do limite de detecção do método, como o bário, cuja concentração ficou abaixo do limite de detecção em 48 amostras, o enxofre em 45 amostras, o ítrio em 62 amostras, o níquel em 16 e o titânio em 105 amostras.

Tabela 17 - Valores de concentrações elementares na amostra de própolis de referência determinadas por ICP OES, CHN e calculadas utilizando parâmetros fundamentais

Elemento	Concentrações / mg.kg¹	
	Analisadas	Calculadas por parâmetros fundamentais
Hidrogênio	7,4 ± 0,2	-
Carbono	60,5 ± 0,4	-
Nitrogênio	2,2 ± 0,2	-
Sódio	128 ± 10	-
Magnésio	1170 ± 30	-
Alumínio	155 ± 17	-
Vanádio	0,18 ± 0,02	-
Fósforo	2036 ± 144	2248 ± 187
Enxofre	-	3580 ± 386
Potássio	12100 ± 400	14000 ± 2500
Cálcio	2000 ± 60	2152 ± 320
Titânio	12 ± 2	< 34,72
Manganês	44,8 ± 0,8	47 ± 9
Ferro	147 ± 6	153 ± 31
Níquel	6,1 ± 0,6	6,3 ± 1
Cobre	9,6 ± 0,3	9,9 ± 0,6
Zinco	36 ± 2	37,1 ± 0,7
Bromo	-	1,66 ± 0,16
Rubídio	-	41 ± 3
Estrôncio	9,4 ± 0,3	9,5 ± 0,4
Ítrio	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Bário	-	17 ± 1

Tabela 18 - Concentrações em mg·kg⁻¹ dos elementos presentes em amostras de própolis determinadas utilizando FP

Elemento	Concentrações / mg·kg⁻¹		
	Mínimo	Máximo	Limite de detecção
<i>Fósforo</i>	380	10500	-
<i>Enxofre</i>	830	5600	800
<i>Potássio</i>	1020	18500	-
<i>Cálcio</i>	1030	12500	-
<i>Titânio</i>	34	240	25
<i>Manganês</i>	28	1270	-
<i>Ferro</i>	59	540	-
<i>Níquel</i>	0,24	19	0,2
<i>Cobre</i>	0,82	12	-
<i>Zinco</i>	3,1	58	-
<i>Bromo</i>	0,54	8,0	-
<i>Rubídio</i>	2,9	75	-
<i>Estrôncio</i>	2,2	35	-
<i>Ítrio</i>	0,023	0,11	0,02
<i>Bário</i>	8,0	24	6

Para realização da análise discriminante foi construída uma matriz de dados usando as intensidades das emissões $K\alpha$ e $K\beta$ (ou $L\alpha$ e $L\beta$) de cada elemento químico presente no modelo, onde cada linha da matriz de dados corresponde a uma amostra e cada coluna uma linha emissão específica. As amostras foram divididas em dois grupos: um grupo de calibração e um grupo de validação com 84 e 42 amostras, respectivamente. Os grupos foram separados utilizando-se o algoritmo de Kennard-Stone [54].

O modelo PLS-DA criado com as amostras de calibração mostrou uma variância em Y de 96,07% com quatro variáveis latentes. Na etapa de validação, o modelo foi capaz de prever corretamente a origem de todas as amostras de validação (Figura 13 e 14).

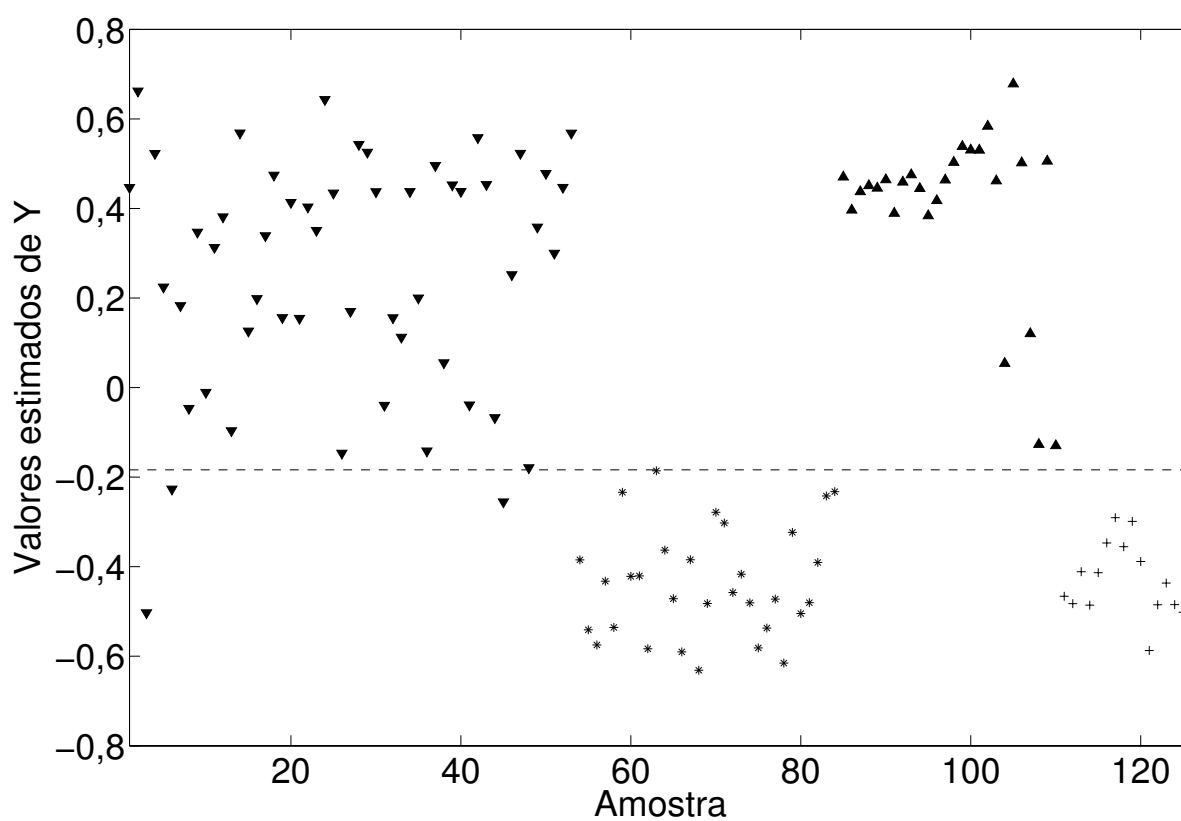


Figura 13 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA para amostras de própolis.

(▼) Amostras de calibração do PR, (*) amostras calibração MG, (▲) amostras validação PR, (+) amostras validação MG

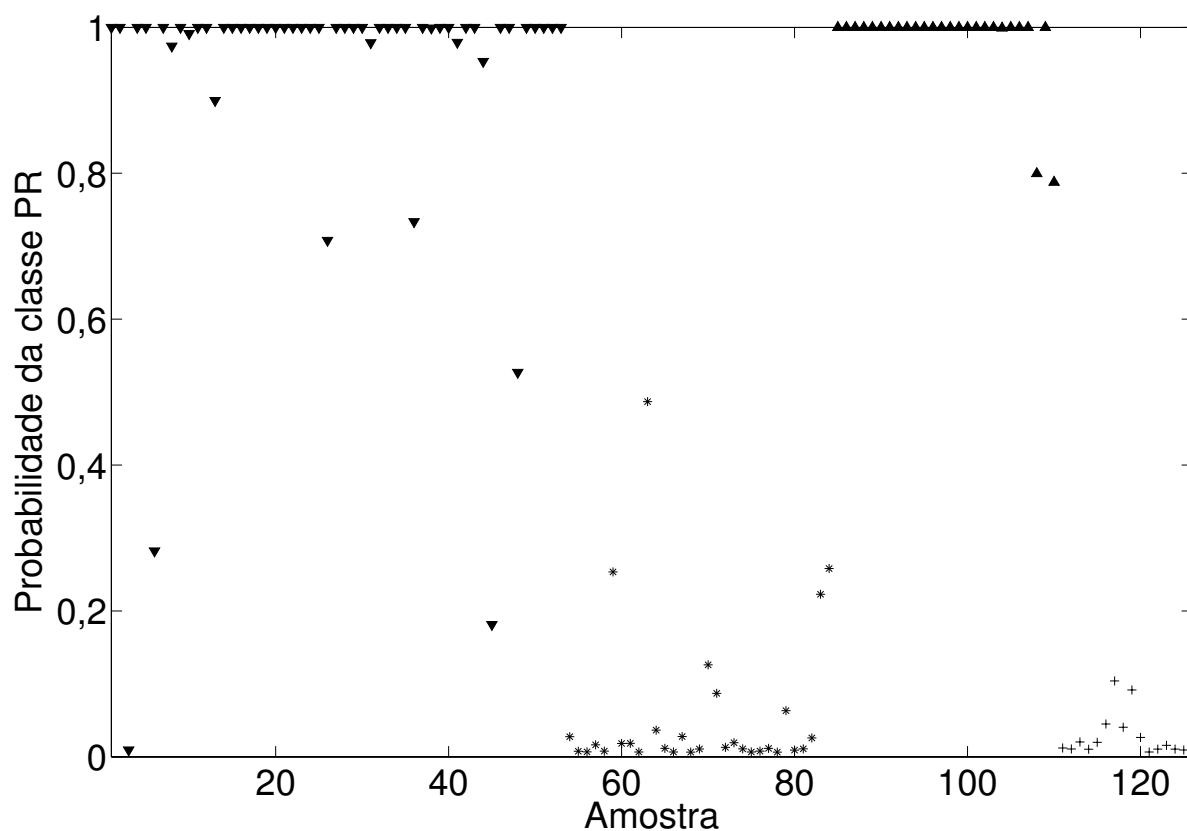


Figura 14 - Probabilidade de classificação na classe PR das amostras de própolis. (▼) amostras de calibração do PR, (*) amostras calibração MG, (▲) amostras validação PR, (+) amostras validação MG

O gráfico de *scores* do modelo PLS mostra que na primeira variável latente já ocorre a separação dos grupos (veja Figura 15). Este fato, junto com uma análise dos *loadings* da primeira variável latente que apresentaram os maiores valores para os elementos potássio, manganês, ferro, zinco, bário, rubídio e bromo (veja Figura 16), nos permitem afirmar que estes foram os elementos responsáveis pela separação dos grupos.

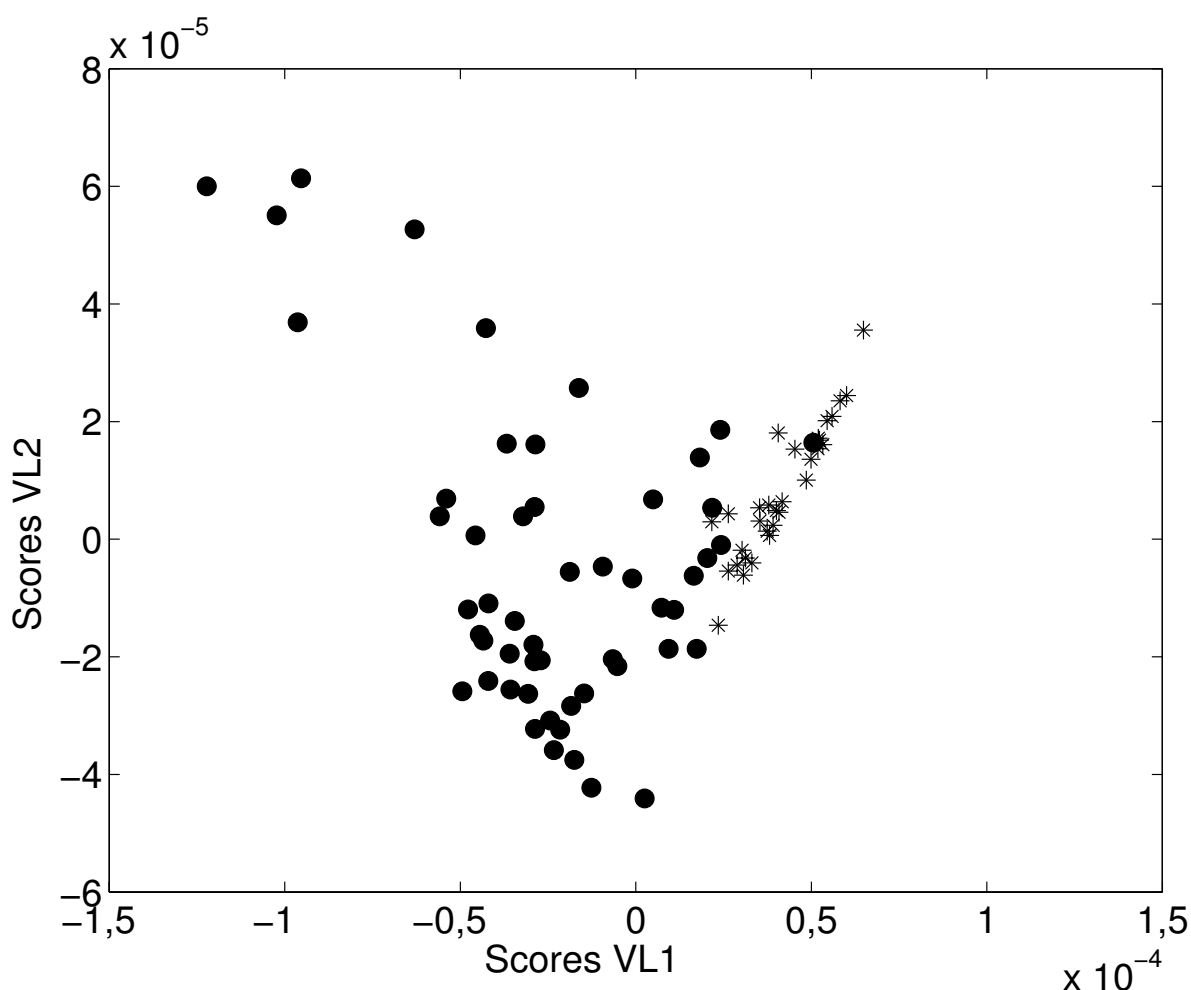


Figura 15 - Gráfico de scores da VL1 pelos scores da VL2 do modelo PLS-DA

(●) amostras de calibração do PR, (*) amostras calibração MG

Foi criado um modelo onde foram retiradas as emissões dos elementos que não eram importantes para a separação dos grupos e também os elementos cuja concentração estivesse perto do limite de detecção do método, ou seja: o enxofre, o titânio, o níquel, o ítrio e o bário. Na Figura 17 estão apresentados os valores previstos de Y para o modelo PLS-DA criado utilizando as emissões com maiores concentrações nas amostras. Verifica-se que o modelo criado usando somente as emissões dos elementos fósforo, potássio, cálcio, manganês, ferro, cobre, zinco, bromo, rubídio e estrôncio também foi capaz de prever corretamente a procedência de todas as amostras de validação. Isto pode ser confirmado através da Figura 18 que apresenta os valores de probabilidade da amostra de própolis ser classificada como procedente do Paraná utilizando este modelo PLS-DA.

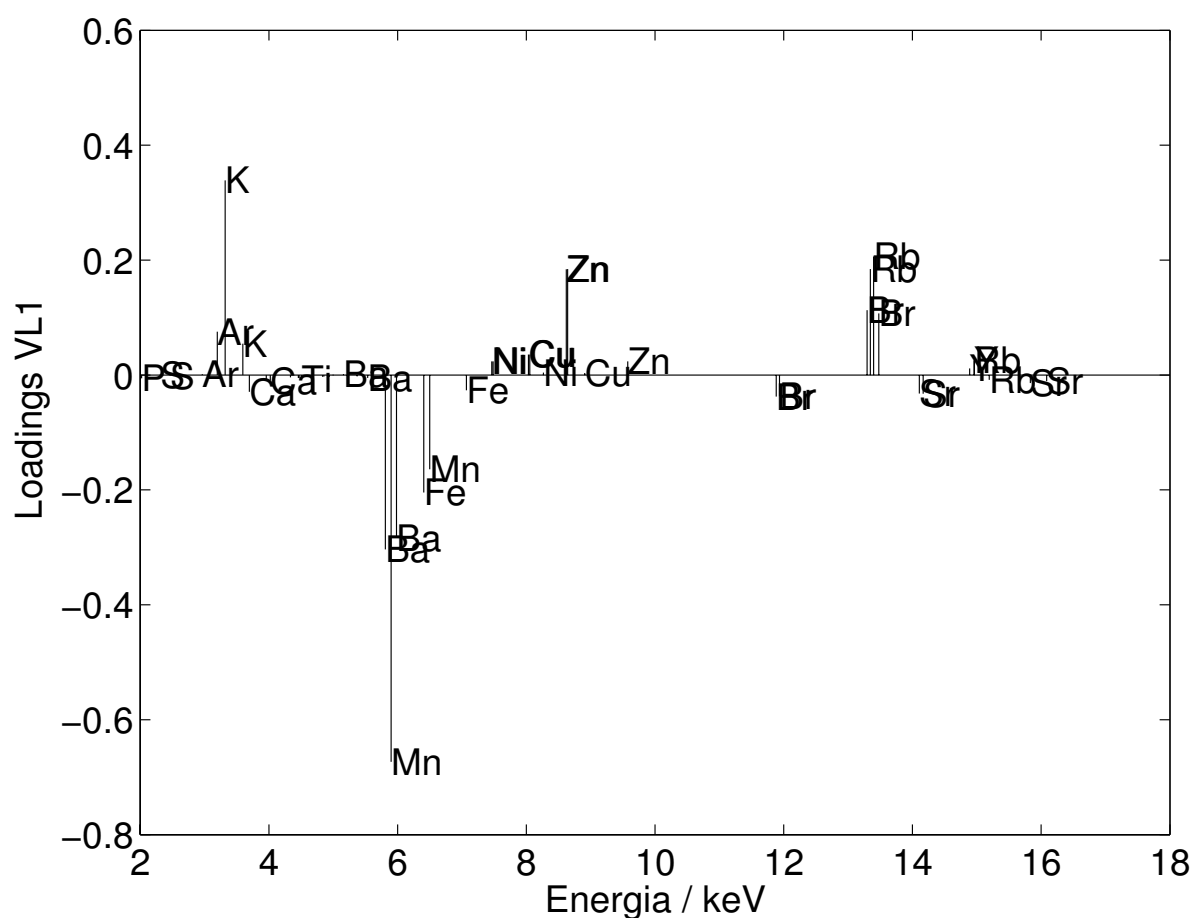


Figura 16 - Gráfico de energias pelos loadings da primeira variável latente do modelo PLS-DA

Como os elementos responsáveis pela separação dos grupos, com exceção do bário, foram identificados em todas as amostras e apresentaram teores semi-quantitativos bem acima do limite de detecção, é possível afirmar que pode ser utilizado um equipamento de fluorescência de raios X por energia dispersiva, ou então, por comprimento de onda, que utilize um tubo de raios X como fonte de excitação no lugar da técnica de fluorescência de raios X com luz síncrotron.

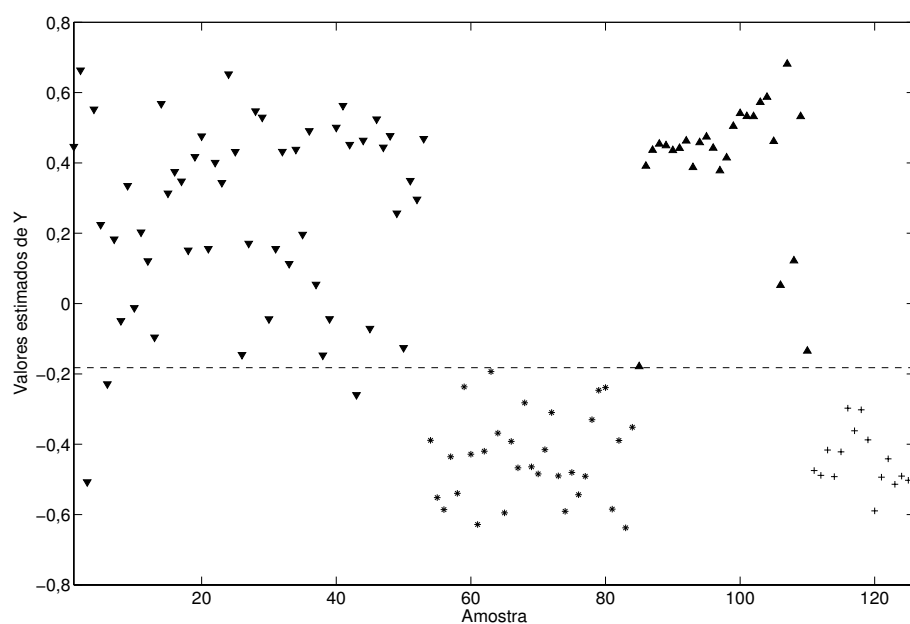


Figura 17 - Valores previstos pelo modelo PLS-DA utilizando os principais elementos identificados.

(▼) Amostras de calibração do PR, (*) amostras calibração MG, (▲) amostras validação PR, (+) amostras validação MG

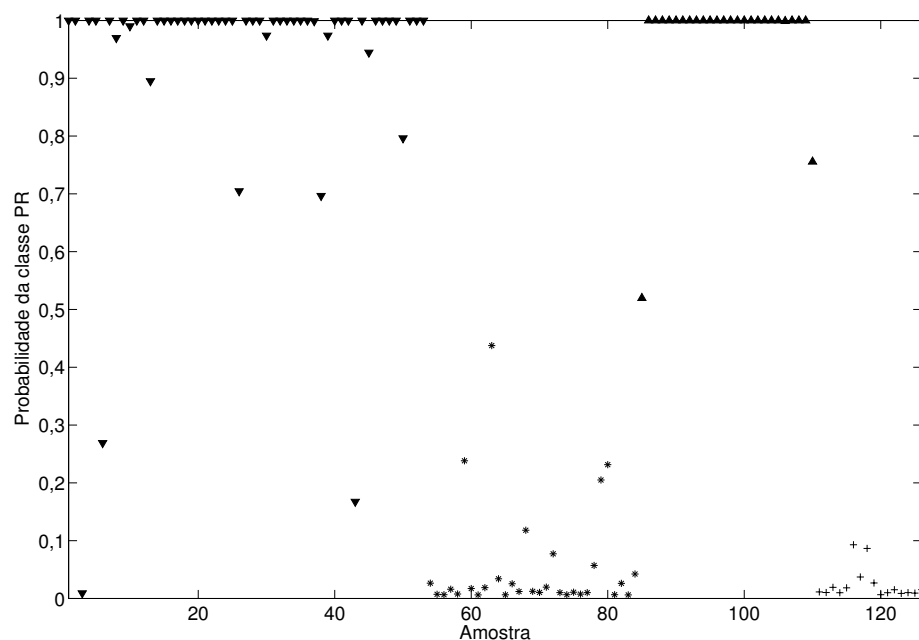


Figura 18 - Probabilidade de classificação na classe PR das amostras de própolis utilizando o modelo com os principais elementos identificados.

(▼) amostras de calibração do PR, (*) amostras calibração MG, (▲) amostras validação PR, (+) amostras validação MG

4.4 Conclusões da terceira aplicação

Para a classificação de amostras de própolis utilizando fluorescência de raios X com luz síncrotron e análise discriminante com método dos mínimos quadrados parciais os resultados obtidos nos permitem concluir:

- foi possível construir modelos de classificação capazes de prever a origem geográfica de todas as amostras utilizadas para validação do método;
- uma análise dos *scores* e *loadings* mostraram que os principais elementos responsáveis pela separação dos grupos, nas amostras estudadas, foram o potássio, manganês, ferro, zinco, bário, rubídio e bromo;
- apesar do método ter sido desenvolvido utilizando a luz síncrotron para excitação dos átomos, os teores encontrados dos principais elementos responsáveis pela separação dos grupos nos permitem afirmar ser possível a utilização da técnica de fluorescência de raios X utilizando um tubo de raios X como fonte método de excitação dos átomos para as amostras estudadas;
- em estudos futuros é recomendável que sejam realizados testes com amostras provenientes de outras regiões do Brasil e representantes de outras tipagens de própolis com o objetivo de verificar a viabilidade do método para todos os tipos de amostras de própolis.

Capítulo 5

Determinação da tipagem da própolis
utilizando espectroscopia no
infravermelho e PLS-DA

5. Determinação da tipagem da própolis utilizando espectroscopia no infravermelho e PLS-DA

Nesta aplicação foi desenvolvido um método para determinação da tipagem da própolis bruta utilizando espectroscopia no infravermelho médio com Transformada de Fourier e reflectância difusa (*Diffuse-Reflectance Infrared Fourier Transform*) – DRIFT e análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais. Até o momento não existem registros na base de dados do ISI Web of Knowledge de trabalhos utilizando espectroscopia no infravermelho para caracterização de amostras de própolis. Esta matriz tem sido caracterizada principalmente através de técnicas cromatográficas. A utilização de métodos quimiométricos associados com espectrometria no infravermelho pode ser uma técnica promissora para o estudo de amostras de própolis, tanto para análises qualitativas quanto quantitativas.

5.1 Parte experimental

Foram utilizadas 65 amostras de própolis, de quatro tipagens diferentes previamente determinadas por métodos cromatográficos e/ou espectrometria de massas. Dessas 65 amostras, doze foram retiradas de colméias de abelhas da espécie jataí (*Tetragonisca angustula*) e as restantes 53 foram retiradas de colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera*. As amostras estavam distribuídas, segundo a tipagem nos seguintes grupos: vinte amostras provenientes da cidade de Cruz Machado no estado do Paraná, vinte amostras provenientes de diversas regiões do estado de Minas Gerais, treze amostras provenientes de Cruz das Almas no Recôncavo Baiano e doze amostras provenientes do Estado de São Paulo, de abelhas da espécie *Tetragonisca angustula*.

Assim como na aplicação da classificação de própolis utilizando fluorescência de raios X, a preparação das amostras consistiu de moagem criogênica em nitrogênio líquido seguido de separação granulométrica entre 100 e 200 mesh utilizando peneiras de aço inoxidável. Entre cada preparação de amostra, o material utilizado foi limpo,

primeiramente, através de um enxague com álcool comercial, seguido de lavagem com detergente e finalmente enxaguo com água destilada e secagem no ambiente.

Os espectros de infravermelho médio com reflectância difusa da própolis bruta foram coletados na região de 428 a 5981 cm^{-1} utilizando um espectrômetro de infravermelho marca ABB Bomem, modelo MB100, com acessório para reflectância difusa DR-81 da Japan Spectroscopic Co. Ltda. Para cada amostra foram obtidos espectros em triplicata utilizando 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . Antes de cada espectro foi obtido um espectro de referência utilizando-se brometo de potássio na mesma granulometria das amostras.

Inicialmente, foi calculado, a partir dos espectros em triplicata, o espectro médio para cada amostra utilizando o programa Origin versão 7.0 da OriginLab [72]. Foi selecionada, então, a região espectral de 5980,8 a 426,3 cm^{-1} para tratamento quimiométrico. Na Figura 19 estão mostrados os espectros de reflectância difusa para as amostras de própolis na região selecionada.

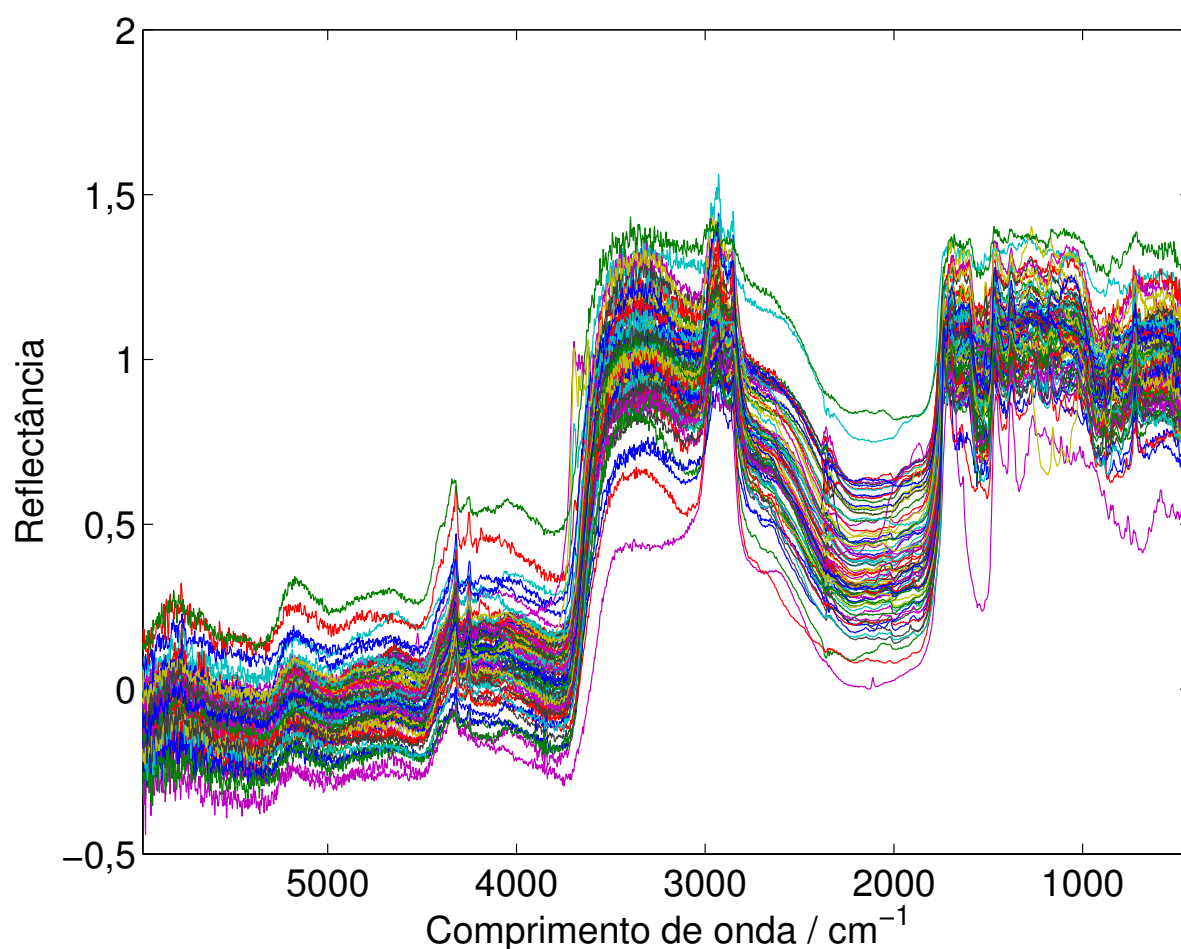


Figura 19 - Espectros de reflectância difusa de própolis na região de 5980,8 a 426,3 cm^{-1}

Os espectros se apresentavam muito ruidosos e com grande deslocamento da linha de base (ver Figura 19), deste modo foi realizada uma correção da linha de base e um alisamento dos espectros antes de proceder-se com o tratamento quimiométrico dos dados. O alisamento foi realizado utilizando-se o algoritmo de Savitsky-Golay [53] com 15 pontos no filtro e um polinômio de ordem um. O problema do deslocamento da linha de base foi solucionado obtendo-se a primeira derivada do espectro. A Figura 20 apresenta o conjunto de espectros médios corrigidos (alisados e derivados) obtidos para todas as amostras de própolis na região de 5980,8 a 426,3 cm^{-1} .

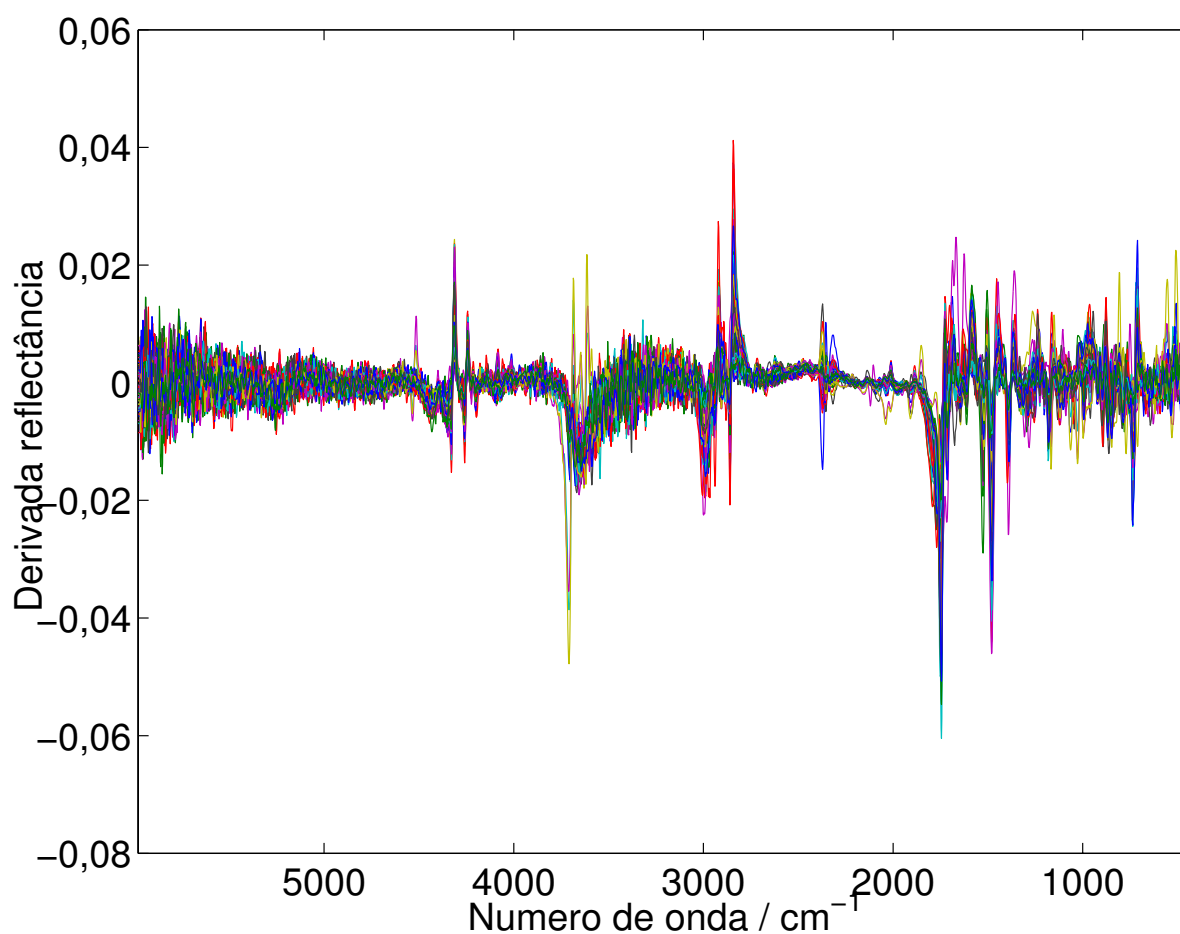


Figura 20 - Espectros de amostras de própolis, alisados e com a primeira derivada, na região de 5980,8 a 426,3 cm^{-1}

Cada um dos grupos de espectros correspondentes às tipagens de própolis foi dividido em um grupo de calibração contendo dois terços das amostras da tipagem, e um grupo de validação contendo um terço restante, utilizando o algoritmo de Kennard-Stone [54].

A separação dos grupos de calibração e validação efetivou-se na criação da matriz Y de resposta que variou conforme o tipo de modelo PLS-DA criado (PLS2 ou PLS1). No modelo PLS-DA que utilizou PLS2, foi atribuído à matriz Y, para as amostras de calibração, os valores {1 0 0 0}, {0 1 0 0}, {0 0 1 0} ou {0 0 0 1} dependendo se a amostra era da primeira, segunda, terceira ou quarta tipagem, respectivamente. Nos modelos PLS-DA, onde se utilizou PLS1, atribuiu-se à matriz Y, para as amostras de calibração, o valor 1 para as amostras da tipagem de interesse e o valor 0 para as

amostras das outras tipagens. Neste caso foram criados quatro modelos. Um para cada tipagem sendo estudada. Todos os modelos PLS-DA foram criados utilizando o pacote PLS-Toolbox versão 3.5 da Eigenvector Research, Inc [56] rodando sobre o Matlab versão 6.5 da Mathworks [55]. Para todos os modelos criados foram utilizadas quatro variáveis latentes.

No modelo utilizando PLS2 se obteve uma variância explicada em Y de 63,86%. Este modelo apresentou os piores resultados de previsão para as amostras de validação, mesmo assim, as previsões foram satisfatórias com um acerto de 100% na previsão para quase todas as tipagens de própolis. Somente para as amostras de própolis provenientes do Recôncavo Baiano ocorreu erro na atribuição da tipagem das amostras de validação onde duas amostras de própolis de Jataí foram classificadas como amostras do Recôncavo Baiano. Na Figura 21 são mostrados os valores de previsão calculados pelo modelo PLS-DA (PLS2) para as amostras do Paraná onde podemos ver que as sete amostras de previsão provenientes do Paraná foram classificadas corretamente uma vez que estão posicionadas acima do limite (linha tracejada). Na Figura 22 são mostrados os valores de previsão das amostras provenientes da BA. Verifica-se que duas das quatro últimas amostras de previsão estão classificadas como amostras da Bahia, entretanto, são amostras de própolis de Jataí.

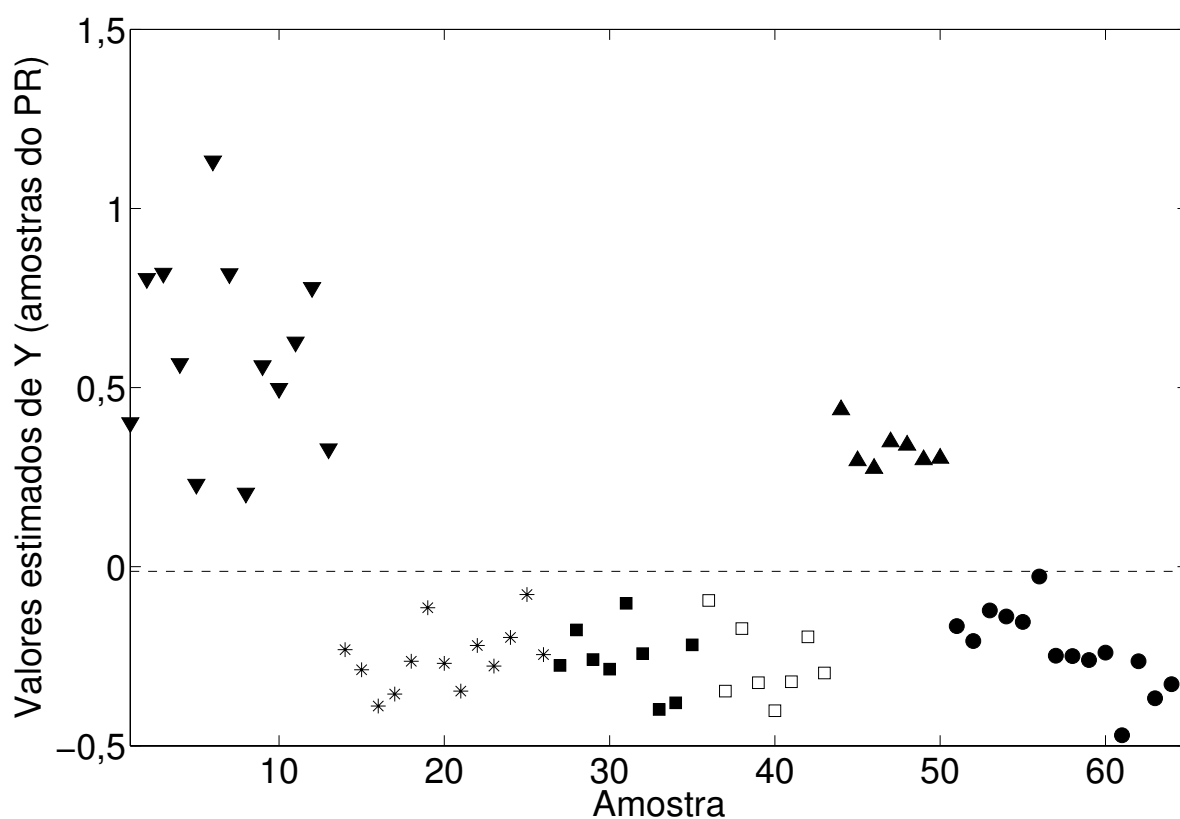


Figura 21 - Valores previstos para amostras do PR utilizando PLS-DA com PLS2.

Amostras de calibração: (▼) PR, (*) MG, (■) BA, (□) Jataí. Amostras de validação: (▲) PR, (●) outras tipagens.

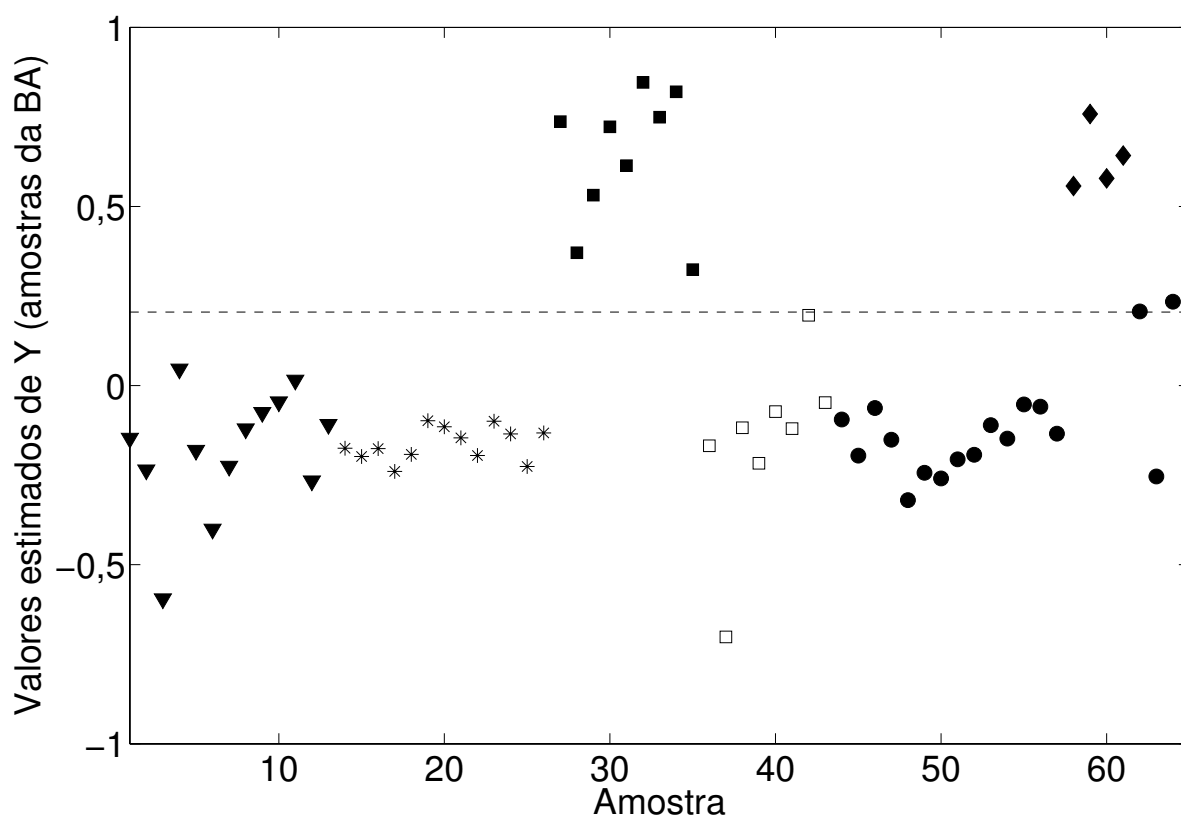


Figura 22 - Valores previstos para amostras da BA utilizando PLS-DA com PLS2.

Amostras de calibração: (▼) PR, (*) MG, (■) BA, (□) Jataí. Amostras de validação: (◆) BA, (●) outras tipagens.

No caso dos modelos PLS-DA utilizando PLS1 as previsões foram corretas para 100% das amostras de validação em todos os quatro modelos. As variâncias previstas em Y para os modelos foram de 40,95%, 40,67%, 32,30% e 29,95% com quatro variáveis latentes para as amostras do PR, MG, BA e Jataí, respectivamente. Na Figura 23 temos o exemplo do modelo criado para as amostras de MG. Verifica-se que todas as amostras de validação da tipagem de MG foram corretamente classificadas.

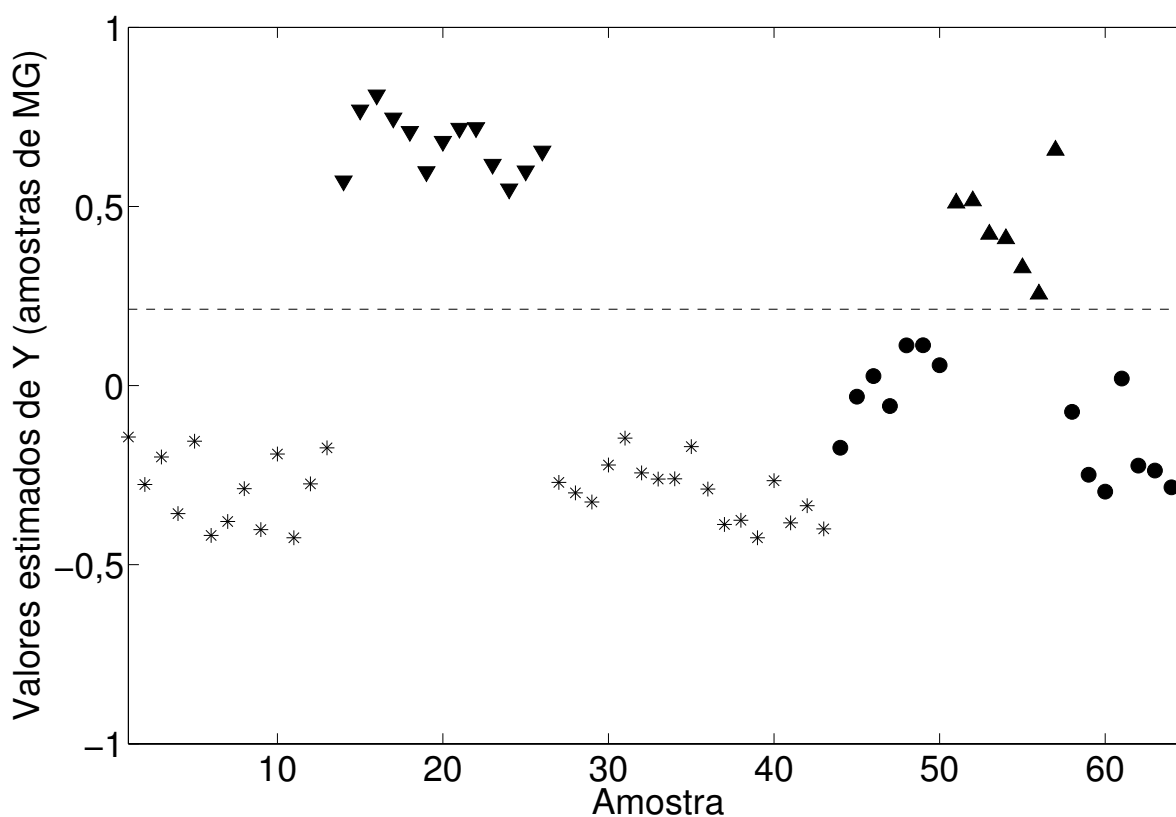


Figura 23 - Valores previstos para amostras de MG utilizando PLS-DA com PLS1. Amostras de calibração: (▼) MG, (*) outras amostras de calibração. Amostras de validação: (▲) MG, (●) outras tipagens.

O melhor desempenho dos modelos PLS-DA utilizando PLS1 comparados com o modelo utilizando PLS2 pode ser visualizado através do cálculo da probabilidade de classificação na classe de interesse. As Figuras 24 e 25 mostram as probabilidades de classificação das amostras de própolis na tipagem da Bahia. Verifica-se que para o caso do PLS-DA utilizando PLS1 todas as amostras, tanto da BA quanto de outra tipagem, apresentam 100% de probabilidade de serem classificadas corretamente o que já não ocorre para o modelo utilizando PLS2.

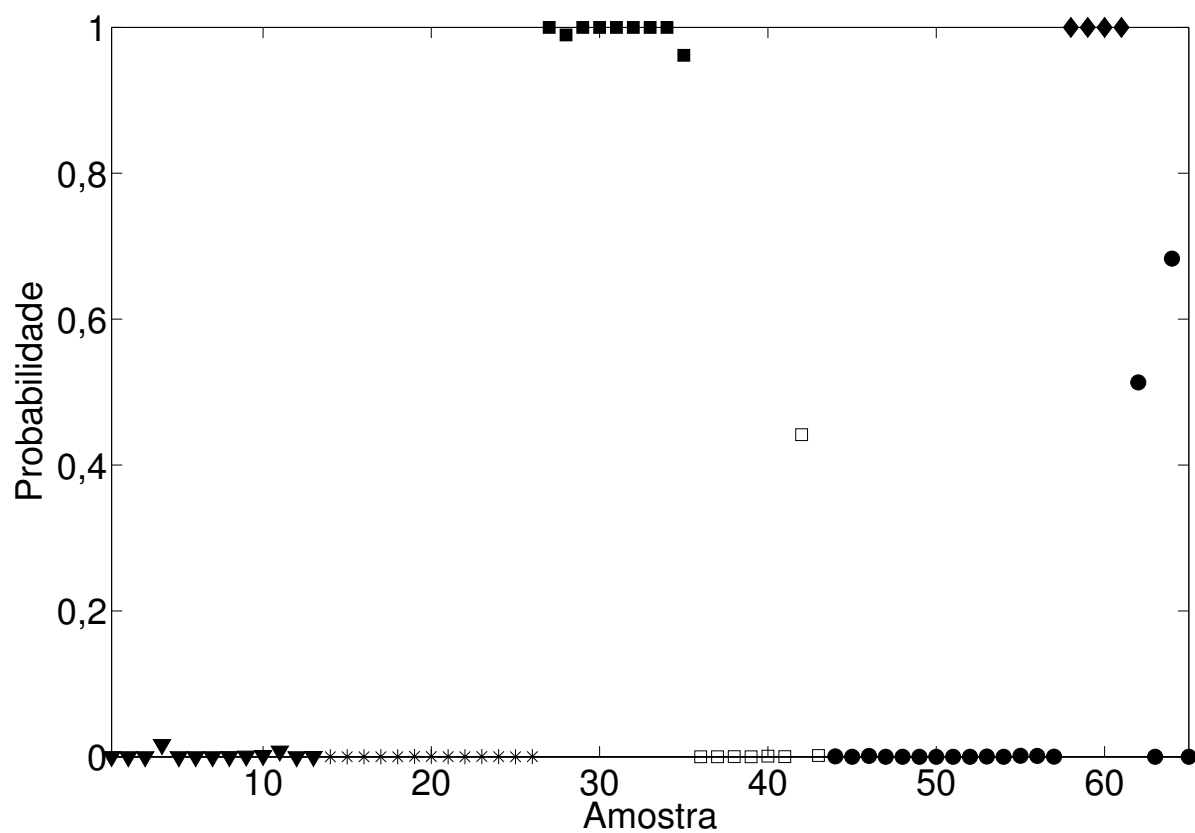


Figura 24 - Probabilidade de classificação na tipagem da BA utilizando PLS-DA com PLS2.

Amostras de calibração: (▼) PR, (*) MG, (■) BA, (□) Jataí. Amostras de validação: (◆) BA, (●) outras tipagens.

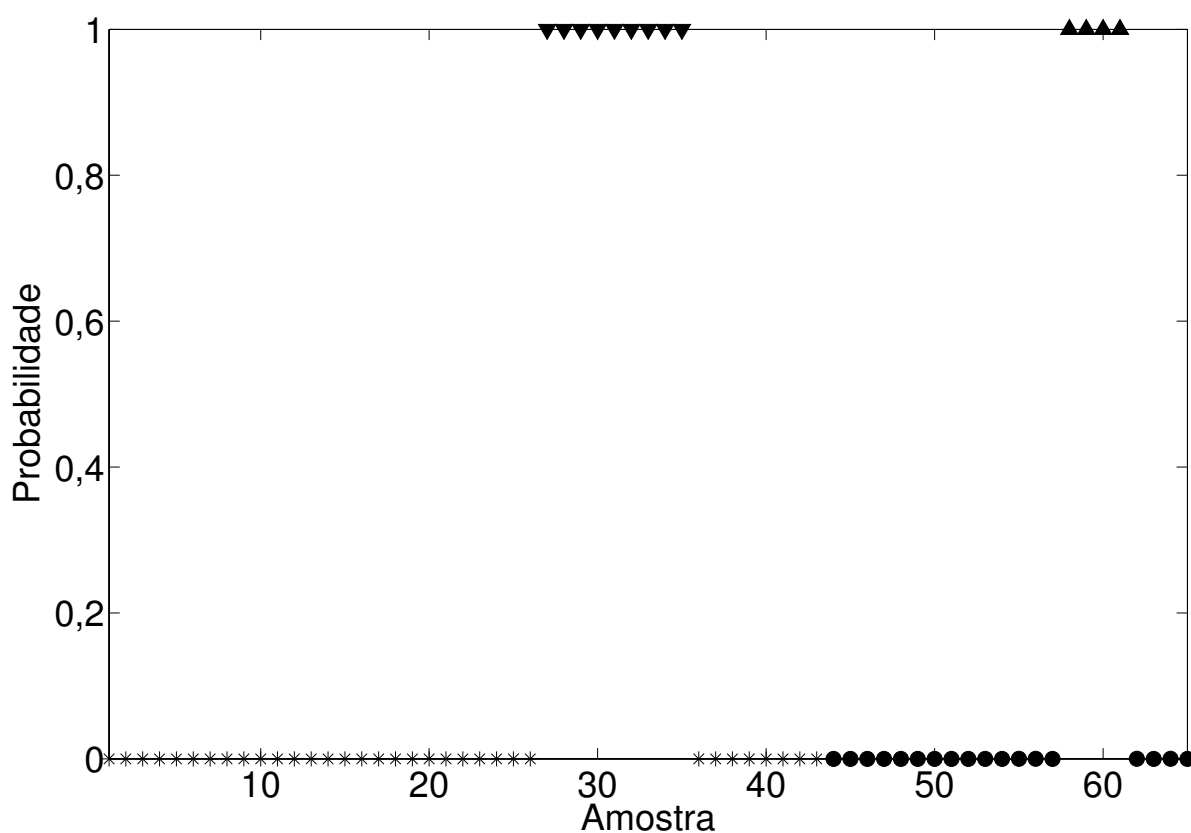


Figura 25 - Probabilidade de classificação na tipagem da BA utilizando PLS-DA com PLS1.

Amostras de calibração: (▼) BA, (*) outras tipagens. Amostras de validação: (▲) BA, (●) outras tipagens.

5.2 Conclusões quarta aplicação

Os resultados para o método de determinação da tipagem da própolis utilizando espectroscopia no infravermelho e PLS-DA nos permitem concluir:

- os modelos de análise discriminante por mínimos quadrados parciais criados utilizando PLS1 foram capazes de prever com 100% de confiança a tipagem das amostras de própolis do grupo de validação;
- os modelos criados utilizando PLS1 apresentaram resultados melhores que o

modelo com PLS2. Entretanto, este último apresentou resultados bastante satisfatórios com previsões corretas para a maioria das amostras de validação estudadas;

- a metodologia criada comparada com os métodos cromatográficos normalmente utilizados, mostrou ser mais rápida, menos laboriosa e com um uso muito menor de solventes diminuindo assim a produção de resíduos no laboratório.

Capítulo 6

Conclusões gerais

6. Conclusões gerais

Os resultados obtidos, nos trabalhos executados nas quatro aplicações desenvolvidas, nos permitem tirar as seguintes conclusões:

- a utilização de ferramentas quimiométricas de classificação e calibração permitiu o desenvolvimento de metodologias para determinação de parâmetros de qualidade empregando técnicas analíticas pouco utilizadas para as amostras de mel e própolis;
- os métodos desenvolvidos apresentaram características de rapidez de execução, custo e operacionalidade melhores que os métodos atualmente utilizados para determinação dos parâmetros estudados;
- pode-se destacar como aplicações mais relevantes: a determinação da tipagem da própolis utilizando espectroscopia no infravermelho e PLS-DA que mostrou resultados muito promissores na utilização da técnica de espectroscopia no infravermelho para determinação de parâmetros da própolis. Destaca-se aqui a rapidez do método e o ineditismo da utilização da técnica neste tipo de amostra; e a aplicação de cor em mel que apresenta grande potencial para substituição das técnicas atualmente disponíveis no mercado para determinação deste parâmetro;

Bibliografia

Bibliografia

- [1] Food and Agriculture Organization of The United Nations - *FAOSTAT*, 2006.
Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acessado em 2006-07-19
- [2] BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.
- [3] Codex Alimentarius Commission. *CODEX STAN 12*: Revised Codex Standard for Honey, Standards and Standard Methods, Food and Agriculture Organization of The United Nations, v. 11, 7 p., 2001.
- [4] DONER, L. W. The sugars of honey - Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 28, n. 5, p. 443-456, 1977.
- [5] MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B. Glicídios no mel. *Química Nova*, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [6] ANTONESCU, C.; MATTESCU, C. Environmental pollution and its effects on honey quality. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 6, n. 5, p. 371-379, 2001.
- [7] CAROLI, S.; FORTE, G.; IAMICELI, A.L., GALOPPI, B. Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques. *Talanta*, v. 50, n. 2, p. 327-336, 1999.
- [8] CONTI, M. E.; BOTRE, F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 69, n. 3, p. 267-282, 2001.
- [9] FODOR, P.; MOLNAR, E. Honey as an environmental indicator - Effect of sample preparation on trace-element determination by ICP-AES. *Mikrochimica Acta*, v. 112, n. 1-4, p. 113-118, 1993.
- [10] LEITA, L.; MUHLBACHOVA, G.; CESCO, S.; BARBATTINI, R.; MONDINI, C. Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 43, n. 1, p. 1-9, 1996.
- [11] PRZYBYLOWSKI, P.; WILCZYNSKA, A. Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*, v. 74, n. 3, p. 289-291, 2001.
- [12] UREN, A.; SERIFOGLU, A.; SARIKAHYA, Y. Distribution of elements in honeys and effect of a thermoelectric power plant on the element contents. *Food Chemistry*, v. 61, n. 1-2, p. 185-190, 1998.
- [13] DEVILLERS, J.; DORE, J. C.; MARENCO, M.; POIRIER-DUCHENE, F.; GALAND, N.; VIEL, C. Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 21, p. 5998-6007, 2002.
- [14] LATORRE, M. J.; PENA, R.; PITA, C.; BOTANA, A.; GARCIA, S.; HERRERO, C.

Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chemistry*, v. 66, n. 2, p. 263-268, 1999.

[15] LATORRE, M.J.; PENA, R.; GARCIA, S.; HERRERO, C. Authentication of Galician (NW Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *Analyst*, v. 125, n. 2, p. 307-312, 2000.

[16] PARAMAS, A. M. G.; BAREZ, J. A. G.; GARCIA-VILLANOVA, R. J.; PALA, T. R.; ALBAJAR, R. A.; SANCHEZ, J. S. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 1, p. 157-165, 2000.

[17] PAMPLONA, B. C. *Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de Apis mellifera e suas relações físico-químicas*. 131 p. (Dissertação de mestrado. Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

[18] MARINI, F.; MAGRI, A. L.; BALESTRIERI, E.; FABRETTI, F.; MARINI, D. Supervised pattern recognition applied to the discrimination of the floral origin of six types of Italian honey samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 515, n. 1, p. 117-125, 2004.

[19] DEVILLERS, J.; MORLOT, M.; PHAM-DELEGUE, M. H.; DORE, J. C. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, v. 86, n. 2, p. 305-312, 2004.

[20] BAREZ, J. A. G.; GARCIA-VILLANOVA, R. J.; GARCIA, S. E.; PALA, T. R.; PARAMAS, A. M. G.; SANCHEZ, J. S. Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *European Food Research and Technology*, v. 210, n. 6, p. 437-444, 2000.

[21] MATEO, R.; BOSCH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 2, p. 393-400, 1998.

[22] CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 5, p. 1844-1849, 1998.

[23] KELLY, J. F. D.; DOWNEY, G.; FOURATIER, V. Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 1, p. 33-39, 2004.

[24] SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 7, p. 972-978, 2001.

[25] SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 6, p. 787-792, 2001.

[26] SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 81, n. 8, p. 683-690, 2001.

- [27] SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, n. 4, p. 351-360, 2002.
- [28] GHISALBERTI, E. L. Propolis - review. *Bee World*, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.
- [29] CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, v. 73, n. , p. S1-S6, 2002.
- [30] DOS SANTOS PEREIRA, A.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. D. Propolis: 100 years of research and future perspectives. *Quimica Nova*, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
- [31] MARCUCCI, M. C. Propolis - Chemical-composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.
- [32] CUSTODIO, A. R.; FERREIRA, M. M. C.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 3, p. 354-357, 2003.
- [33] PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, v. 58, n. 58, 2000.
- [34] PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.
- [35] SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A. F.; MAIA, A. B. R. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Brazilian propolis: Physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 3, p. 285-289, 2003.
- [36] MARCUCCI, M. C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. *Revista Fitos*, v. 1, n. 3, p. 36-46, 2006.
- [37] PEREIRA, A. D.; BICALHO, B.; RADLER, F.; NETO, D. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie*, v. 34, n. 3, p. 291-298, 2003.
- [38] VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; De JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*: 1st edition. Amsterdam: Vandeginste, B. G. M.; Rutan, S. C., 1998. .
- [39] GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least-Squares Regression - A Tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v. 185, p. 1-17, 1986.
- [40] BRERETON, R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, v. 125, n. 11, p. 2125-2154, 2000.
- [41] GARCÍA-ALVAREZ, M.; CERESUELA, S.; HUIDOBRO, J. F.; HERMIDA, M.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Determination of polarimetric parameters of honey by near-infrared transfectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 3, p. 419-425, 2002.
- [42] DVASH, L.; AFIK, O.; SHAFIR, S.; SCHAFFER, A.; YESELSON, Y.; DAG, A.;

LANDAU, S. Determination by near-infrared spectroscopy of perseitol used as a marker for the botanical origin of avocado (*Persea americana* Mill.) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 19, p. 5283-5287, 2002.

[43] GARCÍA-ALVAREZ, M.; HUIDOBRO, J. F.; HERMIDA, M.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Major components of honey analysis by near-infrared transreflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 11, p. 5154-5158, 2000.

[44] QIU, P. Y.; DING, H. B.; TANG, Y. K.; XU, R. J. Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 7, p. 2760-2765, 1999.

[45] PASCHOAL, J.; BARBOZA, F. D.; POPPI, R. J. Analysis of contaminants in lubricant oil by near infrared spectroscopy and interval partial least-squares. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 11, n. 3, p. 211-218, 2003.

[46] COSTA, P. A.; POPPI, R. J. Genetic algorithm in chemistry. *Quimica Nova*, v. 22, n. 3, p. 405-411, 1999.

[47] SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, TIMOTHY A. Principles of Instrumental Analysis. In: Harcourt Brace & Company. 5th. edition. Philadelphia: Harcourt Brace & Company, 1998. cap. 17 - Applications of Infrared Spectrometry, p. 404-428.

[48] DAVIES, A. M. C.; RADOVIC, B.; FEARN, T.; ANKLAM, E. A preliminary study on the characterisation of honey by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 10, n. 2, p. 121-135, 2002.

[49] CLARKE, Margaret A. Sugars and Sugar Products. In: AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th. edition: AOAC International, 1995. cap. 44, p. 22.

[50] CADET, F.; OFFMANN, B. Extraction of characteristic bands of sugars by multidimensional analysis of their infrared spectra. *Spectroscopy Letters*, v. 29, n. 3, p. 523-536, 1996.

[51] HINENO, M. IR-Spectra and normal vibrations of beta-d-glucopyranose. *Carbohydrate Research*, v. 56, n. 2, p. 219-227, 1977.

[52] GRDADOLNIK, J. *An Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy of Water Solutions*. 2004. Disponível em: <http://www.ijvs.com/volume6/edition2/section3.html>.

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

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

[55] MATHWORKS. *Matlab. Versão 6.5*. Natick. 2003. Disponível em: <http://www.mathworks.com/products/matlab/>

[56] EIGENVECTOR_RESEARCH. *PLS_Toolbox. Versão 3.5*. 3905 West Eaglerock Drive, Wenatchee, WA 98801, 2005. Disponível em: <http://software.eigenvector.com/>

[57] NORGAARD, L. *The iToolbox for MATLAB*. July 2004. The Royal Veterinary and

Agricultural University. Denmark, 2004. Disponível em: <http://www.models.kvl.dk>

[58] MARTENS, H.; NAES, T. *Multivariate Calibration*. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. cap. 5 - Outlier Detection, p. 267-296.

[59] MILLER, J. C.; MILLER, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*. In: Ellis Horwood. *Analytical Chemistry Series*. 3rd edition. New York: Ellis Horwood, 1993. cap. Errors in instrumental analysis; regression and correlation, p. 101-141.

[60] NHB *Honey color*, 2002. Disponível em: <http://www.nhb.org/download/factsht/color.pdf>.

[61] USA. United States Standards for Grades of Extracted Honey. May 23, 1985

[62] CASTRO, R. M.; ESCAMILLA, M. J.; REIG, F. B. Evaluation of the color of some Spanish unifloral honey types as a characterization parameter. *Journal of AOAC International*, v. 75, n. 3, p. 537-542, 1992.

[63] GELADI, P.; GRAHN, H. *Multivariate Image Analysis*: First Edition. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1996. .

[64] LIED, T. T.; ESBENSEN, K. H. Principles of MIR, multivariate image regression I: Regression typology and representative application studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 58, n. 2, p. 213-226, 2001.

[65] GNU. *The GIMP - GNU Image Manipulation Program*. Versão 2.2.6. 2005. Disponível em: <http://www.gimp.org>

[66] ANTONELLI, A.; COCCHI, M.; FAVA, P.; FOCA, G.; FRANCHINI, C. G.; MANZINI, D.; ULRICI, A. Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm. *Analytica Chimica Acta*, v. 515, n. 1, p. 3-13, 2004.

[67] MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. *Chemometrics: a textbook*. In: Data handling in science and technology. 1st edition. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B. V., 1988. cap. Supervised Pattern Recognition, p. 385-413.

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

[69] SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, TIMOTHY A. *Principles of Instrumental Analysis*. In: Harcourt Brace & Company. 5th edition. Philadelphia: Harcourt Brace & Company, 1998. cap. 12 - Atomic X-Ray Spectrometry, p. 272-298.

[70] MARCUCCI, M. C.. (2000) Processo de identificação de tipagens da própolis Brasileira. Patente requerida Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, INPI no. PI0105471-6, 12.22.20002000

[71] IAEA *Quantitative X-ray Analysis System*. Versão 3.5. 2005. Disponível em: <http://www.iaea.org/index.html>

[72] ORIGINLAB *Origin*. Versão 7.0. Northampton, 2002. Disponível em: <http://www.originlab.com>