

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA
VISÍVEL E INFRATERMELHO PRÓXIMO:
CLASSIFICAÇÃO DE AÇÚCARES, DETERMINAÇÃO
DE BRIX E ACIDEZ TOTAL EM SUCOS DE
LARANJA

Tese de Doutorado

Paulo Roberto Saliba

Orientador: Prof. Dr. Celio Pasquini

Campinas - SP

1999

UNIDADE	<u>IQ</u>
N.º CHAMADA:	<u>UN. Am.</u>
V. Ex.	<u>22d</u>
TOMADO BC/	<u>39319</u>
PREC.º	<u>229/99</u>
C ☐ D ☒	
PREÇO	<u>R\$ 11,00</u>
DATA	<u>28/10/99</u>
N.º CPD	

CM-00136851-4

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

Sa33d Saliba, Paulo Roberto
Desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando espectroscopia visível e infravermelho próximo: classificação de açúcares, determinação de brix e acidez total em sucos de laranja / Paulo Roberto Saliba. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Celio Pasquini.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Reflectância difusa. 2. Cor ICUMSA. 3. NIR. I. Pasquini, Celio.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

À minha família:

Elisete,

Ana Paula e

Carolina.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do Grupo de Instrumentação e Automação em Química Analítica e aos amigos do Laboratório de Química Ambiental, pelo companheirismo e amizade, sempre presentes no nosso dia-a-dia.

Aos Senhores Professores e Funcionários do IQ/UNICAMP, por terem contribuído para a execução deste trabalho.

À CITROSUCO, em particular ao Sr. Oséia Pereira Filho, Gerente do Laboratório de Controle de Qualidade, pela cessão das amostras de suco de laranja.

Ao CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Agradecimento especial:

Ao Prof. Dr. Celio Pasquini pela orientação serena e segura, pela confiança demonstrada e particularmente pela amizade fraternal.

ÍNDICE

RESUMO -----	ii
ABSTRACT -----	iii
I. INTRODUÇÃO -----	1
I.1. Espectrofotometria Aplicada à Química Analítica-----	1
I.2. Detector de Arranjo Linear de Fotodiodos-----	5
I.3. Reflectância-----	8
I.4. Qualidade de açúcares-----	10
I.5. Controle de qualidade industrial em suco de laranja-----	16
I.6. Algumas características e fundamentos de espectroscopia no infravermelho próximo-----	21
I.7. Transmitância-----	25
I.8. Filtros óptico-acústicos sintonizáveis-----	26
I.9. Quimiometria-----	29
I.10. Análise de Componentes Principais e Regressão de Com- ponentes Principais-----	30
I.11. Método de Calibração Multivariada Empregando Regressão de Mínimos Quadrados Parciais-----	31
II. OBJETIVOS -----	34
III. PARTE EXPERIMENTAL -----	35
III.1. Construção do Espectrofotômetro Multicanal-----	35
III.2. Medidas de reflectância de amostras de açúcar-----	39
III.3. Determinação simultânea de acidez total e sólidos dissolvidos (grau brix) em suco de laranja concentrado, utilizando espectroscopia no infravermelho próximo-----	41
III.3.1 Diagrama de blocos do Sistema NIR utilizado-----	41
III.3.2 Cella para medidas de Transmitância-----	42
III.3.3 Procedimento Analítico-----	45
III.3.4 Tratamento de Dados-----	46
III.3.5 Amostras diluídas-----	48
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	50
IV.1 Espectros Típicos para açúcares-----	50
IV.2 Espectros Típicos para sucos de laranja-----	51
IV.3 Determinação do índice de cor de açúcares-----	52
IV.4 Suco de Laranja-----	55
V. CONCLUSÕES -----	64
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	66

RESUMO

ii

“Desenvolvimento de Metodologias Analíticas Utilizando Espectroscopia Visível e Infravermelho Próximo: Classificação de açúcares, determinação de BRIX e acidez total em sucos de laranja”.

Autor: Paulo Roberto Saliba

Orientador: Prof. Dr. Celio Pasquini

Este trabalho descreve o desenvolvimento de metodologias analíticas com utilização de espectroscopia visível e infravermelho próximo. No visível desenvolveu-se um novo método para a determinação da cor ICUMSA de açúcares para exportação. Para tal, secundariamente, construiu-se um espectrofotômetro multicanal empregando-se como detector um arranjo linear de fotodiodos EGG-Reticon - RL 1024. A faixa espectral coberta pela superfície sensível do detector foi de 414,6 - 652,7 nm. O equipamento foi utilizado para medidas de reflectância difusa visando determinação da cor de açúcares. Boa correlação ($R = 0,93$) foi observada entre as medidas de reflectância a 420 nm e os resultados obtidos pelo método convencional. Um espectrofotômetro infravermelho próximo (NIR) com monocromador baseado em filtro óptico-acústico sintonizável (AOTF), foi empregado visando a determinação simultânea de acidez total e sólidos solúveis (grau Brix) em sucos de laranja. Medidas de acidez total e sólidos solúveis foram efetuadas em mais de 1000 amostras de suco de laranja concentrado, obtidas durante um período de cerca de 2 anos, da Citrosuco S.A. Os dados obtidos na faixa espectral de 1500 a 1900 nm foram tratados por Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e obteve-se valores de SEP (Erro Padrão de Previsão) (SEP Acidez: 0,18 - SEP Brix: 0,21) adequados ao controle de qualidade de sucos de laranja concentrado para exportação. O método pode ser adaptado para o controle em linha destes parâmetros na indústria de sucos.

ABSTRACT

iii

“Development of Analytical Methodologies Using Visible and Near Infrared Spectroscopy: Sugar classification and, determination of BRIX and total acidity in orange juice”.

Author: Paulo Roberto Saliba
Adviser: Prof. Dr. Celio Pasquini

This work describes the development of analytical methodologies using visible and near infrared spectroscopy. In the visible range a new method for determination of color index of sugars (ICUMSA) produced for exportation was developed. Secondly, a multi-channel spectrophotometer was constructed employing a diode array detector EGG-Reticon - RL 1024. The spectral range of the instrument was determined to be from 414.6 to 652.7 nm. The equipment was employed to obtain the diffuse reflectance measurements aiming the determination of the sugar color index. A good correlation ($R = 0.93$) was observed between the measurements taken at 420 nm and the results obtained by the conventional method. A near infrared (NIR) spectrophotometer with a acousto-optical tunable filter was employed with the objective of the simultaneous determination of the total acidity and total dissolved solids in concentrate orange juice. Measurements of the total acidity and total dissolved solids were made for more than 1000 samples supplied by CITROSUCO S.A. The results obtained in the spectral range 1500-1900 nm were modeled by Partial Least Square algorithm (PLS) and SEP (Standard Error of Prediction) values of 0.18 and 0.21 were obtained for total acidity and total dissolved solids, respectively. The results were considered suitable for quality control of concentrate orange juice. The developed methodology can be adapted to be used in-line aiming the control of those parameters in the orange industry.

I. INTRODUÇÃO:

A Química Analítica atual tem se beneficiado dos avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas, particularmente relacionados com o uso dos microcomputadores pessoais, nos moldes hoje conhecidos. Processadores velozes, associados a programas escritos de forma “personalizada” para um uso específico, têm permitido que um número muito grande de informações sobre amostras sejam geradas e armazenadas com grande facilidade.

No que se refere a área da espectroanalítica, por exemplo, o uso clássico da Lei de Beer [1] para a calibração envolvendo apenas um comprimento de onda tem cedido espaço para o uso de métodos multivariados de calibração [2], onde o espectro inteiro ou parte dele é utilizado. Isto permite que muitas informações, outrora desprezadas, sejam aproveitadas. Com isto, a espectroscopia UV-VIS e infravermelho próximo (NIR), têm sofrido ampliações em seu uso.

I.1. Espectrofotometria Aplicada à Química Analítica

Dentre os métodos instrumentais de análise, destacam-se pela importância, os métodos espectrofotométricos [3,4], os quais se baseiam na interação da energia radiante com a matéria.

Ao estudarmos as propriedades e a natureza da energia radiante nos deparamos com o que se convencionou chamar de *dualidade*

essencial. Sob alguns aspectos as propriedades da energia radiante são as de uma onda, já em outros aspectos fica evidenciado que a radiação consiste em pacotes de energia discretos, chamados fótons. Quando um ou vários fótons são envolvidos podemos dar o tratamento de onda e obter resultados aproximados. Já para um tratamento rigoroso o conceito de partícula se faz necessário. Fóton é um quantum de energia cujo conteúdo E é diretamente proporcional à frequência:

$$E = h \nu = h c \lambda^{-1} \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,6262 \times 10^{-34} \text{ J.S}^{-1}$), ν (Hz) é a frequência, c é a velocidade da luz no vácuo ($2,99792 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$) e λ é o comprimento de onda.

Um feixe de radiação é formado de energia que é emitida por uma fonte. A energia se propaga através de um ou mais meios até ser absorvida por um receptor. Neste percurso, da fonte até o último absorvente, o feixe pode sofrer absorção parcial. Pode ainda sofrer mudança de direção por refração, difração ou reflexão ou ainda pode tornar-se parcial ou totalmente polarizado.

As interações físicas entre a energia radiante e a matéria seguem diferentes mecanismos e fornecem diferentes tipos de informações, dependendo da região espectral em que ocorrem. Daí decorre a

necessidade para o químico analítico saber as mais importantes transições, atômicas ou moleculares, relacionadas a cada região espectral: A Tabela I mostrada abaixo relaciona parte desta informação.

Tabela I - Regiões do espectro eletromagnético:

Região	Faixa de λ (e número de onda, cm^{-1})	Transições envolvidas
Raios X	0,01 - 10 nm	Elétrons das camadas K e L
Ultravioleta distante	10 - 180 nm	Elétrons de camadas intermediárias
Ultravioleta próximo e visível	180 - 780 nm	Elétrons de valência
Infravermelho próximo	780 - 2500 nm (13000 - 4000 cm^{-1})	Vibrações moleculares
Infravermelho médio	2500 - 50000 nm (4000 - 200 cm^{-1})	Vibrações moleculares
Infravermelho distante	50000 - 1000000 nm (200 - 10 cm^{-1})	Rotações moleculares e vibrações fracas
Microondas	0,1 - 100 cm (10 - 10 ⁻² cm^{-1})	Rotações moleculares

Os espectros de emissão/absorção dos átomos são constituídos normalmente por linhas. Já os das moléculas por bandas. Os níveis de energia responsáveis pelos espectros atômicos mostram os diferentes estados de energia permitidos para seus elétrons. Numa molécula, a emissão ou absorção de energia pode ocorrer em transições entre níveis de energia não relacionados a transições eletrônicas. Uma molécula pode, também, mudar seu nível de energia de duas maneiras: variação da energia rotacional da molécula e variação da energia vibracional da molécula. A molécula só pode existir em certos níveis discretos de energia vibracional e rotacional, já que essas energias internas são quantizadas, da mesma maneira que a energia eletrônica.

Transições entre diferentes níveis de energia eletrônicos moleculares dão origem aos chamados espectros eletrônicos, os quais ocorrem nas regiões do *visível* ou ultravioleta. Transições entre níveis vibracionais com o mesmo estado eletrônico dão origem a espectros na região do infravermelho e do *infravermelho próximo*. Estes espectros são chamados espectros vibracionais-rotacionais.

Os espectros são obtidos com o uso de instrumentos denominados espectrofotômetros que apresentam características diferentes com relação aos seus componentes em função da faixa de comprimento de onda de operação e pela forma de obtenção da medida espectrofotométrica (ex., transmitância ou reflectância).

I.2. Detector de Arranjo Linear de Fotodiodos (PDA, Photodiode Array).

Os sistemas ópticos utilizados em espectroscopia são classificados como multiplexados e não-multiplexados. Os instrumentos não-multiplexados podem empregar um ou vários detectores[3,5]. Os que empregam vários detectores são chamados multicanais ou espaciais e monitoram simultaneamente vários comprimentos de onda. Já os que empregam somente um detector são chamados monocanais ou temporais e o monitoramento dos diversos comprimentos de onda é feito de forma seqüencial. Os instrumentos não-multiplexados podem ser dispersivos quando utilizam rede de difração e não dispersivos quando empregam filtros ou diodos emissores de luz (LED).

Os instrumentos multiplexados empregam um único detector que recebe informações simultâneas. Estas informações são codificadas de acordo com um determinado padrão e transformadas posteriormente em informações espectrais, através de métodos matemáticos. Estes instrumentos podem utilizar, ainda, sistemas dispersivos, como espectrofotômetros com transformada de Hadamard [6] ou sistemas não dispersivos, como espectrofotômetros com transformada de Fourier [7].

Os instrumentos multicanais normalmente possuem um monocromador fixo ou rotativo, dependendo de sua aplicação e

empregam como detectores filmes fotográficos, arranjo de fotomultiplicadoras, dispositivos de transferência de carga (CTD, Charge Transfer Devices) e arranjos lineares de fotodiodos (PDA).

O espectrofotômetro visível construído para a primeira parte deste trabalho pode ser classificado como: não-multiplexado, de monocromador fixo, dispersivo e multicanal, que são os fotodiodos.

Os instrumentos multicanais apresentam algumas vantagens em relação aos monocanais, como menor tempo de aquisição de espectros e melhor relação sinal-ruído (S/N) [9,10].

A aquisição de dados de forma simultânea permite diminuir o tempo de análise. O uso do monocromador fixo possibilita a aquisição de espectros nos quais as distorções são minimizadas e em poucos milissegundos. A medida do comprimento de onda é feita com alta reprodutibilidade, pois esta não é determinada pelo deslocamento da rede de difração.

Um detector de arranjo linear de fotodiodos [8-10] é constituído de um circuito integrado único. Ele possui um sensor de radiação, um elemento de leitura e um elemento de armazenamento, sendo fabricado em um único cristal de silício. Cada diodo atua ao mesmo tempo como elemento de armazenamento de carga e como transdutor de intensidade luminosa/carga elétrica.

O PDA, ao ser fabricado, é submetido a uma oxidação na sua superfície, formada de um substrato semicondutor do tipo-n,

produzindo uma camada de óxido de silício. A espessura do óxido formado pode variar de 0,4 a 3,0 μm [5,11]. Através de um processo de fotolitografia, são abertas pequenas janelas na camada de óxido de silício. Difunde-se um semiconductor do tipo-p nas janelas abertas, formando-se as junções pn.

A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático do cristal de silício e da geometria do sensor.

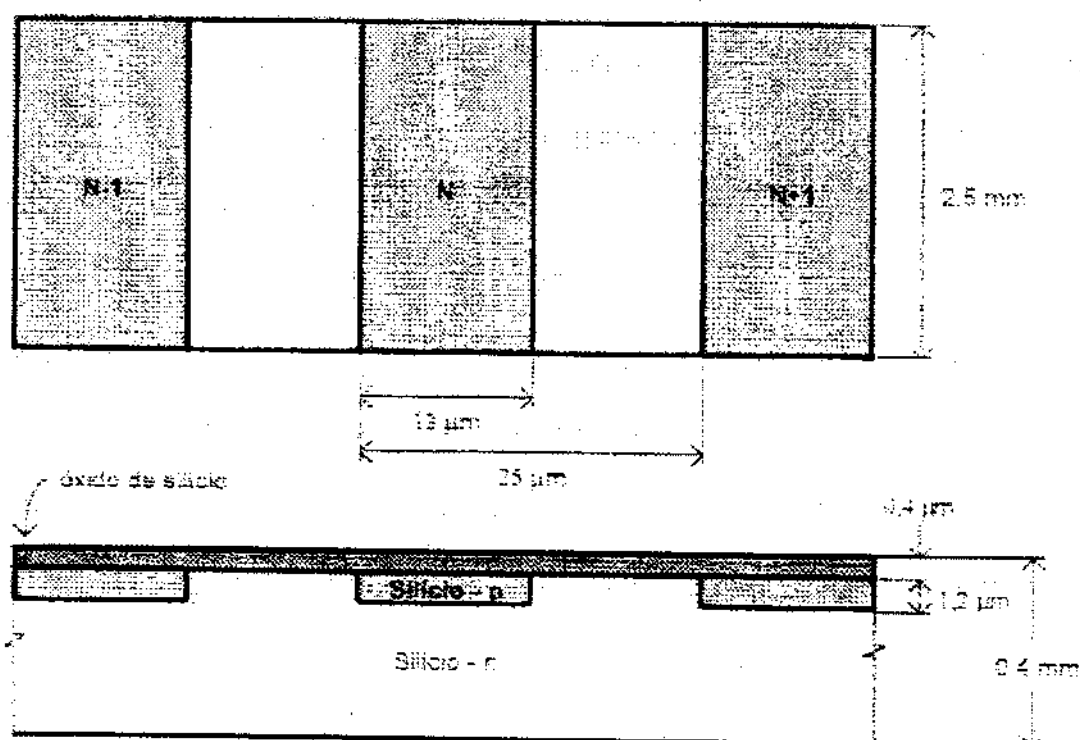


Figura 1 - Diagrama esquemático da geometria de um arranjo linear de fotodiodos.

Cada diodo do arranjo é um minúsculo capacitor formado pela polarização reversa que ocorre entre as junções dos semicondutores tipo p e tipo n. Cada elemento capacitivo (diodo) formado pela polarização reversa entre a junção pn, é um elemento fotosensível do arranjo [5]. Assim, como mostrado na Figura 1 cada elemento apresenta uma geometria com razão de 100:1 (2,5 mm x 25 μm), adequada para ser utilizada na saída de monocromadores convencionais.

I.3. Reflectância

Quando a luz incide numa superfície, um dos fenômenos possíveis de ocorrer é o da reflexão. Dois processos distintos podem ocorrer (Figura 2). O primeiro processo é a reflexão especular, a qual ocorre na superfície de um meio espelhado onde há reflexão de modo regular (externa). O outro tipo é a reflectância difusa [12-14], onde a radiação penetra e, subsequenteemente, reaparece na superfície do sistema, resultado da absorção parcial e espalhamento múltiplo dentro do sistema. Esses dois processos são complementares, sendo que a reflexão especular pode ser eliminada ou minimizada através da preparação da própria amostra ou arranjos ópticos.

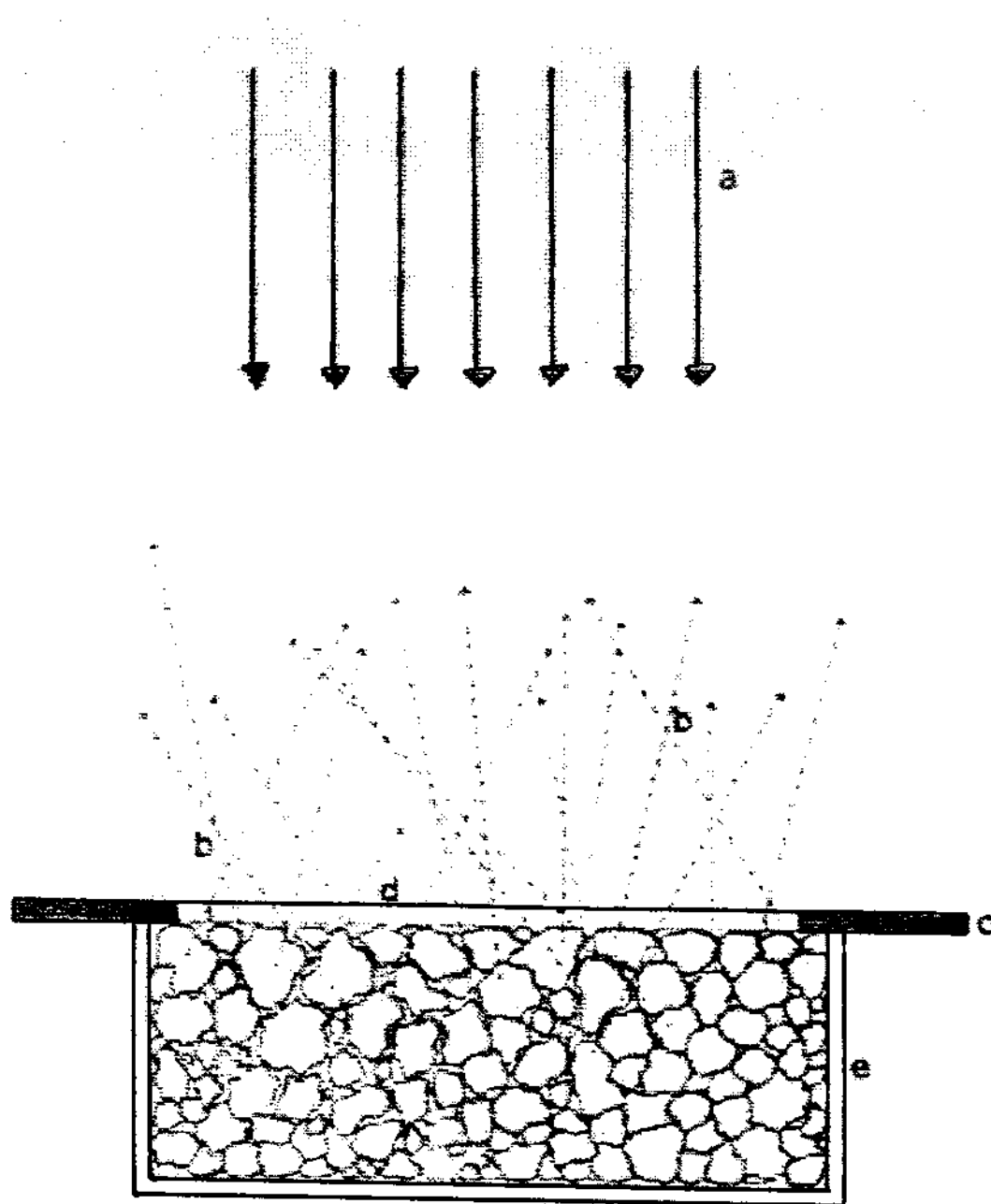


Figura 2 - Interação da luz com um sólido Ópticamente Denso: a = luz incidente; b= luz difusamente refletida; c= cobertura da cela; d= janela da cela; e = cela da amostra.

A reflectância difusa é dependente da composição do sistema, análogo à absorção da luz. Somente o componente refletido difusamente pode conter a informação da absorção relativa a composição da amostra.

Alguns modelos matemáticos para a reflectância difusa foram propostos [13-15]. O modelo mais amplamente usado para interpretar quantitativamente os dados de reflectância difusa é o de Kubelka-Munk [13]. A chamada função de Kubelka-Munk, $F(R)$, é definida como:

$$F(R) = (1-R)^2 / 2R = KC \quad (2)$$

onde R é a reflectância difusa, C a concentração e K é uma constante envolvendo os coeficientes de absorção e de espalhamento.

1.4. Qualidade de açúcares

Um dos parâmetros utilizados na avaliação da qualidade de açúcares para a exportação [16] é a medida da cor (cor ICUMSA - International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis). Quanto mais escuro for o açúcar, maior será o valor numérico da cor ICUMSA. A cor do açúcar é devido à umidade e cinzas (sílica, alumínio, ferro, óxido de cálcio, óxido de magnésio, óxido de potássio, óxido de sódio, cloro, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido

carboxílicos, etc.) incorporadas durante o processo de cristalização do açúcar. As cinzas são impurezas que estão diretamente relacionadas com o percentual de não-açúcar e somadas à umidade podem chegar a 4 % (m/m) da amostra.

O fator umidade tem muita importância na conservação do açúcar, sendo o maior responsável pela deterioração do produto. A perda da qualidade se dá quando a porcentagem da umidade ultrapassa 1% (m/m). O princípio fundamental de sua conservação está em produzi-lo seco e mantê-lo armazenado neste estado. Devido as propriedades higroscópicas do açúcar, sobretudo quando os cristais se apresentam cobertos por um fino filme de mel exausto (melaço), torna-se impossível mantê-lo seco. No entanto, boas condições de armazenagem (espaço, empilhamento, temperatura ambiente, umidade relativa do ar, ventilação, etc.) e ensacamento podem diminuir a velocidade de absorção da umidade e consequentemente retardar a deterioração.

O mel exausto é um subproduto resultante de massas cozidas de terceira, submetidos as turbinas centrífugas que o separam dos cristais de açúcar da massa de mesma classe. Tal mel já foi duas vezes ao tacho de cozimento a vácuo e já passou duas vezes pelos cristalizadores e turbinas. A composição do mel é variável, no entanto, de maneira aproximada, possui um conteúdo total de

açúcares (sacarose e glicose) de cerca de 55 %; 20 % de água; e 10 % de cinzas.

O Método de Ensaio para a Determinação da cor ICUMSA do açúcar, estabelece as seguintes etapas:

- Homogeneizar e quartear as amostras de açúcar coletadas.
- Pesar com precisão de 0,01 g, exatamente 100,00 g de açúcar e transferir quantitativamente para erlenmayer de 250 mL.
- Adicionar 100 mL de água destilada medidos em pipeta volumétrica de 100 mL.
- Dissolver o açúcar completamente com auxílio de agitador magnético.
- Montar o conjunto de filtração, colocando o pré-filtro sobre a membrana de 0,45 u.
- Filtrar a solução aplicando vácuo.
- Desprezar os primeiros 30 mL e coletar o restante diretamente no kitassato. O filtrado deve se apresentar límpido.
- Termostatizar o refratômetro a 20 ° C utilizando o banho termostático.
- Determinar o Brix refratométrico do filtrado isento de bolhas de ar. O valor do Brix refratométrico deve se situar entre 49,5 ° e 50,5 ° . Se o valor obtido for maior que 50,5 ° corrigir com a adição de volume adequado de água destilada.

Se o valor obtido for menor que 49,5 °, descartar a solução e reiniciar o processo.

- Ajustar o espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nm, acertando 100 % de transmitância com água destilada.
- Lavar por 3 vezes a cubeta de vidro com parte do filtrado.
- Encher a cubeta (5 cm de caminho óptico) com o filtrado restante e determinar a sua transmitância T. O valor da transmitância lida deverá situar-se entre 20 e 80 %. Caso a transmitância seja menor que 20 %, desconsiderar a leitura e repetir a medida utilizando cubeta de 1 cm de caminho ótico.
- Os resultados são expressos em termos numéricos, utilizando-se a seguinte equação:

COR ICUMSA (420 nm) = 1000 (-logT)/(b . c), onde T = transmitância lida no aparelho; b = caminho ótico da cubeta utilizada em cm; c = concentração da solução de açúcar em g/mL encontrada em função do Brix e da densidade:

$$c \text{ (g/mL)} = (\text{Brix} \cdot \text{densidade } 20^{\circ} \text{ C} / 4^{\circ} \text{ C}) / 100$$

A Resolução nº 02/84, de 05/04/1984, do Ministério da Indústria e do Comércio do Brasil, estabelece parâmetros para a classificação de açúcares segundo o teor de sacarose e a cor ICUMSA (Tabelas II e III).

Tabela II - Classificação de açúcares pelo teor de sacarose:

TIPO DE AÇÚCAR	POLARIZAÇÃO MÍNIMA (°S à 20° C)
Demerara	96,00 a 98,00
Standard	99,30
Cristal Superior	99,50
Cristal Especial	99,70
Cristal Especial Extra	99,80
Refinado Amorfo	99,00
Refinado Granulado	99,80

Tabela III - Classificação de açúcares pela cor:

Cor a 420 nm (valores máximos)	TIPO
maior do que 760	Demerara
760	Cristal Standard
480	Cristal Superior
230	Cristal Especial
150	Cristal Extra Especial
80	Açúcar Refinado Amorfo
45	Açúcar Refinado Granulado

Os métodos de análise de açúcares na indústria açucareira podem ser divididos em químicos e físicos. O método físico mais importante na análise de açúcares é a polarimetria, baseada na propriedade que apresentam as substâncias opticamente ativas, entre as quais os açúcares, de alterar a inclinação do plano de vibração de uma luz polarizada. Dentre os métodos químicos, os mais empregados são aqueles fundamentados na reação dos açúcares redutores com soluções de complexo de íon cúprico (sal de Horne).

I.5. Controle de qualidade industrial de suco de laranja

A Indústria Brasileira responde por mais da metade [17] da produção mundial de suco de laranjas. Para que o produto brasileiro seja exportado há necessidade de que o controle de qualidade seja rígido e os produtos só embarcam desde que a qualidade esteja devidamente certificada.

A grande demanda de análises é suprida pelos laboratórios das próprias indústrias de suco. Grau Brix, acidez total, glicose, frutose, sacarose, ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido málico, prolina, potássio, sódio, fosfato, pectina e ácido ascórbico, são algumas das determinações rotineiras realizadas nas indústrias. Para os sucos concentrados os parâmetros usuais são grau Brix ($66,0 \pm 0,5$ g/100g) e Acidez total obtida por titulação potenciométrica até pH 8,2 [17] (3,0 a 8,0 g/100g). Já para a análise de sucos reconstituídos (grau brix = 11,20 a 11,50 g/100g), ou seja, diluídos e com o acréscimo de várias substâncias, alguns valores estão listados na Tabela abaixo:

Tabela IV - Teores médios para alguns constituintes de suco de laranja reconstituído:

Ácido Cítrico	1,7 a 6,7 g/L
Ácido Ascórbico	200 a 380 mg/L
Prolina	500 a 1500 mg/L
Pectina Total	500 a 2000 mg/L
Pectina solúvel em água	200 a 1500 mg/L

Muitos procedimentos de análise são demorados e caros. Um desafio a ser vencido é o de simplificar as rotinas e torná-las baratas e rápidas. Para isto o uso de um espectrofotômetro NIR aliado ao tratamento matemático da calibração multivariada poderá permitir avanços significativos neste mister.

A literatura internacional [17-21] que trata da análise de sucos de laranjas mostra que a maioria dos trabalhos abordam o tema da adulteração. Trabalhos realizados no Brasil e publicados em revistas de análise de alimentos, são raros. O Artigo de Revisão de Robards e outros [17], publicado em 1995 chega a insinuar, que a falta de trabalhos brasileiros sobre sucos de laranjas industrializados tem por finalidade ocultar a baixa qualidade da indústria brasileira. Estas acusações nos parecem infundadas, daí a necessidade de trabalhos desenvolvidos no meio acadêmico sobre sucos de laranjas brasileiros.

Twomey et al [19], realizaram uma série limitada de experimentos com a finalidade de demonstrar o potencial da espectroscopia NIR na detecção de adulterações de sucos de laranja. Para isto utilizaram 65 amostras de sucos de laranja concentrados obtidos do Brasil e de Israel. As amostras foram adulteradas com 10 % (m/m) de (1) polpa lavada de laranja; (2) suco de toranja; (3) açúcar sintético/mistura de ácidos e 5 % (m/m) de (4) polpa lavada de laranja; (5) suco de toranja . Espectros de todas as amostras na faixa de 1100 - 2498 nm foram obtidos num espectrofotômetro NIR

6500 (Silver Springs, MD, USA). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para reduzir cada espectro a 20 componentes principais. Análise de Fatores foi utilizada para distinguir os diferentes grupos de amostras. Usando sucos de laranja concentrado puro e com 10 % de adulteração foram obtidos resultados exatos na previsão de 94-95 % das amostras. Para as amostras de suco puro e com 5 % de adulteração a classificação correta foi obtida para 94 % das amostras. Os resultados mostraram que a aplicação de PCA e Análise de Fatores discriminantes nos espectros de reflectância NIR permitem detectar adulterações com uma precisão média de 90 %. Ademais, nenhuma amostra não adulterada foi prevista como adulterada, durante todo o trabalho.

Li et al [20] utilizaram a combinação de NIR e Calibração Multivariada para a determinação de glicose, frutose, sacarose, ácido cítrico e ácido málico em sucos de laranja. As concentrações destes componentes foram analisadas pelo método enzimático e consideradas como referências relativas para espectroscopia NIR. Espectros do extrato seco de 218 amostras de sucos de laranja foram obtidos na faixa de 1100 - 2500 nm. Os dados do espectro original NIR foram tratados por pré-tratamentos matemáticos como transformações derivativas e MSCorrection. SMLR (Regressão Linear Múltipla por Passo) e PLSR (Regressão de Mínimos Quadrados Parciais) foram usados para criar modelos de calibração relacionando

os valores das referências químicas com os dados espectrais. A habilidade de previsão dos modelos de calibração foram aceitáveis em comparação com os métodos de referência. Os resultados obtidos com PLS1 foram ligeiramente melhores do que os obtidos pelo método de calibração SMLR (Regressão Linear Múltipla por Passo). Na previsão, o ácido málico, em menor concentração (0,28 g/L), apresentou um erro relativo grande. Tal erro relativo foi $\geq 10\%$.

Evans et al [21] utilizaram espectroscopia NIR para determinar a autenticidade de sucos de laranja através da análise discriminante de 3 fontes de sucos. Três pré-tratamentos e cinco transformações de dados para melhorar a discriminação foram comparados. A Análise de Componentes Principais de 92 amostras usadas na calibração foi seguida pela Análise de Variáveis Canônicas, utilizando acima de 25 componentes principais. Os resultados foram comparados através de pré-tratamentos e transformações para a calibração e teste de dados (50 amostras). Obteve-se 100 % de sucesso na previsão, usando 25 componentes principais, nenhuma transformação e nenhum pré-tratamento. Aplicando-se MSCorrection (ver páginas 45-46) com e sem pré-tratamento e transformações a porcentagem de previsão correta cai para 98 %. O pior resultado obtido na previsão foi de 78 % utilizando Segunda derivada e sem pré-tratamento de dados.

A determinação de concentrações individuais em misturas de ácidos é de grande valor em trabalhos analíticos, tanto na indústria como na pesquisa. Muitas técnicas são utilizadas, desde métodos instrumentais como HPLC [22] e Voltametria de onda quadrada [23], bem como métodos cromatográficos como Cromatografia em Camada Delgada [24], Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa [25], Cromatografia Líquida Partição-Exclusão de Íons [26], e titulações como Titulações potenciométricas [27] e Titulações em sistemas de Análise Por Injeção em Fluxo [28].

Os sucos de frutas contém uma grande variedade de ácidos, os quais são oriundos da própria fruta ou colocados pela indústria com as seguintes finalidades: (a) modificar a doçura do açúcar presente; (b) imitar o sabor da fruta; (c) como preservativo em xaropes ou soluções coloridas e (d) para catalisar a inversão da sacarose no xarope ou bebida.

Ácidos em frutas cítricas são formados por energia liberada do ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs). Entre os ácidos presentes em sucos de frutas comerciais podemos citar: ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido sórbico, ácido succínico, dentre outros.

Em sucos de frutas cítricas, como no suco de laranja, os ácidos que predominam são o ácido cítrico e o ácido málico. Para a exportação de sucos de laranja concentrados, muitas análises são

requeridas. Dentre as análises, destacam-se, pela importância, o teor total de ácidos e a medida do grau Brix. Estas duas determinações são rotineiramente feitas durante o processo de obtenção do suco de laranjas concentrado. O grau Brix é obtido através do método refratométrico clássico e a acidez total é obtida por titulação volumétrica empregando detecção potenciométrica.

I.6. Algumas características e fundamentos de espectroscopia no infravermelho próximo(Near Infrared, NIR):

A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho próximo compreende a faixa de comprimentos de onda entre 780 nm até 3000 nm (final do visível até início do infravermelho médio) [29]. Ela foi descoberta em 1800 por um astrônomo de nome Herschel [30]. Utilizando um prisma de vidro para decompor a luz, Herschel movia um termômetro através das cores com o objetivo de saber qual a cor ou cores do espectro eram responsáveis pelo calor produzido. Ele observou que havia uma pequena variação de temperatura entre as cores. Ao colocar o termômetro além da região do vermelho notou uma grande variação de temperatura. Como sabemos que o infravermelho médio e o infravermelho longínquo não passam através do vidro, o que Herschel descobriu, na realidade, foi a região do infravermelho

próximo. A região do espectro NIR compreendida entre 700 e 1100 nm é conhecida como Região de Herschel [30].

A origem do espectro NIR está associada principalmente à anarmonicidade das ligações hidrogênio-carbono, hidrogênio-nitrogênio e hidrogênio-oxigênio, causada pela pequena massa do átomo de hidrogênio e o grande momento de dipolo das suas ligações com átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio. Se as ligações obedecessem o modelo teórico do Oscilador Harmônico, o diagrama de energia potencial seria uma parábola sem distorções das bordas e níveis de energia espaçados igualmente. Devido a anarmonicidade, o que se observa no diagrama de energia potencial é uma parábola distorcida nas bordas e níveis de energia com espaçamentos desiguais, o que permite originar o espectro de bandas na região do infravermelho próximo.

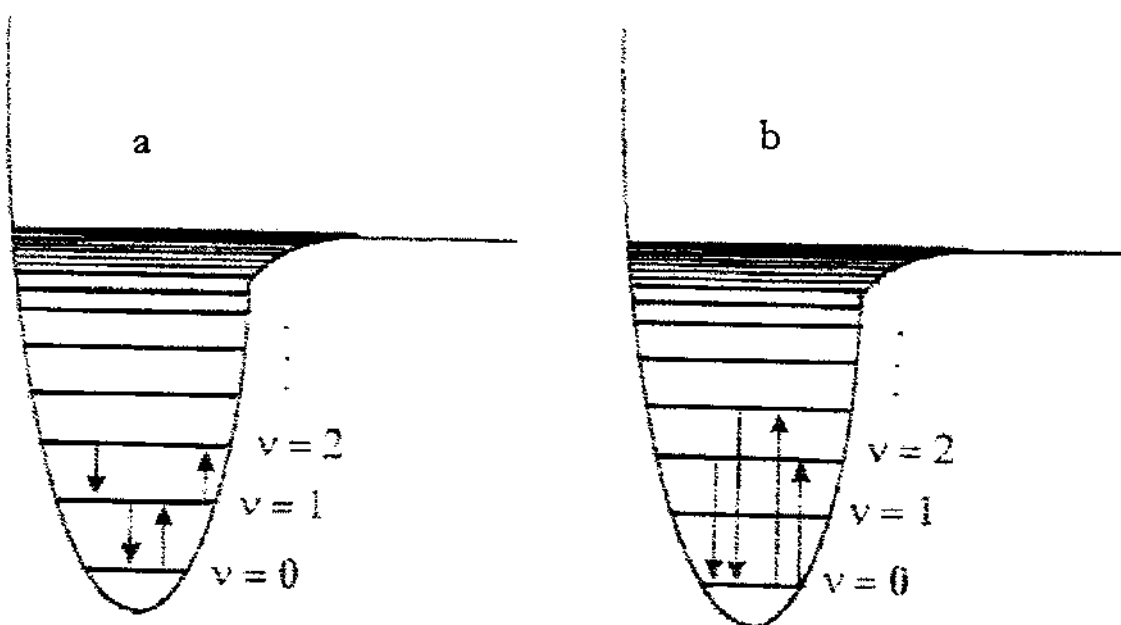


Figura 3 - Transições de níveis vibracionais que podem ocorrer no IV-médio (a) e no IV-próximo (b).

Como as bandas de absorção no infravermelho próximo são harmônicas originárias da interação de diferentes modos vibracionais e de combinações das bandas fundamentais, suas intensidades são baixas. Enquanto a frequência e o comprimento de onda da banda fundamental dependem da geometria, massa atômica e forças intramoleculares, a intensidade da banda depende das variações causadas no momento de dipolo pelo deslocamento vibracional. A intensidade das harmônicas reflete a intensidade da fundamental, sendo também, afetadas pela anarmonicidade. A intensidade da primeira harmônica está por volta de 10% da intensidade da fundamental e a segunda harmônica por volta de 1%. Para bandas de combinação (simples,

binárias ou de maior ordem) também ocorrem grandes diminuições de intensidade. As ligações predominantemente responsáveis pelas ocorrências espectrais na região NIR são: C-H, N-H e O-H.

As bandas fundamentais normalmente ocorrem no IV- Médio. Bandas Harmônicas, também chamadas bandas de sobretons ou de "overtone", são bandas de absorção múltiplas das fundamentais. Para a frequência fundamental (ν), a primeira harmônica é dada por 2ν , a segunda por 3ν , e assim por diante. Elas originam-se das transições onde $\nu = 2, 3, \dots$ e sua intensidade é bem menor do que as das bandas fundamentais. Na prática estes níveis de energia não são espaçados igualmente, devido a anarmonicidade. Em consequência, a ocorrência destas bandas não se dá exatamente à frequências múltiplas da frequência fundamental. De fato, elas são deslocadas para comprimentos de onda maiores, ocorrendo na região NIR.

Bandas de Combinação são as bandas de absorção obtidas a partir da diferença ou soma de duas ou mais frequências fundamentais diferentes ($\nu_i \pm \nu_j$), onde ν_i e ν_j são os estados vibracionais. Uma combinação binária é constituída da diferença, ou soma, de duas bandas de absorção, combinação ternária, de três bandas, etc. O mecanismo de variação simultânea de dois ou mais números quânticos vibracionais (combinação) é chamado de mecanismo de Stepanov.

Um espectro NIR contém, portanto, principalmente informações sobre a quantidade de átomos de hidrogênio ligados a carbono, nitrogênio e oxigênio.

As análises por NIR são rápidas, já que dispensam, muitas vezes, o preparo da amostra, utilizando pequenas quantidades de amostra, as quais não são destruídas.

As aplicações de medidas de transmitância para análises quantitativas [31] em amostras sólidas ou em soluções concentradas têm crescido rapidamente nos últimos anos. Avanços em instrumentação, inclusive com o desenvolvimento de programas computacionais mais adequados para o processamento do sinal, monocromadores com melhor desempenho (por ex: AOTF) e uso de tratamento quimiométrico, tem tornado a espectroscopia NIR uma ferramenta atrativa para uma grande quantidade de materiais nas áreas de agricultura [19,29,32-34], indústria alimentícia [29,35,36], petroquímica [37-42], têxtil [43], farmacêutica [44-48], sistemas biológicos [49-52] e outros segmentos industriais, de uma maneira geral.

I.7. Transmitância

As intensidades das bandas em espectroscopia NIR são referidas em termos de transmitância ou absorbância [29]. Transmitância é a razão da energia radiante transmitida através de

uma amostra com a energia radiante aplicada sobre a amostra. Absorbância é o logarítmo recíproco da transmitância ($A = \log 1/T$).

Os espectros para posterior tratamento foram calculados usando-se as medidas de transmitância, empregando a cela vazia como referência e foram obtidos para cada comprimento de onda sendo convertidos para valores de absorbância, pela expressão abaixo:

$$A = -\text{Log } I_s/I_e \quad (3)$$

onde **A** é o valor da absorbância, I_e é a intensidade do feixe medido para cada comprimento de onda da cela vazia, e I_s é a intensidade do feixe para cada comprimento de onda, obtido com a cela contendo a amostra.

1.8. Filtros óptico-acústicos sintonizáveis (Acousto Optic Tunable Filters, AOTF)

A espectroscopia NIR se vale de instrumentação similar à utilizada para a espectroscopia de absorção no UV-VIS. Lâmpadas de tungstênio são usadas como fontes e celas são usualmente de quartzo ou vidro, como as utilizadas na região de 200 a 700 nm. Os detectores são, geralmente, fotocondutores de sulfeto de chumbo (PbS). Alguns

instrumentos empregam vários filtros de interferência para seleção de bandas de radiação. Com a evolução dos monocromadores, passou-se a utilizar grades de difração, sistemas com transformada de Fourier e Filtros Óptico-Acústico Sintonizáveis (AOTF).

O monocromador de AOTF baseia-se no efeito óptico-acústico [54,55], teorizado em 1922 por Brillouin, segundo o qual a onda luminosa poderia ser difratada por uma onda acústica. Em 1932, Debye e Sears [54,55] observaram pela primeira vez o efeito de interação luz-som, ou seja, o efeito óptico-acústico. Esta idéia está fundamentada no fato de que quando uma onda acústica propaga em um material transparente, ela produz uma modulação periódica no índice de refração devido a mudança na densidade no meio acústico, induzido pela compressão e rarefação da onda sonora que nele se propaga. Em consequência a propagação de uma onda acústica produz uma rede de difração móvel que irá difratar frações da luz incidente. Ver Figura 4 abaixo:

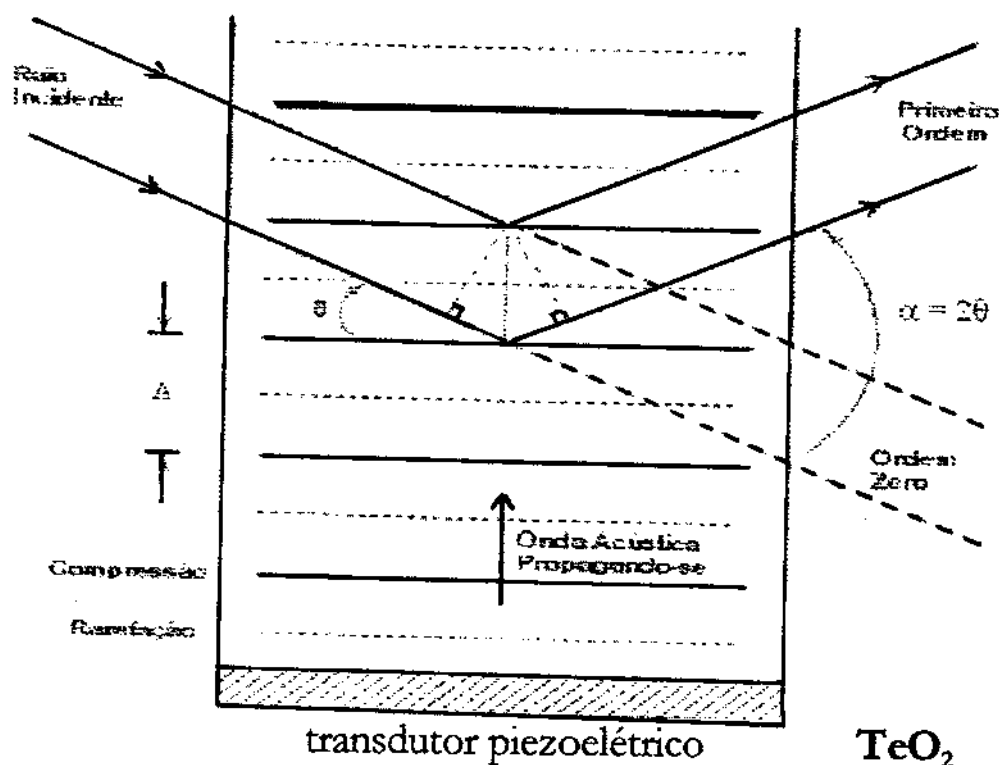


Figura 4 - Difração da luz em meio isotrópico.

O uso de AOTF apresenta um grande número de vantagens em relação aos monocromadores usualmente utilizados. Não possui partes móveis, já que a seleção do comprimento de onda é feita através da rádio-freqüência aplicada (RF), o que permite acesso rápido e aleatório a qualquer comprimento de onda. A largura da banda é estreita (cerca de alguns nanômetros). O AOTF é um dispositivo de dimensões reduzidas (3x3x6 cm) que permite o uso de fibra óptica no feixe de saída, possibilitando seu uso em processos industriais que necessitem monitoração in/on-line. A eficiência de transmissão de luz por um AOTF pode chegar a 98%.

I.9. Quimiometria

Quando várias medidas instrumentais são realizadas para uma mesma amostra e diversos valores para muitas variáveis são obtidos, a análise de dados necessita ser feita através das técnicas matemáticas da Estatística Multivariada.

O emprego das técnicas Matemáticas e da Estatística Multivariada para uso no tratamento de dados químicos levaram ao desenvolvimento de uma nova área na Química, a Quimiometria[2,28,56].

A Quimiometria é assim entendida como a parte da Química que utiliza métodos estatísticos e matemáticos para selecionar ou definir as melhores condições para a obtenção de medidas experimentais e permitir a obtenção mais completa possível de informações, a partir de dados físico-químicos.

A classificação das amostras, de acordo com suas propriedades, bem como a quantificação de variáveis e até mesmo a previsão de resultados, tomaram a Quimiometria indispensável em muitas áreas químicas, como por exemplo nas análises por infravermelho próximo [29].

I.10. Análise de Componentes Principais (PCA) e Regressão de Componentes Principais (PCR):

A Análise de Componentes Principais [57] foi introduzida no tratamento de dados químicos por Malinowski, no final dos anos 60. O nome dado na época era o de Análise de Fatores.

O objetivo principal desta técnica é o de encontrar relações entre objetos e classificá-los de acordo com suas similaridades. Deve também detectar as amostras anômalas, ou seja, aquelas que não pertencem a nenhuma das categorias de amostras conhecidas.

A Análise de Componentes Principais é utilizada para a redução de dados. Pode ser entendida geometricamente como um método para encontrar uma estrutura linear (reta, plano, hiperplano) que modele de forma adequada o conjunto de pontos. Isto permite que um espaço de dimensão alta possa ser reduzido a um outro de menor dimensão, o que torna possível a visualização de pontos.

O método da Regressão dos Componentes Principais pode ser dividido em duas fases. A primeira fase consiste em descrever o bloco das variáveis independentes (matriz X) pela modelagem de componentes principais, o que resulta na representação de X como sua matriz de *scores* T .

Na Segunda fase da Regressão dos Componentes Principais, utiliza-se a Regressão Linear Múltipla para que seja estabelecida a

relação entre o bloco de variáveis dependentes (matriz Y) e a matriz de *scores* T.

Corre-se o risco no PCR de perder informação na escolha do número de componentes principais a serem utilizados. A escolha correta do número de componentes principais é, portanto, uma etapa fundamental para uma adequada modelagem.

I.11. Método de Calibração Multivariada Empregando Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares, PLS):

O método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) [2,56-62], tem sido muito utilizado para efetuar Calibrações Multivariadas, particularmente na Química Analítica.

O PLS decompõe a matriz de dados em uma soma do produto de dois vetores, que são chamados de *scores* e *loadings*. Uma matriz de variáveis independentes (X), que contém os dados dos espectros e uma matriz de variáveis dependentes (Y), que contém as propriedades a serem analisadas, podem ser representadas pelas suas matrizes de *scores* sem perda de informação estatística útil.

Uma relação entre os dois blocos de *scores* pode ser feita correlacionando-se os *scores* do bloco Y, com os *scores* do bloco (X) para cada componente principal de cada vez.

Componentes principais são funções lineares das variáveis originais, estimadas para conterem, em ordem mais baixa, as principais informações estruturadas dos dados.

Com a finalidade de manipular as informações desses dois blocos simultaneamente e obter a melhor correlação possível é feita uma leve rotação dos eixos das componentes principais. Ocorre então a mudança dos valores dos *scores*, que são projeções dos pontos nestes eixos o que produz a melhor relação linear entre os *scores* dos dois blocos.

Na análise de dados com o PLS utiliza-se toda a informação disponível e determina-se as componentes principais em X e Y.

Feita a calibração, o modelo é utilizado para a previsão do bloco dependente a partir do bloco independente conhecido.

A Figura 5, abaixo, mostra de forma geométrica a relação entre as variáveis X e Y, quando utilizamos o PLS.

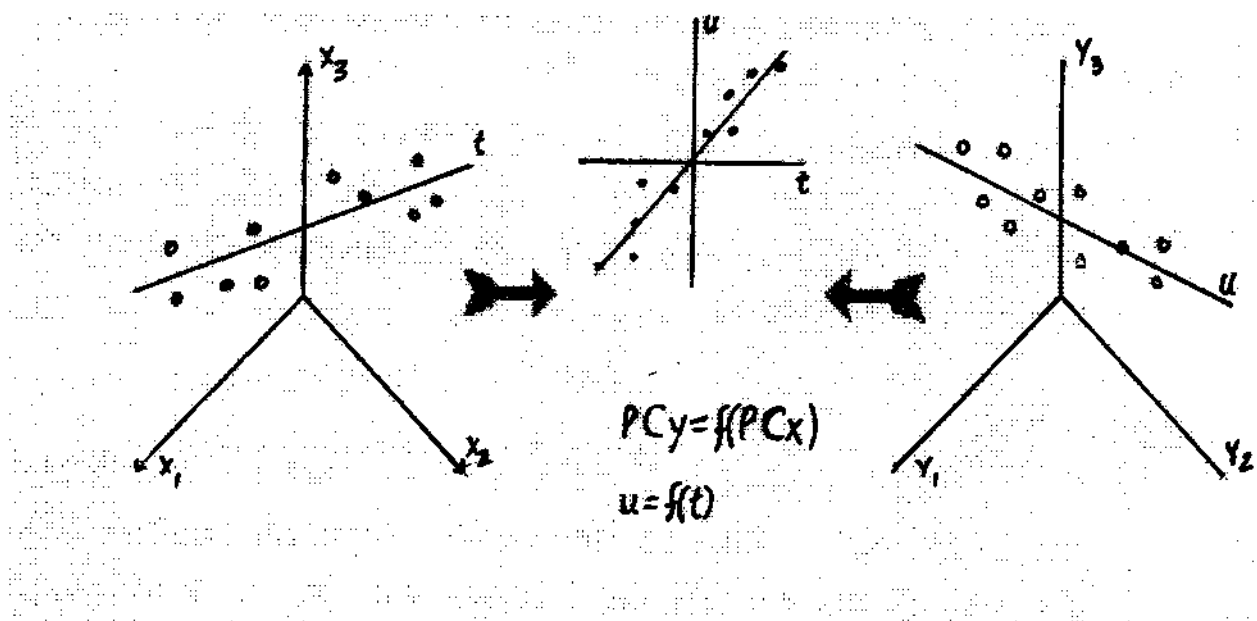


Figura 5 - Relação entre as variáveis X e Y no PLS.

II. OBJETIVOS:

II.1. Desenvolver metodologia rápida, baseada em medidas de reflectância na região visível do espectro, para a determinação do índice de cor (cor ICUMSA) de açúcares. Secundariamente, este trabalho tem como objetivo a construção de um espectrofotômetro que opere na região visível do espectro e que empregue um arranjo linear de fotodiodos com o intuito de se obter espectros de reflectância de forma mais rápida e com o uso de feixes de fibras ópticas.

II.2. Desenvolver metodologia baseada em medidas de transmitância na região NIR para a determinação direta e simultânea do grau BRIX e da acidez total de sucos de laranja concentrados.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Construção do Espectrofotômetro Multicanal

O esquema do espectrofotômetro multicanal construído para a obtenção de medidas de reflectância difusa é mostrado na Figura 6, abaixo:

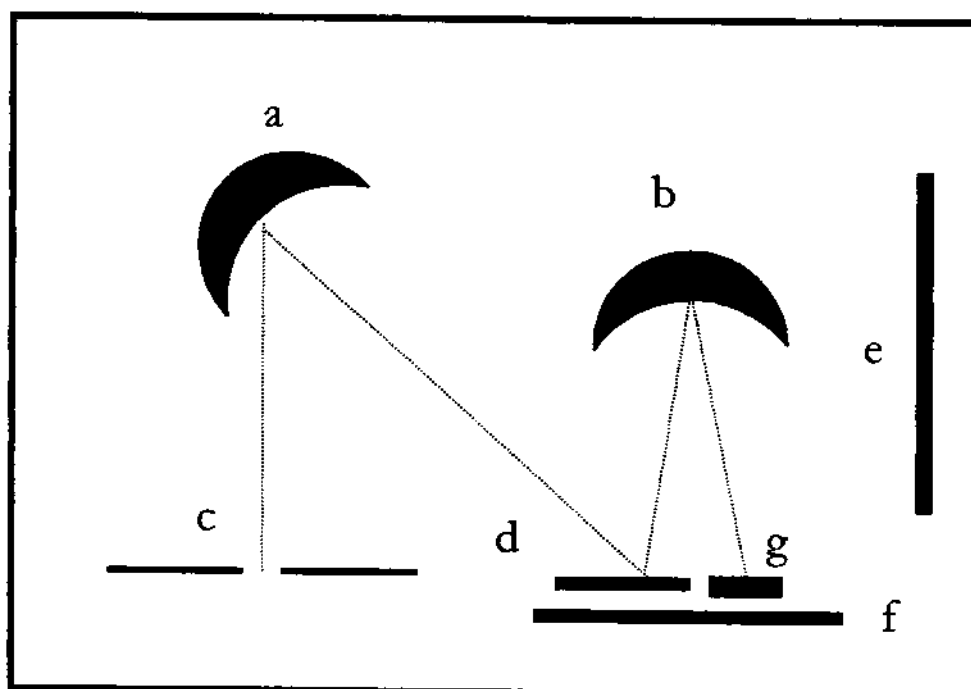


Figura 6 - Esquema da vista superior do espectrofotômetro, onde: a e b são os espelhos côncavos (45 mm de diâmetro e 150 mm de distância focal - Funbec); c é a fenda regulável para a entrada da luz; d é a rede de difração (3,0 x 3,0 cm, com 650 linhas/mm e blaze em 500 nm); e é a placa RC1000; f é a placa RC1001; e g é o arranjo linear de fotodiodos.

A fonte de alimentação para o Arranjo Linear de Fotodiodos foi construída para se obter um “ripple” ≤ 1 mV. Tal especificação é fundamental, pois é recomendada pelo fabricante do Arranjo Linear de Fotodiodos [63], sendo necessária para aquisição de dados com resolução de 12 bits.

As placas de circuito integrado (RC1000 e RC1001) do Arranjo Linear de Fotodiodos operam com tensões de +5V, +15V e -15V na seção digital; já na seção analógica as tensões exigidas são de -15V e +15V.

Para a seção digital utilizou-se reguladores de voltagem da família 78 e 79. Já para a seção analógica utilizou-se na construção da fonte os reguladores variáveis de voltagem LM317 e LM337 [64]. Estes reguladores podem ser ajustados para tensões desejadas por meio de resistores variáveis ligados em um de seus terminais [10].

As tensões e flutuações da corrente contínua das fontes das seções analógica e digital foram monitorados através de um osciloscópio e se mostraram adequadas para uso com arranjo linear de fotodiodos.

Foram construídos dois suportes com placas de alumínio em L com a finalidade de posicionar as placas RC1000 e RC1001 dentro da caixa de alumínio do monocromador(e e f da Figura 6).

Para a instalação da placa de interface no microcomputador foi necessária a construção de uma caixa de conectores externa. Nesta caixa de conectores foram instalados 3(três) conectores com 20 pinos cada um. Cabos paralelos com 20 fios e conectores (fêmeas) nas duas extremidades foram montados com a finalidade de facilitar a conexão e desconexão ao microcomputador.

Após a instalação da placa nos conectores de expansão do computador, ligou-se seus conectores, tanto na placa como na caixa de conectores externos. Esta caixa de conectores foi ligada ao Arranjo Linear de Fotodiodos através de um pino para o “clock”, um pino para o “start”, um pino para o terra e um conector tipo BNC através do qual é transportado o sinal de vídeo.

O ajuste do PDA ao plano focal da fenda foi feito inicialmente de forma grosseira, com o uso de uma régua que permitiu alinhar a superfície do Arranjo Linear de Fotodiodos com a fenda.

Um ajuste mais fino foi feito através da observação de vários espectros, usando como fonte uma lâmpada de vapor de mercúrio e movimentação de parafusos micrométricos de ajuste no fundo da caixa do monocromador. Pela definição das linhas do espectro achou-se o melhor ajuste.

Para a calibração do Arranjo Linear de Fotodiodos utilizou-se uma lâmpada de mercúrio [65] , cujas raias de emissão são conhecidas e uma fonte de tungstênio com filtro azul (465 nm). A

faixa de comprimentos de onda coberta pelo Arranjo Linear de Fotodiodos foi determinada como sendo de 238,1 nm. Tal faixa pode cobrir comprimentos de onda variados dentro da região do visível, dependendo da posição dada aos parafusos de ajuste do fundo da caixa do monocromador.

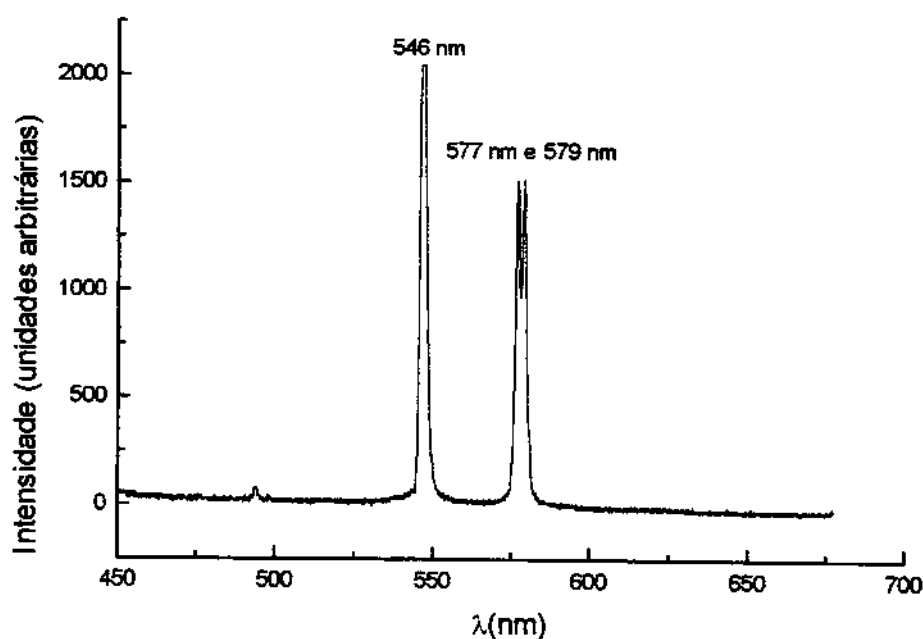


Figura 7 -Espectro de emissão de uma fonte de vapor de mercúrio utilizado na calibração de comprimentos de onda dos 1024 diodos.

Para as medidas de reflectância difusa utilizou-se uma fibra óptica bifurcada.

III.2. Medidas de reflectância de amostras de açúcar

O método oficial de determinação do índice de cor de açúcares para exportação foi estabelecido pela ICUMSA e utiliza uma solução 50% de açúcar em água [16]. A solução assim obtida é filtrada para a eliminação de material particulado. A seguir é lido o valor da absorção da luz, no comprimento de onda de 420nm (visível). O procedimento requer várias horas para possibilitar uma determinação.

Avaliou-se a cor ICUMSA de vários açúcares através da espectrofotometria de reflectância difusa multicanal. A luz refletida foi dispersa por uma rede de difração. O detector utilizado foi um Arranjo Linear de Fotodiodos com 1024 elementos.

Para a obtenção das medidas montou-se um sistema, conforme o mostrado na Figura 8. As amostras de açúcar foram trituradas e peneiradas tomando-se a porção de granulometria acima de 100 mesh, de forma a ficarem mais homogêneas. Foram obtidos espectros de 400 a 600 nm para amostras compactadas na cela de reflectância difusa. Utilizou-se como referência uma amostra padrão de BaSO₄ (sólido branco).

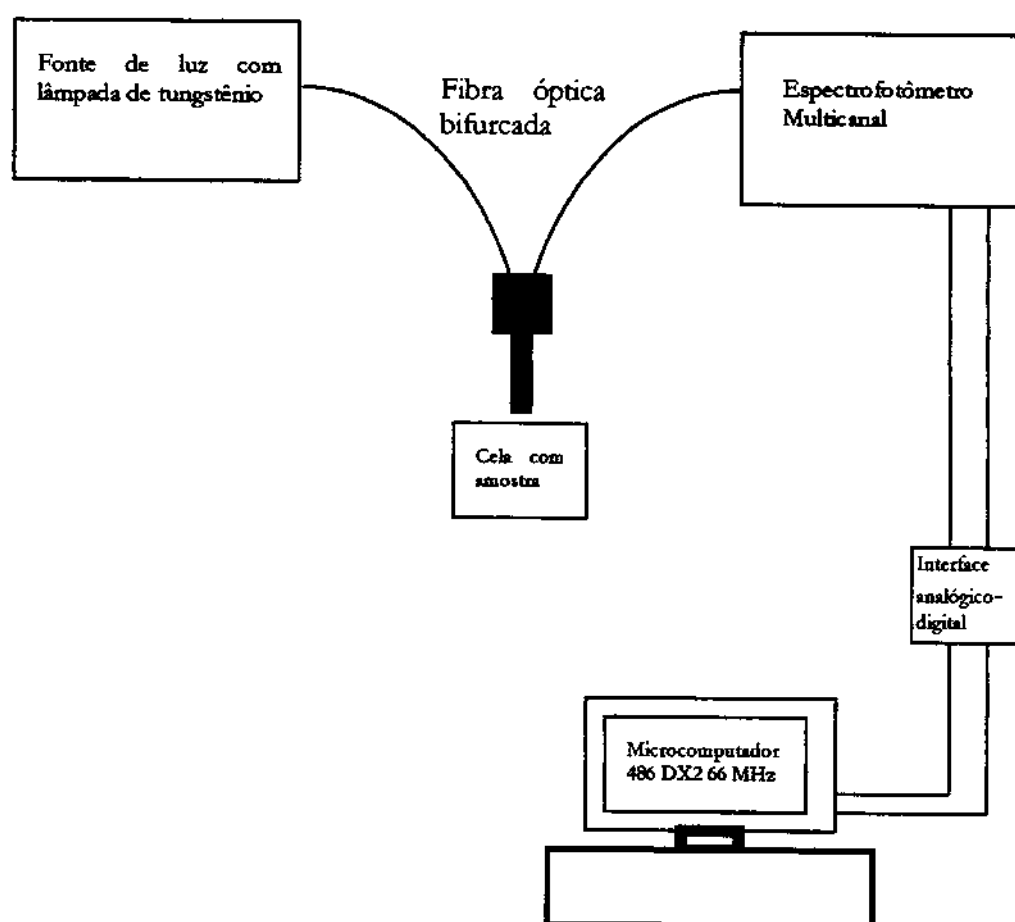


Figura 8 - Esquema do Sistema montado para medidas de reflectância difusa de açúcares.

III.3. Determinação simultânea de acidez total e sólidos dissolvidos (grau brix) em suco de laranja concentrado, utilizando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).

III.3.1. Diagrama de blocos do Sistema NIR utilizado.

A Figura 9 apresenta o espectrofotômetro NIR empregado para a obtenção de medidas de transmitância. O instrumento emprega um Filtro Óptico-Acústico Sintonizável (Brimrose - AOTF) para varrer o espectro NIR na faixa de 1500 a 1900 nm [66]. A fonte de luz é constituída por uma lâmpada de 100 W halogênio/tungstênio ligada a uma fonte ISO-TECH IPS 1810H, fornecendo 12V/8A. Um filtro de transmitância (Ealing, RG 830) é empregado para cortar a luz nos comprimentos de onda abaixo de 830 nm. O controle do sinal de rádio frequência aplicado ao AOTF é feito por um gerador de rf (Brimrose) controlado por um microcomputador [67] (IBM Pentium 100 MHz) executando um programa de controle escrito em VisualBasic 4.0 [68]. Um amplificador "lock-in" (Stamford, SR 830 DSP) e uma placa de aquisição de dados com um conversor AD de 12 bits (Advantec, modelo 711S) [69] são empregados para recuperar o sinal. O "lock-in" fornece a modulação TTL (190 Hz) para o sinal de rf. Um espectro completo (88 comprimentos de onda, média de 10 leituras

por comprimento de onda) é obtido em 20 s, usando o espectrofotômetro construído.

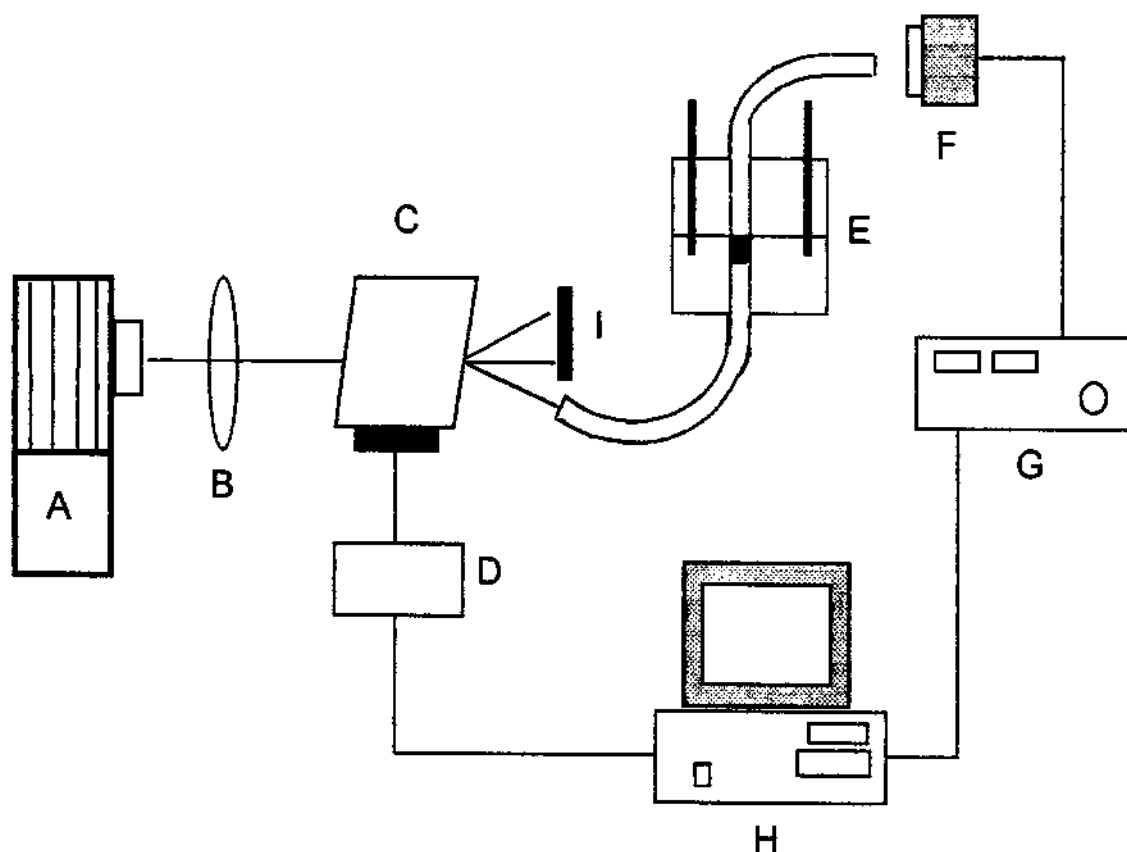


Figura 9 - Arranjo espectrofotométrico para obtenção de medidas de transmitância no Infravermelho Próximo. A, caixa da fonte de luz; B, lente de colimação; C, filtro óptico-acústico sintonizável; D, gerador de rádio frequência; E, cela de transfectância; F, detetor de PbS; G, amplificador "lock-in"; H, microcomputador; e I anteparo.

III.3.2. - Cella para medidas de Transmitância

A Figura 10 mostra a cela construída para a obtenção de medidas de transmitância em suco de laranja concentrado. A cela é constituída de PTFE e duas fibras ópticas de núcleo líquido

(Lumatec NIR-liquid guide, 7 mm de diâmetro e 2 m de comprimento) que são empregadas como guias de onda luminosa da fonte de luz até a cela e da cela até o detector. A amostra é colocada diretamente na superfície final da fibra óptica, encaixada dentro da parte inferior da cela e alojada num reservatório circular de 2 mm de profundidade e com o mesmo diâmetro da fibra.

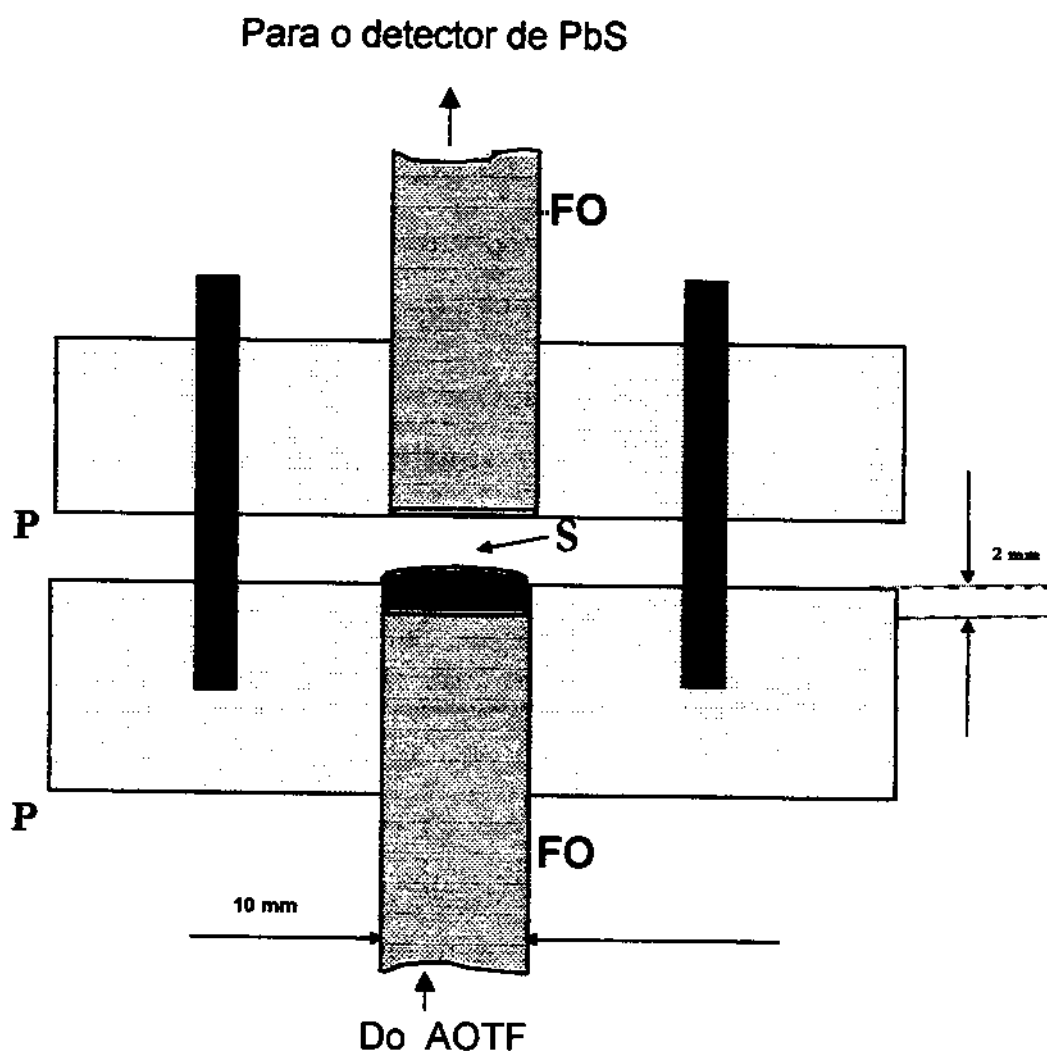


Figura 10 - Cela de Transmitância. , Fibra óptica (FO) com núcleo líquido; P, blocos de PTFE, e S, suco de laranja concentrado.

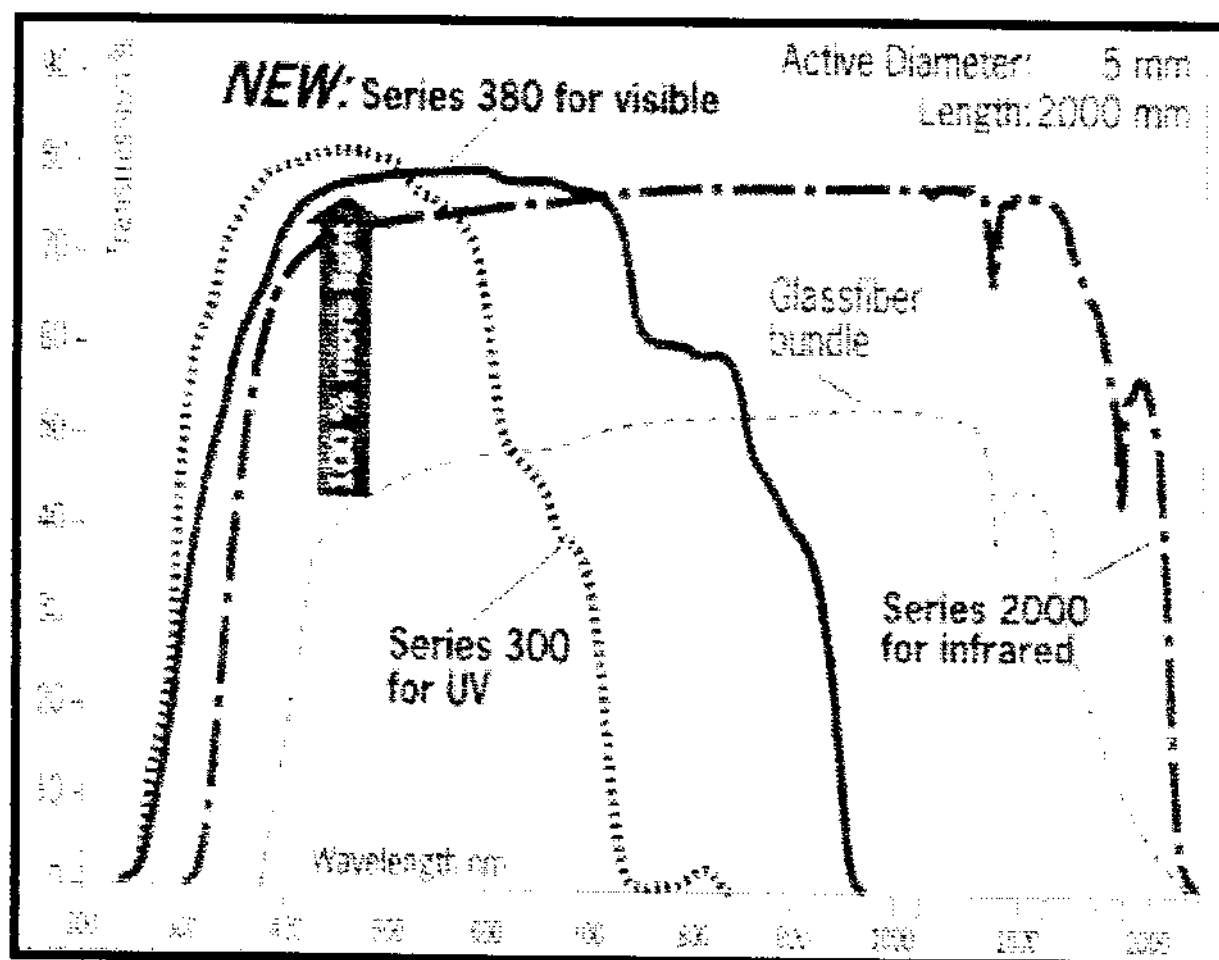


Figura 11 - Espectros comparativos de várias fibras fabricadas pela Lumatec. A fibra óptica utilizada foi a da "**Series 2000 for infrared**".

O espectro da fibra óptica mostrado na Figura 11 permite verificar que a partir de 1900 nm ocorre um corte na intensidade

luminosa, daí a escolha da faixa para a obtenção dos espectros (1500 nm - 1900 nm).

As amostras de suco de laranja concentrado foram obtidas da Citrosuco S.A. e foram conservadas congeladas em freezer, até sua utilização. O laboratório de Controle de Qualidade da Citrosuco forneceu uma tabela com as medidas de grau Brix (65.5-66.5) e acidez total referentes as amostras. Os valores de grau Brix foram obtidos num refratômetro digital a 25° C. A acidez total (4-6%(m/m)), expressa em função da quantidade de ácido cítrico, foi obtida por titulação potenciométrica clássica, com o uso de solução padrão de NaOH, até pH 8.2.

III.3.3. Procedimento Analítico

Após a otimização do treinamento do operador, através de várias medidas preliminares, chegou-se ao procedimento analítico que produziu a melhor rotina e os melhores resultados.

A rotina de colocação da amostra consiste em abrir a cela, introduzir a amostra de suco de laranja concentrado, através de uma haste de vidro (utilizada também na sua homogeneização) até preencher o espaço cilíndrico da cela (1 cm X 2 mm) e fechar a cela com bastante cuidado para não retirar parte da amostra da cavidade da cela.

Após a colocação da amostra, e já com todo o equipamento ligado e estabilizado por mais de 30 minutos, obtém-se os espectros. Cada medida é a média de 10 leituras a cada comprimento de onda, obtida, conforme programado. O tempo de obtenção dos espectros é de cerca de 1 minuto. Os dados obtidos são salvos no diretório escolhido para posterior tratamento e visualização. Neste caso utilizou-se o programa Origin versão 4.0, para estas finalidades.

Para a limpeza da cela utiliza-se água destilada e papel fino absorvente. A nova amostra só é introduzida depois da cela estar limpa e seca.

III.3.4. Tratamento de Dados

Após a obtenção dos espectros, os dados são salvos e a seguir são tratados no programa computacional Origin 4.0. No Origin são feitos os cálculos para a obtenção dos espectros de transmitância. Os dados são transformados numa matriz.

A matriz transposta de dados é importada para o programa computacional The Unscrambler 6.0. São inseridas duas colunas com as propriedades das amostras, ou seja, acidez total e brix. São realizados alguns pré-tratamentos, como uso de um filtro digital para minimizar o ruído ("smoothing") e aplicação da MSCorrection (correção para diferenças de caminho óptico ocorridas durante a obtenção dos espectros).

"Smoothing" é uma transformação relevante para variáveis cujas funções variam com o tempo, provocando ruídos indesejáveis. No Unscrambler existem dois algoritmos para a função "smoothing". O primeiro é a Média Móvel que é um método clássico que restitui cada observação para uma média de observações adjacentes. O segundo é o de Savitzky-Golay que equivale a derivada de ordem zero, o qual foi utilizado neste trabalho.

"Multiplicative Scatter Correction" (MSCorrection - nome como é chamado no Unscrambler) é um método de transformação usado para compensar os efeitos aditivos e/ou multiplicativos em dados espectrais. Um número grande de efeitos similares podem ser tratados com sucesso pelo MSCorrection: variação do caminho óptico, mudanças de offset, etc.

MSCorrection é uma transformação específica para espectros. Ela consiste numa conveniente linha de regressão separada para cada amostra do espectro, expressa em função do valor médio para cada comprimento de onda; os coeficientes a e b da linha de regressão são usados para corrigir os valores para cada amostra.

$$\text{MSC completo: } M_{\text{novo}}(i, k) = (M(i, k) - a)/b$$

$$\text{Offset comum: } M_{\text{novo}}(i, k) = M(i, k) - a$$

Amplificação comum: $M_{\text{novo}}(i, k) = (M(i, k))/b$

O MSCorrection pode ser aplicado ao espectro inteiro ou para faixas escolhidas do espectro. Variáveis consideradas importantes podem ser omitidas (deixadas fora da correção).

No procedimento de modelagem escolhe-se um certo número de amostras, incluindo os extremos, para serem utilizadas no modelamento matemático empregando Mínimos Quadrados Parciais (PLS). "Outliers" são detectados e retirados do modelo. "Outlier" é uma observação irregular (amostra afastada ou variável afastada), comparada com a maior parte dos dados. Pontos extremos não são necessariamente "outliers"; eles são pontos que aparentemente não pertencem a maior parte dos dados.

O restante das amostras do mesmo grupo é utilizado para se fazer a previsão das propriedades, com base no modelo obtido.

III.3.5. Amostras diluídas

Com o objetivo de verificar se o modelamento pelo PLS apresenta bons resultados quando a faixa de acidez total e grau brix é mais ampla, foram empregadas quarenta e cinco amostras de suco de laranja concentrado.

Inicialmente, quinze amostras de suco de laranja concentrado foram diluídas de forma a se obter mais trinta amostras. Cada

amostra original sofreu duas diluições. O total de amostras foi, portanto, de quarenta e cinco amostras.

Utilizando-se um refratômetro RFM 340 (BS), do Laboratório de Análises da Citrosuco S.A. de Limeira - S.P., foram obtidos os graus brix das quarenta e cinco amostras, a 25 ° C.

O grau brix obtido no refratômetro refere-se a porcentagem em massa dos sólidos aparentes, que inclui açúcar e parte do ácido cítrico [70]. Há necessidade, portanto, de se incluir uma correção no grau brix, relacionada com o ácido cítrico não observado no refratômetro.

Para a obtenção do valor de brix corrigido da acidez da amostra, utilizou-se a tabela de Lindsay [71] ou a seguinte equação :

$$\mathbf{Bc = Br + (\% \text{ ácido} \times 0,19 + 0,01)} \quad (4)$$

Onde, **Bc** é o valor do grau brix corrigido, **Br** é o valor do grau brix obtido no refratômetro e **% ácido** é a porcentagem em massa do ácido expressa em função do ácido cítrico existente na amostra.

A faixa de brix corrigida foi de 61,91 à 66,07 e a faixa de acidez total obtida foi de 2 à 8 % (m/m), para as soluções diluídas

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Espectros Típicos para açúcares

A Figura 12, abaixo, apresenta 10 espectros de reflectância de açúcares, com vários índices de cor:

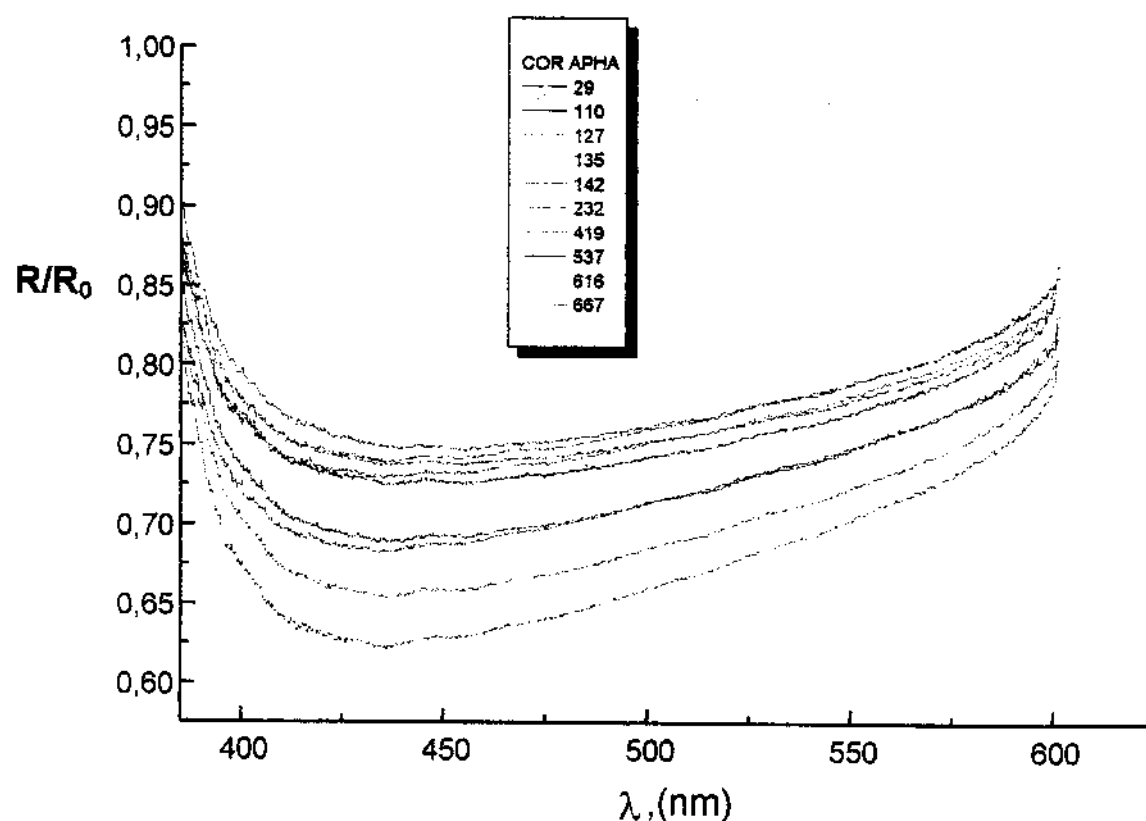


Figura 12 - Espectros de reflectância de amostras de açúcar com índices de cor entre 29 e 667.

IV.2. Espectros Típicos para sucos de laranja

A Figura 13 apresenta os espectros NIR obtidos de 20 amostras de sucos de laranjas concentrados produzidos pela

Citrosuco S.A.. A faixa de 70 a 92 MHz do AOTF, corresponde aos comprimentos de onda na faixa de 1900 a 1500 nm.

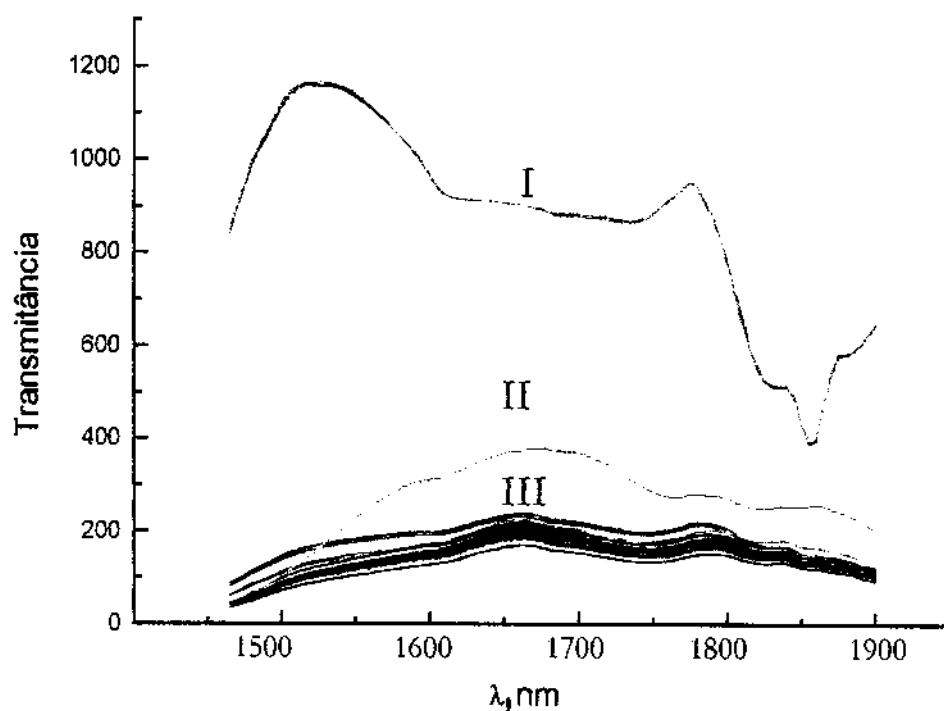


Figura 13 -Espectros típicos obtidos . De cima para baixo: I, grupo de espectros: referência ar: 6 espectros; II, grupo de espectros: referência água: 3 espectros; III, grupo de espectros: 20 amostras de suco de laranja.

A Figura 14 mostra espectros de absorbância de amostras de suco de laranja concentrado, após os cálculos em que relacionamos os espectros do suco com os espectros respectivos do branco (utilizando-se como referência o ar). O eixo X apresenta os comprimentos de onda em nm.

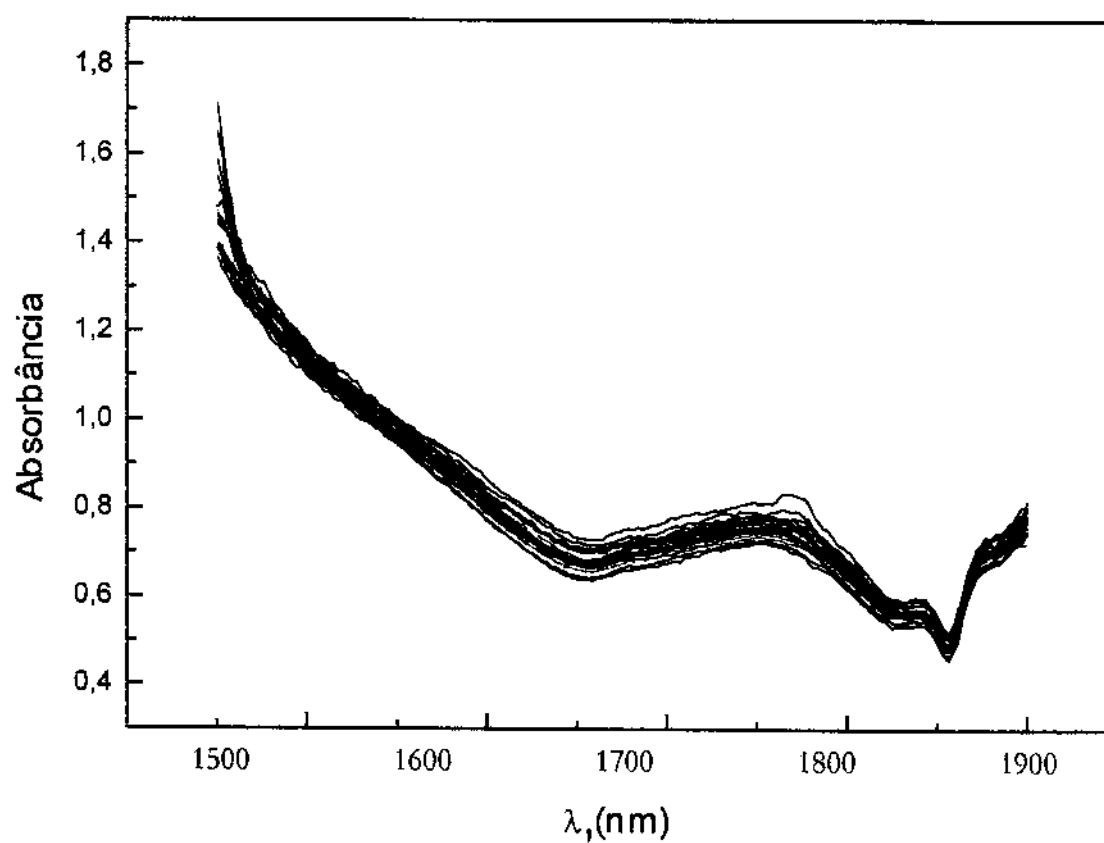


Figura 14: Conjunto de espectros de absorbância obtidos de 24 amostras de suco de laranja concentrado.

IV.3. Determinação do índice de cor de açúcares

Com o objetivo de comparar os valores obtidos nos espectros de reflectância difusa em 420 nm com os obtidos pelo método padrão, fez-se um gráfico (Reflectância vs Cor ICUMSA), obtendo-se um coeficiente de correlação igual a 0,93.

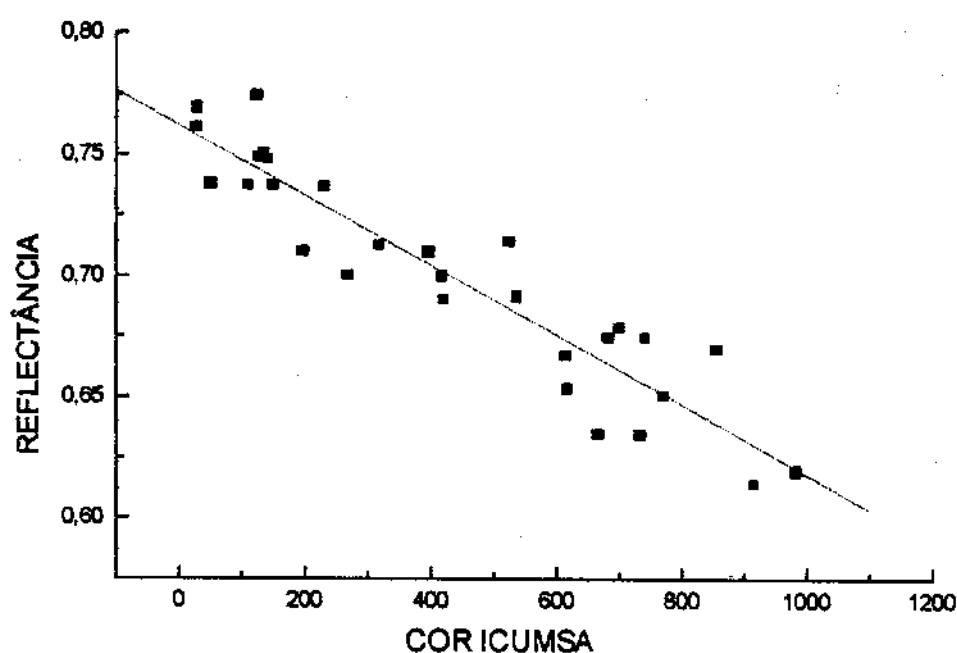


Figura 15 - Relação entre Reflectância (420 nm) e cor ICUMSA.

Tabela V - Correspondência entre cor ICUMSA e Reflectância Difusa. A coluna CI * CALCULADO foi obtida através da equação da regressão linear da reflectância em 420 nm.

n° AMOSTRA	COR ICUMSA (CI)	REFLECTÂNCIA 420 nm	CI * CALCULADO	REFLECTÂNCIA 440.2 nm
1	29	0.761	5	0.748
2	30	0.768	49	0.759
3	51	0.737	170	0.729
4	110	0.736	173	0.727
5	125	0.774	84	0.769
6	127	0.748	91	0.742
7	135	0.750	80	0.739
8	142	0.747	98	0.736
9	151	0.736	173	0.729
10	198	0.709	361	0.704
11	232	0.736	176	0.730
12	269	0.699	431	0.692
13	319	0.712	342	0.706
14	398	0.709	364	0.702
15	419	0.699	432	0.691
16	421	0.690	497	0.697
17	526	0.713	334	0.711
18	537	0.691	489	0.685
19	616	0.666	659	0.656
20	618	0.652	755	0.646
21	667	0.634	884	0.625
22	683	0.674	608	0.670
23	700	0.678	578	0.667
24	734	0.634	886	0.629
25	742	0.674	607	0.667
26	772	0.650	774	0.639
27	856	0.669	642	0.661
28	915	0.613	1027	0.605
29	983	0.619	988	0.616

Aplicou-se também Regressão Linear entre os valores de reflectância difusa medidos a 440,2 nm (mínimo de reflectância) e Cor ICUMSA, obtendo-se igualmente um coeficiente de correlação de 0,93.

A filtração usada no método padrão, que remove qualquer material insolúvel é, provavelmente, responsável pela correlação relativamente baixa obtida pela comparação dos resultados dos dois métodos. A retirada do material insolúvel influencia de forma determinante na medida, já que ele é um dos responsáveis pela cor observada nas amostras. Inversões, onde amostras visualmente mais escuras apresentam índice de cor menor que o previsto por reflectância, foram observadas com uma relativa frequência.

Em vista das inversões observadas tentou-se obter um modelo de calibração multivariada utilizando PLS1 com dados de todo o espectro ou partes dele. Os valores de RMSEP (Raiz Quadrada Média do Erro de Previsão) e SEP (Erro Padrão de Interpretação) para calibração utilizando os índices das cores ICUMSA foram de 67,7 e 70,5 , respectivamente, para modelo com 13 amostras e duas componentes principais. Para 19 amostras (no modelo) os valores de RMSEP e SEP obtidos foram ainda piores: 108,1 e 147,0 , respectivamente.

IV.4. Suco de Laranja

Durante duas safras de laranjas foram colhidas e analisadas mais de 1000 amostras de suco de laranja concentrado, fornecidas pela indústria exportadora Citrosuco S. A. (Limeira -SP e Matão - SP). A faixa de brix corrigida nas amostras analisadas foi de 65,5 a 66,5 % (m/m) e a faixa de acidez total medida em função do ácido cítrico foi de 3 a 7 % (m/m).

Muitos testes preliminares foram feitos até se obter uma Cella de Transmitância (Figura 10) adequada para as medidas no NIR. Foram feitas medidas de reflectância difusa com o suco seco (desidratado em dessecador), mas os resultados obtidos não foram adequados. Uma cela de fluxo para preenchimento de suco concentrado, utilizando bomba peristáltica, foi construída. A falta de uniformidade na camada de suco e os dois vidros externos à cela não permitiram medidas adequadas de transmitância no NIR, utilizando-se a cela de fluxo.

Para cada grupo de amostras (cerca de 100 amostras) obtidas da Citrosuco S. A., todos os procedimentos de obtenção de espectros e tratamento de dados foram realizados. No tratamento de dados pelo programa computacional The Unscrambler foi observado que a correção através do MSCorrection permitiu um melhor modelamento pelo PLS. Abaixo encontram-se espectros de 9 amostras, antes e após a correção no espectro inteiro, feita através do MSCorrection.

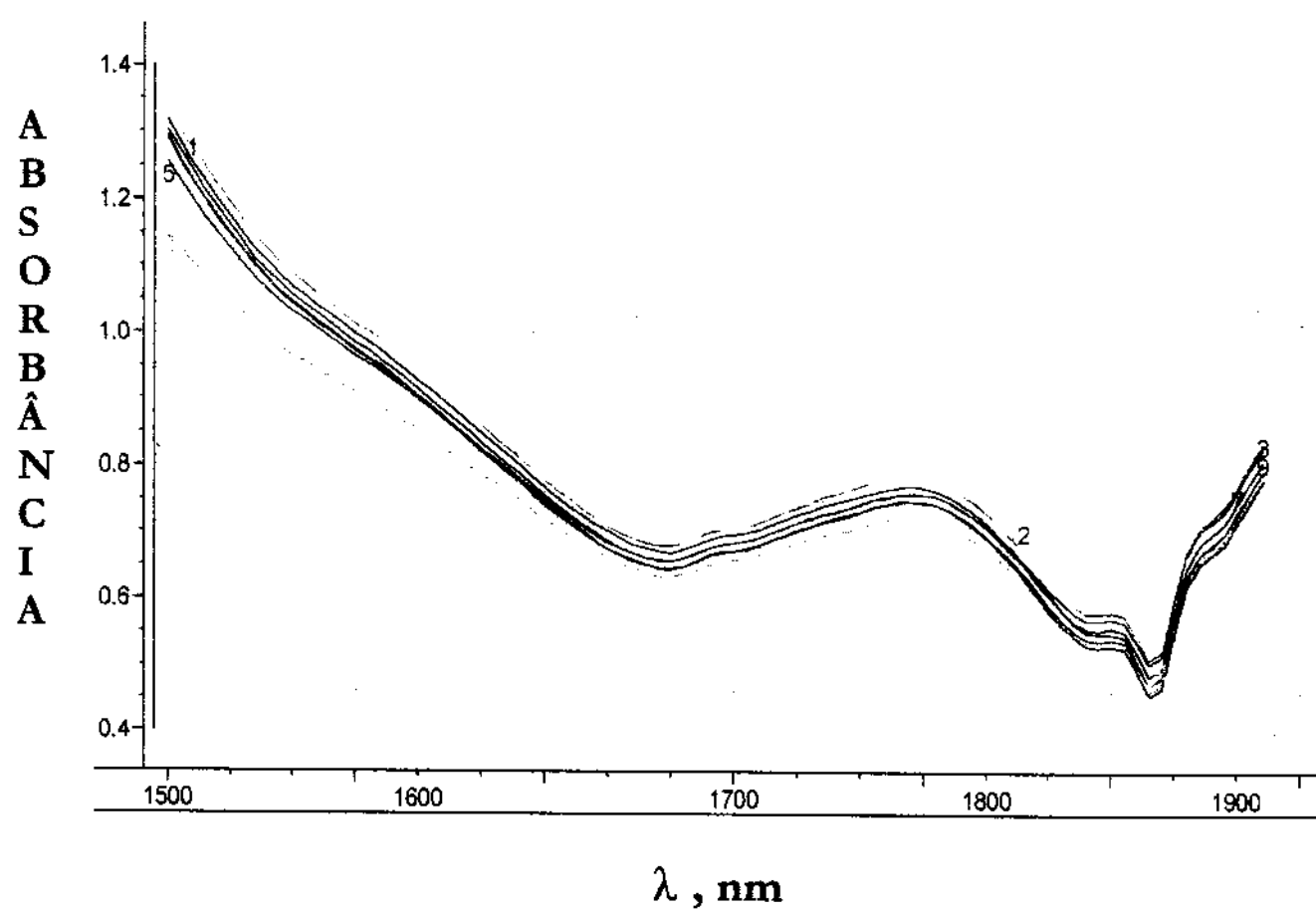


Figura 15 - 9 espectros antes do MSCorrection

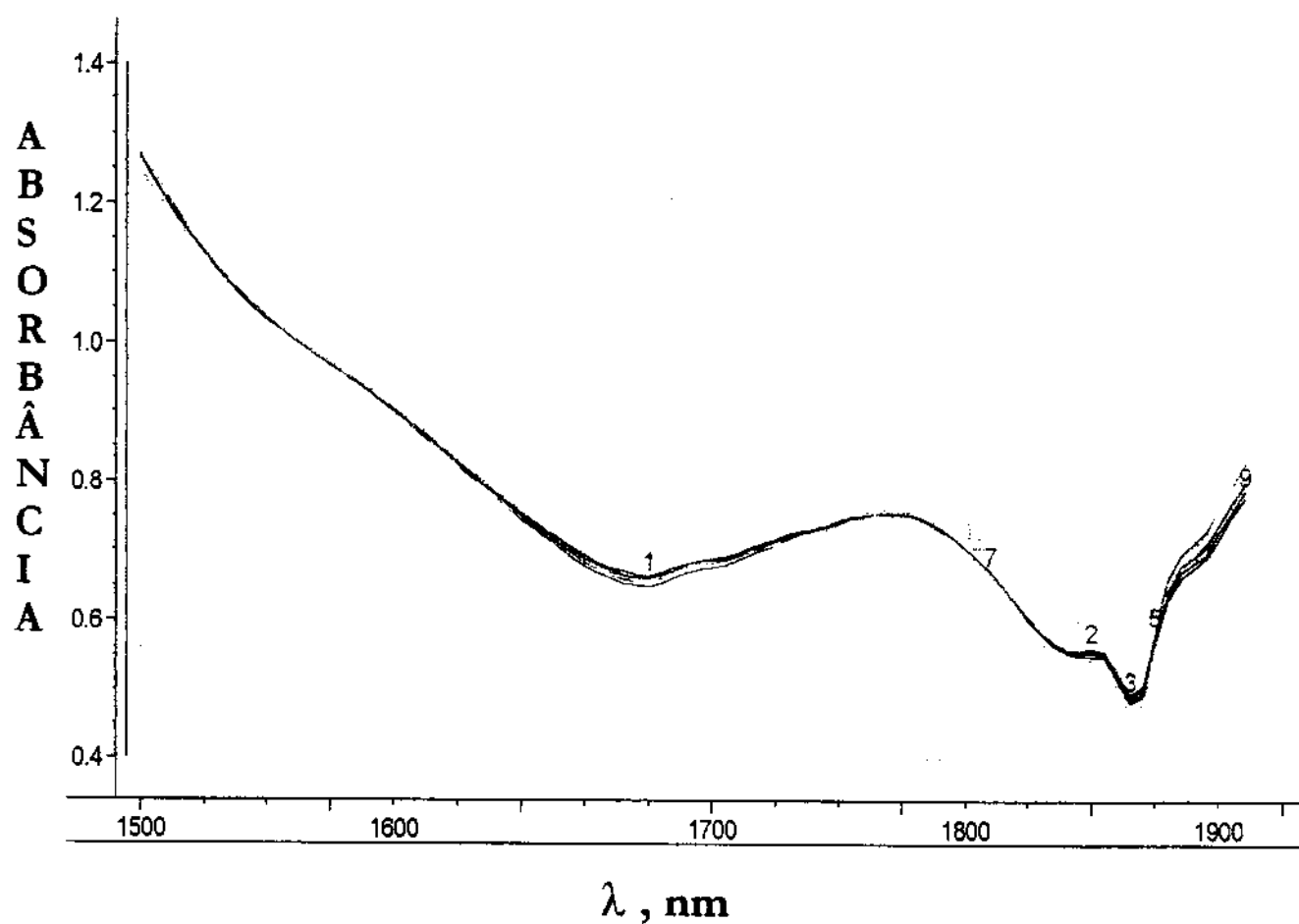


Figura 16 - 9 espectros após o MSCorrection

Nota-se nas Figuras 15 e 16 acima, entre 1700 e 1800 nm, uma banda de combinação correspondente ao grupo CH e em 1900 nm o início da região correspondente ao primeiro sobretom de absorção de H_2O .

Após a construção da cela de transmitância e de se efetuar medidas exploratórias no sentido de encontrar as melhores condições de obtenção dos espectros, 122 amostras tiveram seus espectros obtidos na região de 1500 a 1900 nm. Sessenta amostras escolhidas de maneira aleatória foram utilizadas para a construção do modelo PLS e outras 62 amostras foram utilizadas para a validação do modelo.

Uma matriz de dados contendo os espectros (cada espectro com 88 pontos obtidos das médias de 10 medidas por ponto) foi importada para o Unscrambler [61]. Foram testados vários pré-tratamentos de dados: passagem dos dados por filtro digital, filtro com transformada de Fourier, primeira derivada (algoritmo de Norris), normalização, seleção de variáveis e aplicação de MSCorrection. Este último tratamento se mostrou adequado para os dados contidos na matriz. Ver Tabelas 7 e 8, abaixo:

Tabela 7 - PLS1 para grau BRIX

	Nº DE AMOSTRAS PARA MODELO	RMSEC MODELO	SEC MODELO	Nº DE AMOSTRAS PARA PREVISÃO	RMSEP PREVISÃO (%)	SEP PREVISÃO (%)
ESPECTRO ORIGINAL	60 (-5 OUTLIERS)	0,18	0,18	62	0,16	0,16
COM MS Correction	60 (-5 OUTLIERS)	0,16	0,16	62	0,19	0,19
COM DERIVADA -NORRIS	60 (-5 OUTLIERS)	0,15	0,15	62	0,33	0,33

Tabela 8- PLS1 para acidez total

	Nº DE AMOSTRAS PARA MODELO	RMSEC MODELO	SEC MODELO	Nº DE AMOSTRAS PARA PREVISÃO	RMSEP PREVISÃO (%)	SEP PREVISÃO (%)
ESPECTRO PURO	60 (-5 OUTLIERS)	0,19	0,19	62	0,32	0,31
COM MS Correction	60 (-5 OUTLIERS)	0,19	0,19	62	0,39	0,28
COM DERIVADA -NORRIS	60 (-5 OUTLIERS)	0,22	0,22	62	0,33	0,29

Os melhores resultados de SEPs (standard error of prediction) obtidos para as 62 amostras de validação do modelo foram iguais a 0,31% (m/m) e 0,16 % (m/m) para acidez total e brix, respectivamente. Foram usadas 4 componentes principais. O Unscrambler sugere o número ótimo de componentes principais, baseado na curva de variância residual, no entanto, a observação visual desta curva permite uma melhor escolha do número de componentes principais.

Os valores de SEP encontrados para ambos os parâmetros, usando espectroscopia NIR, são adequados para o controle de qualidade de sucos concentrados.

O modelamento através do PLS2 foi feito para 60 amostras, com MSCorrection, obtendo-se os seguintes resultados:

Tabela 9- PLS2 para acidez total e grau BRIX:

	Nº DE AMOSTRAS PARA MODELO	RMSEC MODELO	SEC MODELO	Nº DE AMOSTRAS PARA PREVISÃO	RMSEP PREVISÃO (%)	SEP PREVISÃO (%)
ESPECTRO COM MSCorrection PARA BRIX	60 (-25 OUTLIERS)	0,20	0,20	11	0,20	0,20
ESPECTRO COM MSCorrection PARA ACIDEZ	60 (-25 OUTLIERS)	0,20	0,20	11	0,66	0,50

Para o PLS2, modelamento simultâneo de acidez total e grau BRIX, o número de "outliers" aumentou muito. A previsão para BRIX foi similar ao PLS1, no entanto, para acidez total, os resultados pioraram consideravelmente. Outras tentativas foram feitas, obtendo-se resultados semelhantes. Daí, a opção por tratar todos os dados utilizando-se PLS1, ou seja, modelamentos separados para acidez e brix.

Embora as mais de 1000 amostras analisadas tenham se mantido numa faixa estreita de grau brix e acidez total, resolveu-se diluir 30 amostras a partir de 15 amostras concentradas originais e tentar o modelamento das 45 amostras (mais duas amostras padrão), numa faixa mais ampla de brix e acidez total. Neste caso as faixas de BRIX e acidez total se estenderam de 66,07 - 61,91 e 5,56 - 3,91 %, respectivamente.

Utilizando-se 18 amostras representativas (dentro de toda a nova faixa mais ampla de acidez e brix) para modelamento e 27 amostras para previsão, obteve-se os valores de SEP para brix e acidez total de 0,355 e 0,431 %, respectivamente. Utilizou-se 3 componentes principais, conforme sugestão do Unscrambler, baseado na variância residual. Neste mesmo grupo de amostras fez-se o modelamento utilizando brix corrigido e brix sem correção da acidez. Os resultados obtidos foram similares, conforme Tabela 10, abaixo:

Tabela 10- PLS1 para grau brix corrigido e sem correção:

	Nº DE AMOSTRAS PARA MODELO	RMSEC MODELO	SEC MODELO	Nº DE AMOSTRAS PARA PREVISÃO	RMSEP PREVISÃO (%)	SEP PREVISÃO (%)
ESPECTRO PURO	18	0,20	0,20	27	0,36	0,35
BRIX CORRIGIDO				29	0,32	0,43
ESPECTRO PURO	18	0,19	0,19	27	0,42	0,33
BRIX SEM CORREÇÃO				29	0,31	0,32
COM MSCorrection	18	7,9E-2	8,1E-2	27	0,30	0,30
BRIX CORRIGIDO				29	0,39	0,39
COM MSCorrection	18	6,9E-2	7,1E-2	27	0,40	0,40
BRIX SEM CORREÇÃO				29	0,38	0,38

Observa-se que os valores de SEC e SEP para brix corrigido e brix sem correção não apresentam diferenças significativas.

Um suco de referência foi analisado para grau brix e acidez total por 12 laboratórios de indústrias de sucos, utilizando métodos padrão. O desvio padrão absoluto para as determinações de brix foi de 0,07 e o SEP 0,18%. O SEP e o desvio padrão da acidez total foi de 0,31% e 0,08, respectivamente. Portanto, o método de transfectância NIR proposto neste trabalho é capaz de fazer boas previsões para valores de brix e acidez total, dentro da faixa estreita usualmente utilizada na indústria.

V. CONCLUSÕES

O espectrofotômetro construído com Arranjo Linear de Fotodiodos mostrou-se bastante versátil e de fácil operação. O controle do equipamento é feito pelo microcomputador o que permite gravar os espectros obtidos para posterior tratamento de dados. O custo é baixo, se comparado aos instrumentos vendidos no mercado, já que o gasto na sua construção não chega a 30 % do valor dos instrumentos comerciais similares.

Na avaliação da qualidade de açúcares utilizando-se espectroscopia de reflectância difusa multicanal o equipamento mostrou-se bastante rápido. A análise pelo método recomendado pela ICUMSA, com etapa de filtragem da solução amostra, leva cerca de 3 horas, já com o equipamento montado a análise é feita em cerca de 5 minutos.

No método espectrofotométrico por reflectância, após a homogeneização da amostra por trituração, esta é analisada de forma integral. Isto não ocorre no método padrão pois parte considerável de impurezas insolúveis é retida no processo de filtração, permitindo a ocorrência de inversões claramente observadas através de comparação visual das amostras.

O equipamento usado para análises no infravermelho próximo (NIR) possui a grande vantagem de permitir fácil adaptação para

medidas “in-line” , nas indústrias de suco. Permite análises rápidas, diretamente na amostra. Reduz o consumo de vidrarias, reagentes e mão de obra. O preço do equipamento NIR montado no laboratório é cerca de 6 vezes mais barato do que o similar fabricado pela Brimrose.

Os valores de SEP (0,16 e 0,28 %) encontrados na calibração multivariada (PLS) para brix e acidez , respectivamente, usando espectroscopia NIR, são adequados para o controle da qualidade de sucos concentrados.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Ewing, G. W., Métodos Instrumentais de Análise Química, São Paulo, Ed. Edgard Blücher, Vol 1, 1972.
2. Martens, H., and Neas, T., Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, 1993.
3. Skoog, D. A., and Leary, J. J., Principles Of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, Philadelphia, EUA, 4th Edition, 1992.
4. Sommer, L., Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet - The Principles, Elsevier, New York, Vol 8, 1989.
5. Busch, K. W, and Busch, M.A., Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis, John Wiley, New York, 1990.
6. Poppi, R. J., Vasquez, P. A. M., and Pasquini, C., Fast Scanning Hadamard Spectrophotometer, Applied Spectroscopy, 46, 1822-1827, 1992.
7. Perkins, D. A., Fourier Transform - Infrared Spectroscopy, Journal of Chemical Education, 63, A5-A10, 1986.

-
8. Lázaro, F., Rios A., Luque de Castro M. D., and Valcárcel, Diode Array Detectors in Hydrodynamic Analytical Systems, *Analisis*, 14, 378-388, 1986.
 9. Raimundo Jr, I. M., Construção de um espectrofotômetro multicanal e de um analisador automático de fluxo monossegmentado, Tese de Doutorado, Campinas, UNICAMP, 1995.
 10. Bellato, C. R., Automação de Espectrógrafos de Rede Plana, Tese de Doutorado, Campinas, UNICAMP, 1996.
 11. Talmi, Y., and Simpson, R. W., Self-Scanned Photodiode Array: a Multichannel Spectrometric Detector, *Applied Optics*, 19, 1401-1414, 1980.
 12. Hecht, H. G., Comparison of Continuum Models in Quantitative Diffuse Reflectance Spectrometry., *Anal. Chem.*, 48, 1775-1779, 1976.
 13. Kubelka, P., Munk, F., Ein beitrag zur optik der farbanstriche., *Z. Tech. Phys.*, 12, 593-601, 1931
 14. Wendland, W. W., Hecht, H. G., Reflectance Spectroscopy,

Interscience, 1966.

15. Berntsson, O., Burger, T., Folestad, S., Danielsson, L. G., Kuhn, J., and Fricke, J., Effective Sample Size in Diffuse Reflectance Near-IR Spectrometry, *Anal. Chem*, 71,617-623, 1999.
16. Method GS2/3-9 (1994)., The Determination of White Sugar Solution Colour - Official., International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA)., 1994.
17. Robards, K., and Antolovich, M., Methods for Assessing the Authenticity of Orange Juice , A Review., *Analyst*, 120 ,1-28,1995.
18. Kimball, D. A., Citrus Processing: Quality Control and Technology, Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.
19. Twomey, M., Downey, G., and McNulty, P. B., The Potential of Nir spectroscopy for the detection of the adulteration of orange juice, *J. Sci. food Agric.*, 67, 77-84, 1995.
20. Li, W., Goovaerts, P., and Meurens, M., Quantitative Analysis of Individual Sugars and Acids in Orange Juices by Near-Infrared

-
- Spectroscopy of Dry Extract, *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2252-2259, 1996.
21. Evans, D. G., Scotter, C. N. G., L.Z. Day, L.Z., and Hall, M. N., Determination of the authenticity of orange juice by discriminant analysis of near infrared spectra, *J. Near Infrared Spectroscopy*, 1, 33-44, 1993.
22. Genarro, M. C., Abrigo, C., Ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography in the analysis of food, *Analisis*, 19, 151-154, 1991.
23. Fung, Y. S., Mo, S. Y., Application of square-wave voltammetry for the determination of ascorbic acid in soft drinks and fruit juices using a flow-injection system, *Anal. Chim. Acta*, 261, 375-380, 1992.
24. Cecchi, H. M., Comparação e desenvolvimento de métodos analíticos para ácidos benzóico e sórbico em alimentos, Tese de Doutorado, Campinas, UNICAMP, 1988.

-
25. Kakimoto, M., Simultaneous determination of sorbic acid, dehydroacetic acid and benzoic acid by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr*, 594, 253-257, 1992.
 26. Pineda, G. M., *Análise Cromatográfica de Ácidos Carboxílicos*, Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 1984.
 27. Souza, N. E., *Determinações simultâneas de ácidos em misturas por titulações potenciométricas e suas aplicações à análise de antiácidos, sucos de uva e vinhos*, Tese de Doutorado, UNICAMP, 1985.
 28. Poppi, R. J., Pasquini, C., Spectrophotometric determination of mixture of weak acids using multivariate calibration and flow injection analysis titration, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 19, 243-254, 1993.
 29. Norris, K., and Williams, P., *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, 1990.

-
30. McClure, W. F., Near-Infrared Spectroscopy - The Giant is Running Strong, *Anal. Chem*, 66, 43A-53A, 1994
 31. Tkachuk, R., Protein analysis of whole wheat kernels by near infrared reflectance, *Cereal Foods World*, 26, 584-587, 1981.
 32. Wetzel, D. L., Near-infrared reflectance Analysis Sleeper Among Spectroscopic Techniques, *Anal. Chem.* , 55, 1165A, 1983.
 33. Rotolo, P., Near-infrared reflectance instrumentation, *Cereal Foods World*, 24, 94, 1979.
 34. Mroczyk, W. B., and Michalski, K. M., Quantitative and qualitative analyses in near-infrared analysis of basic compounds in sugar beet leaf, *Computers Chem.*, 19, 299-301, 1995
 35. McQueen, D. H., Wilson, R., Kinnunen, A., Jensen, P. J., Comparason of two infrared spectroscopy methods for cheese analysis, *Talanta*, 42, 2007-2015, 1995.
 36. McQueen, D. H., Wilson, R., Kinnunen, A., Near and mid-infrared photoacoustic analysis of principal components of

-
- foodstuffs, *Trends in Analytical Chemistry*, 14, 482-492, 1995.
37. Lambert, D., Descartes, B., Llinas, J. R., Espinosa, A., Osta, S., Sanchez, M., Martens, A., On-line NIR monitoring and optimisation for refining and petrochemical processes, *Analysis*, 23, M9-M13, 1995.
38. Prüfer, H., Mamma, D., Near infrared on-line analysis of motor octane number in gasoline with an acousto-optic tunable transmission spectrophotometer, *Analysis*, 23, M14-M18, 1995.
39. Lambert, D., Descartes, B., Espinosa, A., Sanchez, M., Osta, S., Martens, A., Valleur, M., NIR on-line advanced control system for gasoline blender, *Analysis*, 23, M20-M25, 1995.
40. Rohrback, B. G., Computer-assisted rating of gasoline octane, *Trends in Analytical Chemistry*, 10, 269-271, 1991.
41. Dankor, K. K., Kratochvil, B., Thompson, G. R., Analysis of Athabasca oil sand by near-infrared-diffuse reflectance spectroscopy, *Analyst*, 120, 2713-2717, 1995.

-
42. Guchardi, R., Construção e avaliação de um espectrofotômetro infravermelho próximo com monocromador baseado em filtro óptico-acústico sintonizável, Dissertação de Mestrado, Unicamp, 1997.
43. Ashworth, C. M., Kirkbright, G. F., Spillane, D. E. M., Quantitative examination of polyester-cotton by near-infrared photoacoustic spectroscopy, *Analyst*, 108, 1481-1484, 1983.
44. Dreassi, E., Ceramelli, G., Corti, P., Massacesi, M., Perruccio, P.L., Quantitative Fourier transform near-infrared spectroscopy in the quality control of solid pharmaceutical formulations, *Analyst*, 120, 2361-2365, 1995.
45. Dreassi, E., Ceramelli, G., Corti, P., Perruccio, P. L., Lonard, S., Application of near-infrared reflectance spectrometry to the analytical control of pharmaceuticals: Ranitidine Hydrochloride tablet production, *Analyst*, 121, 219-222, 1996.

-
46. Wu, W., Walczak, B., Massart, D. L., Prebble, K A., Last, I. R.,
Spectral transformation and wavelength selection in near-infrared
spectra classification, *Anal. Chim. Acta.*, 315, 243-255, 1995.
47. Jouan-Rimbaud, D., Khots, M. S., Massart, D. L., Last, I. R.,
Prebble, K A., Calibration line ajustament to facilitate the use of
syntetic calibration samples in near-infrared spectrometric
analysis of pharmaceutical production samples, *Anal. Chim. Acta.*,
315, 257-266, 1995.
48. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., and Serrano, D.,
Near-Infrared analytical control pharmaceuticals. A single
calibration model from mixed phase to coated tablets, *Analyst*,
123, 2307-2312, 1998.
49. Marquardt, L. A., Arnold, M. A., Small, G. W., Near-infrared
spectroscopic measurement of glucose in a protein matrix, *Anal.*
Chem., 65, 3271-3278, 1993.
50. Williams, D. C., Soper, S. A., Ultrasensitive near-ir fluorescence

-
- detection for capillary gel electrophoresis and DNA sequencing applications, *Anal. Chem.*, 67, 3427-3432, 1995.
51. Pan, S., Chung, H., Arnold, M. A., Near-infrared spectroscopic measurement of physiological glucose levels in variable matrices of protein and triglycerides, *Anal. Chem.*, 68, 1124-1135, 1996.
52. Hall, J. W. et al., Near-infrared spectroscopic determination of acetate, ammonium, biomass, and glycerol in *Escherichia coli* fermentation, *Appl. Spec.*, 50, 102-108, 1996.
53. Riley, M. R., Arnold, M. A., and Murhammer, D. W., Matrix-Enhanced Calibration Procedure for Multivariate Calibration Models with Near-Infrared Spectra, *Applied Spectroscopy*, 52, 1339-1347, 1998.
54. Tran, C. D., Acousto-Optic devices optical elements for spectroscopy, *Anal. Chem.*, 64, 971A, 1992.
55. Xu, J., and Strous, R., *Acousto-Optic Devices: Principles, Design, and Applications.*, Wiley-Interscience Publication, New York,

1992.

56. Kowalski, B. R., Chemometrics: Mathematics and statistics in chemistry., D. Reidel, Dordrecht, The Netherlands, 1984.
57. Poppi, R. J., Construção de um Espectrofotômetro com Transformada de Hadamard e sua Aplicação em Análise por Injeção em Fluxo., Tese de Doutorado, Campinas, UNICAMP, 1993.
58. Leardi, R., and De Noord, O. E., Genetic Algorithms as a Tool for Wavelength Selection Multivariate Calibration., Anal. Chem., 67, 4295-4301, 1995.
59. Bangalore, A. S., Shaffer, R. E., Small, G. W., Genetic Algorithm-Based Method for Selection Wavelengths and Model Size for Use with Partial Least-Squares Regression: Application to Near-Infrared Spectroscopy, Anal. Chem., 68, 4200-4212, 1996.
60. Sun, J., A Multivariate Principal Component Regression Analysis of NIR data., Journal of Chemometrics, 10, 1-9, 1996.

-
61. The Unscrambler[®] 6.0, User's Guide, by Camo As, 1996.
 62. Demir, C., Brereton, R. G., Multivariate Calibration on designed mixtures of four pharmaceuticals, *Analyst*, 123, 181-189, 1998.
 63. EG&G Reticon, Operation and Alignment Procedures. RC1000/1001, California, EUA, 1992.
 64. Catálogo da National Semicondutor HK Ltd., National Application Specific Analog Products Databook, Hong Kong, 1995.
 65. Robinson, J. W. Handbook of Spectroscopy, Vol. 1, Boca Raton, CRC, p.857, 1985.
 66. Guchardi, R., Construção e avaliação de um espectrofotômetro infravermelho próximo com monocromador baseado em filtro óptico-acústico sintonizável., Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 1997.
 67. Malcolm-Lawes, D. J., Microcomputers and Laboratory Instrumentation, Plenum Press, New York, 2nd edn., 1988.

-
68. Manual do Visual Basic, Version 3.0, Microsoft Corporation, 1992.
 69. Advantech Co., Ltd., PC-LabCard , PCL-711S PC-MULTILAB, Taiwan, 1993.
 70. Yeatman, J. N., Senzel, A. J., Springer, J. A., Correction of Refractometer Sucrose Readings for Citric Acid Content in Frozen Concentrate for Lemonade, Journal of The AOAC, 59, 368, 1976.
 71. Lindsay, C. W., Calculation of Juice Content in a Diluted Fruit Juice Beverage, Journal of AOAC International, 76, 424-430, 1993.