



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências
Departamento de Química

Caracterização de alguns parâmetros de qualidade da polpa de fruta por FTIR-ATR

Cátia Marisa Marques da Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Ofélia Maria Serralha dos Anjos
Coorientador: Prof. Doutor António José Geraudes de Mendonça

Covilhã, Outubro de 2016

Dedicatória

Por minha vontade dedico esta tese aos meus avós. Em especial ao meu avó materno, Álvaro Marques dos Santos, que partiu deixando saudade e foi um grande exemplo enquanto ser humano, pai e avó que era.

Dedico ainda este trabalho aos meus pais que são a minha fonte de força, disciplina e porto de abrigo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Ofélia Anjos, orientadora da tese, à qual expresso o meu agradecimento pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e total disponibilidade que teve para comigo.

À Engenheira Magda David por toda a sua disponibilidade, apoio e conhecimentos transmitidos ao longo do estágio, enquanto orientadora em ambiente industrial, na empresa Frulact.

Ao Professor Doutor António Mendonça, pela coorientação, dedicação e pelo tempo despendido ao longo deste processo.

À Professora Doutora Fernanda Domingues, Diretora do 2º Ciclo do Curso de Biotecnologia, por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Ismael, que ocupava na data o cargo de Presidente do Departamento de Química e me auxiliou permitindo o desenvolvimento das análises no laboratório da UBI.

À empresa Frulact, enquanto entidade Industrial Agro-Alimentar, que me acolheu durante o estágio, permitindo a utilização das instalações destinadas ao Controlo de Qualidade, através da análise e recolha de amostras para desenvolvimento de todo este processo. Um especial obrigado ao Sr. João Miranda, que na qualidade de administrador, autorizou este trabalho e colaboração entre entidades.

A todos os colegas e amigos que conheci no Laboratório de Controlo de Qualidade da empresa com quem tive o gosto de trabalhar e desenvolver variadas atividades, que me ajudaram e permitiram conhecer os processos que envolvem a produção e crescer enquanto futura profissional.

A todos os meus colegas do curso de Biotecnologia que tão bem me acolheram e auxiliaram ao longo desta etapa. Um grande e especial obrigado aos meus colegas e amigos, Lúcia Queirós e João Cardoso, pela amizade, ajuda, paciência, força e todos os momentos que me proporcionaram neste percurso.

Aos meus amigos, Sara Costa, David Oliveira, Rita Gomes, Cláudio Teigão, Sílvia Gomes, Vanessa Fortes, que me apoiaram e auxiliaram ao longo desta etapa, pela companhia, conversas e coragem que me transmitiram nos momentos mais difíceis.

À minha família, em especial aos meus pais, que apesar de por vezes não compreenderem, sempre me apoiaram e me deram forças para continuar com amor e carinho. Um obrigado por tornarem esta jornada possível.

Por último um agradecimento especial a ti António Madeiras, por seres o meu grande pilar e fonte de força e equilíbrio ao longo desta etapa atribulada, pelo teu amor, carinho, tolerância e compreensão em todos os momentos, um grande obrigado por seres quem és.

“Se não sabes, aprende. Se já sabes, ensina.”

Confúcio

Resumo

Com a crescente evolução industrial e a procura de produtos com elevada qualidade em prazos de entrega apertados, as indústrias alimentares vêm-se obrigadas a acelerar os seus processos de produção e consequentemente os processos de controlo de qualidade dos seus produtos de forma a garantir a sua qualidade. Perante isto, o presente trabalho tem como objetivo colmatar a necessidade de desenvolver, de forma rápida e eficaz, as análises de controlo de qualidade na indústria alimentar.

O trabalho foi desenvolvido em parceria com a empresa Frulact onde foram obtidas as amostras e desenvolvidas as análises físico-químicas de matéria-prima e produto acabado. Posteriormente, as mesmas amostras foram analisadas, através de ensaios de espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* com a técnica de refletância total atenuada (FTIR-ATR) desenvolvidas no equipamento *Platinum ATR* da *Bruker* e *software OPUS* versão 7.0, nas instalações da UBI.

Inicialmente é apresentada a revisão bibliográfica que comporta a etapa de estágio e o contexto teórico da técnica em estudo. Durante o desenvolvimento de atividades na empresa foram desenvolvidas todas as tarefas que comportam o controlo de qualidade da empresa. Foram analisados através de técnicas tradicionais os parâmetros físico-químicos de pH, Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável na matéria-prima e análises Microbiológicas de produto acabado, executadas no laboratório interno de controlo da qualidade da Frulact. Relativamente à base teórica da técnica de FTIR-ATR esta contempla a sua origem, funcionamento e aplicação na área alimentar, pelo que são apresentados alguns estudos já realizados na análise de géneros alimentícios para diferenciação e controlo de qualidade dos produtos.

Os produtos analisados foram o morango inteiro e morango cortado como matéria-prima e alguns tipos de produto acabado que foram avaliados quanto ao controlo de qualidade visual, organolético, analítico e microbiológico, na empresa, e posteriormente desenvolvidos os ensaios de FTIR-ATR, no departamento de química da UBI, para posterior comparação.

São apresentados os materiais e métodos utilizados para a análise dos parâmetros em estudo dos produtos selecionados que dão origem aos resultados. Deste modo, é possível a comparação de resultados e obtenção de conclusões acerca da técnica de FTIR-ATR sendo considerada a sua utilização a nível industrial.

Os modelos desenvolvidos apresentam elevados coeficientes de correlação, bem como erros de previsão baixos. Estes podem ser utilizados na previsão de resultados para o parâmetro de sólidos solúveis totais e acidez total titulável de amostras de matéria-prima e produto acabado. No entanto não foi possível desenvolver um modelo para o parâmetro de pH devido à baixa

variabilidade dos resultados. A técnica revelou bons resultados, no entanto seria importante reforçar o estudo e diversificar as amostras para assegurar a sua credibilidade e aplicabilidade.

Palavras-chave

FTIR-ATR, pH, Sólidos Solúveis Totais, Acidez Total Titulável, Morango.

Abstract

With increasing industrial development and the demand for products with high quality in tight deadlines, food industries are obliged to accelerate their production processes and consequently the quality control processes of its products to ensure your quality. Given this, the present study aims to address the need to develop quickly and effectively, the quality control analysis in food industry.

The work was developed in partnership with Frulact company which were obtained samples and developed the physical and chemical analysis of raw material and finished product. Thereafter, these samples were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance technique (FTIR-ATR) device developed in Platinum ATR Bruker OPUS software version 7.0 and, in UBI facilities.

Initially it is presented the literature review that includes the internship stage and the theoretical context of technical a study. During the development of activities in the company have been developed all the tasks that involve the quality control of the company. Were analyzed using traditional techniques physicochemical parameters of pH, Total Soluble Solids and Total Titratable Acidity developed in raw material and Microbiological analyzes of finished product, performed in the internal laboratory of quality control in the Frulact. Regarding the theoretical basis of FTIR-ATR technique contemplates its origin, operation and application of the same in the food area, here are shown some previous studies in the analysis of food for differentiation and quality control of products.

The products analyzed were the whole strawberry and strawberry cut as raw material and some types of finished product were evaluated for control of visual quality, organoleptic, analytical and microbiological testing, the company, and further developed the FTIR-ATR tests in chemistry department UBI, for comparison.

The materials and methods used for the analysis of the study of selected products on parameters from which the results are displayed. Therefore, it is possible to compare results and obtain conclusions about the FTIR-ATR technique being considered to be used at industrial level.

The developed models have high correlation coefficients and low forecast errors. These can be used to forecast results for the total soluble solids and titratable acidity parameter samples of raw material and finished product. However it was not possible to develop a model for the pH parameter due to the low variability of results. The technique has yielded good results, however it would be important to strengthen the study and diversify samples to ensure their credibility and applicability.

Keywords

FTIR-ATR, pH, Total Soluble Solids, Total Titratable Acidity, Strawberry.

Índice

Capítulo I - Introdução	1
1.1 Fruta	2
1.2 Polpa de Fruta	3
1.3 Frulact	4
1.3.1 Rastreabilidade	4
1.3.2 Controlo de Qualidade	6
Capítulo II - Revisão Bibliográfica	9
2.1 Espectroscopia de Infravermelho	9
2.2 Espectro Eletromagnético de Infravermelho	11
2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i>	12
2.3.1 Técnicas de Transmissão e Reflexão	14
2.3.2 FTIR-ATR.....	15
2.3.3 Fatores que Influenciam o Espectro de FTIR-ATR	17
2.4 Quimiometria	19
2.4.1 Pré-Tratamento e Tratamento Espectral	20
2.5 Aplicações do FTIR-ATR na Análise de Alimentos	21
Capítulo III - Componentes Analisados.....	25
3.1 Matéria-Prima	25
3.1.1 Morango Inteiro.....	27
3.1.2 Morango Cortado (10x10 mm)	27
3.2 Produto Acabado	28
3.2.1 Morango+	28
3.2.2 Morango -	29
3.2.3 Framboesa.....	29
3.2.4 Cereais	30
Capítulo IV - Material e Métodos	31
4.1 Obtenção de Amostras	31
4.1.1 Receção e Recolha de Amostras de Matéria-Prima	31
4.1.2 Recolha de Amostra de Produto Acabado.....	32
4.1.3 Recolha de Amostras de Produto Acabado para Análise Microbiológica.....	33
4.2 Parâmetros Analíticos Avaliados	34
4.2.1 Preparação das Amostras	34
4.2.2 pH.....	35
4.2.3 Sólidos Solúveis Totais	36
4.2.4 Acidez Total Titulável.....	37
4.3 Análise por FTIR-ATR	38
4.3.1 Matéria-Prima e Produto Acabado	38

4.3.2 Desenvolvimento de Modelos	40
Capítulo V - Resultados e Discussão.....	43
5.1 Matéria-Prima	43
5.2 Produto Acabado.....	48
5.2.1 Análise Microbiológica de Produto Acabado.....	55
Capítulo VI - Conclusão e Perspetivas Futuras	57
Referências Bibliográficas	59
Anexos.....	65
Morango Inteiro	65
Morango Cortado.....	66
Morango +	67
Morango -.....	68
Framboesa	69
Cereais.....	70

Lista de Figuras

Figura 1- Fluxograma geral de processamento no complexo industrial do Tortosendo, da empresa Frulact.	5
Figura 2 - Exemplo de um espectro de água (Sun 2009).	10
Figura 3 - Espectro eletromagnético (Biochem 2002).	11
Figura 4 - Esquema dos componentes básicos de um interferómetro de Michelson (Stuart 2004; Davis & Mauer 2010a).	13
Figura 5 - Características gerais de uma configuração de reflexão interna e rotulagem de vários componentes (Thermo 2015).	16
Figura 6 - Esquema de uma reflexão total atenuada típica (Perkin Elmer 2005; Stuart 2004).	17
Figura 7 - Fluxograma aplicado para desenvolver e utilizar as calibrações (Kramer 1998).	20
Figura 8 - Produto acabado denominado de “Morango+”, depois da recolha e espalhamento do mesmo.	29
Figura 9 - Produto acabado denominado de “Framboesa” no copo de recolha e após espalhamento.	30
Figura 10 - Produto acabado denominado de “Cereais”, após recolha e espalhamento.	30
Figura 11 - Atividade de controlo de qualidade à receção de matéria-prima. A) Mesa de controlo de qualidade onde se visualiza a matéria-prima, a caixa de papelão e respetivo saco plástico. B) Corpos estranhos removidos após a análise de matéria-prima, para que seja deliberada a sua aceitação para posterior utilização.	32
Figura 12 - Potenciómetro da VWR, “pHenomenalTM”.	36
Figura 13 - Equipamento TCR 15-30 da marca Index com capacidade para medir os sólidos solúveis totais.	37
Figura 14 - Equipamento de FTIR-ATR (A, B, e C) e respetivo computador responsável pela aquisição e tratamento dos espectros.	39
Figura 15 - Espectros de FTIR-ATR referentes à análise de matéria-prima, morango inteiro e morango cortado, na região de 4 000-400 cm ⁻¹	45
Figura 16 - Representação gráfica dos resultados do estudo do parâmetro de sólidos solúveis totais (presentes na coluna à esquerda) e acidez total titulável (presentes na coluna à direita), para análise de morango inteiro (gráficos A e B) e morango cortado (gráficos C e D).	47
Figura 17 - Espectros obtidos pela técnica de FTIR-ATR na análise de produto acabado, denominados por “Morango +”, Morango -, “Framboesa” e “Cerais”, respetivamente, na região de 4 000-400 cm ⁻¹	50
Figura 18 - Representação gráfica dos resultados do estudo do parâmetro de sólidos solúveis totais (presentes na coluna à esquerda) e acidez total titulável (presentes na coluna à direita), para análise de produto acabado denominados por “Morango +” (gráficos A e B), “Morango -” (gráficos C e D), “Framboesa” (gráficos E e F) e “Cereais” (gráficos G e H).	54

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Esquema da cadeia típica do morango, desde o seu cultivo à comercialização (Coopermit 2013).	25
Tabela 2 - Resultados estatísticos para o conjunto das amostras de morango inteiro e morango cortado analisados em laboratório de acordo com os procedimentos físico-químicos.	43
Tabela 3 - Resultados estatísticos referentes ao estudo de morango inteiro segundo os procedimentos físico-químicos.	44
Tabela 4 - Resultados estatísticos relativos ao estudo de morango cortado segundo os procedimentos físico-químicos.	44
Tabela 5 - Representação da faixa espectral relevante na análise dos picos resultantes da técnica de FTIR-ATR no morango inteiro e morango cortado.	45
Tabela 6 - Resultados do desenvolvimento dos modelos referentes às amostras de matéria-prima para a Calibração, Validação Cruzada e Conjunto de Testes de Validação.	46
Tabela 7 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Morango +”.	48
Tabela 8 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Morango -”.	48
Tabela 9 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Framboesa”.	49
Tabela 10 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Cereais”.	49
Tabela 11 - Representação da faixa espectral relevante na análise dos picos resultantes da técnica de FTIR-ATR para produto acabado.	51
Tabela 12 - Resultados do desenvolvimento dos modelos referentes às amostras de produto acabado para a Calibração, Validação Cruzada e Conjunto de Testes de Validação.	52

Lista de Acrónimos

ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
ATR	Refletância Total Atenuada
ATT	Acidez Total Titulável
BRC	<i>British Retail Consortium</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EPL	Comprimento de Trajetória Eficaz
FAR	Infravermelho Distante
FTIR	Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de <i>Fourier</i>
Ge	Germânio
H	Hidrogénio
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
IQF	<i>Individual Quick Frozen</i>
IRE	Elemento de Reflexão Interna
IV	Infravermelho
MID	Infravermelho Médio
MSC	Correção Multiplicativa de Sinal
NaOH	Hidróxido de Sódio
NIR	Infravermelho Próximo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTA	Ocratoxina A
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Regressão de Componentes Principais
pH	Potencial de Hidrogénio
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
QASA	Qualidade, Ambiente e Segurança Alimentar
RMSECV	Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada
RMSEE	Erro Médio Quadrático de Calibração
RMSEP	Erro Médio Quadrático de Previsão
RPD	Desvio Residual de Previsão
TIBrTII	Bromo Iodeto de Tálho
UBI	Universidade da Beira Interior
ZnSe	Seleneto de Zinco

Capítulo I - Introdução

As frutas apresentam-se como um elemento essencial da alimentação dos portugueses que são aconselhados a comer mais de uma peça de fruta por dia. No entanto este alimento não se encontra apenas sob a forma de fruta fresca na nossa alimentação, mas sim numa panóplia de produtos transformados e derivados da fruta que são apreciados por um público-alvo muito vasto e diferenciado. Existem várias empresas que lidam com produtos hortofrutícolas diariamente em Portugal, estas empresas estão sujeitas a um controlo cada vez mais rigoroso por parte das entidades reguladoras nacionais e internacionais como por exemplo: a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) e a *European Food Safety Authority* (EFSA). Estas entidades são responsáveis pela avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, fiscalização destas atividades e ainda emitir pareceres científicos independentes sobre a segurança alimentar.

A empresa Frulact possui um sistema de controlo de qualidade bastante exigente e rigoroso que dispõe de várias certificações mediante a política de Qualidade, Ambiente e Segurança Alimentar (QASA). As práticas de controlo de qualidade desenvolvidas nesta empresa possuem uma vasta gama de parâmetros a analisar. Sendo assim necessário a atualização e uso de novas tecnologias para analisarem esses parâmetros de forma rápida e eficaz.

Como alternativa às análises desenvolvidas pelos métodos analíticos oficiais, surge a espectroscopia de infravermelho com transformadas de *Fourier* (FTIR) acoplada com refletância total atenuada (ATR) que permite obter de forma mais eficaz e não destrutiva as informações acerca das propriedades físicas e químicas de uma amostra. Este método apresenta como vantagens a sua fácil utilização e rapidez de análise, uma vez que a preparação da amostra é quase inexistente permitindo se necessário uma atuação imediata sobre algum produto. Uma atuação imediata contribui para a diminuição de desperdícios e redução dos prejuízos adjacentes.

O FTIR permite uma abordagem qualitativa e quantitativa. Do ponto de vista qualitativo, permite a distinção das amostras semelhantes por grupos, sendo considerado por vários autores, tais como *Barbara Stuart* e *Schmitt* e colaboradores, entre outros, como um método que fornece um *fingerprint* de um determinado componente (Stuart 2004; Schmitt & Flemming 1998; Mauer et al. 2009; Shyam 2010; Gallardo-Velázquez et al. 2009). Relativamente à análise quantitativa são utilizadas técnicas de quimiometria que permitem a quantificação de vários parâmetros tais como: pH, sólidos solúveis totais e acidez total titulável.

Com a evolução do FTIR e em particular da técnica de ATR foram já desenvolvidos diferentes estudos que demonstram a sua relevância, nomeadamente para uma eficiente e rápida determinação de açúcares e ácidos orgânicos de frutos (Bureau et al. 2009; Bureau et al. 2013; Nagarajan et al. 2006), na análise de outros hortícolas, leguminosas e derivados, onde foi

possível a distinção entre alimentos conforme e não conforme (Craig et al. 2012), em outros alimentos em que foram avaliadas as características nutritivas e valor energético (Iñón et al. 2004; Moros et al. 2005), na deteção de adulterantes e outros compostos importantes para um controlo de qualidade rigoroso (Gallardo-Velázquez et al. 2009; Duarte et al. 2004), e na monitorização de reações biológicas e químicas em determinados produtos (Cocciardi & Sedman 2005).

Para uma melhor compreensão do estado atual da análise de produtos frutícolas em ambientes industriais é necessário uma explicação acerca das propriedades da fruta e como estas se relacionam com a alimentação em Portugal.

1.1 Fruta

O interesse no valor nutricional das frutas e produtos hortícolas tem vindo a aumentar, devido ao elevado nível de obesidade e outros problemas relacionados com a dieta e saúde das populações. Por outro lado, tem-se observado um incremento do apoio governamental na área da alimentação e saúde, nomeadamente através da criação do Concelho Nacional de Alimentação e da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) que atua em cooperação com a *European Food Safety Authority* (EFSA). O objetivo do primeiro programa nacional de promoção da alimentação saudável consistiu em melhorar o estado nutricional da população portuguesa (Barrett 2008; Graça & Gregório 2012)

A fruta e vegetais são uma importante componente da dieta diária saudável, uma vez que estes são a fonte primária de alguns nutrientes essenciais (Who 2003; Pennington & Fisher 2009). É recomendado um consumo mínimo de 400 g de hortofrutícolas por dia, equivalente a 150 kg por pessoa por ano (Pennington & Fisher 2009; Candeias *et al.* 2005). A nova roda dos alimentos é composta por 7 grupos de alimentos que indicam a proporção em que deve estar presente na alimentação diária. A fruta ocupa 23% da dose diária recomendada para uma alimentação saudável (Franchini *et al.* 2004).

O termo botânico “fruta” refere-se às sementes e tecidos circundantes de uma planta (Pennington & Fisher 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) tentou alcançar um significado universal para fruta através de inquéritos a consumidores. Grande parte das pessoas definem “fruta” como a componente carnuda em torno das sementes de uma planta que comporta um sabor doce e que é frequentemente consumido cru sob forma de sobremesa ou lanche (Who 2003).

A fruta é caracterizada pelos seus conteúdos de açúcares simples e de fácil absorção (frutose) com uma quantidade ínfima de gordura. Apresenta uma elevada capacidade de fornecer água, fibras, minerais e uma quantidade apreciável de vitaminas do complexo B, C e carotenos (Dias 2011). Contém ainda substâncias com propriedades antioxidantes, nomeadamente os ácidos orgânicos e pigmentos, que podem ter atividade metabólica e anti-carcinogénica. O consumo

de fruta pode influenciar o curso das células tumorais no corpo humano (Kader 2001). Foram desenvolvidos estudos que indicam que o consumo de fruta pode ajudar a prevenir o cancro do pulmão, bexiga, boca, faringe, laringe, esófago, estômago, cólon e reto (Dias 2011). O consumo adequado de fruta também tem demonstrado uma redução no risco de contrair doenças cardiovasculares (Christensen *et al.* 2013; Bazzano *et al.* 2011) e na prevenção contra o excesso de peso e obesidade (Aranceta *et al.* 2007)

É importante proceder à diferenciação dos tipos de fruta para que os investigadores possam avaliar as relações entre dieta, saúde e doença. Existem diferentes tipos de classificação da fruta de acordo com a sua composição, cor, família botânica, região de origem e a parte da planta que é comestível (Pennington & Fisher 2009). Relativamente à aquisição e consumo de fruta, é de senso comum que não deve estar excessivamente madura, suja, com fendas ou fissuras, nem contaminada por parasitas ou bolores (Gregório *et al.* 2012).

O processamento e cocção deste género alimentício podem afetar consideravelmente o seu valor nutricional (Kader 2001). É recomendado o consumo variado de fruta fresca e como um todo, ou seja ingerindo a casca e sementes, se possível, excluindo ou reduzindo ao máximo a ingestão de fruta no formato de sumo e fruta seca (Christensen *et al.* 2013).

Existem alimentos que incluem fruta, ou mais precisamente polpa de fruta, que também podem fornecer os benefícios parciais da fruta quando ingerida como um todo. O uso de polpa de fruta é cada vez mais recorrente na conceção de géneros alimentícios.

1.2 Polpa de Fruta

A fruta minimamente processada consiste na produção através do corte de fruta fresca, sendo submetida a um processamento mínimo como a remoção da casca, corte ou trituração, tendo em vista a sua utilização final (Ahvenainen 2000).

A fruta pode ser transformada em vários produtos distintos, tais como, sumo e concentrado de fruta, polpa, doces e geleias, enlatados, molhos ou simplesmente mantidos sob a forma de minimamente processados em saladas de fruta previamente preparadas e embaladas. Dependendo das etapas de transformação e do fim a que se destina o produto, é submetido a diferentes processos de limpeza, lavagem e/ou desinfeção.

A polpa é a parte comestível de frutos inteiros, eventualmente descascados ou sem sementes, podendo apresentar-se cortada em rodela, mas sem ser reduzida a polme através de peneiração. É um produto não fermentado, não concentrado, obtido da fruta por processos tecnológicos adequados, com um teor mínimo de sólidos em suspensão (Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas 2003; Mendes & Laurino 2010).

A fruta está a sair da tradicional zona dos frescos dos supermercados para ocupar novos espaços. Desde as garrafas de sumo de fruta, fruta cortada e embalada pronta a consumir, *snacks* e mais recentemente em pacotes de fruta desidrata. E ainda longe dos olhares dos consumidores, nos laboratórios e empresas são criados produtos diferentes e inovadores tendo por base a fruta na sua forma original e em polpa (Silva 2014).

1.3 Frulact

A empresa Frulact consiste numa indústria alimentar responsável pela produção de preparados à base de fruta para outras marcas da indústria alimentar. Tal como outras empresas da área alimentar em Portugal, tem como objetivo proporcionar aos consumidores produtos naturais, saudáveis e de elevada qualidade a nível organolético.

Esta empresa procura manter uma seleção rigorosa das equipas de trabalho, equipamentos e processos de fabrico tendo em conta o *Know-How* e as políticas de gestão ambiental.

Trata-se de uma multinacional que possui várias unidades fabris, no entanto foi na Maia que teve início, expandindo-se posteriormente para a zona da Covilhã. Possui uma unidade secundária sediada na freguesia do Ferro, responsável pela primeira Transformação. Este processo, segundo a empresa, consiste na preparação da fruta para posterior utilização. Na freguesia do Tortosendo está presente a unidade principal onde é feita a transformação de um conjunto de matérias-primas em produto acabado (Informática 2015).

A gama de produtos que esta empresa fornece ao mercado tem por base a produção de polpas e concentrados de fruta e subdivide-se de acordo com o seu fim, nomeadamente para a produção de lacticínios, gelados, pastelaria e bebidas. Estes alimentos representam uma fatia considerável na alimentação diária dos diferentes estágios etários (Frulact 2014).

1.3.1 Rastreabilidade

As instalações do Tortosendo possuem infraestruturas e equipamentos que vão ao encontro dos requisitos gerais aplicáveis, presentes no Regulamento (CE) Nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004. Sendo que também os operadores desta empresa se regem pelas regras impostas para o Sector Alimentar.

É importante que exista uma rastreabilidade total dos produtos. Esta vertente acarreta um elevado nível de responsabilidade aos fornecedores de cada matéria-prima, nomeadamente as condições de transformação, armazenamento e transporte, sendo que após a chegada dos produtos às instalações a responsabilidade fica ao encargo dos colaboradores da empresa.

A matéria-prima deve percorrer um curso ininterrupto até ser transformada em produto acabado, e posteriormente embalado, sem que exista cruzamento de produtos na cadeia de produção como se pode observar na Figura 1. Os produtos seguem uma linha contínua para

evitar possíveis contaminações físico-químicas e microbiológicas que são indesejáveis e alvo de preocupação permitindo ainda uma fácil identificação e controlo de possíveis riscos associados.

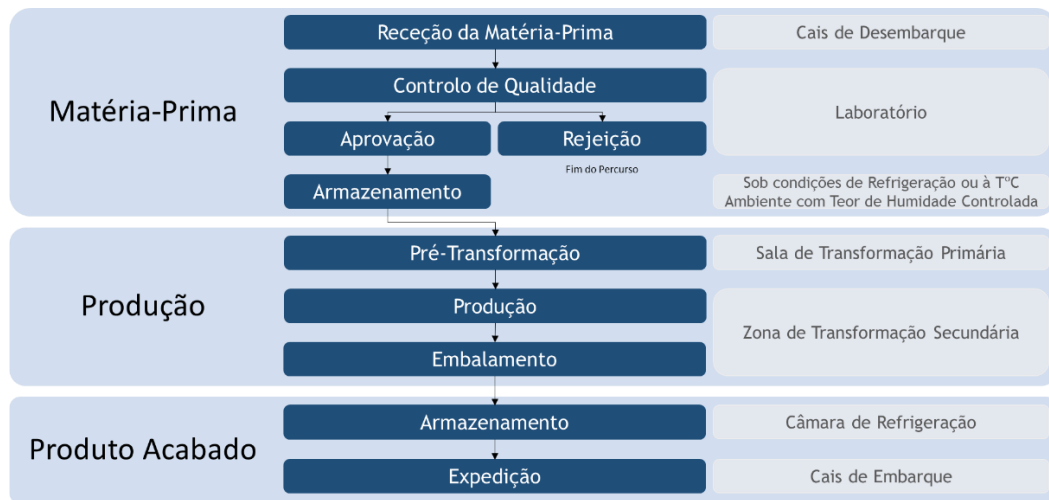


Figura 1- Fluxograma geral de processamento no complexo industrial do Tortosendo, da empresa Frulact.

A Frulact tem implementado nas instalações um adequado sistema de análise de perigos e pontos críticos de controlo, comumente designado por HACCP proveniente do termo inglês “*Hazard Analysis and Critical Control Point*”. Tratando-se de um instrumento que auxilia os operadores de empresas do sector alimentar a alcançar padrões mais elevados de segurança dos géneros alimentícios (Parlamento Europeu & União Europeia 2004). Este plano encontra-se em constante processo de avaliação e atualização para que todas as normas de boas práticas sejam cumpridas e todos os Pontos Críticos de Controlo devidamente identificados e fiscalizados.

Todo o processo tem em vista as medidas específicas de higiene, no que diz respeito aos critérios microbiológicos e de temperatura aplicáveis, a implementação de processos de modo a respeitar os alvos estabelecidos para cumprir com os requisitos, a constante monitorização e manutenção da cadeia de frio, assim como também a recolha frequente de amostras para posterior análise (Gonçalves 2006).

Dispõe de várias certificações que satisfazem os seus princípios e exigência dos seus clientes, nomeadamente (Informática 2015):

- ISO 9001:2008 - Sistema de Gestão da Qualidade;
- ISO 22000:2005 - Sistema de Gestão da Segurança Alimentar;
- NP ISO 14001: 2012 - Sistemas de Gestão Ambiental;
- BRC - Global Standard for Food Safety;
- Produção Biológica;
- NP 4457:2007 - Investigação, Desenvolvimento e Inovação.

De um modo genérico, as regras gerais e específicas, nomeadamente de higiene e segurança, têm como principal objetivo garantir um elevado nível de proteção do consumidor em matéria de segurança dos géneros alimentícios (Parlamento Europeu & União Europeia 2004).

1.3.2 Controlo de Qualidade

O Controlo de Qualidade é realizado nas várias etapas de desenvolvimento do produto, nomeadamente na receção da fruta e restantes matérias-primas, no decorrer do processo de fabrico e na fase de produto acabado, onde é feita ainda uma análise microbiológica dos produtos para garantir a sua segurança ao longo da sua vida útil.

O conceito de matéria-prima engloba uma panóplia de elementos que são utilizados como base na produção de determinado produto. A fruta destaca-se como ingrediente principal e fundamental no processo. Na receção da fruta são analisados vários parâmetros físico-químicos tais como: o °brix, pH, humidade, elementos anómalos e calibre. Estes parâmetros irão ser referidos ao longo deste trabalho. São também testados alguns aromas e corantes, entre outros aditivos usados na formulação do produto final.

Por outro lado, o produto acabado é considerado o resultado que reúne todos os elementos da sua receita e contém todas as características que permitem que este seja enviado para o cliente. Previamente são garantidas todas as condições físico-químicas, organoléticas e de segurança que vão ao encontro dos parâmetros exigidos pelo cliente para posterior aprovação do produto. No produto final procede-se à avaliação de outros parâmetros importantes tais como: grau Brix, pH, aparência (cor e textura), calibre e viscosidade. São ainda executadas análises microbiológicas ao longo do processo, e as condições higiénicas são mantidas com uma monitorização rigorosa de temperatura e pressão.

Para o controlo e posterior aprovação da matéria-prima e produto acabado são realizadas análises de referência para garantir que todos os parâmetros de controlo estão dentro das normas. Estas normas definem o valor limite mínimo e máximo permitido. Pelo que se torna importante abordar algumas das principais análises utilizadas neste controlo que dizem respeito à componente físico-química.

A determinação dos sólidos solúveis totais, grau Brix, é responsável pela determinação da presença de compostos solúveis em determinada solução. É comumente utilizada na matéria-prima, de modo a identificar o estado de maturação do fruto, e ao longo do processo para medir a quantidade aproximada de açúcares. Estes podem estar presentes nas mais variadas formas, desde sacarose, glucose, entre outros. É um fator determinante na libertação do produto ao cliente, uma vez que é um fator de qualidade quanto ao sabor (Oliveira *et al.* 2011) e influência a capacidade de conservação ao longo do tempo.

Relativamente ao pH, a sua análise é feita no decorrer do processo para verificar a estabilidade do mesmo que irá determinar a segurança e o período de vida útil de cada produto, uma vez que um valor de pH acima das especificações pode levar a deterioração dos alimentos durante o armazenamento e distribuição (Kress-Rogers & Brimelow 2001), pelo que é vital a avaliação deste critério.

Um outro parâmetro utilizado é a acidez total titulável, que verifica a quantidade de ácido de uma amostra quando reage com uma base de concentração conhecida (NaOH, 0,25 M), este parâmetro é comumente associado, neste caso concreto na fruta, à presença de ácido cítrico, estando relacionado com a análise da etapa de maturação do produto.

As análises Microbiológicas são desenvolvidas preferencialmente nos produtos acabados aquando do seu embalamento. Estes procedimentos visam garantir a inexistência de uma contaminação que possa comprometer a estabilidade do produto, assim como também a segurança do produto quando utilizada pelo cliente e no seu posterior consumo. As análises executadas verificam a flora total, a inexistência de bolores, leveduras, coliformes totais e microrganismos formadores de esporos, de acordo com as seguintes normas:

- NP-1828_Géneros alimentícios. Análise microbiológica. Colheita de amostras;
- NP-1829_ Géneros alimentícios. Análise microbiológica. Preparação da amostra;
- NP-3005_Géneros alimentícios. Análise microbiológica. Preparação das diluições para análise microbiológica;
- ISSO-7954_Microbiologia de alimentos e rações para animais - Método horizontal para a enumeração de bolores e leveduras;
- NP-1410_Microbiologia alimentar sumos e polmes de frutos e produtos hortícolas e seus derivados pesquisa de bactérias coliformes;
- NP-2164_Microbiologia alimentar. Pesquisa de coliformes fecais. Filtração em membrana, incubação e contagem.

Considerando o grau de exigência e todos os fatores a ter em conta para a análise e verificação de matéria-prima e produto acabado seria vantajosa a implementação de um método simples e rápido de análise através do FTIR-ATR, caso este corresponda eficazmente ao proposto. No entanto sabe-se que alguns elementos presentes na composição do produto acabado podem influenciar a obtenção de resultados dificultando a determinação dos valores pretendidos.

Capítulo II - Revisão Bibliográfica

2.1 Espectroscopia de Infravermelho

O conceito de espectroscopia reside no estudo da interação da luz com a matéria, através de transmissão, absorção ou reflexão. A luz é uma onda eletromagnética, cujo comprimento de onda se encontra no intervalo visível a olho nu com a capacidade de propagação através de diferentes meios (ar, água e vácuo) e materiais (vidro). No entanto é a parte elétrica da luz, denominada de vetor elétrico, que é responsável pela interação com as moléculas da matéria (Smith 2011).

Propriedades espectroscópicas, como a absorção, fluorescência e dispersão (linear e dicroísmo circular) podem fornecer informações sobre a identidade, concentração e/ou dinâmica de moléculas, com sensibilidade a pequenas mudanças na estrutura molecular ou na sua vizinhança (Parson 2009).

Uma das técnicas de espectroscopia mais utilizadas na área de caracterização de alimentos ou controlo de qualidade é a espectroscopia de infravermelho (Cordella *et al.* 2002; Stuart 2004). Esta tem sido adotada como uma ferramenta analítica em várias áreas de estudo, tendo superado, em alguns casos, os métodos tradicionais. As principais razões para a grande aceitação desta tecnologia são a rapidez com que as amostras podem ser caracterizadas, quase sem manipulação, e a flexibilidade do equipamento, pelo que é frequentemente utilizada no controlo de qualidade e monitorização de processos na Indústria Alimentar (Blanco & Villarroya 2002; Syahariza *et al.* 2005; Che Man *et al.* 2005).

Esta técnica permite uma análise rápida e não destrutiva como alternativa a técnicas de medição química para caracterização de qualidade e medidas quantitativas (Syahariza *et al.* 2005).

Trata-se de um método de análise que se baseia na observação de vibrações de moléculas que são excitadas na zona de comprimento de onda correspondente ao infravermelho. Uma das grandes vantagens da espectroscopia de infravermelho é a sua capacidade de analisar a maior parte das amostras em quase todos os estados (Stuart 2004). Sendo utilizada no fornecimento de informações da estrutura e composição molecular numa vasta gama de materiais (Syahariza *et al.* 2005; Che Man *et al.* 2005).

De um ponto de vista generalizado esta técnica fornece informação estrutural que constitui um *Fingerprint* molecular da amostra. Pelo que pode ser utilizada apenas como ferramenta de caracterização da amostra ou deteção de adulterantes e outros constituintes, aquando de uma análise de géneros alimentícios (Cordella *et al.* 2002).

A região de infravermelho (10-14000 cm^{-1}) do espectro eletromagnético é dividida em três regiões: próximo, médio e distante. O infravermelho (IV) médio (400-4000 cm^{-1}) é a região mais comumente utilizada para análise, uma vez que todas as moléculas possuem absorvância a frequência característica e vibração molecular primária (Davis & Mauer 2010a).

Os espectros de IV, como se pode observar na Figura 2, são medidos através do cálculo de intensidade da radiação incidente, antes e após a passagem pela amostra, apresentado sob a forma de absorvância em função da frequência.

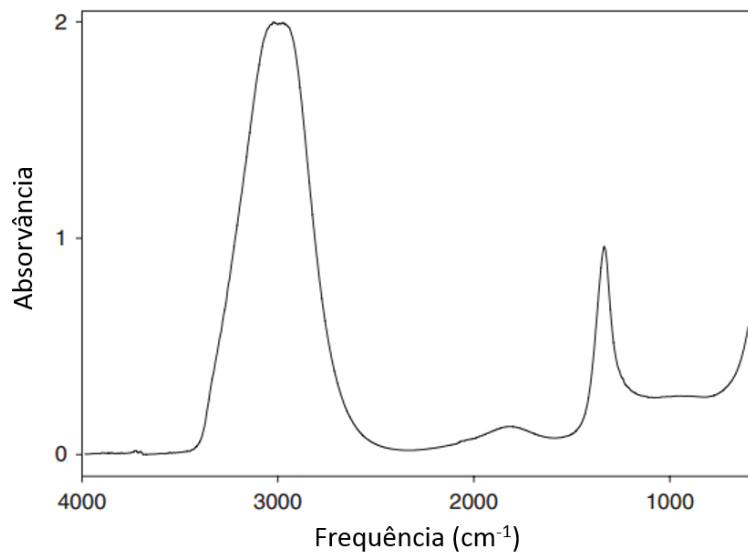


Figura 2 - Exemplo de um espectro de água (Sun 2009).

Os espectros de absorvância na espectroscopia de infravermelho seguem a lei de *Lambert Beer*, que relaciona a concentração e a absorvância, presente na equação 1.

$$A_{\lambda} = l\varepsilon_{\lambda}c \quad (1)$$

onde A_{λ} representa a absorvância, l é a distância percorrida pela radiação através da amostra, ε_{λ} indica a absorvidade e c a concentração.

A transmitância não é diretamente proporcional à concentração e é definida na equação 2.

$$T (\%) = \frac{I_S}{I_R} \quad (2)$$

onde I_S indica a intensidade do feixe de infravermelho depois de passar pela amostra, I_R é a intensidade do feixe antes de passar pela amostra e T a transmitância (Davis & Mauer 2010a).

Atualmente os instrumentos de espectroscopia de infravermelho, utilizados para aplicações analíticas, baseiam-se numa medição interferométrica, designada por espectroscopia de infravermelho por transformadas de *Fourier*. A utilização da Transformada de Fourier permite

a conversão dos dados matemáticos em formato interferométrico para o comprimento de onda no formato tradicional baseado na frequência espectral (Coates 1998b).

2.2 Espectro Eletromagnético de Infravermelho

O infravermelho refere-se à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e as micro-ondas. O espectro eletromagnético refere-se à recolha de energia radiante, de raios cósmicos a raios-X para a luz visível e micro-ondas, cada um dos quais podem ser considerados como uma onda ou partícula que viaja à velocidade da luz. Estas ondas diferem umas das outras no tempo e frequência, tal como ilustrado na Figura 3 (Biochem 2002).

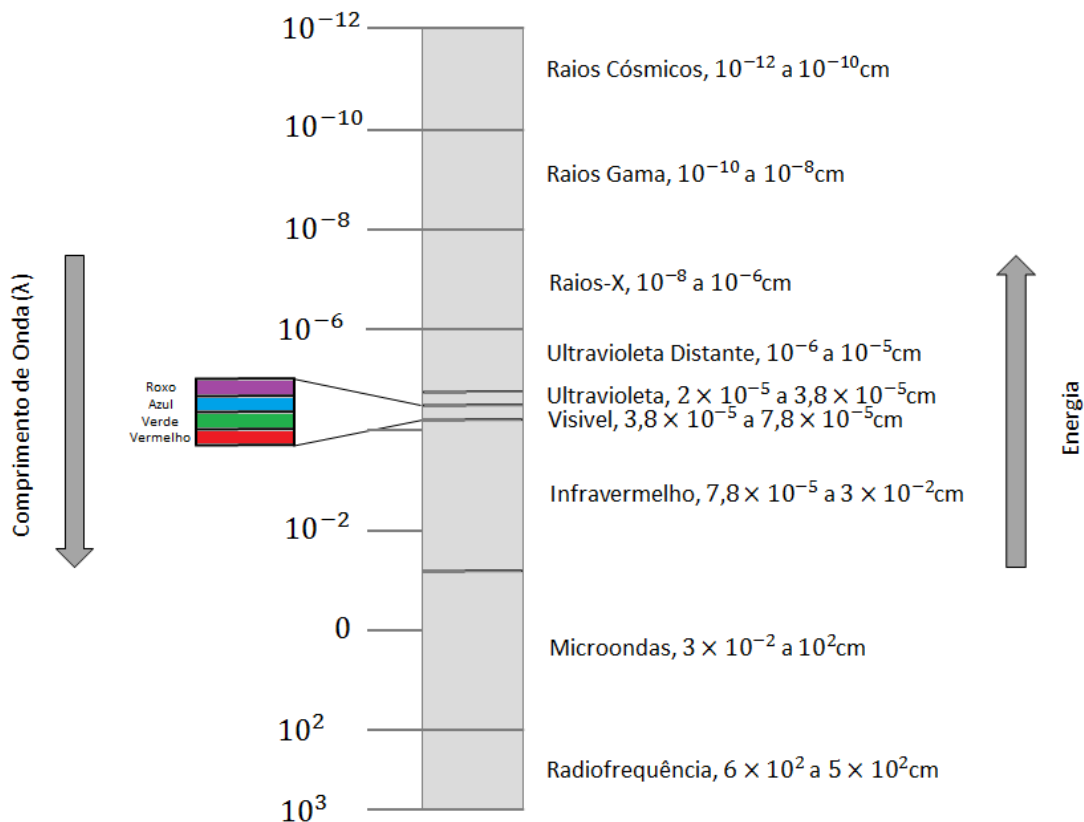


Figura 3 - Espectro eletromagn3tico (Biochem 2002).

Tanto do ponto de vista de aplica3o3o como da componente de instrumenta3o3o, 3 conveniente dividir o espectro de infravermelho em tr3s regi3es distintas, como j3 foi referido anteriormente, sendo designadas devido 3 sua rela3o3o com o espectro vis3vel:

- *NIR* - Infravermelho pr3ximo, no qual a frequ3ncia varia entre 14 000 e 4 000 cm^{-1} e o comprimento de onda de 0,8 a 2,5 μm , posicionado ao lado da regi3o3o vis3vel, denominado de harm3nico ou vibra3o3es harm3nicas mais altas;
- *MID* - Infravermelho m3dio, onde a frequ3ncia varia de cerca de 4 000 a 400 cm^{-1} e o comprimento de onda alcan3a desde 2,5 a 25 μm . Podendo este intervalo ser utilizado

para o estudo da estrutura de moléculas. Comumente, o termo “Espectroscopia de Infravermelho” refere-se a esta região central de Infravermelho;

- *FAR* - Infravermelho distante, em que a frequência varia entre aproximadamente 400 a 10 cm^{-1} e o comprimento de onda de 10 a 1 000 μm , sendo a região de menor consumo de energia com a capacidade de excitar a estrutura vibracional (Reichenbacher & Popp 2012).

Os espectros de absorção, emissão e reflexão de radiação de infravermelho, de espécies moleculares, podem ser explicados assumindo que todos são o resultado de trocas energéticas distintas produzidas nas transições de moléculas de um estado de energia vibracional e rotacional para outro distinto (Skoog *et al.* 1998).

O conceito de vibrações características é utilizado para a análise qualitativa de moléculas poliatômicas. Em compostos orgânicos, ocorrem vibrações características geralmente entre a gama de frequências de 4 000 e 1 500 cm^{-1} . Compostos inorgânicos contendo átomos pesados podem apresentar vibrações características em frequências muito baixas. As vibrações características são baseadas em movimentos, principalmente vibrações de alongamento, que são localizadas e características de grupos funcionais típicos. Enquanto bandas individuais não são suficientes para confirmar a identidade de uma molécula, estas bandas fornecem informações úteis sobre o tipo e quantidade das subestruturas que compõem uma molécula (Hof 2003). Esta análise irá conseqüentemente ser passível de ser usada para análise da estrutura molecular de matérias-primas em empresas alimentares.

2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de *Fourier*

Os espectrômetros são comercializados desde cerca de 1940 e desde então sofreram vários progressos. Os aperfeiçoamentos mais significativos na espectroscopia de infravermelho surgiram como resultado da aplicação da transformada de *Fourier* em espectrômetros (FTIR). Este tipo de instrumento emprega um interferômetro e explora o processo matemático de transformação de *Fourier* (Stuart 2004).

Esta técnica baseia-se na interferometria que é a ciência e técnica da sobreposição de duas ou mais ondas de entrada que resulta numa terceira que pode ser usada para explorar a diferença entre as ondas de entrada (Van de Voort 1992). A transformada de Fourier permite uma melhoria da qualidade dos espectros de infravermelhos obtidos e minimizar o tempo utilizado para obtenção de resultados (Stuart 2004).

De um modo geral os espectrômetros de infravermelho baseiam-se no interferômetro de Michelson, representado de uma forma esquemática na Figura 4.

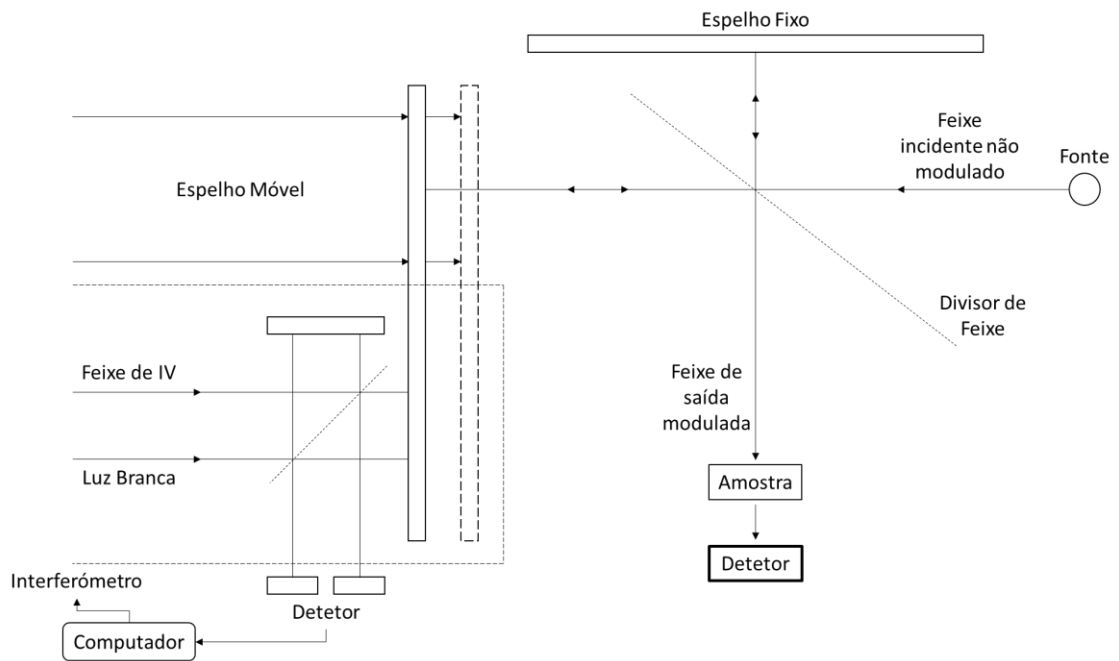


Figura 4 - Esquema dos componentes básicos de um interferômetro de Michelson (Stuart 2004; Davis & Mauer 2010a).

Esta técnica possui uma fonte de infravermelho, que emite radiação, que passa através de um interferômetro, geralmente um interferômetro *Michelson*, com a presença de dois espelhos planos colocados perpendicularmente, um dos quais se pode movimentar na direção perpendicular ao plano, e um divisor de feixe escolhido de acordo com a região a ser examinada que corta os planos destes dois espelhos. Os dois feixes são refletidos a partir destes espelhos, retornando para o divisor de feixe onde eles se recombinam e interferem. Quando a radiação de infravermelho passa através de uma amostra, alguma radiação é absorvida enquanto a restante é transmitida para o detector. O espelho em movimento produz uma diferença de trajeto óptico entre os dois braços do interferômetro onde para diferentes comprimentos de onda, os dois feixes interferem destrutivamente no caso de ocorrer transmissão, e construtivamente no caso de o feixe ser refletido. A flutuação da intensidade da energia que chega ao detector é lida utilizando sistema de aquisição de dados em tempo real o que resulta num interferograma que contem a informação espectral da amostra. Um interferograma é um espectro com a intensidade de luz absorvida em função do tempo. Posteriormente é aplicada a função matemática, denominada por transformada de Fourier, responsável pela transformação do interferograma num espectro de infravermelho onde a intensidade é em função da frequência (Davis & Mauer 2010a; Stuart 2004; Schmitt & Flemming 1998; Van de Voort & Ismail 1991).

Nos últimos anos, o desenvolvimento da espectroscopia FTIR, e das suas óticas auxiliares, têm tido um enorme progresso. A fotometria e precisão do comprimento de onda, a qualidade espectral e reprodutibilidade de instrumentos modernos em combinação com técnicas de quimiometria permitem uma ampla área de aplicações (Schmitt & Flemming 1998).

A tecnologia de espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier levou a uma renovação do interesse pela espectroscopia de infravermelho como ferramenta de análise quantitativa. Com a diminuição do custo desta tecnologia, é agora possível considerar a sua utilização para análise de vários componentes de géneros alimentícios (Van de Voort & Ismail 1991).

2.3.1 Técnicas de Transmissão e Reflexão

Com a utilização da tecnologia de espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier*, a interação entre a amostra e a radiação de infravermelho de determinada intensidade, pode ser absorvida, refletida, dispersa ou transmitida. Na análise por espectroscopia a medição da luz é subdividida em duas técnicas distintas, nomeadamente a transmissão e a reflexão (Hof 2003).

A espectroscopia de transmissão é bastante utilizada como técnica de medição. Esta é uma metodologia simples que pode ser aplicada na caracterização de gases, líquidos e sólidos que permitam a passagem de luz (Hof 2003). Esta técnica mede o decréscimo na intensidade da radiação que passa através da amostra quando é absorvida. Trata-se de uma análise muito sensível pelo que é necessário ter um cuidado especial na preparação da amostra, nomeadamente a sua concentração, homogeneidade e tamanho das partículas (Hof 2003).

Relativamente aos métodos de espectroscopia de reflexão estes podem ser utilizados em materiais mais opacos. A medição através da reflexão pode ser desenvolvida de acordo com dois tipos de configuração básicos, a reflexão externa (especular) e interna (ATR), fornecendo dados que são influenciados, de uma maneira ou de outra, através do índice de refração da amostra ou comprimento de onda de medição (Hof 2003; Osborne *et al.* 1993; Coates 1998a).

No caso da espectroscopia de reflexão externa, quando o feixe de infravermelhos incide na amostra pode ser refletido sob a forma de reflexão especular ou difusa, esta análise é influenciada pelas características físicas da amostra podendo afetar o espectro obtido. Por sua vez a reflexão interna, usualmente empregue na reflexão total atenuada (ATR), o feixe de infravermelhos é diretamente refletido na amostra (Hof 2003; Osborne *et al.* 1993; Coates 1998a). Sendo esta técnica bastante utilizada na Indústria Alimentar para análise de matéria-prima e controlo de qualidade de produto acabado.

No entanto, para ser aplicável na indústria alimentar, qualquer metodologia desenvolvida deve atender a três critérios básicos: a instrumentação deve ser operacionalmente simples e precisa, equipada com protocolos analíticos específicos previamente definidos para um determinado produto alimentar ou categoria; é necessário obter protocolos de preparação e manuseamento de amostras padronizados; é importante desenvolver procedimentos de calibração padrão juntamente com, padrões de calibração pré-formulados e pré-analisados (Van de Voort & Ismail 1991).

2.3.2 FTIR-ATR

Os primeiros relatos que descrevem a técnica de reflexão total atenuada foram publicados em 1933 por *Taylor*, que aplicou esta metodologia para obtenção de espectros (Paul A. Wilks & Hirschfeld 1985). Esta técnica esteve disponível em diferentes formas durante muitos anos, sendo também conhecida como FTIR-ATR (Coates 1998a). É utilizada, comumente, no infravermelho para a obtenção de espectros de absorção de filmes de espessura mínima e materiais opacos (Hollas 2004).

A reflexão total atenuada ocorre quando um meio de absorção se encontra muito perto, ou em contacto com a superfície refletora. A luz refletida internamente é atenuada, a energia dissipa sob a forma de uma pequena quantidade de calor e a intensidade da radiação refletida internamente diminui segundo os comprimentos de onda em que o material absorve energia (Shyam 2010; Thermo 2015).

O princípio da técnica de ATR baseia-se na transmissão de luz através de um elemento ótico, constituído por um material de elevado índice de refração. De acordo com o ângulo de incidência pode ocorrer reflexão e refração parcial, se o ângulo de incidência for pequeno ou no caso de o ângulo de incidência ser superior ao ângulo crítico, respetivamente. O feixe de radiação de infravermelho entra no cristal onde se dá a reflexão interna total em função do índice de refração das duas superfícies. O feixe ultrapassa a superfície refletora e alcança a amostra, perdendo energia num comprimento de onda específico, no qual esta absorve radiação. Ou seja, isto resulta na atenuação da luz refletida internamente, em função da absorção da amostra. A profundidade de penetração depende do comprimento de onda, do índice de refração do cristal e do ângulo de radiação incidente. Por sua vez a radiação resultante da reflexão total atenuada é medida e marcada em função do comprimento de onda no espectrómetro que é dada pela razão espectral de absorção característica da amostra (Coates 1998a; Stuart 2004; Van de Voort & Ismail 1991).

A atenuação da radiação refletida internamente resulta da penetração do campo de radiação eletromagnética no interior da amostra em contacto com a superfície refletora, campo evanescente. É a interação do campo evanescente com a matéria em contacto com a superfície refletora que resulta na atenuação da reflexão interna, ilustrada na Figura 5.

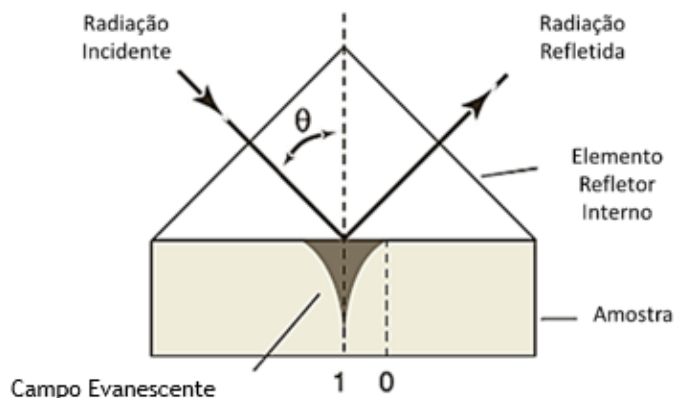


Figura 5 - Características gerais de uma configuração de reflexão interna e rotulagem de vários componentes (Thermo 2015).

Existem três componentes básicos num sistema de Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, a fonte de radiação, o interferômetro e o detetor (Sherman 2000).

A fonte de radiação comumente utilizada em instrumentos de FTIR é a fonte arrefecida por água para proporcionar uma melhor potência e estabilidade, tendo a capacidade de diferenciar e medir a frequência de absorção de determinado componente. O monocromador é substituído por um interferômetro, que divide os feixes radiantes, gera uma diferença de trajeto ótico entre os dois feixes e recombina-os de modo a produzir sinais de interferência repetitivos. Estes sinais são medidos em função da diferença de trajeto ótico por um detetor, que se traduz na informação espectral infravermelha após a passagem pela amostra (Sherman 2000).

Um fator importante a considerar é a reatividade entre a superfície do elemento sensor e a amostra pelo que se pretende que sejam utilizados materiais que evitem a resistência química e corrosão para praticamente qualquer tipo de amostra (Coates 1998a). Os cristais utilizados em células de ATR são feitos a partir de materiais que tenham pouca solubilidade em água e com elevada capacidade de índice de refração, nomeadamente Seleneto de Zinco (ZnSe), Germânio (Ge) e Bromo Iodeto de Tálcio (TlBrI), contudo é o tamanho do cristal que vai determinar o número de interações entre o feixe e respectiva amostra (Bruker 2011; Stuart 2004). A Figura 6 representa o percurso do feixe de IV no cristal de ATR quando existe interação com determinada amostra durante a prática de reflexão total atenuada.

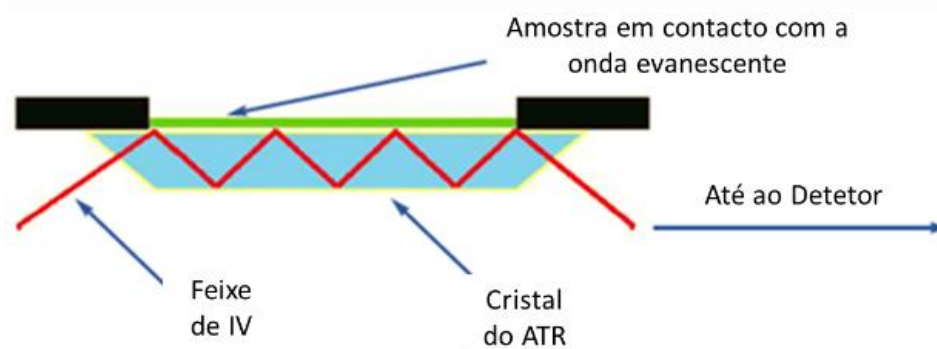


Figura 6 - Esquema de uma reflexão total atenuada típica (Perkin Elmer 2005; Stuart 2004).

Os equipamentos de FTIR-ATR facilitam o tratamento de amostras sólidas, líquidas e polpas viscosas, o que é particularmente útil na análise de produtos alimentares, uma vez que estes podem facilmente ser convertidos em qualquer uma das formas. Tem como vantagens uma melhor proporção de sinal-ruído, melhor transferência de energia, melhor resolução do comprimento de onda e uma flexibilidade superior da tecnologia de FTIR-ATR, o que sugere que a análise quantitativa de sistemas biológicos e alimentares é uma proposta viável (Van de Voort & Ismail 1991).

Ao longo dos tempos foram sendo desenvolvidos diferentes acessórios de FTIR-ATR para manuseamento de líquidos, nomeadamente equipamentos com base no formato tradicional, componentes cilíndricos, horizontais e sondas de imersão. O formato horizontal fornece uma plataforma de amostragem quase universal para líquidos e sólidos. A maioria das unidades FTIR-ATR são construídos com cristais na horizontal com uma espécie de utilidade de aperto para assegurar um bom contacto com a amostra sólida, enquanto que para o caso de análise de líquidos e pastas, onde é suficiente colocar uma pequena quantidade de amostra sobre o cristal e iniciar a medição diretamente. As vantagens do formato horizontal são: facilidade de utilização, higienização/recuperação, força dureza do cristal e inércia química que permite a manipulação de fluidos corrosivos tais como ácidos fortes e soluções alcalinas (Coates 1998a; Bruker 2011).

2.3.3 Fatores que Influenciam o Espectro de FTIR-ATR

Tendo em conta a complexidade deste fenómeno existem vários fatores que afetam a análise espectral de FTIR-ATR após a aplicação desta metodologia, nomeadamente:

- **Comprimento de onda da radiação infravermelha**

A profundidade de penetração é proporcional ao comprimento de onda e depende também da razão entre os índices de refração e o ângulo de incidência. À medida que o comprimento de onda da radiação infravermelha aumenta, a profundidade de penetração aumenta. Isto faz com que as intensidades de banda relativas no espectro de FTIR-ATR aumentem com a diminuição do número de onda, quando comparado com um espectro de transmissão de uma

mesma amostra. Este fenômeno pode ser matematicamente corrigido pela maioria das aplicações de *software* comercial de FTIR (Shyam 2010; Thermo 2015).

- **Índice de refração do elemento de reflexão interna/cristal e amostra**

O índice de refração do cristal deve ser consideravelmente superior ao da amostra (Bruker 2011).

Ao aumentar o índice de refração do material de reflexão interna, o ângulo crítico é diminuído e afeta a profundidade de penetração da onda evanescente na amostra que conseqüentemente diminui. Isto irá diminuir o comprimento da trajetória eficaz e, portanto, diminuir a absorvância do espectro (Thermo 2015).

- **A profundidade de penetração**

O controlo da profundidade de penetração é obtido através da alteração do ângulo de incidência do feixe de radiação infravermelha recebida, no que diz respeito ao cristal ou alteração do índice de refração do cristal.

- **Comprimento do caminho eficaz**

O comprimento da trajetória eficaz (EPL) pode ser utilizado como comparação entre a aproximação da absorvância esperada de um espectro de ATR e de um espectro de transmissão. O EPL está diretamente relacionado com a absorvância, em que um aumento quer na penetração eficaz, quer no número de reflexões irá aumentar a absorvância medida.

- **Ângulo de incidência**

O ângulo de incidência altera a profundidade de penetração. Quando o ângulo de incidência aumenta, a profundidade de penetração diminui e conseqüentemente a absorvância irá diminuir.

- **Eficiência de contacto da amostra**

Outro fator que afeta a qualidade de um espectro de ATR é a eficiência de contacto da amostra. Uma vez que a onda evanescente decai rapidamente com a distância a partir da superfície, é importante colocar a amostra em contacto ótico íntimo com o cristal. Isto é facilmente alcançado com líquidos, porque eles molham a superfície do cristal ATR, no entanto, no caso de amostras com superfícies duras, granulares ou texturizadas podem não fornecer as condições adequadas de contacto. Neste caso é importante o uso de um dispositivo que pressione a amostra contra o elemento de reflexão interna para garantir um

contacto adequado e evitar a existência de vazios de ar entre a amostra e a superfície de contacto, reduzindo a intensidade do espectro.

- **Material do cristal ATR**

O material da superfície refletora define o seu índice de refração, o alcance da transmissão infravermelha e as propriedades químicas do cristal. O material utilizado no cristal deve ter um índice de refração mais elevado do que a amostra para permitir a reflexão interna, sendo escolhidos normalmente cristais com um índice de refração superior a 2,2 para a técnica de ATR. O material do cristal de ATR, também deve ser escolhido pela sua resistência química para à amostra, sendo o ZnSe ($n = 2,4$), o elemento de reflexão interna mais comum, uma vez que pode ser utilizado para amostras com pH entre 5 e 9.

Uma clara vantagem da técnica de FTIR-ATR é que evita a utilização de uma célula ou outra ferramenta adicional. Uma desvantagem é que o cristal ATR é vulnerável à acumulação de depósitos à superfície e a substâncias abrasivas (Shyam 2010).

2.4 Quimiometria

A quimiometria é uma disciplina que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para a seleção do processo e respetivos dados de tratamento experimental ideais para a análise química. Esta reúne vários temas como o desenvolvimento de experiências, métodos de extração de informações e técnicas que permitam a compreensão de mecanismos químicos (Roggo *et al.* 2007).

Os métodos quimiométricos em paralelo com a biologia computacional, que possui abordagens baseadas em computação básica, são aplicados como mineração de dados técnicos em dados de bioprocessamento (Papadopoulou *et al.* 2011).

Pode pensar-se numa análise quimiométrica como sendo constituída por três componentes que interagem entre si, o *hardware* (espectrómetro), *software* (modelação), e um banco de dados (calibração) (Difoggio 2000).

Hoje em dia a espectroscopia de infravermelho e a quimiometria têm provado a sua eficácia para ambas as análises qualitativas e quantitativas em diferentes campos como a agricultura, géneros alimentícios, química e outras indústrias (Roggo *et al.* 2007).

A abordagem básica no desenvolvimento de calibrações e a sua correta colocação em prática está ilustrada na Figura 7. É uma técnica simples, no entanto colocá-la em prática nem sempre é fácil (Kramer 1998).

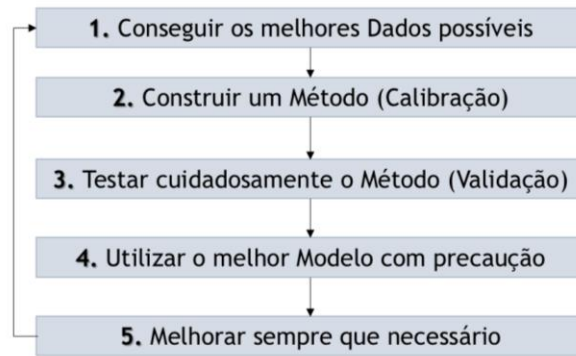


Figura 7 - Fluxograma aplicado para desenvolver e utilizar as calibrações (Kramer 1998).

Para se obterem bons modelos de calibração é importante que a aquisição de espectros seja rigorosa permitindo a obtenção de espectros com qualidade e que os dados analíticos de base sejam robustos, de qualidade e apresentem repetibilidade adequada. É importante trabalhar com o melhor conjunto de dados e amostras, no entanto, a definição de melhor nem sempre é óbvia pelo que é importante manusear diversos fatores até alcançar o pretendido. Se não forem alcançados dados de qualidade não é indicado avançar no processo de calibração quimiométrica (Kramer 1998).

A melhor forma de proteção contra uma calibração inadequada aquando da sua aplicação é testar um elevado número de amostras, efetuar validações cruzadas e mudar os grupos de validação e validação cruzada de acordo com a metodologia apresentada em Anjos et al. (2016). De modo a desvendar qualquer falha ou fraqueza que a calibração possua e ajudar a perceber as limitações da mesma. A calibração desenvolvida é utilizada como conjunto de treino para prever as concentrações das amostras de validação que se consideram como desconhecidas. Sendo posteriormente as concentrações previstas obtidas comparadas com os resultados reais da mesma amostra (Kramer 1998).

2.4.1 Pré-Tratamento e Tratamento Espectral

Após uma medição analítica, os dados recolhidos são muitas vezes tratados por diferentes técnicas de processamento de sinal. O objetivo é a obtenção de maior qualidade ou dados que correspondam à realidade, permitindo extrair a quantidade máxima de informação significativa, embora não seja fácil de realizar (Chau *et al.* 2005).

Devido à instabilidade a que os espectrómetros estão sujeitos é importante executar um pré-tratamento espectral que filtre e elimine influências externas que prejudicam a análise dos espectros obtidos, tais como variações da instrumentação, as condições experimentais e de outros fatores. Permitindo obter melhorias significativas no desenvolvimento do modelo de calibração que se pretende desenvolver (Defernez & Wilson 1997; Chau *et al.* 2005).

Os dados obtidos através de técnicas instrumentais, tais como espectroscopia de infravermelho, são cada vez mais analisados para identificação da amostra e classificação por métodos

quimiométrico, que se baseiam na análise de componentes principais (PCA) (Defernez & Wilson 1997). A centralização e normalização são frequentemente úteis na análise deste tipo de dados (Ozaki *et al.* 2013).

A análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta padrão capaz de obter e compactar informações relevantes de um conjunto de dados confusos, em função da existência de correlação entre as variáveis (Shlens 2014; Sabin *et al.* 2004). Com a utilização desta técnica estatística um elevado número de variáveis originais independentes é sistematicamente reduzido a um conjunto de variáveis menor e conceitualmente mais coerente (Dunteman 1989).

O método de regressão de componentes principais (PCR) é dividido em duas fases. Primeiro os dados espectrais são tratados a partir do método de PCA e posteriormente é aplicada uma regressão multi-linear nas variáveis com pontuações preditivas (Roggo *et al.* 2007).

Foi desenvolvido o método de regressão de quadrados mínimos parciais (PLS) de modo a evitar a dificuldade em definir os componentes principais, presente no método de PCR (Naes *et al.* 2004). Este método estabelece uma ligação linear entre os dados espectrais e os valores de referência que são adaptados de modo a obter os valores que melhor descrevem os valores de referência (Roggo *et al.* 2007).

A centralização na média é uma operação que reduz problemas de arredondamento e desvio e diminui o tamanho do modelo resultante. As medições instrumentais centradas e ponderadas são utilizadas como base de construção do modelo de calibração de modo a modificar a influência relativa de cada medição no modelo resultante (Thomas 1994).

O método de correção multiplicativa de sinal (MSC) é desenvolvido de acordo com os valores espectrais individuais e análise espectral. Este visa minimizar a interferência relativa à dispersão de luz, com base na dispersão média de todos os espectros utilizados na calibração multivariada, de modo a aproximar os valores espectrais a uma linha de regressão linear (Naes *et al.* 2004; Morgano *et al.* 2007).

Existem diferentes procedimentos de normalização populares na prática comum. Um procedimento comum de normalização é a chamada normalização significativa, onde após a sua aplicação todos os espectros têm a mesma área (Ozaki *et al.* 2013).

2.5 Aplicações do FTIR-ATR na Análise de Alimentos

Segundo Stuart e colaboradores (2004) a técnica de infravermelho pode ser utilizada para obter informações qualitativas e quantitativas sobre amostras de alimentos, relativamente aos componentes principais, nomeadamente água, proteínas, gorduras e hidratos de carbono. Com o aumento das normas e legislações aplicadas aos géneros alimentícios, assim como também o crescente aumento da exigência requerida por parte de clientes e respetivos consumidores é

importante identificar que moléculas estão presentes numa determinada amostra e em que concentrações, sendo este o motivo pelo qual a análise de espectros através de espectroscopia de infravermelhos é tão útil (Smith 2011). A análise através da espectroscopia de infravermelho, nomeadamente utilizando o equipamento de ATR, tem sido utilizada numa vasta gama de aplicações a nível industrial. Existe uma crescente demanda para garantir o abastecimento de alimentos seguros que despoletou assim o interesse pela investigação neste ramo, pelo que têm vindo a ser desenvolvidos vários estudos que confirmam a utilização desta metodologia na análise detalhada e controlo de qualidade dos mais diversos produtos alimentares.

Tal como referido anteriormente, a deteção rápida e específica de agentes patogénicos nos alimentos é cada vez mais importante na segurança alimentar. Atualmente é possível aplicar este método com sucesso na deteção, distinção, identificação e classificação de bactérias pertencentes a diferentes espécies, em particular de origem alimentar, tais como *Listeria*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, e *Bacillus*. Os métodos de FTIR-ATR são altamente específicos e sensíveis, permitindo a identificação de bactérias, ou até mesmo o reconhecimento da estirpe. Devido a isto, existe uma procura crescente por espectroscopia FTIR na área da microbiologia alimentar, devido ao seu avanço tecnológico, simplicidade de preparação de amostra, e velocidade de análise (Davis & Mauer 2010b).

Alguns autores usaram o FTIR-ATR para a identificação preliminar dos principais ficocolóides (nomeadamente alginato, agar e carragenina) produzidas por algas castanhas e vermelhas comestíveis. Esta técnica permitiu distinguir entre produtores de agar e carragenina o que provou a sua utilidade em indústrias alimentares para uma rápida caracterização de polissacarídeos em algas (Gómez-Ordóñez & Rupérez 2011).

A presença de Ocratoxina A (OTA) em comida infantil, cevada, milho (infecção fúngica), cerveja, café e vinho, e desenvolvimento de métodos de deteção analítica através da aplicação de reflexão difusa no infravermelho médio e reflexão total atenuada na espectroscopia têm sido documentados. Os resultados de ATR obtiveram um alto desempenho da classificação de amostras contaminadas, facilidade de preparação da amostra e uma perspetiva de automação com a possibilidade de controlo on-line durante o processamento (Galvis-Sánchez *et al.* 2007).

A utilização da técnica de espectroscopia de FTIR tem sido bem sucedida na determinação de sacarose e glucose e discriminação dos vinhos tintos, óleos comestíveis e cerveja. O FTIR-ATR tem provado ser uma técnica rápida e facilmente aplicável, sem necessidade de uma trabalhosa preparação da amostra e operadores qualificados (Beullens *et al.* 2006).

A espectroscopia FTIR-ATR tornou-se uma técnica alternativa para a análise de açúcares em diversas amostras de alimentos, que tem como principais características o facto de ser evasivo e potencialmente mais rápido do que os métodos tradicionais (Anjos *et al.* 2015). Duarte e colaboradores (2002) concluíram que o espectro de FTIR de uma amostra de sumo pode ser

utilizado como um rápido indicador do grau de maturação, útil para estabelecer condições apropriadas para o armazenamento e transporte de modo a que nenhum excesso de amadurecimento ou outras perdas de qualidade ocorram.

Lagaron e colaboradores (2007) selecionam o FTIR-ATR como uma ferramenta adequada para investigar as propriedades antimicrobianas de quitosano porque, mesmo quando outros métodos analíticos não conseguem monitorizar o processo de libertação de componentes bioativos, esta técnica permite obter informação direta de como o biocida é quimicamente ligado à matriz do polímero caracterizando de forma completa e simultânea todo o processo de libertação, incluindo alterações.

FTIR-ATR foi usado por Lyman e colaboradores (2003) para estudar o efeito de condições de torrefação no sabor do café. Os estudos mostram que os espectros de FTIR-ATR de café preparado podem ser utilizados para determinar o efeito das condições de torrefação na composição molecular do café. A gama de frequências $1800-1680\text{ cm}^{-1}$ representa a região carbonilo do espectro que fornece uma impressão característica do sabor que parece ser consistente com o sabor e aroma percebido pelos provadores de café.

Foi investigada a viabilidade da espectroscopia de FTIR para quantificar mudanças bioquímicas que ocorrem na carne de porco fresca picada na tentativa de monitorizar a deterioração. Os espectros recolhidos podem ser considerados como impressões digitais bioquímicas que contêm informação valiosa para a discriminação de amostras de carne em classes de qualidade correspondente a diferentes níveis de deterioração, pode ainda ser utilizado para correlacionar a população dos diferentes grupos de microrganismos diretamente da superfície da amostra (Papadopoulou *et al.* 2011).

Paradkar & Irudayaraj (2002) utilizaram a técnica de FTIR-ATR para o controlo de qualidade do teor de cafeína em refrigerantes e outros produtos como chás.

A espectroscopia FTIR utilizando o ATR e a espectroscopia NIR foram usadas com sucesso para detetar o tipo e nível de adulterantes em xarope de açúcar (Paradkar *et al.* 2003). Estas metodologias também se mostraram eficientes na caracterização e quantificação de óleos essenciais obtidos de diferentes espécies de tomilho, orégãos e várias espécies de camomila. Neste contexto várias aplicações de ATR-FTIR e espectroscopia NIR em combinação com algoritmos quimiométricos sofisticados foram introduzidas com êxito para a caracterização qualitativa e quantitativa de óleos essenciais durante os últimos anos (Schulz *et al.* 2003).

O método espectroscópico de ATR-FTIR foi usado para estimar as concentrações xarope de milho em três variedades diferentes de amostras de mel para a determinação quantitativa de adulteração de açúcar, através de materiais adoçantes mais baratos (Sivakesava & Irudayaraj 2001a). Outro trabalho desenvolvido pelo mesmo autor descreve a utilização do mesmo método

e demonstra o seu potencial como ferramenta analítica eficaz para distinguir diferentes níveis de açúcar de beterraba invertido no mel (Sivakesava & Irudayaraj 2001b).

Os métodos de espectroscopia têm mostrado serem muito robustos em estudos de autenticidade de alimentos nomeadamente em produtos da pesca (Alamprese & Casiraghi 2015), polpas e sumos (Kelly & Downey 2005; Tewari et al. 1999; Twomey et al. 1995; Contal et al. 2002; Xie et al. 2008), queijo (Ottavian et al. 2012), carnes (Cozzolino & Murray 2003), deteção de melanina em leite em pó e farinha de soja (Haughey et al. 2013; Lu et al. 2009), azeite (Sinelli et al. 2010), vinho (Cozzolino et al. 2003), cafés (Brindet et al. 1996) e inúmeros outros alimentos.

De um modo geral os métodos de espectroscopia de infravermelhos rápidos têm sido utilizados com sucesso na deteção de adulteração de uma grande gama de produtos alimentícios complexos, incluindo óleos, carboidratos sob a forma de pós, sumos, mel, café, leite, vinagre, carne de caranguejo e trigo (Mauer *et al.* 2009).

Capítulo III - Componentes Analisados

3.1 Matéria-Prima

O morangueiro pertence à família *Rosaceae*. As cultivares mais difundidas comercialmente pertencem à espécie “*Fragaria x ananassa Duchesne*”, originada no século XVIII a partir de hibridações espontâneas entre duas espécies selvagens de frutos grandes, que tinham sido trazidas da América para a Europa no século XVII (Coopermit 2013).

De um modo geral os morangos utilizados na produção de produto acabado na Frulact têm origem em países como a Polónia, Espanha, Marrocos e Portugal. Entre as inúmeras variedades de morangos utilizados estão nomes como *Senga Sengana*, *Cama Rosa*, *Ventana*, *Marisol*, *Primóris* e *Festival Margarita* que ocupam a maioria dos morangos fornecidos para posterior laboração.

A parte comestível do morango não corresponde ao que botanicamente se denomina fruto, é na verdade um falso fruto originado pelo engrossamento do receptáculo da flor após a fecundação dos óvulos (Coopermit 2013). Os verdadeiros frutos (aquénios) são aquilo a que por vezes se chama de sementes e estão distribuídas à superfície da parte carnuda avermelhada.

Os morangos são ricos em vitamina C e em ácido fólico, sendo igualmente uma boa fonte de fibras. Cerca de 8 morangos de tamanho médio contêm aproximadamente 160 %, 20 % e 16 % do consumo diário recomendado de vitamina C, de ácido fólico e de fibras, respetivamente (Coopermit 2013).

A cadeia típica do morango para o mercado em fresco é apresentada esquematicamente na Tabela 1. É importante que todas as etapas sejam coordenadas e realizadas com rapidez de forma a evitar a exposição do morango a temperaturas elevadas.

Tabela 1 - Esquema da cadeia típica do morango, desde o seu cultivo à comercialização (Coopermit 2013).



Numa fase inicial tudo o que diz respeito às condições e rastreabilidade do produto, a responsabilidade recai inteiramente sobre o fornecedor, que deve ter em conta todas as etapas pela qual este fruto fresco passa, nomeadamente:

- A fase de cultivo que engloba as mais variadas atividades, desde a preparação do terreno e sua desinfecção e fertilização, plantação, rega e controlo de pragas e doenças, entre outras;
- A decisão da data de colheita que é vital para a obtenção de boas características físicas, químicas e organolépticas, visto que se esta não for feita no devido momento o tempo de maturação do fruto pode não ser o suficiente para atingir as características pretendidas, comprometendo a qualidade do produto;
- Posteriormente a remoção das folhas tem uma elevada importância na aceitação ou não do produto, uma vez que cada fornecedor tem de respeitar os limites impostos no Boletim de Análise para a presença deste componente na matéria-prima;
- A congelação deste fruto é feita pela técnica de Individual Quick Frozen (IQF) de modo a obter o morango inteiro congelado ou preparar o mesmo para a etapa de corte, possibilitando manter a textura pouco alterada e todos os frutos separados;
- Esta etapa de corte é opcional, dependendo do que o cliente pretende, pode ou não ocorrer, no entanto caso se proceda ao corte, este é feito de acordo com determinado calibre, neste caso é utilizado um corte de 10x10 mm, este corte deve ser regular e uniforme, para obter uma matéria-prima homogénea;
- O embalamento é feito em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (0,92 g/cm³) opaco azul, com uma espessura de 0,045 µm. São sujeitos a testes que atestam a conformidade dos mesmos, nomeadamente a determinação da migração global em simuladores alimentares aquosos por imersão total. Este produto tem como função acondicionar corretamente o produto e evitar a sua perda ou contaminação, posteriormente estes sacos são inseridos em caixas de papelão devidamente seladas e identificadas, facilitando o seu transporte em grandes quantidades.

Por sua vez o transporte desde o fornecedor até ao cliente que deve ser feito de acordo com as normas de logística para produtos alimentícios congelados, sendo obrigatória a rastreabilidade de temperatura ao longo do trajeto para verificar se houve alguma quebra na cadeia de frio, a permissão para descarregar a matéria-prima é feita de acordo com esta informação.

Quando o produto já se encontra nas instalações da indústria, o responsável por manter e assegurar as condições adequadas ao fruto é o cliente, que irá proceder posteriormente a um conjunto de análises para que se averigüe se o lote recebido será realmente aceite ou será emitida uma não conformidade.

As análises são executadas pelos funcionários do Laboratório de Controlo de Qualidade. Procede-se à recolha de uma amostra representativa do total da quantidade recebida em fábrica para manter a fiabilidade. Segue-se um processo de escolha rigoroso, para deteção de elementos vegetais e não vegetais que não sejam admitidos, e executam-se as análises físicas e químicas que verificam o estado de maturação do fruto, permitindo aprovar ou rejeitar a matéria-prima consoante os resultados obtidos.

Caso a matéria-prima seja aprovada esta é devidamente acondicionada na sala de congelação onde é mantida a uma temperatura aproximada de -18°C até utilização da mesma nas linhas de produção da indústria.

3.1.1 Morango Inteiro

Este produto consiste em morango inteiro congelado por técnicas de IQF que provém de diferentes fornecedores.

É feita uma análise física do produto onde é procurada essencialmente a presença de folhas e eventuais restos do pedúnculo do morango, mas também a presença de outros componentes não vegetais que possam surgir aquando da análise e que podem levar a rejeição direta da matéria-prima que comprometem o fruto e a sua consequente utilização.

Relativamente ao aspeto visual é importante ter em conta o estado e integridade do fruto em si, caso a amostra tenha frutos podres ou estragados é necessário averiguar a situação, para que se possa agir em conformidade.

São executadas análises químicas que verificam o estado de maturação do fruto, nomeadamente a identificação de sólidos solúveis totais, pH e acidez total titulável, caso os valores obtidos não se encontrem dentro dos limites pode ser necessário rejeitar o lote, uma vez que a sua utilização pode comprometer a produção de produto acabado que use esta matéria-prima.

O lote de matéria-prima de morango rececionada é armazenado na câmara de congelação a uma temperatura de -18 °C de modo a manter a sua integridade evitando que este perca qualidade ou sofra qualquer tipo de contaminação.

3.1.2 Morango Cortado (10x10 mm)

Trata-se de morango cortado em pedaços de calibre 10x10 mm, ou seja que sofre um corte específico permitindo que o morango fique com estas dimensões para posterior utilização, sendo congelado por técnicas de IQF que provém de diferentes fornecedores até às instalações da indústria.

No que diz respeito à análise do controlo de qualidade, integridade e maturação do fruto são realizados o mesmo tipo de estudos. A tarefa de verificação da presença de objetos estranhos torna-se mais complicada nesta matéria-prima tendo em conta o corte o que permite uma aglomeração do produto e aumento das faces e número de peças a analisar.

O conjunto de avaliações efetuados dita se a matéria-prima está conforme ou não conforme e consequentemente se é ou não aceite por parte do controlo de qualidade para posteriormente ser armazenada e utilizada no desenvolvimento de produto acabado.

Tal como sucede no morango inteiro, também os lotes de matéria-prima de morango cortado (10x10) são armazenados na câmara de congelação a uma temperatura de -18°C para manter a sua integridade evitando que este perca qualidade ou sofra qualquer tipo de contaminação.

3.2 Produto Acabado

Foram selecionados alguns produtos, na sua fase final, de acordo com a sua variabilidade e frequência de fabrico de modo a obter um número razoável de amostras para se poderem efetuar modelos de calibração robustos.

3.2.1 Morango+

Consiste num produto desenvolvido na indústria que tem por base pedaços de morango de dimensão estabelecida.

O morango apresenta-se com um corte de calibre de 10x10 mm, o que permite que após a sua transformação ainda estejam presentes.

Possui um aspeto heterogéneo, observável na Figura 8, uma vez que é constituído por pedaços e uma envolvente que tem um aspeto gelatinoso, o conjunto destes elementos apresenta-se na cor avermelhada bastante brilhante com destaque dos pedaços de morango. Tem um elevado grau de viscosidade.

No que diz respeito à avaliação organolética este produto é muito doce, destacando-se essencialmente o sabor a morango.



Figura 8 - Produto acabado denominado de “Morango+”, depois da recolha e espalhamento do mesmo.

3.2.2 Morango -

É um produto confeccionado na indústria que tem por base da sua constituição os pedaços de morango.

Também neste caso o morango possui um calibre de corte de 10x10mm, permitindo a deteção de pedaços após processamento.

Caracterizado por um aspeto heterogéneo, visto que se trata de um produto com pedaços e uma envolvente de aspeto gelatinoso, tendo uma cor avermelhada bastante brilhante onde os pedaços de morango se encontram em realce. Possui um elevado grau de viscosidade.

Relativamente à avaliação organolética este produto é menos doce que o produto acabado anterior, Morango +, sendo o nível de doçura a maior distinção entre ambos. Também neste se destaca o sabor a morango.

3.2.3 Framboesa

Este produto é confeccionado na indústria que tem por base da sua constituição a framboesa e a elevada presença de cálcio, uma vez que se trata de um produto enriquecido com este componente, e também a Vitamina D3.

Tem um aspeto bastante homogéneo de cor fúcsia escuro, sem pedaços e com um elevado grau de viscosidade, representado na Figura 9.

Na avaliação organolética deste produto evidencia-se um sabor a framboesa bastante forte, podendo ser ou não detetado o sabor do cálcio que o constitui, possui ainda um nível considerável de açúcar.



Figura 9 - Produto acabado denominado de “Framboesa” no copo de recolha e após espalhamento.

3.2.4 Cereais

Este preparado é um produto confeccionado na indústria que como ingredientes coco, cereais e frutos secos, nomeadamente pinhões, noz e granulado de avelã.

Neste caso o coco apresenta-se com um corte de modo a que seja notável a sua presença, nomeadamente com dimensões de 6x6x6mm e ralado, os cereais sob a forma de flocos e farelo e os frutos secos por sua vez encontram-se inteiros, com o tamanho de 6x6x6mm e de 3-5mm, os pinhões, a noz e o granulado de avelã, respetivamente.

Apresenta-se com um aspeto heterogéneo, como se pode observar na Figura 10, com um elemento de cor esbranquiçada acastanhada que envolve os pedaços cortados de cereais e frutos secos, evidenciando a presença dos pinhões que são os únicos mantidos inteiros. Caracterizado por um elevado grau de viscosidade.

Através da análise organolética, tendo em conta que se trata de um produto acabado mais complexo, pode destacar-se o sabor do coco e de alguns cereais, sendo também um produto doce.



Figura 10 - Produto acabado denominado de “Cereais”, após recolha e espalhamento.

Capítulo IV - Material e Métodos

4.1 Obtenção de Amostras

De acordo com o tipo de amostra a ser obtida foram adotados diferentes procedimentos e técnicas de modo a respeitar todos os critérios de segurança e controlo de qualidade exigidos para os diferentes elementos.

4.1.1 Receção e Recolha de Amostras de Matéria-Prima

O controlo da matéria-prima a quando da sua receção é de extrema importância, não só em termos logísticos, mas também e principalmente do ponto de vista de Controlo de Qualidade. É através desta análise que o lote vai ser aceite ou rejeitado, dependendo dos limites impostos pelos Boletins de Análise especificados pelo fornecedor para os diferentes parâmetros a ter em conta.

A matéria-prima pode ser rececionada de diferentes modos, sempre respeitando as regras de higiene e segurança alimentar, sendo os mais usuais: i) em caixas de papelão devidamente identificadas por guias, de modo a manter a rastreabilidade do produto e suas características, com um saco de plástico forte dentro do qual se encontra o produto congelado; ii) em sacas de papelão com um revestimento de plástico; iii) em caixas de plásticos com sacos plásticos.

Numa primeira fase é efetuada uma análise essencialmente visual onde são detetados componentes anómalos vegetais ou não vegetais, nomeadamente folhas e pedúnculos ou fibras e plásticos, que não deveriam estar presentes. Posteriormente é retirada uma amostra para proceder às restantes análises necessárias para a aprovação da matéria-prima que englobam a determinação do pH, Sólidos Solúveis Totais (SST) e Acidez Total Titulável.

Todo o conjunto de procedimentos é feito segundo os protocolos internos que respeitam as normas referentes ao HACCP.

As caixas que contêm uma amostra representativa que depende da quantidade do lote são previamente pesadas para controlo do peso. Estas são posteriormente “batidas” em local apropriado para que os frutos congelados por processo de IQF ou Estático se desagreguem permitindo posteriormente a sua correta análise.

A seleção de amostras para controlo de qualidade é efetuada de acordo com o seguinte procedimento:

- A caixa que contém a matéria-prima é aberta e o seu conteúdo é despejado sobre a mesa de controlo de receção de matérias-primas, como se pode observar na Figura 11A;
- A caixa de papelão é pesada vazia para controlo do peso;

- É efetuada um controlo visual pelo operador que mexe diretamente na matéria-prima, utilizando luvas, de modo a detetar corpos estranhos (Figura 11B), vegetais ou não vegetais, ou outro tipo de não conformidades, nomeadamente bolores;
- É feita a recolha de matéria-prima de modo a efetuar a análise dos parâmetros impostos para cada produto, nomeadamente os conteúdos retidos nos crivos (tamisador), a determinação do pH, sólidos solúveis totais e ainda em alguns casos específicos a determinação do extrato seco ou teor de humidade, dependendo do tipo de amostra;
- O produto restante é novamente inserido no saco plástico e respetiva caixa para ser posteriormente armazenada na sala de congelação industrial a uma temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- É preenchida uma folha com a análise de quantidades e peso das caixas que contêm a informação da data de análise, o produto analisado, o peso de produto teórico, o peso da caixa e o peso de produto real para controlo de quantidades enviadas pelo fornecedor;
- Os resultados necessários são inseridos informaticamente para aprovação ou não da matéria-prima em questão e a sua ficha de análise é impressa para que posteriormente seja arquivada.

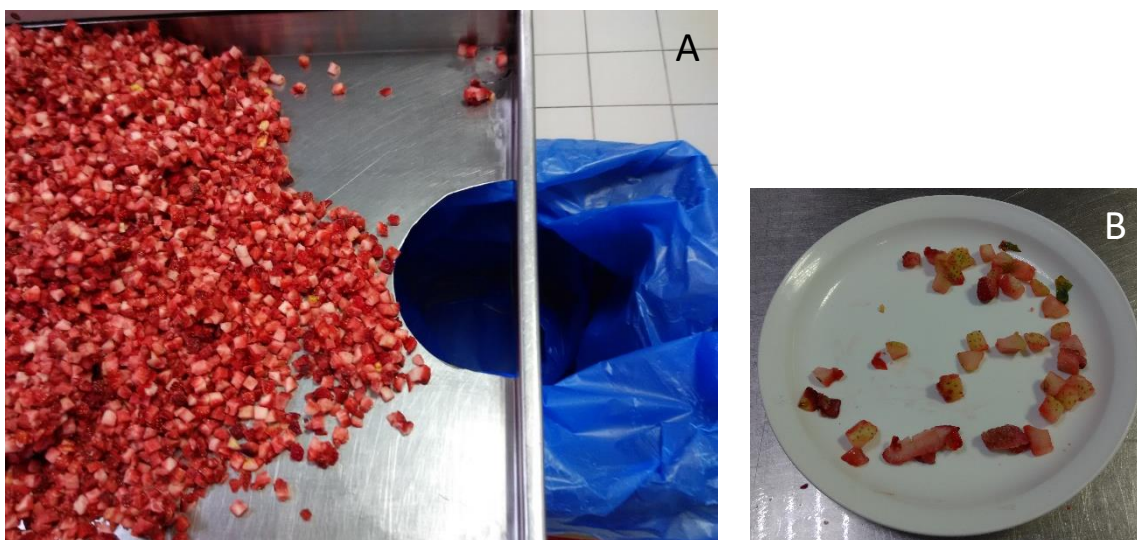


Figura 11 - Atividade de controlo de qualidade à receção de matéria-prima. A) Mesa de controlo de qualidade onde se visualiza a matéria-prima, a caixa de papelão e respetivo saco plástico. B) Corpos estranhos removidos após a análise de matéria-prima, para que seja deliberada a sua aceitação para posterior utilização.

4.1.2 Recolha de Amostra de Produto Acabado

A obtenção contínua de amostras representativas de produto acabado é importante para um correto e adequado Controlo de Qualidade do produto ao longo do processo, permitindo perceber se existe a necessidade de proceder a algum acerto dos componentes que fazem parte da sua composição, o que é importante para uma ação corretiva imediata do produto evitando assim que este sofra qualquer tipo de danos, não diminuindo a qualidade do produto.

Este procedimento engloba diferentes etapas de trabalho, numa fase inicial a recolha da amostra executada por um operador da linha de produção que é retirada diretamente do

“Mixer” onde o produto está a ser desenvolvido e posteriormente o procedimento analítico levado a cabo por parte do analista de laboratório responsável pelo produto acabado que verifica os resultados obtidos pelo operador e executa análises adicionais que irão caracterizar e distinguir o produto, para que possa ser aprovado.

Preparação da Amostra:

Na preparação da amostra devem ser mantidas as condições de desinfeção dos utensílios utilizados necessárias para que o produto não seja contaminado.

As amostras para controlo do produto acabado são recolhidas por operadores da linha de produção que pulverizam álcool no utensílio de recolha, esperam que seque e inserem-no no “Mixer” tentando obter uma amostra homogénea que represente a totalidade do produto em questão para que os procedimentos posteriores não obtenham resultados que não demonstrem a realidade e totalidade do produto, a amostra é depositada em copos plásticos e transportada até ao laboratório para que sejam efetuadas as análises necessárias.

Procedimento:

- A amostra de produto acabado é trazida pelo operador para o laboratório deixando-a no local apropriado para que o Analista responsável possa proceder à sua recolha;
- O analista executa todas as tarefas necessárias e análises exigidas consoante o produto;
- Procede ainda às análises de auto-controlo que verifica os resultados obtidos pelos operadores de linha;
- Uma amostra representativa do produto é retirada para um copo esterilizado para que as análises de controlo de pH, °Brix e Acidez Titulável sejam executadas.

4.1.3 Recolha de Amostras de Produto Acabado para Análise Microbiológica

A recolha contínua de amostras de produto acabado é essencial para o Controlo de Qualidade do produto ao longo do processo, permitindo iniciar os procedimentos de controlo microbiológico dos produtos necessários para a aprovação do produto.

Este procedimento engloba diferentes etapas de trabalho, numa fase inicial a recolha da amostra por um operador fabril diretamente do contentor em que o produto está a ser embalado, posteriormente a fase de anotação da informação necessária para proceder às análises microbiológicas por parte do analista de laboratório responsável pela microbiologia e por último o procedimento das análises em si.

É importante durante todo este processo manter as condições de esterilização para que os produtos não sofram qualquer tipo de contaminação posterior ao embalamento, o que poderia conduzir a uma deteção incorreta de contaminações microbiológicas, o que seria um

desperdício não só de tempo, devido há necessidade de proceder a repetições e descobrir a fonte de contaminação, como também um mau emprego de meios.

Preparação da Amostra:

Tendo em conta que se trata de Análises Microbiológicas é necessário todo um conjunto de procedimentos que possibilitam o posterior tratamento das amostras, nomeadamente a preparação de Meios, soluções enriquecidas, entre outros compostos necessários dependendo do tipo de produto em análise para que se possam proceder aos testes.

As amostras são recolhidas por operadores da linha de produção que pulverizam álcool na boca do contentor e colocam a arder com o auxílio do maçarico para tentar manter as condições de assepsia evitando contaminações, abrindo a torneira do contentor é permitido assim que o produto escorra para dentro dos frascos plásticos microbiológicos, previamente esterilizados e abertos no local, assim que tenham produto suficiente o frasco é devidamente fechado e a boca do contentor devidamente higienizada. O frasco é levado pelo operador para que posteriormente se possa dar continuidade ao processo de análise.

Procedimento:

- Numa fase inicial o analista do laboratório regista as informações necessárias de cada frasco que contem amostra microbiológica de um determinado produto, de modo a saber de que tipo de análise se trata e as condições em que é trabalhado;
- São desenvolvidas as técnicas necessárias sobre condições de assepsia, que neste caso passam pela utilização de chama com a utilização de bico de *Bunsen*, onde são feitas pesagens na balança de precisão para os frascos de vidro, e a câmara de fluxo laminar, onde é feito o plaqueamento do produto;
- As amostras utilizadas para uma posterior análise em FTIR, no laboratório do polo de química da Universidade da Beira Interior, são retiradas aquando da pesagem do produto ou posteriormente à fase de plaqueamento na câmara de fluxo laminar, passando produto dos frascos plásticos microbiológicos para os copos esterilizados que são devidamente enroscados, voltando a ser abertos apenas no momento da análise, para evitar contaminações.

4.2 Parâmetros Analíticos Avaliados

Foram analisados diferentes parâmetros de modo a assegurar a segurança e qualidade da matéria-prima e produto acabado obtidos como amostras de controlo.

4.2.1 Preparação das Amostras

Para a realização dos ensaios de pH, Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável as amostras de matéria-prima são previamente deixadas a descongelar à temperatura ambiente, cerca de

20 °C, até ser possível proceder à sua trituração, através da utilização de uma varinha mágica, da marca *Braun*, corretamente higienizada, para obtenção de uma amostra mais solúvel e homogénea, facilitando assim a sua posterior análise.

As amostras de produto acabado não sofrem qualquer tipo de transformação, uma vez que reúnem já as condições necessárias para a sua utilização no respetivo equipamento, utilizando apenas uma colher procede-se a uma homogeneização da amostra através de movimentos circulares para que o produto esteja o mais uniforme possível na altura da análise.

Na análise do parâmetro de Acidez Total Titulável é ainda posteriormente necessário utilizar um copo esterilizado que é colocado sobre a balança de precisão para ser tarado, de seguida com o auxílio de uma colher homogeneiza-se novamente o produto e retira-se a quantidade suficiente para perfazer um total de 10 g de produto dentro do copo. Tara-se novamente e com água destilada perfaz-se o peso de 50 g, ou seja 50 mL de água destilada. O frasco utilizado como recipiente é fechado pela respetiva tampa, permitindo a correta homogeneização da amostra através de agitação.

A correta preparação da amostra é crucial para a obtenção de resultados que correspondam à realidade.

4.2.2 pH

A avaliação do pH refere-se à intensidade do carácter ácido de uma solução, que é dada pela atividade do ião de hidrogénio (H^+).

Existem vários métodos para a medição de pH de uma solução, mas aquela que se revela mais prática, simples e eficiente é a medição do pH através de um eletrodo de vidro, tratando-se ainda da técnica mais rigorosa e que pode ser aplicada a uma vasta gama de amostras. Este método consiste na medição da diferença de potencial resultante da diferença de iões de H^+ entre a solução interna do eletrodo e a amostra.

Este parâmetro foi medido num equipamento da *VWR*, "*pHenomenal™*", observado na Figura 12, com capacidade para medir o pH e a temperatura da amostra em questão de modo a obter resultados mais precisos. As amostras são previamente preparadas para posteriormente proceder ao ensaio.

Procedimento:

- Ligar prévia e atempadamente o aparelho de modo a que este tenha tempo de estabilizar;
- Higienizar corretamente o eletrodo e a sonda com água destilada e secar adequadamente;
- Proceder à calibração do aparelho utilizando ambas as soluções padrão e de acordo com o protocolo apropriado estabelecido pelo fabricante;

- Higienizar novamente, secar e introduzir o eléctrodo e a sonda na amostra a ser analisada de modo a que ambos os componentes se encontrem em profundidade suficiente para uma correta obtenção de resultados;
- Agitar com cuidado para que a amostra envolva totalmente o eléctrodo e parar para que a sonda estabilize;
- Após a leitura do resultado higienizar novamente o eléctrodo e sonda de pH;
- No espaço de tempo em que o potenciómetro não se encontra em utilização o eléctrodo e a sonda de temperatura encontram-se mergulhadas em Água Destilada até nova utilização.



Figura 12 - Potenciómetro da VWR, “pHEnomenalTM”.

4.2.3 Sólidos Solúveis Totais

A quantidade de sólidos solúveis é avaliada pelo grau Brix, identificado pelo símbolo de °Brix.

Esta técnica é comumente utilizada nas Industrias Alimentares para medir a quantidade aproximada de açúcares em uma vasta gama de produtos, nomeadamente preparados de fruta. Possui como principais vantagens o facto de se tratar de uma medição simples, rápida e que não necessita de utilizar uma grande quantidade de amostra, evitando assim desperdícios. Esta técnica permite ainda a sua prática em laboratório ou no local.

A avaliação dos sólidos solúveis pode ser efetuada com um refratómetro manual ou eléctrico, no entanto o eléctrico é mais utilizado uma vez que permite uma observação do resultado mais rigorosa sem influências do operador. Por outro lado o manual é comumente utilizado em amostras com adição de compostos como cálcio que por vezes não permitem a obtenção de resultados no refratómetro eléctrico.

Os sólidos solúveis totais foram quantificados com o equipamento *TCR 15-30* da marca *Index*, presente na Figura 13. Antes da quantificação deste parâmetro é necessário proceder à preparação das amostras.

Procedimento:

- Aquando da medição, se necessário, calibrar previamente com água destilada;
- Secar adequadamente a lente de leitura;
- Homogeneizar a amostra e colocar uma pequena quantidade na célula de leitura;
- Fechar a tampa e carregar no botão para iniciar a leitura;
- Obter o resultado;
- Higienizar corretamente com água destilada e secar.

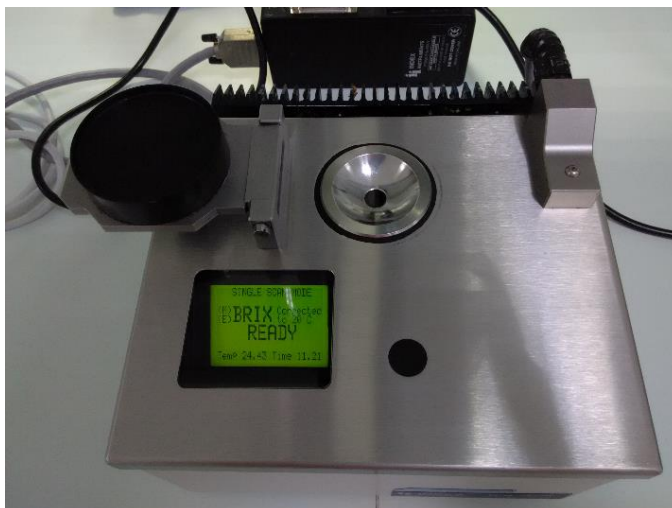


Figura 13 - Equipamento TCR 15-30 da marca *Index* com capacidade para medir os sólidos solúveis totais.

4.2.4 Acidez Total Titulável

A determinação da acidez fornece uma informação valiosa relativamente ao estado de conservação de um produto alimentício.

A acidez total titulável (ATT) pode ser expressa em gramas de ácido por 100g ou 100 mL de amostra, neste caso em concreto a ATT é expressa % de acidez por 100g de amostra utilizando o NaOH com uma concentração de 0,25 mol/L.

Na aplicação desta técnica é utilizado o potenciômetro da VWR, “pHenomenal™”, utilizado previamente para a análise do pH (Figura 12), para proceder à titulação da amostra.

Procedimento Eletrométrico:

- Ligar prévia e atempadamente o aparelho, de modo a que este tenha tempo de estabilizar;
- Higienizar corretamente o eletrodo e a sonda com água destilada e secar adequadamente;
- Proceder à calibração do aparelho utilizando ambas as soluções padrão e de acordo com o protocolo apropriado estabelecido pelo fabricante;
- Higienizar novamente, secar e introduzir o eletrodo e a sonda na amostra a ser analisada de modo a que ambos os componentes se encontrem dentro da solução;

- É iniciada a titulação da amostra através da utilização da pipeta volumétrica e uma pompete que permite que a solução alcalina seja libertada de forma controlada na amostra;
- É necessário e importante manter a agitação da amostra, através de movimentos circulares, para que o NaOH adicionado seja envolvido na restante solução de modo a que esta se mantenha o mais homogénea possível para uma correta leitura do pH;
- Deve permitir-se que o pH estabilize até que a solução atinja um pH de 8,1;
- O volume de NaOH gasto é registado para que posteriormente se possam efetuar os cálculos da acidez.

Cálculos:

$$ATT_{(\% \text{ de acidez}/100g)} = \left(\frac{V \times c \times 100}{P} \right) \times 0,064 \quad (3)$$

Onde V representa o volume de NaOH utilizado, c é a concentração de NaOH (0,25N), 100 utilizado para obter a % de acidez, P indica o peso da amostra utilizada e o valor de 0,064 tem em conta utilização de um padrão de comparação para quantificar a acidez titulável, sendo utilizado neste caso como padrão (fator de conversão) o Ácido Cítrico Anidro em mL.

4.3 Análise por FTIR-ATR

Foi aplicada a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier utilizando o equipamento de reflectância total atenuada, da marca *Platinum ATR* da *Bruker*, para um variado tipo de amostras obtidas.

O procedimento de medição neste tipo de equipamentos é bastante simples e comporta etapas de rápida execução, nomeadamente a limpeza do cristal utilizando um tecido de celulose humedecido com isopropanol, obtenção do background através da unidade de ATR e colocação da amostra, assegurando o contacto íntimo com o cristal para posterior medição da amostra, repetindo estes passos ao longo das diferentes análises (Bruker 2011).

4.3.1 Matéria-Prima e Produto Acabado

O método de análise por espectroscopia do infravermelho por transformadas de Fourier é um método muito fiável e reconhecido, tendo a capacidade de caracterizar, identificar e quantificar uma vasta gama de substâncias.

As amostras de matéria-prima foram previamente descongeladas, trituradas e homogeneizadas pelo que não necessitam de qualquer tipo de preparação adicional para proceder à sua análise por FTIR-ATR (Figura 14). Também para a análise de amostras de produto acabado não é necessário uma preparação prévia adicional.

Procedimento:

- Ligar o computador atempadamente, iniciar o programa *OPUS 7.0*, representado na Figura 14D, de modo a que este tenha tempo de estabilizar, e esperar até que as luzes indicadoras do estado se apresentem todas com a cor verde;
- Higienizar corretamente o aparelho através da utilização da solução de água com álcool isopropílico;
- Proceder ao Background antes de iniciar cada amostra nova, colocada na zona do aparelho representada pela Figura 14B;
- Através do auxílio do utensílio de inox remover um pouco de amostra e colocar sobre o cristal de modo a que esta esteja totalmente coberto;
- Iniciar a análise da amostra e higienizar adequadamente como referido anteriormente entre as repetições da análise das amostras;
- Após a análise de todas as amostras o aparelho deve ser novamente higienizado;
- Os espectros obtidos devem ser guardados e o programa e respetivo computador encerrados devidamente.

Os espectros foram adquiridos através de um espectrómetro *Bruker FTIR (Alpha)* utilizando um dispositivo de refletância total atenuada (ATR) e dois preenchimentos a zero. Efetuando quatro repetições de espectros por amostra obtidos através de 32 varrimentos por espectro e uma resolução espectral de 4 cm^{-1} na gama de número de onda de 400 a $4\,000\text{ cm}^{-1}$.

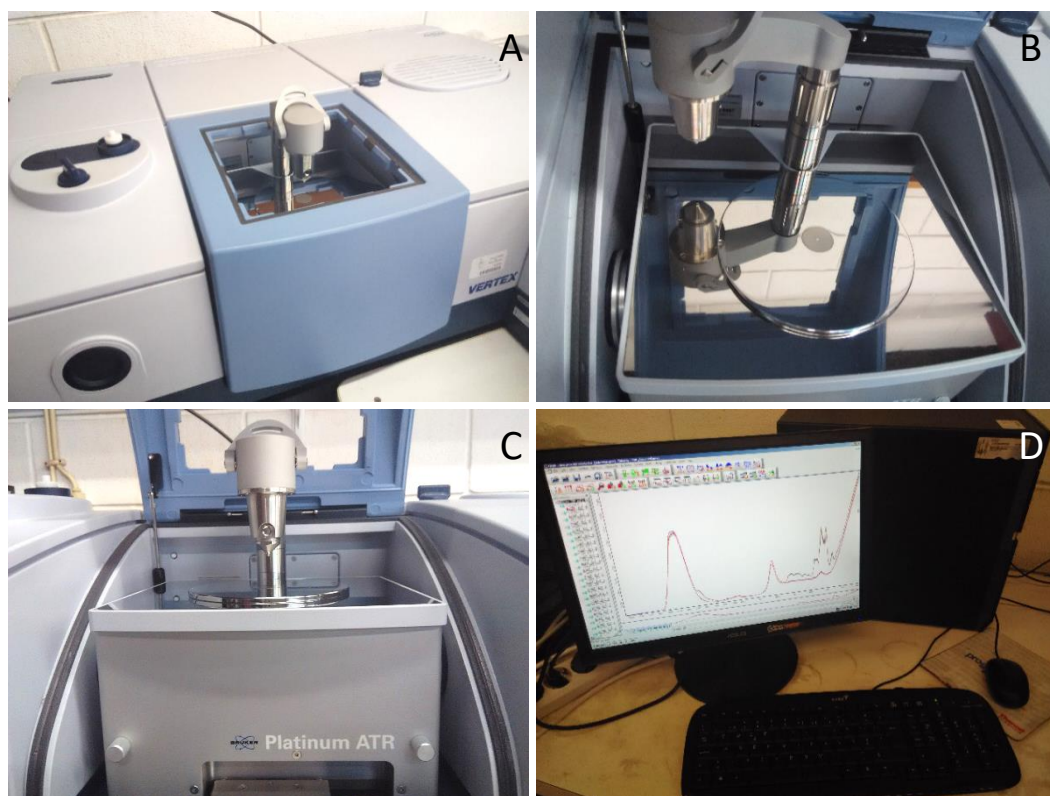


Figura 14 - Equipamento de FTIR-ATR (A, B, e C) e respetivo computador responsável pela aquisição e tratamento dos espectros.

4.3.2 Desenvolvimento de Modelos

Para a obtenção de bons modelos de calibração e fundamental que os dados analíticos que servem de base à construção desses modelos sejam robustos, estejam previamente validados e apresentem repetibilidade.

Para a construção de modelos deve ser utilizado um número elevado de amostras representativas da variabilidade inerente à matriz em análise incluindo valores de parâmetros fora da legislação de modo a garantir a robustez dos modelos além dos limites legais e detetar mais facilmente diferenças de matérias-primas ou produtos com diferentes proveniências, sempre hajam diferenças aparentes.

A construção de modelos PLS é iniciada através da introdução dos espectros de FTIR-ATR com os respetivos resultados obtidos para os diferentes parâmetros em estudo. De seguida o *software* procede à otimização dos dados, de modo a apresentar uma listagem dos diferentes tratamentos em várias regiões espectrais, ordenada de acordo com o menor erro.

Para a calibração de modelos são usualmente analisados vários pré processamentos nomeadamente: correção da linha de base; normalização vetorial; normalização pelo mínimo e máximo; correção multiplicativa de dispersão; primeira derivada; segunda derivada; primeira derivada + correção da linha de base; primeira derivada + normalização vetorial; primeira derivada + correção multiplicativa de dispersão.

Posteriormente é feita uma análise dos diferentes pré-tratamentos que apresentam um erro menor, de modo a que seja escolhido o mais eficiente. Na calibração e validação dos modelos obtidos por espectroscopia de infravermelho a robustez dos mesmos será avaliada por uma série de parâmetros estatísticos, nomeadamente: R_k - número de componentes principais; r^2 - coeficiente de determinação; RMSEE - erro médio quadrático da calibração; RMSECV - erro quadrático médio da validação cruzada; RMSEP - Erro quadrático médio de previsão, que traduz a diferença entre os valores previstos da amostra e os valores de referência da amostra na validação do modelo; RPD - desvio residual de previsão. Nem sempre o método que apresenta um erro menor é o mais vantajoso, devido à utilização excessiva de fatores ou considerar um número de *outliers* demasiado elevado.

Após a seleção do tratamento a realizar nos dados em estudo, o número de fatores é automaticamente eleito pelo *software*, de modo a apresentar um menor erro de RMSECV. Sendo que o número de fatores ou *rank* se situa entre 1 e 10, verificando depois se está a ocorrer *underlifting* ou *overlifting* através da verificação do número de fatores, maior ou menor respetivamente, na construção do modelo. Pode ainda otimizar-se a região espectral obtida caso se considere necessário adicionar ou remover informação espectral, nomeadamente *outliers* que adicionam ruído ao modelo de PLS.

Por último, o conjunto de resultados das diferentes amostras é dividido em dois grupos, um referente aos dados utilizados para desenvolver a calibração e o segundo para a validação, de modo a tornar o modelo mais robusto e versátil. É conveniente que exista um elevado número de amostras para que seja possível a divisão em dois grupos.

A informação analítica dos espectros é analisada e interpretada recorrendo a métodos de quimiometria. A análise espectral raramente é efetuada com os espectros originais, sendo geralmente transformados antes da análise multivariada.

Capítulo V - Resultados e Discussão

Após o desenvolvimento dos procedimentos analíticos de todas as amostras, através dos métodos físico químicos desenvolvidos no laboratório de controlo de qualidade da empresa e o procedimento em FTIR-ATR nas instalações da UBI. Foram usadas técnicas de quimiometria pelo *software* OPUS 7.0, para a construção dos modelos utilizados na previsão dos parâmetros de qualidade em estudo.

Este estudo incidiu na análise de matéria-prima e produto acabado pelo que iremos apresentar os resultados e discussão por esta ordem, respetivamente.

Relativamente a análise do parâmetro de pH através da técnica de espectroscopia utilizada não é possível desenvolver modelos devido à baixa variabilidade observada para cada amostra isoladamente.

5.1 Matéria-Prima

No que diz respeito à obtenção de resultados acerca das amostras analisadas de matéria-prima, nomeadamente morango sob a forma de fruto inteiro e cortado (10x10), a Tabela 2 apresenta os resultados estatísticos referentes às amostras de matéria-prima, quando analisadas em conjunto, sob o método físico-químico.

Tabela 2 - Resultados estatísticos para o conjunto das amostras de morango inteiro e morango cortado analisados em laboratório de acordo com os procedimentos físico-químicos.

Parâmetro	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	pH	Acidez Total Titulável (% acidez)
Nº de Amostras	115	115	58
Mín - Máx	4,10 - 10,60	3,08 - 4,06	0,48 - 0,94
Média $\pm \sigma$	6,96 \pm 1,20	3,55 \pm 0,14	0,76 \pm 0,12
CV	17,23	3,84	15,31

σ - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação; Min - Mínimo; Máx- Máximo

Apesar de este estudo incidir na análise do mesmo fruto, optou-se por dividir o conjunto de amostras de acordo com o formato em que se encontram no momento de receção de matéria-prima. Este procedimento pretende verificar se é detetada alguma diferença relevante que justifique a sua análise de modo individual.

Ao observar individualmente os dados estatísticos da matéria-prima em estudo, de acordo com o formato em que se apresentam, morango inteiro e morango cortado, pode verificar-se que são apresentados resultados semelhantes nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Resultados estatísticos referentes ao estudo de morango inteiro segundo os procedimentos físico-químicos.

Parâmetro	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	pH	Acidez Total Titulável (% acidez)
Nº de Amostras	61	61	9
Mín - Máx	4,76 - 9,30	3,08 - 4,06	0,51 - 0,80
Média ± σ	6,72 ± 1,21	3,57 ± 0,16	0,66 ± 0,10
CV	18,07	4,35	14,62

σ - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação; Mín - Mínimo; Máx- Máximo

Tabela 4 - Resultados estatísticos relativos ao estudo de morango cortado segundo os procedimentos físico-químicos.

Parâmetro	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	pH	Acidez Total Titulável (% acidez)
Nº de Amostras	54	54	49
Mín - Máx	4,10 - 10,60	3,28 - 3,73	0,48 - 0,94
Média ± σ	7,25 ± 1,13	3,52 ± 0,11	0,78 ± 0,11
CV	15,60	3,01	14,30

σ - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação; Mín - Mínimo; Máx- Máximo

Comparando os resultados, presentes nas Tabelas 3 e 4, pode observar-se que o desvio padrão obtido na análise dos diferentes parâmetros é baixo, o que indica que não existe uma grande dispersão de resultados. Relativamente à análise do coeficiente de variação dos diferentes grupos de amostras, o parâmetro de pH apresenta o melhor resultado, o que revela que nesta fase de processo o valor de pH é muito estável, pelo que devido à baixa variabilidade não foi possível encontrar modelos para este parâmetro.

Posteriormente procedeu-se à análise das amostras através da técnica de FTIR-ATR de modo a obter a leitura dos espectros correspondentes ao morango inteiro e cortado, respetivamente, presentes na Figura 15.

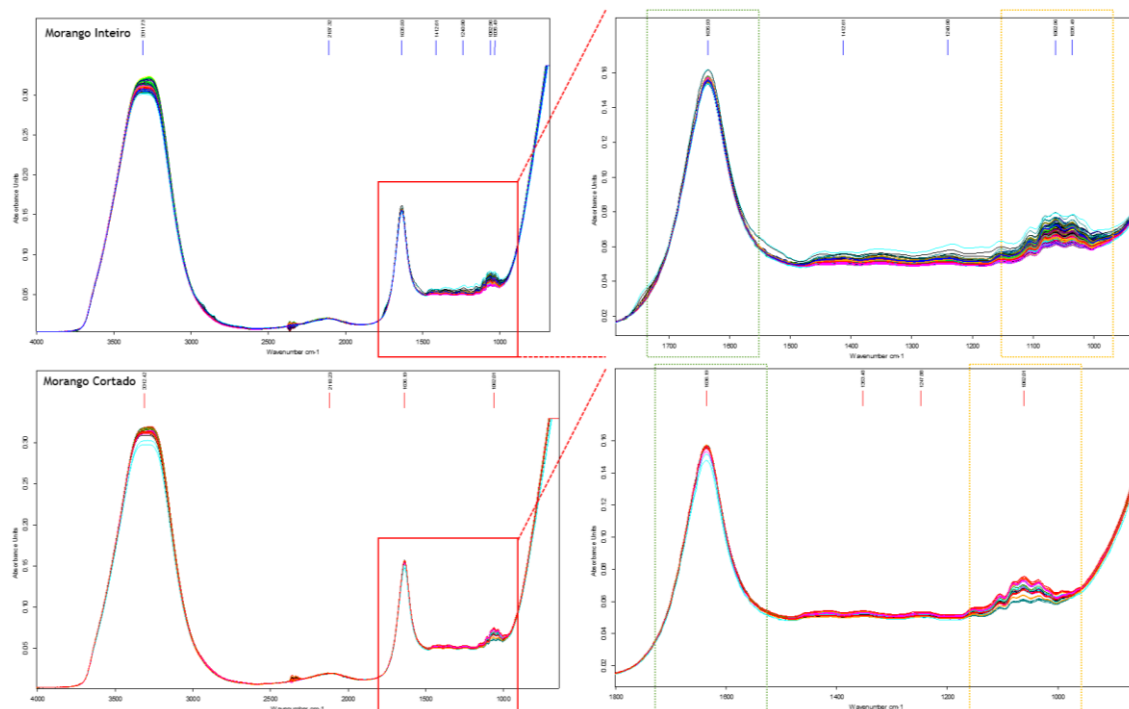


Figura 15 - Espectros de FTIR-ATR referentes à análise de matéria-prima, morango inteiro e morango cortado, na região de 4 000-400 cm^{-1} .

Na Figura 15 estão presentes os espectro de FTIR-ATR obtidos após o pré-tratamento, evidenciando a região espectral mais relevante para o estudo de matéria-prima. Também presentes na Tabela 5 são evidentes as semelhanças entre ambos os produtos.

Tabela 5 - Representação da faixa espectral relevante na análise dos picos resultantes da técnica de FTIR-ATR no morango inteiro e morango cortado.

Produto	Número de Onda (cm^{-1})/Absorvância			
Morango Inteiro	3311,73/0,32	2107,32/0,025	1635,93/0,16	1062,96/0,08
Morango Cortado	3312,42/0,32	2118,23/0,025	1636,19/0,15	1062,01/0,075

A banda a partir de 3 400 a 3 000 cm^{-1} é geralmente associada ao conteúdo de água nas amostras, pois é devido aos grupos OH. Estes grupos são também importantes para a identificação de compostos fenólicos, álcoois e grupos carboxílicos e também a vibração de hidrogénio dos grupos de amida N-H (Droussi et al. 2009; Susanto et al. 2009).

Os picos por volta de 1 650 e 1 543 cm^{-1} são atribuídos a alongamentos da proteína amido (Kyomugasho et al. 2015). Uma banda de absorvância que surge com aproximadamente 1632 cm^{-1} , pode ser atribuída ao grupo carboxilo em alongamento assimétrico (Anjos et al. 2015), no entanto é uma zona espectral importante para os compostos fenólicos porque é característica de vibrações C-C aromáticos, C-O vibrações de alongamento de grupos amida, quininos e cetonas conjugadas (Susanto et al. 2009; Leouifoudi et al. 2014).

Cada segmento do espectro de FTIR-ATR obtido de determinada amostra fornece informação qualitativa e quantitativa, nomeadamente a presença de uma família de hidrato de carbono contendo um monossacárido polissacarídeo complexo, tais como o anel C-O, C-C e C-O-C na região de 1 100-950cm⁻¹ (Song et al. 2016).

A análise multivariada foi desenvolvida através da construção de modelos de PLS, com os dados espectrais das diferentes amostras de matéria-prima, de modo a obter modelos de calibração para cada um dos parâmetros em estudo. Este processo tem em conta a importância de um r² elevado, um erro médio quadrático de calibração e validação cruzada reduzido, o menor número de fatores usados no cálculo e o maior desvio de previsão residual.

Tabela 6 - Resultados do desenvolvimento dos modelos referentes às amostras de matéria-prima para a Calibração, Validação Cruzada e Conjunto de Testes de Validação.

Produto	Parâmetro	Faixa Espectral (cm ⁻¹)	Pré-Tratamento	Calibração				
				Nº de Amostras	Rk	r ²	RMSEE	RPD
Morango Inteiro	Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	2121-1927 + 1734-960	2ndDer	211	5	99,2	0,11	11
Morango Cortado		1896-933	2ndDer	177	2	95,6	0,174	4,8
Morango Inteiro	Acidez Titulável (% acidez)	2995-2791 + 1977-1568 + 1365-1159	1stDer+MSC	33	6	99,8	0,00513	20,3
Morango Cortado		1774-1163	SLS	107	10	99,5	0,00668	13,5
Produto	Parâmetro	Faixa Espectral (cm ⁻¹)	Pré-Tratamento	Validação Cruzada				
				Nº de Amostras	r ²	RMSECV	RPD	Bias
Morango Inteiro	Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	2121-1927 + 1734-960	2ndDer	159	98,5	0,137	8,1	-0,004
Morango Cortado		1896-933	2ndDer	138	95,5	0,175	4,7	-0,004
Morango Inteiro	Acidez Titulável (% acidez)	2995-2791 + 1977-1568 + 1365-1159	1stDer+MSC	33	96,2	0,0181	5,2	0,003
Morango Cortado		1774-1163	SLS	87	93	0,0221	3,8	0,000
Produto	Parâmetro	Faixa Espectral (cm ⁻¹)	Pré-Tratamento	Conjunto de Testes de Validação				
				Nº de Amostras	r ²	RMSEP	RPD	Bias
Morango Inteiro	Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	2121-1927 + 1734-960	2ndDer	47	98,3	0,184	7,7	0,023
Morango Cortado		1896-933	2ndDer	37	92,3	0,213	3,7	0,005
Morango Inteiro	Acidez Titulável (% acidez)	2995-2791 + 1977-1568 + 1365-1159	1stDer+MSC					
Morango Cortado		1774-1163	SLS	20	96,2	0,0179	6,1	0,010

2ndDer - Segunda Derivada; 1stDer - Primeira Derivada; MSC - Correção Multiplicativa de Sinal; SLS - Subtração em Linha Retta; RK - Número de componentes PLS; r² - Coeficiente de Determinação; RMSEE - Erro Médio Quadrático da Calibração; RPD - Desvio Residual Previsto; RMSECV - Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada; BIAS - Valor Médio do Desvio (Erro Sistemático); RMSEP - Erro Médio Quadrático de Previsão.

A Tabela 6 representa os resultados obtidos para a construção do modelo de calibração estabelecida como ideal. Os valores de r² para os modelos selecionados foram maiores do que 95,6 para a calibração, superiores a 93 para a validação cruzada e no que diz respeito aos testes de validação os resultados apresentados são superiores a 92,3.

O pior modelo desenvolvido foi para a amostra de morango cortado no parâmetro correspondente à análise de sólidos solúveis totais com o valor mais baixo de RPD. Foram obtidos resultados superiores a 4,8 na calibração, a 3,8 na validação cruzada e 3,7 no conjunto de testes de validação para o resultado de RPD. De um modo geral o RPD observado na análise das amostras de matéria-prima têm um valor elevado, no entanto este resultado poderá não ser representativo o suficiente para que seja considerado confiável devido ao reduzido número de amostras.

Os resultados apresentados para o Erro Médio Quadrático da Calibração, Validação Cruzada e de Previsão são bastante baixos o que é bom, tendo em conta que quanto mais próximos de zero forem os resultados mais eficaz é a previsão dos resultados executada pelo modelo, maior precisão.

No entanto, não foi possível desenvolver o conjunto de teste de validação para a amostra de morango inteiro referente ao parâmetro de acidez titulável devido ao reduzido número de amostras.

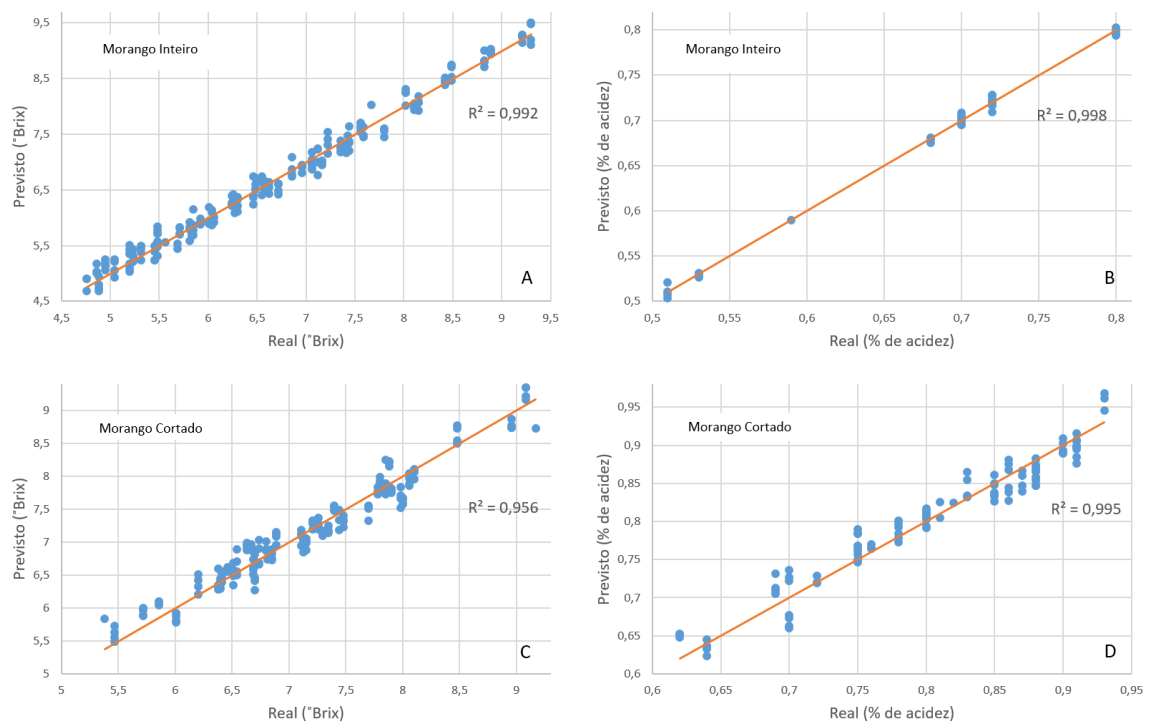


Figura 16 - Representação gráfica dos resultados do estudo do parâmetro de sólidos solúveis totais (presentes na coluna à esquerda) e acidez total titulável (presentes na coluna à direita), para análise de morango inteiro (gráficos A e B) e morango cortado (gráficos C e D).

Na Figura 16 estão presentes os valores medidos e previstos na calibração obtidos pelo modelo de PLS desenvolvido. Os gráficos têm presentes a reta de tendência com os resultados do coeficiente de determinação, r^2 , com um valor médio de 97,4 e 99,6 para o parâmetro de sólidos solúveis totais e acidez total titulável, respetivamente. Tendo em conta que é um valor muito próximo de 1 indica que os pontos estão bastante ajustados à reta e existe uma elevada

precisão dos resultados e conseqüentemente do modelo utilizado. Deste modo pode afirmar-se que a técnica de FTIR-ATR apresenta robustez para que possa vir a ser desenvolvida uma metodologia de análise para estes parâmetros. No entanto, é de referir que serão necessários mais estudos para que se possa obter modelos de calibração para uso industrial e com a devida calibração externa, que não foi possível efetuar neste trabalho devido ao número de amostras.

5.2 Produto Acabado

Relativamente à aquisição de resultados referentes às amostras de produto acabado analisado, tais como “Morango +”, “Morango -”, “Framboesa” e “Cereais”, as Tabelas 7, 8, 9 e 10, apresentam, respetivamente, os resultados estatísticos de cada conjunto de amostras quando analisadas de acordo com o método físico-químico.

Tabela 7 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Morango +”.

Parâmetro	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	pH	Acidez Total Titulável (% acidez)
Nº de Amostras	41	41	40
Mín - Máx	34,64 - 40,08	3,59 - 4,01	0,19 - 0,85
Média \pm σ	38,21 \pm 1,04	3,80 \pm 0,09	0,39 \pm 0,13
CV	2,73	2,49	32,82

σ - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação; Mín - Mínimo; Máx - Máximo

De acordo com os valores apresentados na Tabela 7, relativa à análise de “Morango +”, observa-se que o desvio padrão obtido é bastante baixo, obtendo o melhor resultado, com 0,09, para o parâmetro de análise do pH e o pior resultado, de 1,04, na análise de sólidos solúveis totais, não sendo no entanto suficientemente elevados, estes valores indicam que não existe dispersão de resultados. No que diz respeito à análise do coeficiente de variação, os valores apresentados para a análise de sólidos solúveis totais e pH indicam um conjunto de dados homogêneos. Porém na análise da acidez total titulável o coeficiente de variação de 32,82 sugere que não existe precisão de dados suficientes pelo que são considerados heterogêneos.

Tabela 8 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Morango -”.

Parâmetro	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	pH	Acidez Total Titulável (% acidez)
Nº de Amostras	18	18	16
Mín - Máx	5,69 - 7,00	3,57 - 3,76	0,38 - 0,62
Média \pm σ	6,34 \pm 0,41	3,67 \pm 0,06	0,53 \pm 0,07
CV	6,41	1,64	12,20

σ - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação; Mín - Mínimo; Máx - Máximo

No que diz respeito à análise de “Morango -”, com a observação da Tabela 8 pode verificar-se que o valor do desvio padrão é realmente muito baixo, assim como também o resultado do coeficiente de variação, para todos os parâmetros, pelo que se pode afirmar que o conjunto de resultados é preciso e homogêneo.

Tabela 9 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Framboesa”.

Parâmetro	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	pH	Acidez Total Titulável (% acidez)
Nº de Amostras	106	106	97
Mín - Máx	39,77 - 46,75	3,39 - 8,86	0,56 - 0,83
Média $\pm \sigma$	43,90 \pm 1,31	3,72 \pm 0,52	0,68 \pm 0,06
CV	2,99	14,07	8,98

σ - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação; Mín - Mínimo; Máx - Máximo

Através da análise da Tabela 9 referente ao produto denominado de “Framboesa”, relativamente à análise do desvio padrão o melhor resultado é de 0,06 para o parâmetro de acidez total titulável e o pior diz respeito aos sólidos solúveis totais com um valor de 1,31, no entanto pode considerar-se que estamos perante resultados com pouca dispersão, uma vez que os valores de coeficiente de variação dos diferentes parâmetros são também inferiores a 15%, logo estamos perante um conjunto de resultados homogêneo.

Tabela 10 - Resultados estatísticos relativos à análise de produto acabado, denominado por “Cereais”.

Parâmetro	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	pH	Acidez Total Titulável (% acidez)
Nº de Amostras	22	22	18
Mín - Máx	29,00 - 34,10	3,50 - 3,90	0,40 - 0,59
Média $\pm \sigma$	31,52 \pm 1,26	3,77 \pm 0,08	0,51 \pm 0,05
CV	3,99	2,14	10,59

σ - Desvio Padrão; CV - Coeficiente de Variação; Mín - Mínimo; Máx - Máximo

Segundo a Tabela 10 que apresenta os resultados acerca do produto “Cereais”, onde o desvio padrão indica que não existe uma grande dispersão dos valores, por outro lado estamos perante um coeficiente de variação baixo para todos os parâmetros em análise, o que indica a existência de valores precisos e um conjunto de dados homogêneo.

A obtenção dos espectros foi desenvolvida de acordo com as metodologias de trabalho previamente apresentadas estudando as amostras de produto acabado na totalidade, como se pode observar na Figura 17.

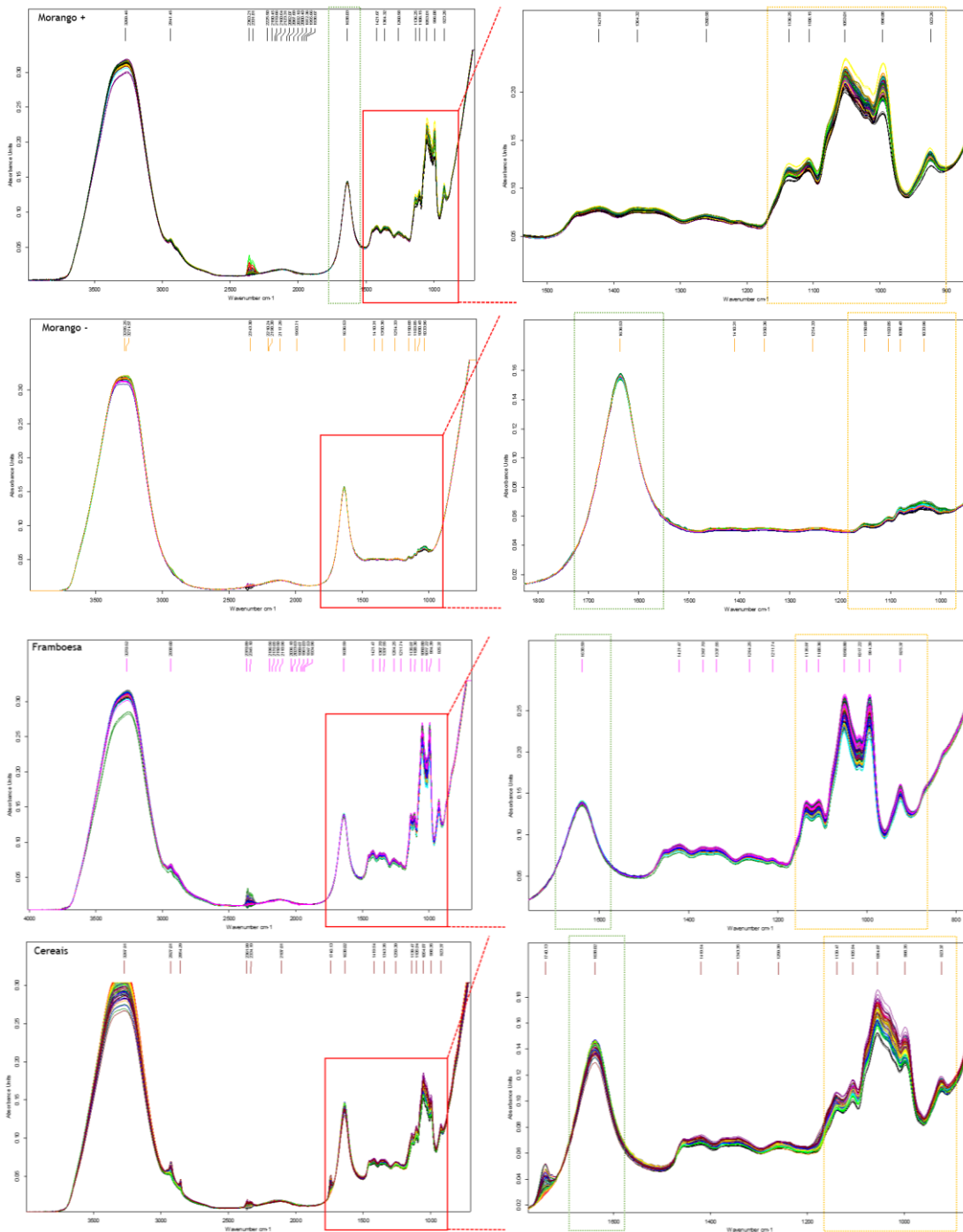


Figura 17 - Espectros obtidos pela técnica de FTIR-ATR na análise de produto acabado, denominados por “Morango +”, “Morango -”, “Framboesa” e “Cereais”, respectivamente, na região de 4 000-400 cm^{-1} .

A Figura 17 tem presentes os espectros de FTIR-ATR, adquiridos em laboratório após o pré-tratamento, com foco nas zonas mais importantes, onde se concentram alguns dos picos que se destacam mais no estudo. Podem comparar-se os resultados obtidos através da análise da Tabela 11, onde se evidenciam os picos mais salientes dos espectros dos diferentes tipos de produto acabado analisados.

Tabela 11 - Representação da faixa espectral relevante na análise dos picos resultantes da técnica de FTIR-ATR para produto acabado.

Produto	Número de Onda (cm ⁻¹)/Absorvância								
Morango +	3269,46 /0,32	2941,45 /0,065	1638,03 /0,14	1421,67 /0,08	1136,25 /0,13	1106,15 /0,13	1053,01 /0,23	996,08 /0,20	923,28 /0,12
Morango -	3285,25 /0,32		1636,53 /0,155		1103,95 /0,07	1060,48 /0,07	1033,98 /0,075		
Framboesa	3270,52 /0,32	2938,60 /0,06	1638,59 /0,14	1421,47 /0,08	1135,67 /0,13	1108,36 /0,13	1050,80 /0,25	994,39 /0,25	925,37 /0,15
Cereais	3267,91 /0,32	2927,01 /0,06	1638,02 /0,15	1419,54 /0,05	1139,47 /0,09	1105,94 /0,10	1054,97 /0,17	998,35 /0,15	923,37 /0,10

A região espectral que representa a água está presente em todos os produtos analisados. Como já foi referido, a faixa espectral onde são identificadas as bandas de vibração alongada de OH e CH presentes entre 3 400-2 900 cm⁻¹ aproximadamente (Suutarinen et al. 1998).

A banda observada em torno de 2 920 cm⁻¹ poderia ser associada à extensão de CH em estruturas alifáticas, tais como os ácidos gordos e outras estruturas de cadeia longa (Hajjouji et al. 2007).

O conjunto de picos situados aproximadamente entre a região 1 460-1 330 cm⁻¹ é tipicamente associado à banda de carboidratos estruturais (Suutarinen et al. 1998).

De um modo geral os doces de fruta são caracterizados acerca do seu teor em frutose, várias bandas espectrais são atribuídas à frutose como deformação de OCH deformação, COH e CCH detetada a 1 425-1 414 cm⁻¹ nos doces normais e adulterados com um adoçante mais barato (glicose). As regiões de 3 390-1 640 cm⁻¹ devem-se ao alongamento (OH), assimetria (CH), alongamento (C=O) e deformação (OH). Outros picos espectrais são identificados devido à presença de glucose, sacarose, ácido cítrico, pectina e pigmento vermelho, a 1 045-1029 cm⁻¹, 1 061-1 058cm⁻¹, 1 378-1 351 cm⁻¹, 927-917 cm⁻¹ e 633-631 cm⁻¹, respetivamente (Mohamed et al. 2011).

Por outro lado na análise de espectros de produto acabado, através da técnica de FTIR, pode afirmar-se que os picos na ordem de 1 644-1 637 cm⁻¹ são atribuídos aos pigmentos sintéticos de morango (Mohamed et al. 2011), que podem ser associados aos picos presentes na análise dos produtos denominados por “Morango +” e “Morango -”.

A observação de picos no comprimento de onda de aproximadamente 1 650 cm⁻¹ e 1540 cm⁻¹ pode representar a presença de proteína, enquanto que a região entre 1 630- 1 602 cm⁻¹ pode ainda ser associada ao grupo carboxílico (Kyomugasho et al. 2015).

A análise multivariada foi novamente desenvolvida através da construção de modelos de PLS, com os dados espectrais das diferentes amostras de produto acabado, de modo a obter modelos de calibração para cada um dos parâmetros em estudo. Nesta etapa é considerada a

importância de um r^2 elevado, um erro médio quadrático de calibração e validação cruzada reduzido, o menor número de fatores usados no cálculo e o maior desvio de previsão residual.

Tabela 12 - Resultados do desenvolvimento dos modelos referentes às amostras de produto acabado para a Calibração, Validação Cruzada e Conjunto de Testes de Validação.

Produto	Parâmetro	Faixa Espectral (cm ⁻¹)	Pré-Tratamento	Calibração				
				Nº de Amostras	Rk	r ²	RMSEE	RPD
Morango +	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	2575-2363 + 2154-1942 + 1524-891	1stDer	128	10	95,8	0,182	4,9
Morango -		2183-1776 + 1574-1369	1stDer + SLS	40	6	99,3	0,036	11,5
Framboesa		2995-2363 + 2154-1942 + 1734-891	MSC	318	7	91,9	0,315	3,52
Cereais		2785-1101	1stDer+MSC	76	4	95,2	0,264	4,6
Morango +	Acidez Titulável (% acidez)	1946-1313	1stDer+SLS	78	9	98,7	0,0101	8,8
Morango -		2791-2584 + 2177-1971 + 1767-1560	1stDer	48	9	99,2	0,0057	11,1
Framboesa		2577-2366 + 1740-1319 + 1111-901	MinMax	303	8	80,2	0,0222	2,3
Cereais		2995-2785 + 2577-2366 + 1948-1738 + 1529-901	2ndDer	39	8	98,5	0,0061	8,1
Produto	Parâmetro	Faixa Espectral (cm ⁻¹)	Pré-Tratamento	Validação Cruzada				
				Nº de Amostras	r ²	RMSECV	RPD	Bias
Morango +	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	2575-2363 + 2154-1942 + 1524-891	1stDer	101	73,7	0,422	2	-0,070
Morango -		2183-1776 + 1574-1369	1stDer + SLS	29	71,9	0,208	1,96	0,056
Framboesa		2995-2363 + 2154-1942 + 1734-891	MSC	251	82,5	0,415	2,4	0,010
Cereais		2785-1101	1stDer+MSC	60	88,5	0,396	3	0,009
Morango +	Acidez Titulável (% acidez)	1946-1313	1stDer+SLS	58	91,4	0,0259	3,4	0,003
Morango -		2791-2584 + 2177-1971 + 1767-1560	1stDer	36	54,9	0,0422	1,5	-0,006
Framboesa		2577-2366 + 1740-1319 + 1111-901	MinMax	240	65	0,0289	1,7	0,001
Cereais		2995-2785 + 2577-2366 + 1948-1738 + 1529-901	2ndDer	33	61,8	0,0278	1,6	-0,002
Produto	Parâmetro	Faixa Espectral (cm ⁻¹)	Pré-Tratamento	Conjunto de Testes de Validação				
				Nº de Amostras	r ²	RMSEP	RPD	Bias
Morango +	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	2575-2363 + 2154-1942 + 1524-891	1stDer	27	88,3	0,322	2,9	-0,028
Morango -		2183-1776 + 1574-1369	1stDer + SLS	9	38	0,203	2,1	0,161
Framboesa		2995-2363 + 2154-1942 + 1734-891	MSC	67	87,9	0,489	2,9	-0,033
Cereais		2785-1101	1stDer+MSC	16	91,4	0,25	3,6	0,079
Morango +	Acidez Titulável (% acidez)	1946-1313	1stDer+SLS	20	85,6	0,023	3,3	0,014
Morango -		2791-2584 + 2177-1971 + 1767-1560	1stDer					
Framboesa		2577-2366 + 1740-1319 + 1111-901	MinMax	63	76,9	0,024	2,1	0,002
Cereais		2995-2785 + 2577-2366 + 1948-1738 + 1529-901	2ndDer					

1stDer - Primeira Derivada; SLS - Subtração em Linha Reta; MSC - Correção Multiplicativa de Sinal; MinMax - Normalização Mínimo Máximo; 2ndDer - Segunda Derivada; RK - Número de componentes PLS; r² - Coeficiente de Determinação; RMSEE - Erro Médio Quadrático da Calibração; RPD - Desvio Residual Previsto; RMSECV - Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada; BIAS - Valor Médio do Desvio (Erro Sistemático); RMSEP - Erro Médio Quadrático de Previsão.

De acordo com a Tabela 12 que apresenta os resultados obtidos para a construção do modelo de calibração estabelecida como ideal. Os valores de r^2 para os modelos selecionados foram maiores do que 80,2 para a calibração, superiores a 54,9 para a validação cruzada e no que diz respeito aos testes de validação os resultados apresentados são superiores a 38.

O pior modelo desenvolvido foi para a amostra de produto “Framboesa” no parâmetro correspondente à análise de acidez titulável com o valor mais baixo de RPD na calibração. Foram obtidos resultados superiores a 2,3 na calibração, a 1,5 na validação cruzada e 2,1 no conjunto de testes de validação para o resultado de RPD. O RPD observado na análise das amostras de produto acabado pode não ser considerado confiável devido ao reduzido número de amostras.

Os resultados apresentados para o Erro Médio Quadrático da Calibração, Validação Cruzada e de previsão são bastante baixos, o que indica que o modelo é preciso.

No entanto não foi possível desenvolver o conjunto de teste de validação para a amostra de produto acabado de “Morango -” e “Cereais” para o parâmetro de acidez titulável devido ao reduzido número de amostras.

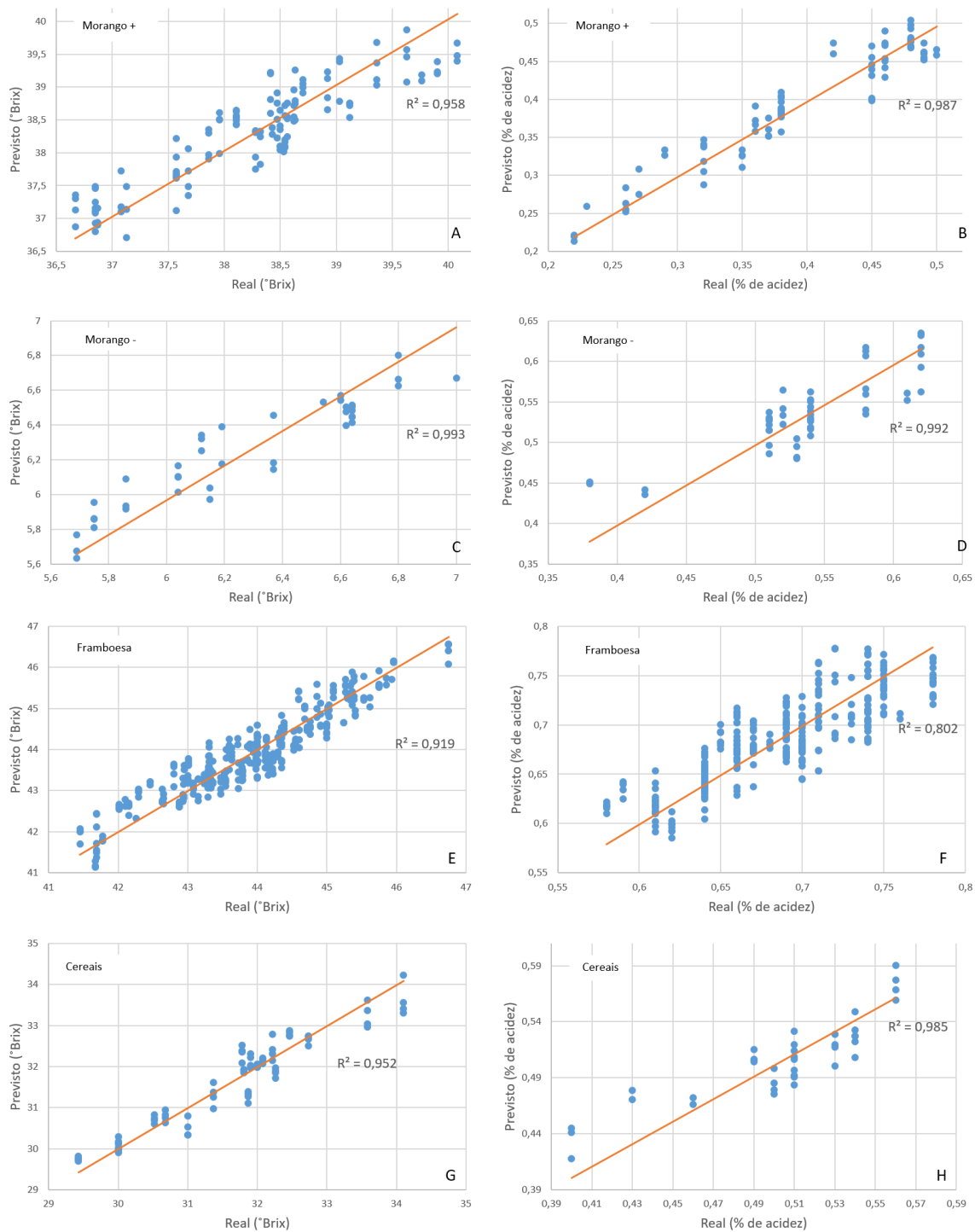


Figura 18 - Representação gráfica dos resultados do estudo do parâmetro de sólidos solúveis totais (presentes na coluna à esquerda) e acidez total titulável (presentes na coluna à direita), para análise de produto acabado denominados por “Morango +” (gráficos A e B), “Morango -” (gráficos C e D), “Framboesa” (gráficos E e F) e “Cereais” (gráficos G e H).

Os valores medidos e previstos na calibração obtidos pelo modelo de PLS desenvolvido estão presentes na Figura 18. A reta de tendência está presente nos gráficos das diferentes amostras para ambos os parâmetros em análise, nos quais o valor do coeficiente de determinação, r^2 , varia entre 91,9 e 99,3 para o parâmetro de sólidos solúveis totais e entre 80,2 e 99,2 para a acidez total titulável, com um valor médio de 95,6 e 94,2, respectivamente. O conjunto de

resultados possui valores altos, pelo que se pode afirmar que se obteve um bom ajuste linear que sugere uma elevada precisão nos resultados e modelo usado. Não existem *outliers*, o que indica que a técnica é viável, uma vez que os resultados obtidos através da análise convencional são semelhantes aos resultados previstos através da técnica de FTIR-ATR. O coeficiente de determinação mais alto está presente na Figura 18C e 18D com o valor de 99,3 e 99,2 para o produto denominado “Morango -” na avaliação dos sólidos solúveis totais e acidez total titulável, respetivamente. O r^2 mais baixo está representado na análise do parâmetro de acidez total titulável na Figura 18F para o produto “Framboesa” possivelmente devido à presença de algumas amostras com resultados discrepantes com o valor de 80,2 aproximadamente. Os sólidos solúveis totais são comumente associados ao valor de sacarose enquanto que a acidez total titulável indica a capacidade de determinada amostra se manter sã, estas características são importantes para a análise de produto acabado ao nível organolético e de determinação do prazo de validade do mesmo.

5.2.1 Análise Microbiológica de Produto Acabado

Foi processada a recolha de todas as amostras de produto acabado indicadas, a normal análise no laboratório de controlo de qualidade da empresa Frulact de modo a detetar qualquer tipo de contaminação e posterior desenvolvimento dos espectros de FTIR-ATR no laboratório da UBI.

Ao longo de toda a etapa não foram obtidos resultados positivos para contaminação das amostras na análise microbiológica pelo que foi impossível estabelecer um termo de comparação entre os espectros obtidos de amostras não contaminadas e contaminadas.

Deste modo torna-se inviável o estudo dos resultados obtidos pela técnica de espectroscopia, visto que não existem dados suficientes que permitam efetuar uma análise apropriada e tecer qualquer tipo de conclusão acerca dos mesmos.

Capítulo VI - Conclusão e Perspetivas Futuras

Este trabalho mostrou-se muito gratificante não apenas pelo estudo efetuado com produtos alimentícios em laboratório, mas também pela experiência que foi efetuar um trabalho em ambiente industrial numa empresa de referência internacional no ramo alimentar.

Após este trabalho conclui-se que o FTIR-ATR é uma poderosa ferramenta na análise de vários produtos, proporcionando uma análise bastante rápida e credível dos parâmetros analisados, através da construção de modelos viáveis.

De um modo geral os resultados obtidos foram satisfatórios, pois para além de os valores previstos pelos modelos se aproximarem bastante dos resultados reais, também o tratamento dos modelos decorreu sem grandes contratempos. No caso da análise do parâmetro de pH não foi viável a realização de modelos devido há falta de variabilidade dos resultados nas diferentes amostras. Por outro lado não foi possível obter resultados que justificassem dar continuidade ao desenvolvimento do estudo microbiológico das amostras, uma vez que não foram obtidos valores que servissem como termo de comparação, visto que a presença de contaminações nas amostras foi inexistente. Os valores obtidos para o coeficiente de determinação indicam bons resultados, no entanto para obter modelos com uma maior fiabilidade seria importante dar continuidade ao estudo analisando um número superior de amostras, o que foi impossível devido ao reduzido período de estágio e a variação do plano de produção imposto na Frulact.

Para esta técnica ser aceite em indústria alimentar será necessário sem dúvida um trabalho mais aprofundado e com uma maior amplitude em termos de produtos e parâmetros analisados. É necessário também, após desenvolvimento de modelos, efetuar uma validação externa em ambiente fabril para provar a credibilidade da técnica.

Outra questão que se levanta é a rentabilidade e viabilidade de utilizar a técnica de FTIR-ATR como metodologia de análise de modo a substituir as diversas análises, efetuadas segundo as metodologias padrão, nas diferentes etapas de processamento do produto em ambiente industrial.

Para completar este trabalho é apresentada uma pequena lista de possíveis trabalhos futuros na investigação e desenvolvimento desta temática:

- Avaliar o parâmetro de pH através de um conjunto de amostragem divergente de modo a ter valores de comparação com elevada variabilidade;
- Verificar a aplicação do FTIR-ATR em análises microbiológicas, que tradicionalmente são muito demoradas e dispendiosas, com o aumento da amostragem e contaminações

induzidas, permitindo a detecção rápida e a análise de diferentes parâmetros através de um procedimento apenas;

- Utilização de análise com o FTIR-ATR numa gama mais ampla de produtos e parâmetros, efetuando os modelos apropriados para os produtos e verificar a sua credibilidade e aplicação;
- Reproduzir um processo de análise utilizando apenas o FTIR e extrair resultados credíveis, confirmados através da validação em um laboratório externo acreditado;
- Comparação e avaliação dos custos na indústria alimentar de análises convencionais e utilização da técnica de FTIR-ATR, de modo a verificar a sua aplicabilidade.

Sendo a utilização do FTIR-ATR uma mais-valia na redução de tempo e de recursos humanos para diversas análises, mostra-se vantajosa a continuação deste estudo para provar a aplicabilidade na indústria alimentar.

Referências Bibliográficas

- Ahvenainen, R., 2000. *Ready-to-use fruit and vegetables - Flair-Flow Europe Technical Manual 376A/00* R. Gormley, ed., Finland.
- Alamprese, C. & Casiraghi, E., 2015. Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to fish fillet authentication. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1, September 2015), pp.720-725.
- Anjos, O. et al., 2015. Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, p.169: 218 - 223.
- Anjos, O. et al., 2016. FTIR-ATR spectroscopy applied to quality control of grape-derived spirits. *Food Chemistry*, p.205:28 - 35.
- Aranceta, J. et al., 2007. Prevention of overweight and obesity: a Spanish approach. *Public health nutrition*, 10(10A), pp.1187-1193.
- Barrett, D.M., 2008. Maximizing the Nutritional Value of Fruits & Vegetables. *Nutrient Preservation*, pp.40-44.
- Bazzano, L., Serdula, M. & Liu, S., 2011. Burden : mortality , morbidity and risk factors. In *Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease*. Zmerican Journal of Clinical Nutrition, pp. 9-31. Available at: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_chapter1.pdf.
- Beullens, K. et al., 2006. The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 116(1-2), pp.107-115.
- Biochem, D. of C. and, 2002. Infrared Spectroscopy : Theory. In Colorado: University of Colorado, pp. 155-164.
- Blanco, M. & Villarroya, I., 2002. NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), pp.240-250.
- Brindet, R., Kemsley, E.K. & Wilson, R.H., 1996. Approaches to adulteration detection in instant coffees using infrared spectroscopy and chemomatrix. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, p.359 e 366.
- Bruker, 2011. Application Note AN # 79: Attenuated Total Reflection (ATR) - a versatile tool for FT-IR spectroscopy.
- Bureau, S. et al., 2009. Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chemistry*, 115(3), pp.1133-1140.
- Bureau, S. et al., 2013. Determination of the composition in sugars and organic acids in peach using mid infrared spectroscopy: Comparison of prediction results according to data sets and different reference methods. *Analytical Chemistry*, 85(23), pp.11312-11318.
- Candeias, V. et al., 2005. *Frutos, Legumes e Hortaliças*, Lisboa: Direção Geral da Saúde. Available at: www.dgs.pt.
- Chau, F.-T. et al., 2005. *Chemometrics: From Basics to Wavelet Transform* Vol 164. J. D. Winefordner, ed., Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience.
- Che Man, Y.B. et al., 2005. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 90(4), pp.815-819.
- Christensen, A.S. et al., 2013. Effect of fruit restriction on glycemic control in patients with type 2 diabetes--a randomized trial. *Nutrition journal*, 12, p.29. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599615&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Coates, J., 1998a. *Applied Spectroscopy: A Review of Sampling Methods for Infrared Spectroscopy* J. Workman, ed., Elsevier Inc.
- Coates, J., 1998b. Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for Infrared and Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 33(4), pp.267-425.

- Cocciardi, R.A. & Sedman, A.A.I.J., 2005. Investigation of the Potential Utility of Single-Bounce Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Analysis of Distilled Liquors and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), pp.2803-2809.
- Contal, L., Leon, V. & Downey, G., 2002. Detection and quantification of apple adulteration in strawberry and raspberry purees using visible and near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(4), p.289 e 299.
- Coopermit, 2013. Manual de Boas Práticas. , p.22. Available at: <http://www.coopermiti.com.br/quemsomos>.
- Cordella, C. et al., 2002. Recent developments in food characterisation and adulteration detection: technique-oriented perspective. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. , 50, pp.1751-1764.
- Cozzolino, D. & Murray, I., 2003. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, p.447 e 452.
- Cozzolino, D., Smyth, H.E. & Gishen, M., 2003. Feasibility study in the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), p.7703 e 7708.
- Craig, A.P., Franca, A.S. & Oliveira, L.S., 2012. Evaluation of the potential of FTIR and chemometrics for separation between defective and non-defective coffees. *Food Chemistry*, 132(3), pp.1368-1374. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.121>.
- Davis, R. & Mauer, L.J., 2010a. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current research, technology and education topics ...*, (1), pp.1582-1594. Available at: <http://www.formatex.info/microbiology2/1582-1594.pdf>.
- Davis, R. & Mauer, L.J., 2010b. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (1), pp.1582-1594. Available at: <http://www.formatex.info/microbiology2/1582-1594.pdf>.
- Defernez, M. & Wilson, R.H., 1997. Infrared spectroscopy: instrumental factors affecting the long-term validity of chemometric models. *Analytical chemistry*, 69(7), pp.1288-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21639337>.
- Dias, D., 2011. Benefícios nutricionais do consumo de Fruta e Vegetais. *Associação Portuguesa dos Nutricionistas*.
- Difoggio, R., 2000. Guidelines for applying chemometrics to spectra: Feasibility and error propagation. *Applied Spectroscopy*, 54(3).
- Droussi, Z., D'Orazio, V. & Provenzano, M.R., 2009. Study of the biodegradation and transformation of olive-mill residues during composting using FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Hazard. Mater*, p.164: 1281-1285. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.081>.
- Duarte, I.F. et al., 2002. Application of FTIR spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), pp.3104-3111.
- Duarte, I.F. et al., 2004. Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, pp.1031-1038.
- Dunteman, G.H., 1989. *Principal Components Analysis* Edition 69., USA: Sage University Paper.
- Franchini, B. et al., 2004. A nova Roda dos Alimentos. . . Um guia para a escolha alimentar diária! *Nutricias*, 4, pp.55-56.

- Frulact, 2014. Frulact.
- Gallardo-Velázquez, T. et al., 2009. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International*, 42(3), pp.313-318. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2008.11.010>.
- Galvis-Sánchez, A.C., Barros, A. & Delgadillo, I., 2007. FTIR-ATR infrared spectroscopy for the detection of ochratoxin A in dried vine fruit. *Food Additives and Contaminants*, 24(11), pp.1299-1305.
- Gómez-Ordóñez, E. & Rupérez, P., 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 25(6), pp.1514-1520. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>.
- Gonçalves, M.D.L., 2006. Novas exigências legais e controlo oficial dos géneros alimentícios. *Segurança e Qualidade Alimentar*, pp.20-23.
- Graça, P. & Gregório, M., 2012. Evolução da Política Alimentar e de Nutrição em Portugal e suas relações com o contexto internacional. *Revista SPCNA*, 18, pp.79-96.
- Gregório, M.J. et al., 2012. *Alimentação Inteligente - Coma Melhor, Poupe Mais* Direção-Geral da Saúde, ed., Lisboa: Edenred Portugal.
- Hajjouji, H.E. et al., 2007. Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresources Technology*, 98, pp.3513-3520.
- Haughey, S.A. et al., 2013. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to detect melamine adulteration of soya bean meal. *Food Chemistry*, p.136:1557-1561.
- Hof, M., 2003. *Handbook of Spectroscopy* G. Gauglitz & T. Vo-Dinh, eds., Wiley-VCH. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja033666c>.
- Hollas, J.M., 2004. *Modern Spectroscopy* Fourth Edi. L. John Wiley & Sons, ed., Wiley.
- Informática, D. de, 2015. Frulact.pt. , p.2015.
- Iñón, F.A., Garrigues, S. & De La Guardia, M., 2004. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*, 513(2), pp.401-412.
- Kader, A., 2001. Importance of Fruits, Nuts, and Vegetables in Human Nutrition and Health. *Horticulture*, (106).
- Kelly, J.D.F. & Downey, G., 2005. Detection of sugar adulterants in apple juice using fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), p.3281e3286.
- Kramer, R., 1998. *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*, New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kress-Rogers, E. & Brimelow, C.J.B., 2001. *Instrumentation and sensors for the food Related titles from Woodhead 's food science , technology and nutrition list* : Second Edi. E. Kress-Rogers & C. J. B. Brimelow, eds., New York Washington, DC: CRC Press.
- Kyomugasho, C. et al., 2015. FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry*, 176, pp.82-90. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.033>.
- Lagaron, J.M., Fernandez-Saiz, P. & Ocio, M.J., 2007. Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), pp.2554-2562.
- Leouifoudi, I. et al., 2014. Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(2), pp.249-257. Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/fst.2014.005>.
- Lu, C. et al., 2009. Rapid detection of melamine in milk powder by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 17, p.59 e 67.

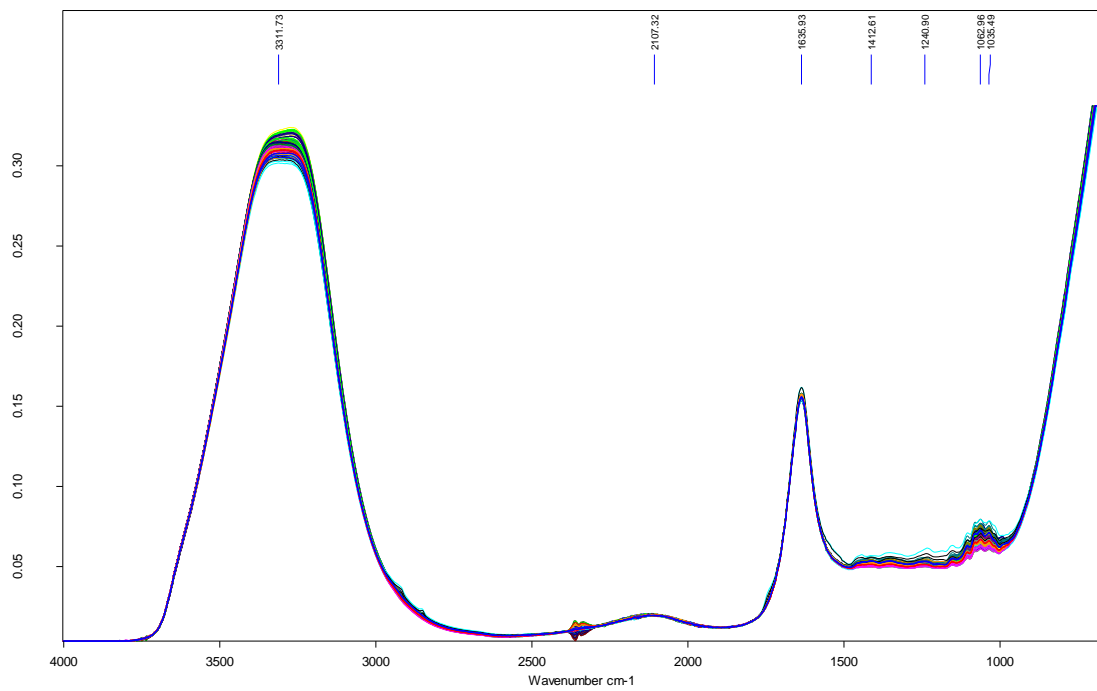
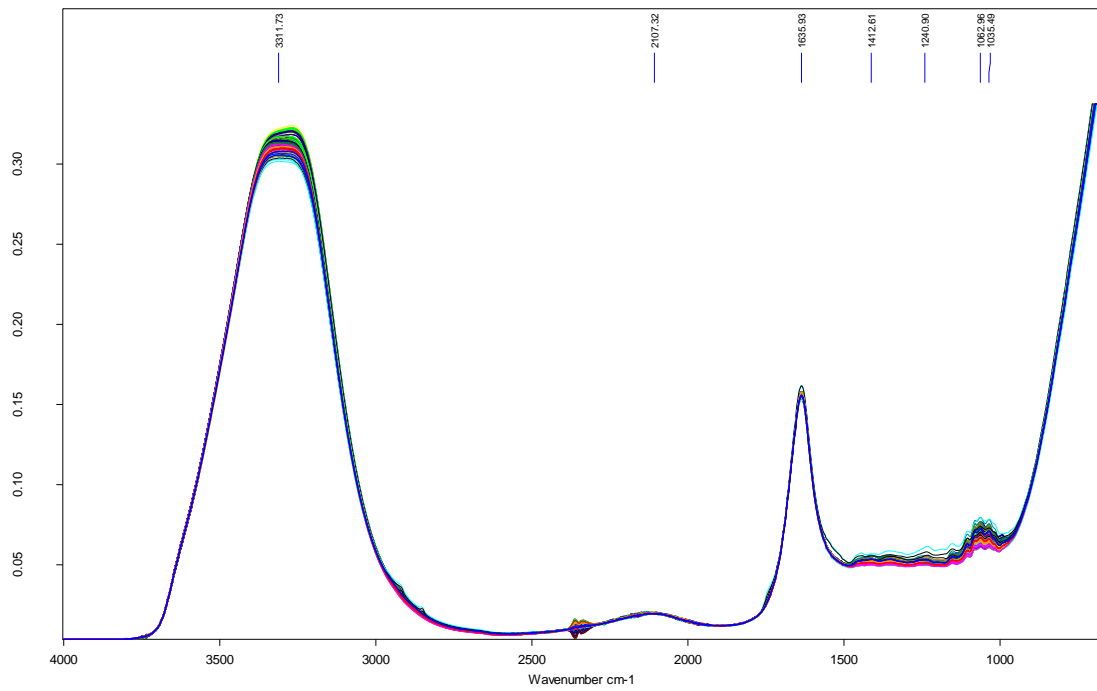
- Lyman, D.J. et al., 2003. FTIR-ATR analysis of brewed coffee: Effect of roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), pp.3268-3272.
- Mauer, L.J. et al., 2009. Melamine detection in infant formula powder using near- and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), pp.3974-3980.
- Mendes, P. & Laurino, M., 2010. Polpa de Fruta - Legislação. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*.
- Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas, 2003. Decreto-Lei Nº 236/2003 de 27 de Setembro de 2003. *Legislação Nacional*, pp.8-12.
- Mohamed, G.F. et al., 2011. Application of FT-IR Spectroscopy for Rapid and Simultaneous Quality Determination of Some Fruit Products. *Nature and Science*, 9(11), pp.21-31.
- Morgano, M.A. et al., 2007. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. *Quim. Nova*, 30(2), pp.346-350.
- Moros, J. et al., 2005. Determination of the energetic value of fruit and milk-based beverages through partial-least-squares attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), pp.181-193.
- Naes, T. et al., 2004. *Multivariate Calibration and Classification*, Chichester, UK: NIR Publications.
- Nagarajan, R. et al., 2006. Quantitative analysis of alcohol, sugar, and tartaric acid in alcoholic beverages using attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2006, pp.1-5.
- Oliveira, V.S. De et al., 2011. Caracterização físico-química e comportamento higroscópico de Material e métodos. *Revista Ciência Agronômica*, 42, pp.342-348.
- Osborne, B.G., Fearn, T. & Hindle, P.H., 1993. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis* Second Edi. T. B. Brother, ed., UK: Longman Scientific & Technical.
- Ottavian, M. et al., 2012. Near-infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d'alvevo cheese. *Journal of Food Engineering*, 113(2), pp.289-298.
- Ozaki, Y., Morita, S. & Du, Y., 2013. *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology* Y. Ozaki, W. F. McClure, & A. A. Christy, eds., New Jersey and Canada: Wiley-Interscience.
- Papadopoulou, O. et al., 2011. Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, 44(10), pp.3264-3271.
- Paradkar, M.M., Sivakesava, S. & Irudayaraj, J., 2003. Discrimination and classification of adulterants in maple syrup with the use of infrared spectroscopic techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(7), pp.714-721.
- Parlamento Europeu & União Europeia, C. da, 2004. Regulamento (CE) Nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia*, 2002.
- Parson, W.W., 2009. *Modern Optical Spectroscopy: With Examples from Biophysics* Student Ed., New York: Springer.
- Paul A. Wilks, J. & Hirschfeld, T., 1985. Internal Reflection Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, (1967), p.45.
- Pennington, J.A.T. & Fisher, R.A., 2009. Classification of Fruits and Vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(SUPPL.).
- Perkin Elmer, 2005. Technical Note: FT-IR Spectroscopy (ATR). , p.5.
- Reichenbacher, M. & Popp, J., 2012. *Challenges in Molecular Structure Determination* Second Edi., Springer.
- Roggo, Y. et al., 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in

- pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(3 SPEC. ISS.), pp.683-700.
- Sabin, J.G., Ferrão, M.F. & Furtado, J.C., 2004. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(3), pp.387-396.
- Schmitt, J. & Flemming, H.-C., 1998. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(1), pp.1-11.
- Schulz, H., Quilitzsch, R. & Krüger, H., 2003. Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 661-662(1-3), pp.299-306.
- Sherman, C.-P., 2000. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* M. B. Division, ed., Mallinckrodt, Inc.
- Shlens, J., 2014. A Tutorial on Principal Component Analysis. Available at: <http://arxiv.org/abs/1404.1100>.
- Shyam, N.J., 2010. *Nondestructive Evaluation of Food Quality* N. J. Shyam, ed., New York: Springer. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-15796-7>.
- Silva, A., 2014. A nova vida da fruta. *Público*. Available at: <http://www.publico.pt/sociedade/noticia/a-nova-vida-da-fruta-1639665>.
- Sinelli, N. et al., 2010. Varietal discrimination of extra vergin olive oils by near and mid infrared spectroscopy. *Food Research International*, 43, p.2126e2131.
- Sivakesava, S. & Irudayaraj, J., 2001a. A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup. *Journal of Food Science*, 66(6), pp.787-792. Available at: <http://bookstore.myift.org/orders/iftstore/ift-9984-2238-5934-8765-house/jfsv66n6p0787-0792ms20000141.pdf>.
- Sivakesava, S. & Irudayaraj, J., 2001b. Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(8), pp.683-690.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A., 1998. *Principios de Análisis Instrumental* Quinta Edi., Philadelphia: Mc Graw Hill.
- Smith, B.C., 2011. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy* Second Edi. T. & F. Group, ed., CRC Pre.
- Song, S.Y., Lee, Y.K. & Kim, I.J., 2016. Sugar and acid content of Citrus prediction modeling using FT-IR fingerprinting in combination with multivariate statistical analysis. *Food Chemistry*, 190, pp.1027-1032. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.068>.
- Stuart, B., 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* L. John Wiley & Sons, ed., Wiley.
- Sun, D.-W., 2009. *Infrared Spectroscopy For Food Quality Analysis and Control* First Edit. D.-W. Sun, ed., New York, USA: Elsevier.
- Susanto, H., Feng, Y. & Ulbricht, M., 2009. Fouling behavior of aqueous solutions of polyphenolic compounds during ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, p.91: 333-340. Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/fst.2014.0051>.
- Suutarinen, J., An, L. & Autio, K., 1998. Comparison of Light Microscopy and Spatially Resolved Fourier Transform Infrared (FT-IR) Microscopy in the Examination of Cell Wall Components of Strawberries. *Biotechnology and Food Research*, 601(31), pp.595-601.
- Syahariza, Z.A. et al., 2005. Detection of lard adulteration in cake formulation by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 92(2), pp.365-371.
- Tewari, J. et al., 1999. Detection of sugar and organic acid concentration in apple juice using infrared spectroscopy. *Journal Scientific and Industrial Research*, 58, p.19e24.
- Thermo, 2015. ATR Theory. , pp.4-5.

- Thomas, E. V., 1994. A primer on multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, 66(15), p.795A-804A. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00087a002>.
- Twomey, M., Downey, G. & McNulty, P.B., 1995. The potential of NIR spectroscopy for the detection of the adulteration of orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(1), p.77 e 84.
- Van de Voort, F.R., 1992. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, 25(5), pp.397-403.
- Van de Voort, F.R. & Ismail, A.A., 1991. Proximate analysis of foods by mid-FTIR spectroscopy. *Trends in Food Science & Technology*, 2, pp.13-17.
- Who, 2003. *Fruit and vegetable promotion initiative/a meeting report*, Geneva. Available at: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68395>.
- Xie, L.J., Ye, X.Q. & Liu, D. H. & Ying, Y.B., 2008. Application of principal component radial basis function neural networks (PC-RBFNN) for the detection of water adulterated bayberry juice by near-infrared spectroscopy. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(12), p.982 e 989.

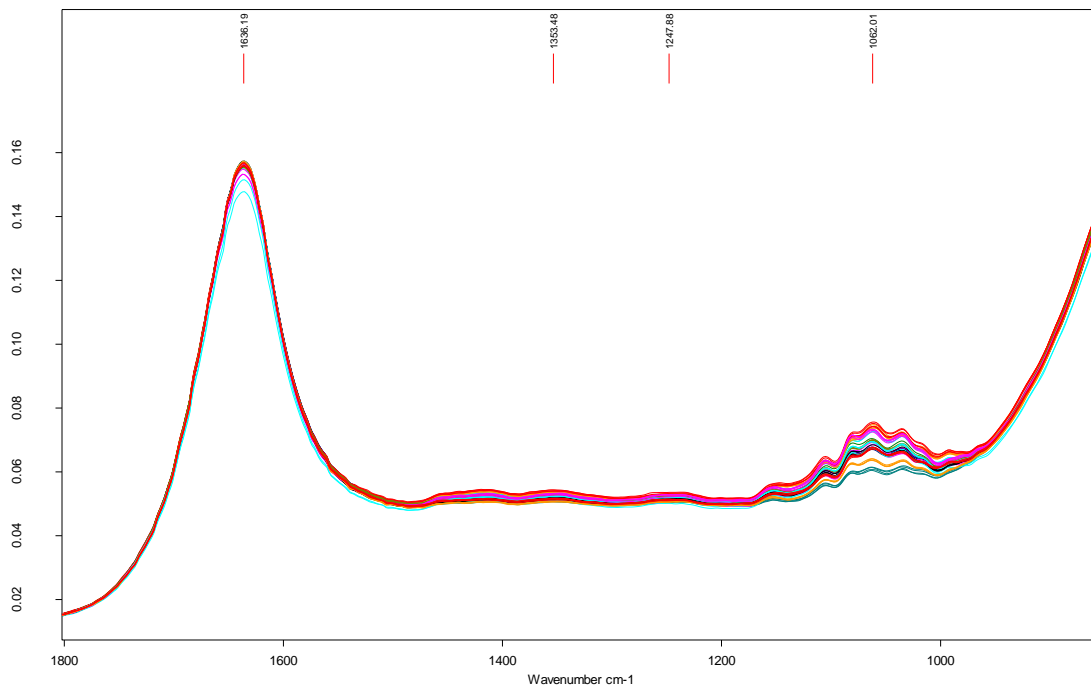
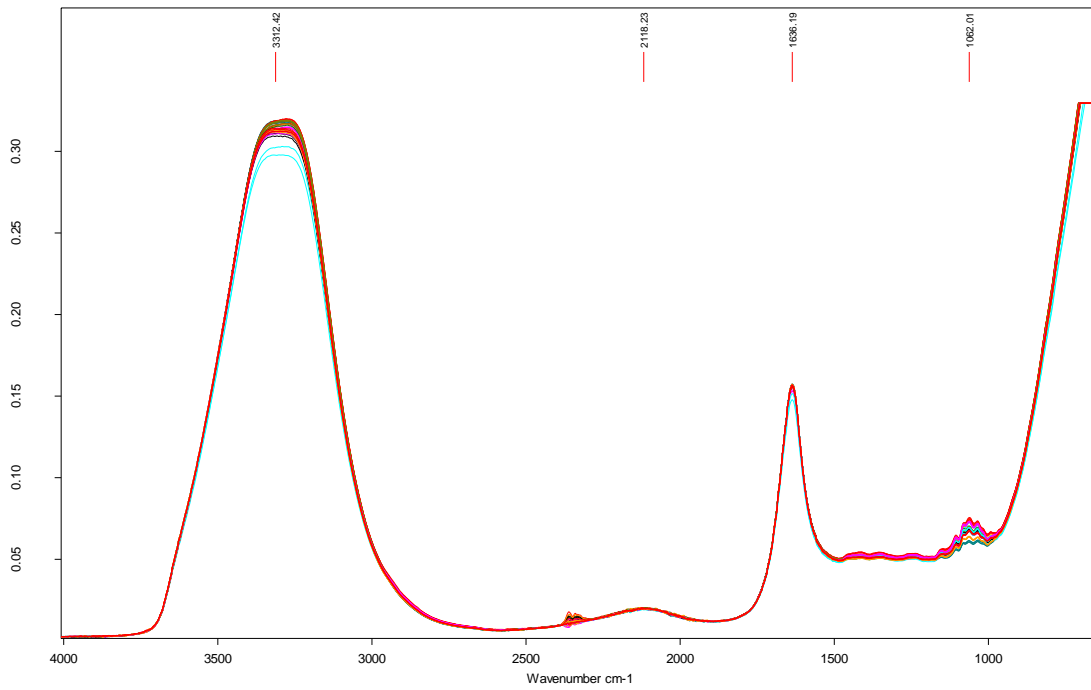
Anexos

Morango Inteiro



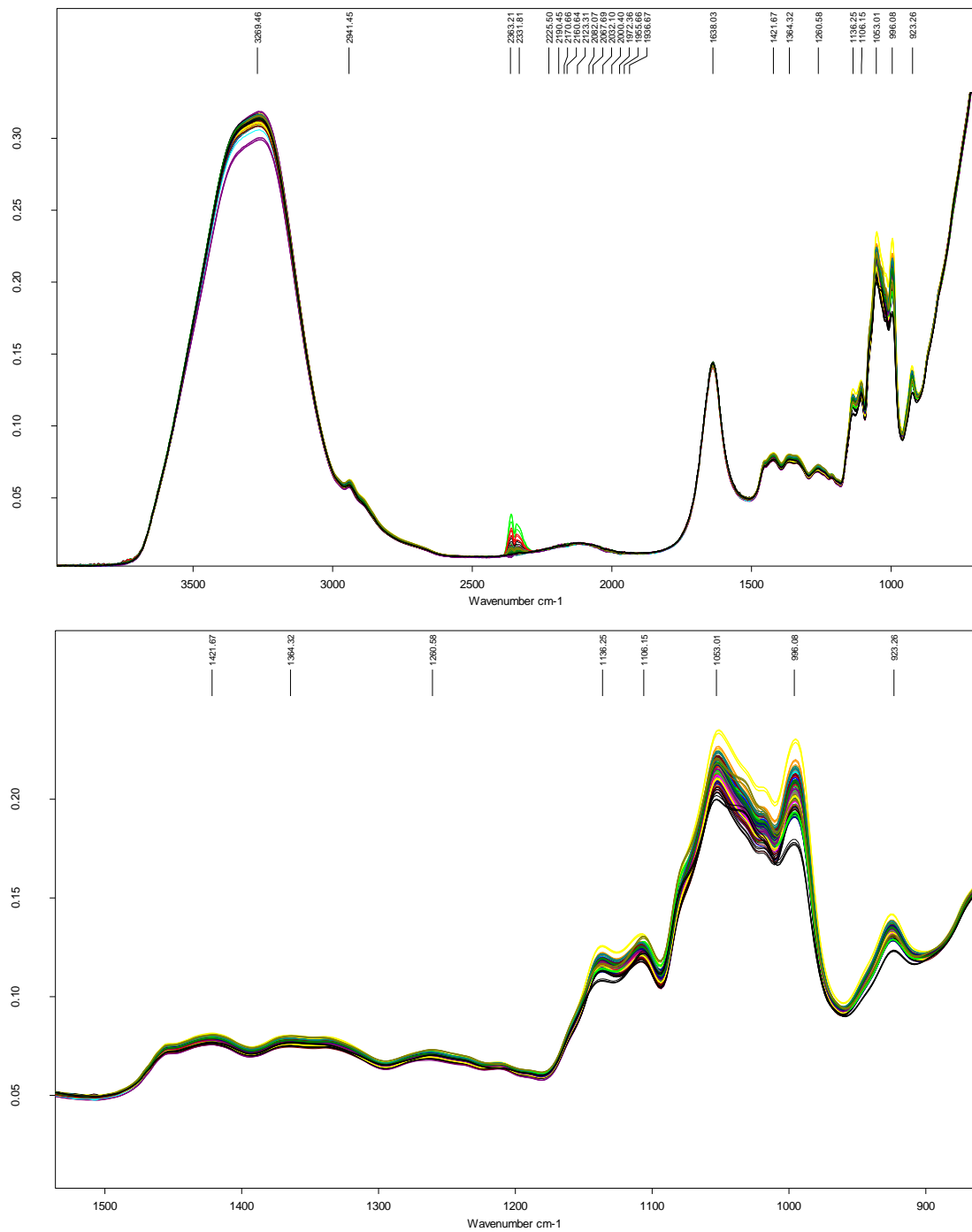
Anexo 1 - Espectros de FTIR-ATR referentes à análise de matéria-prima, morango inteiro, na região de 4 000-400 cm^{-1} .

Morango Cortado



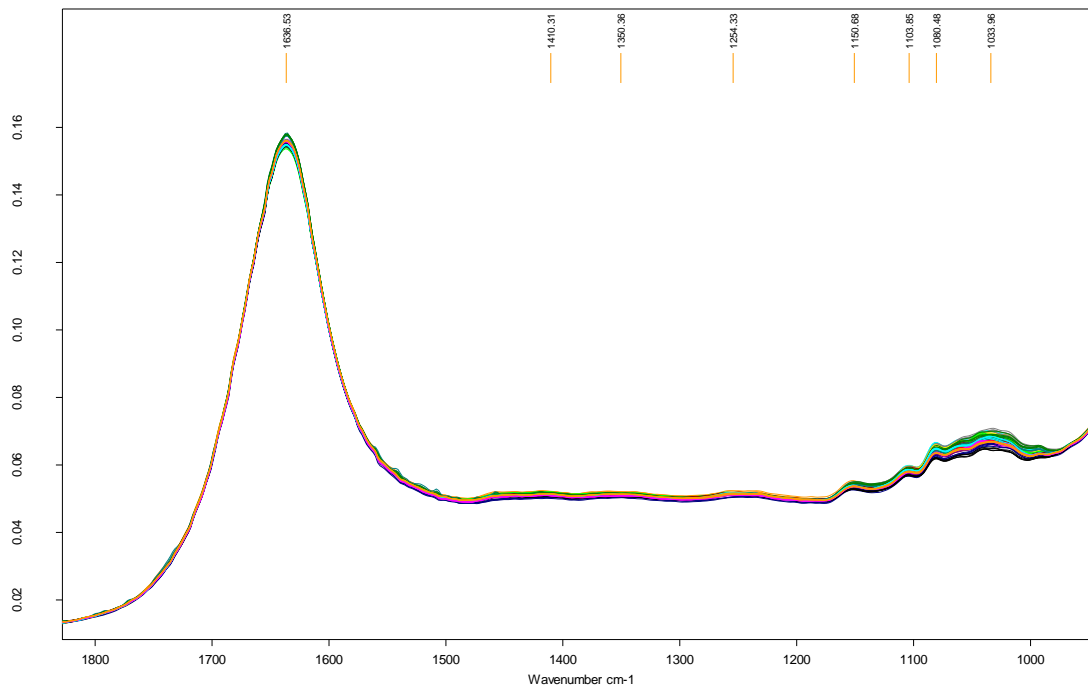
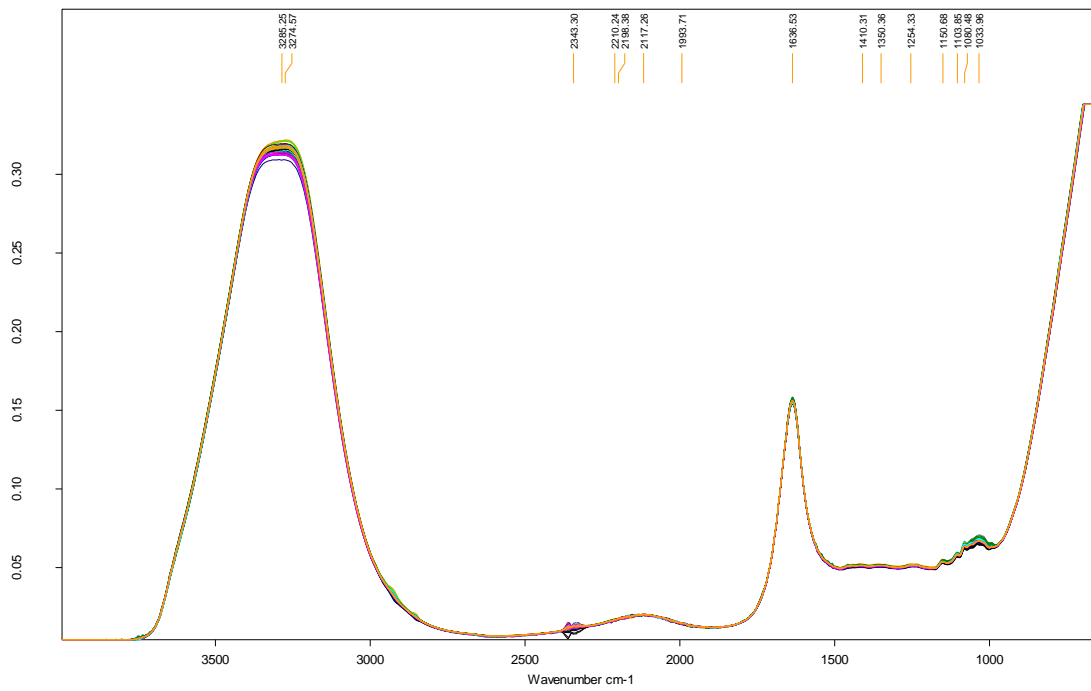
Anexo 2 - Espectros de FTIR-ATR referentes à análise de matéria-prima, morango cortado, na região de 4 000-400 cm^{-1} .

Morango +



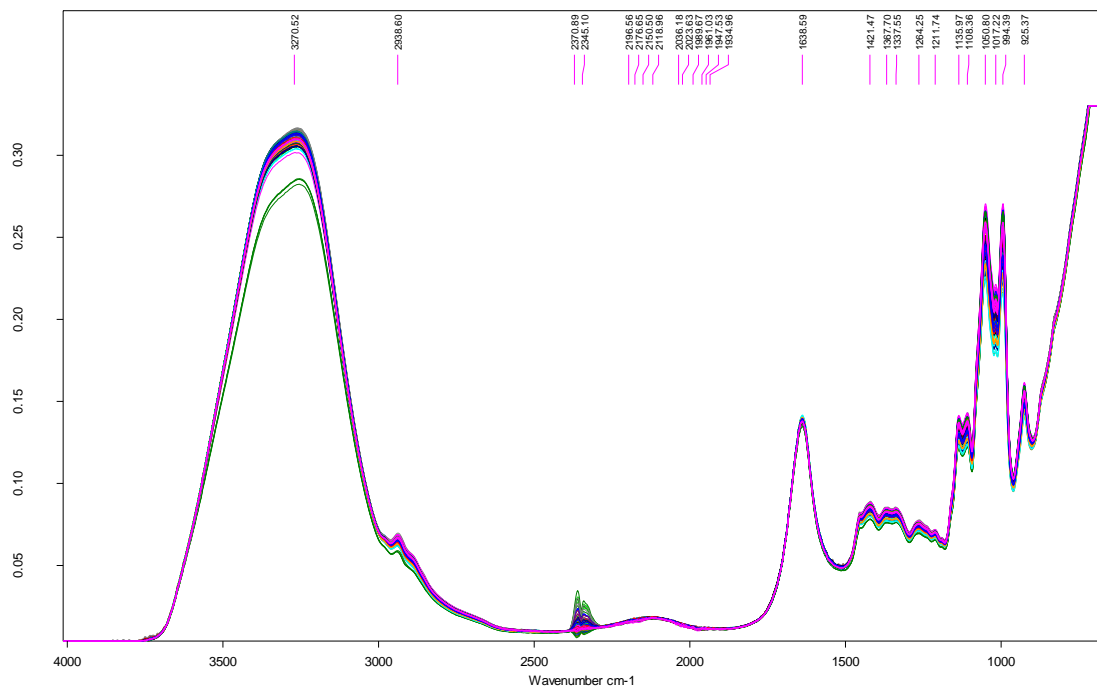
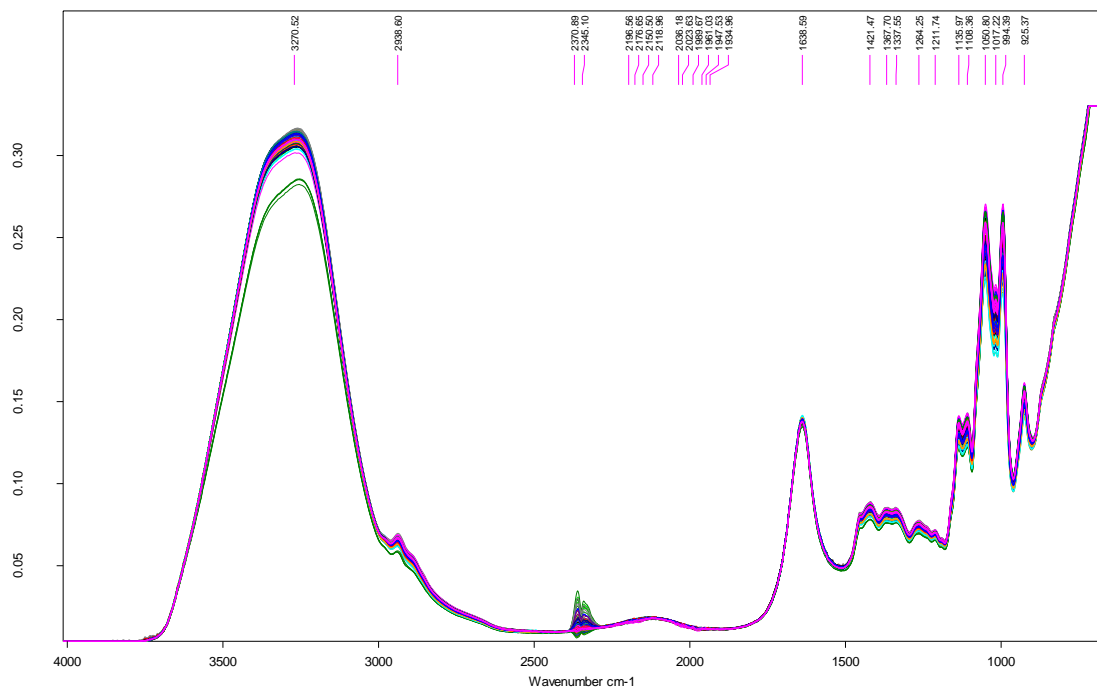
Anexo 3 - Espectros obtidos pela técnica de FTIR-ATR na análise de produto acabado, denominado por "Morango +", na região de 4 000-400 cm⁻¹.

Morango -



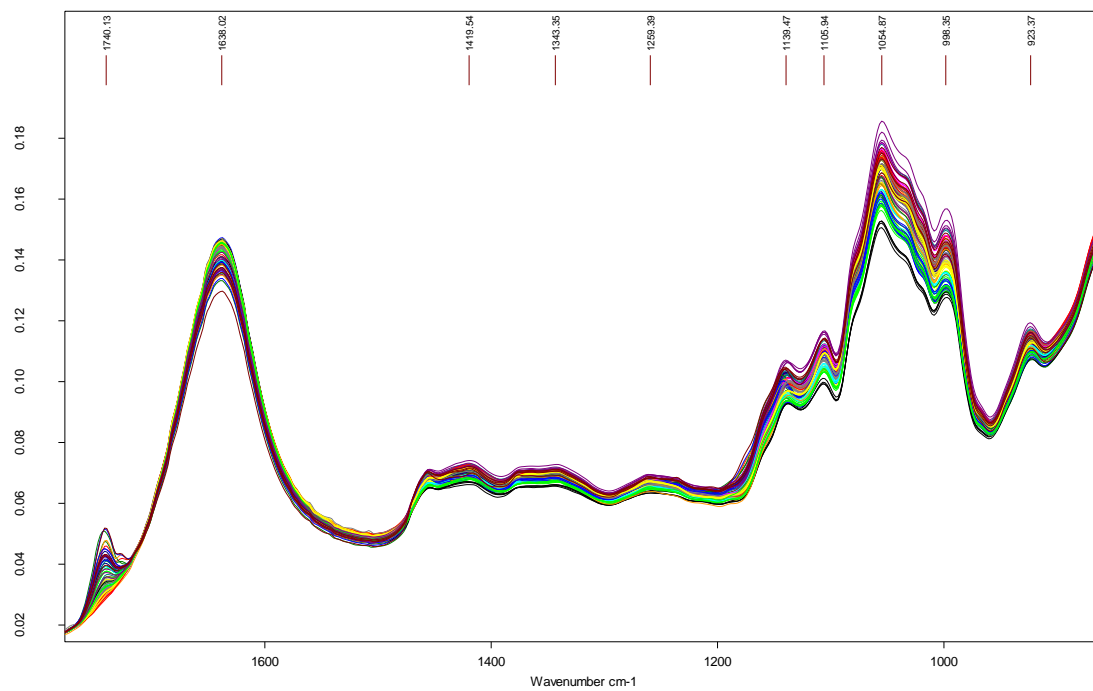
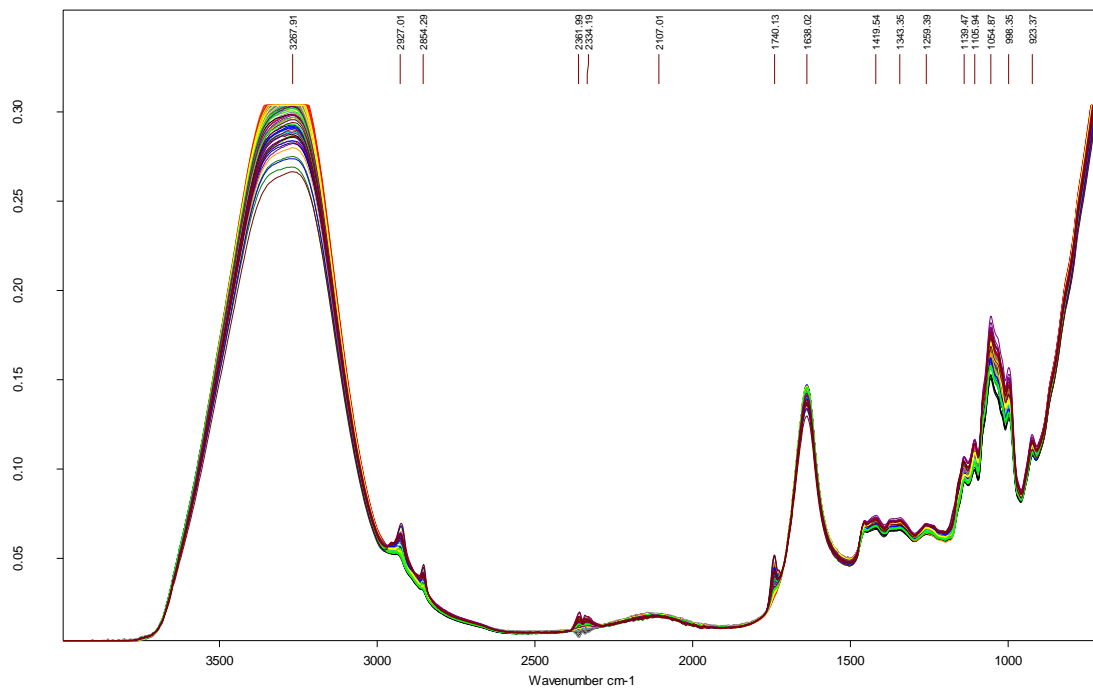
Anexo 4 - Espectros obtidos pela técnica de FTIR-ATR na análise de produto acabado, denominados por “Morango -”, na região de 4 000-400 cm⁻¹.

Framboesa



Anexo 5 - Espectros obtidos pela técnica de FTIR-ATR na análise de produto acabado, denominados por “Framboesa”, na região de 4 000-400 cm^{-1} .

Cereais



Anexo 6 - Espectros obtidos pela técnica de FTIR-ATR na análise de produto acabado, denominados por “Cereais”, na região de 4 000-400 cm⁻¹.