

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“Uma Metodologia para *Screening Analysis* de Sucos Cítricos
Utilizando um Analisador Automático em Fluxo-Batelada,
Espectrometria UV-VIS e Técnicas Quimiométricas”**

Por

Sueny Kêlia Barbosa Freitas

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso

João Pessoa, PB – Agosto de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**“Uma Metodologia para *Screening Analysis* de Sucos Cítricos
Utilizando um Analisador Automático em Fluxo-Batelada,
Espectrometria UV-VIS e Técnicas Quimiométricas”**

Por

Sueny Kêlia Barbosa Freitas

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em química, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em “Química Analítica”.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso

João Pessoa, PB – Agosto de 2006

F866 u

Freitas, Sueny Kêlia Barbosa

Uma metodologia para *screening analysis* de sucos cítricos utilizando um analisador automático em fluxo-batelada, espectrometria UV-VIS e técnicas quimiométricas /Sueny Kêlia Barbosa Freitas. – João Pessoa,2006.

55p.

Orientador: Mário César Ugulino de Araújo.

Dissertação (mestrado) CCEN/UFPB

1. Espectroscopia Molecular
2. Quimiometria

UFPB/BC.

CDU:544.17 (043)

***Em especial, aos meus queridos e amados
pais Antônio Freitas e Helena Barbosa, por
serem exemplo de vida, e pela dedicação,
incentivo e amor em todos os momentos da
minha vida.***

***A minha sobrinha Clara, por ser
fonte de paz e alegria.***

Com amor, dedico.

“Quanto mais eu viver, tanto mais hei de me convencer de que nunca é tarde para aprender.

Não penso nunca no meu possível envelhecimento;

Estou sempre interessado em todos os movimentos modernos.

Sou otimista, e o meu lema favorito, que trago aliás bordado em meu travesseiro é:

Nunca lamente, nunca justifique.

Tenho vivido, sofrido e amado.

Consegui em minha vida o milagre do autodomínio.

Adoro a vida, tornei-a uma aventura, lutei contra adversidades,

Mas reconheço com satisfação que nasci com coragem para viver.”

(Lady Mendel)

AGRADECIMENTOS

- Agradeço, sobretudo a Deus, a quem devo tudo o que tenho e sou;
- Aos meus pais, Antônio Freitas e Helena Barbosa, pelo apoio, dedicação, presença indispensável em minha vida, pelos ensinamentos preciosos e compreensão da ausência muitas vezes sentida;
- Aos meus irmãos, Suenia e Willams, pela força de sempre nos meus momentos de fraqueza;
- A minha sobrinha Clara que através do seu sorriso, tornou os meus dias mais alegres;
- As minhas tias, Maria e Alzira;
- Ao Professor Mário Ugolino, por seu apoio, amizade e orientação;
- Ao Professor Wallace Fragoso, por sua indispensável colaboração, amizade e co-orientação durante todo o mestrado;
- A Professora Vânia Medeiros, por acreditar em mim, dando a oportunidade de ingressar na pesquisa científica;
- Aos Professores Edvan Cirino e Teresa Saldanha, pelas sugestões e contribuições acadêmicas;
- Aos amigos Socorro, Luciana Medeiros, Glauciene, Elaine, Amália, Pedro, Simone, Alessandra, Luciano, Valdomiro, Chicão, Alexandre Villas, Sara, Joana e Janilce;
- A Amália, pela grande ajuda na parte experimental desse trabalho;
- A Elaine, pelas dicas e discussões e que muito contribuiu para a conclusão deste trabalho;
- A todos que fazem a família LAQA, pela convivência agradável e amizade cultivada nesses anos.
- A todos os professores e funcionários do Departamento de Química que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação;
- A CAPES, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>III</i>
ÍNDICE DE TABELAS	<i>V</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	<i>VI</i>
RESUMO	<i>VIII</i>
ABSTRACT	<i>IX</i>
CAPÍTULO 1	<i>1</i>
1 – INTRODUÇÃO	<i>1</i>
1.1 – <i>Análises de Sucos</i>	<i>2</i>
1.2 – <i>Métodos de Análises Químicas de Suco</i>	<i>4</i>
1.3 – <i>Espectrometria UV-VIS</i>	<i>5</i>
1.3.1 – <i>Lei de Lambert-Beer</i>	<i>6</i>
1.4 – <i>Screening Analysis</i>	<i>9</i>
1.5 – <i>Analisadores Automáticos</i>	<i>9</i>
1.5.1 – <i>Analisadores Automáticos em Fluxo-Batelada</i>	<i>11</i>
1.5.1.1 – <i>Automação da screening analysis</i>	<i>12</i>
1.6 – <i>Quimiometria</i>	<i>13</i>
1.6.1 – <i>Métodos de Reconhecimento de Padrões e Classificação</i>	<i>14</i>
1.6.1.1 – <i>Análise Hierárquica de Classes - HCA</i>	<i>15</i>
1.6.1.2 – <i>Análise de Componentes Principais - PCA</i>	<i>16</i>
1.6.1.3 – <i>Modelagem Independente Flexível por Analogia de</i>	<i>18</i>
Classes -SIMCA	
1.6.1.3.1. – <i>Previsão por um Modelo SIMCA</i>	<i>19</i>
1.7 – <i>Objetivo</i>	<i>20</i>
CAPÍTULO 2	<i>21</i>
2 – EXPERIMENTAL	<i>21</i>
2.1 – <i>Amostras e Diluentes</i>	<i>21</i>
2.2 – <i>Materiais e Equipamentos</i>	<i>22</i>
2.2.1 – <i>Sistema Automático em Fluxo Batelada com Bomba de Aquário</i>	<i>22</i>
2.2.1.1 – <i>Microcomputador</i>	<i>23</i>
2.2.1.2 – <i>Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-VIS</i>	<i>23</i>
2.2.1.3 – <i>Bomba de Aquário</i>	<i>23</i>

2.2.1.4 – Recipientes para Amostra e Diluente	24
2.2.1.5 – Válvulas Solenóides	24
2.2.1.6 – Acionador de Válvulas	24
2.2.1.7 – Câmara de Mistura	26
2.2.1.8 – Agitador Magnético	26
2.2.1.9 – Cella de Fluxo	26
2.2.1.10 – Softwares	27
Fluxo-Batelada	
2.2.1.10.1.– Software do Sistema Automático	27
2.2.1.10.2.– Softwares do Tratamento dos Dados	28
2.3 – Procedimento Analítico do Sistema em Fluxo-Batelada	28
2.3.1 – Etapa de Enchimento dos Recipientes da Amostra e da Água	29
2.3.2 – Etapa de Enchimento dos Canais	30
2.3.3 – Etapa de Drenagem-Limpeza da Câmara	30
2.3.4 – Etapa do Registro dos Espectros do branco e das Amostras	30
2.3.5 – Etapa da Drenagem – Limpeza do Sistema em Fluxo-Batelada	31
CAPÍTULO 3	32
3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
3.1 – Escolha da Região Espectral de Trabalho	32
3.2 – Pré-Processamento dos Espectros das Amostras	34
3.3 – Construção dos Modelos Quimiométricos	36
3.3.1 – HCA	37
3.3.2 – PCA	39
3.3.2.1 – Modelo PCA de todas as Classes dos Sucos	39
3.3.2.2 – Construção dos Modelos PCA de cada Classe do Suco	40
3.3.3 – Screening Analysis dos Sucos Cítricos Industrializados	42
CAPÍTULO 4	46
4 – CONCLUSÕES	46
4.1 – Propostas Futuras	47
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Radiação absorvente e a cor complementar.	5
Figura 2 – Potência da radiação emergente (P_0) e transmitida (P) após passar por uma cubeta contendo uma solução absorvente.	6
Figura 3 – Espectro de absorção UV-VIS do corante orgânico-sintético vermelho N° 40.	8
Figura 4 – HCA de amostras de bebidas alcoólicas destiladas.	16
Figura 5 – Exemplo da PCA sem os dados centrados na média e com os dados centrados na média	17
Figura 6 – Representação tridimensional das embalagens (linha, plano e cubo, respectivamente) de três diferentes agrupamentos ou classes de amostras (A, B e C, respectivamente).	19
Figura 7 – Ilustração Previsão de um modelo SIMCA.	19
Figura 8 – Diagrama Esquemático do Sistema Automático Fluxo–Batelada usado na diluição e nas medidas dos espectros UV-VIS de amostras dos sucos cítricos. MC = Microcomputador; BA = Bomba de Aquário; EAM = Espectrômetro de Absorção Molecular UV-VIS; AV = Acionador de válvulas; AM = Agitador Magnético; R_{H2O} = Recipiente da Água; R_{am} = Recipiente da Amostra; CM = Câmara de Mistura; V1, V2, V3, V4, V5 e V6 = Válvulas Solenóides “three way” e D = Descarte.	23
Figura 9 – Circuito eletrônico do acionador de válvulas.	25
Figura 10 – Câmara de Mistura.	26
Figura 11 – Tela do menu principal do Software de controle e aquisição de dados do sistema fluxo-batelada com bamba de aquário.	27
Figura 12 – Diagrama Simplificado do Sistema Fluxo-Batelada com Bomba de Aquário para Análise de Sucos Cítricos. R_{H2O} = Recipiente da água; R_{am} = Recipiente da amostra; BA = Bomba de aquário; CM = Câmara de Mistura; AM = agitador magnético; V1, V2, V3, V4, V5 e V6 = Válvulas Solenóides “three way”; EAM = espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS e D = descarte.	29
Figura 13 – Espectro puro dos principais corantes dos sucos cítricos na região de 220 a 320 nm.	32
Figura 14 – Espectros típicos de cada tipo de suco cítrico analisado na região de 200 a 650 nm.	33
Figura 15 – Espectros típicos de cada tipo de suco cítrico analisado na região	33

espectral trabalho escolhida (220 a 340 nm).

- Figura 16** – Espectros de todas as amostras de sucos cítricos analisados na região espectral de trabalho escolhida (220 a 340 nm). 34
- Figura 17** – Espectros de todas as amostras de sucos cítricos analisados na região espectral de trabalho escolhida (220 a 340 nm), pré-processados usando o método Savitzky-Golay com uma janela de 7 pontos e o polinômio de segunda ordem. 35
- Figura 18** – Espectros de todas as amostras de sucos cítricos analisados na região espectral de trabalho escolhida (220 a 340 nm), pré-processados usando o método Savitzky-Golay com uma janela de sete pontos e o polinômio de segunda ordem e o método de normalização dos espectros pela média das suas absorbâncias. 36
- Figura 19** – Dendrograma resultante do HCA das amostras dos sucos cítricos. 38
- Figura 20** – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 de todas amostras de sucos cítricos. 39
- Figura 21** – Gráfico da variância explicada versus número de PC's para a classe do suco cítrico industrializado de marca T. 40
- Figura 22** – Gráfico PC1 versus PC2 das amostras de sucos cítricos industrializados modelados. 43
- Figura 23** – Gráfico dos escores da PCA construída usando as amostras de treinamento e previsão da classe T (amostras **Tc** e **Tp**) e todas as demais amostras do conjunto de previsão. 44
- Figura 24** – Gráfico dos escores da PCA construída usando as amostras de treinamento e previsão da (a) classe **B** (amostras **Bc** e **Bp**); (b) classe **C** (amostras **Cc** e **Cp**); (c) classe **M** (amostras **Mc** e **Mp**); (d) classe **S** (amostras **Sc** e **Sp**) e todas as demais amostras do conjunto de previsão. 45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Os intervalos de comprimentos de onda (λ), radiações absorvidas e cores complementares.	5
Tabela 2 – Marcas e quantidades de amostras de sucos cítricos industrializados usados nas análises	21
Tabela 3 – Tipos e quantidades de amostras de sucos não industrializados usados nas análises.	21
Tabela 4 – Amostras de Sucos cítricos do conjunto de treinamento.	36
Tabela 5 – Amostras de sucos cítricos do conjunto de previsão.	37
Tabela 6 – Composição dos sucos cítricos industrializados que foram usados neste trabalho.	39
Tabela 7 – Número de PCs adotados para os modelos PCA de cada classe de suco industrializado, bem como as variâncias cumulativas e individuais explicadas pelas PCs.	41
Tabela 8 – Screening analysis de todas as 144 amostras de sucos cítricos do conjunto de treinamento.	42
Tabela 9 – Screening analysis de todas as 50 amostras de sucos cítricos do conjunto de previsão.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- PCA** – Análise por Componentes Principais (do inglês: *Principal Component Analysis-PCA*)
- SIMCA** – Modelagem Independente Flexível por Analogias de Classes (do inglês: *Soft Independent Modelling of Class Analogy-SIMCA*)
- PCR** – Regressão por Componentes Principais (do inglês: *Principal Component Regression-PCR*)
- PLS** – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês: *Partial Least-Squares Regression-PLS*)
- RMSEP** – Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (do inglês: *Root-Mean Square Error of Prediction*)
- ICP-OES** – Espectroscopia de Emissão Ótica por Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês: *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*)
- HCA** – Análise Hierárquica de Classes (do inglês: *Hierarchical Cluster Analysis-HCA*)
- UV-VIS** – Ultravioleta e Visível
- SFA** – Analisador em fluxo segmentado (do inglês: *Segmented Flow Analyser*)
- FIA** – Analisador por injeção em fluxo (do inglês: *Flow Injection Analyser*)
- MSFA** – Analisador em fluxo monosegmentado (do inglês: *MonoSegmented Flow Analyser*)
- SIA** – Analisador por injeção seqüencial (do inglês: *Sequential Injection Analyser*)
- MFA** – Analisador em fluxo multicomutado (do inglês: *Multicommutation in flow Analyser*)
- FBA** – Analisador em Fluxo Batelada (do inglês: *Flow-Batch Analyser*)
- A** – Absorbância
- b** – Caminho Ótico da Cubeta
- ϵ – Absortividade Molar
- T** – Transmitância
- KNN** – Proporção do Vizinho mais Próximo (do inglês: *K-Nearest Neighbor-KNN*)
- X** – Matriz Original
- T** – Suco Cítrico Artificial de Marca T
- M** – Suco Cítrico Artificial de Marca M
- S** – Suco Cítrico Artificial de Marca S
- C** – Suco Cítrico Artificial de Marca C
- B** – Suco Cítrico Artificial de Marca B
- MC** – Microcomputador
- BA** – Bomba de Aquário

EAM – Espectrofotômetro de Absorção Molecular

AV – Acionador de Válvulas

AM – Agitador Magnético

R – Recipiente

V1 – Válvula Solenóide 1

V2 – Válvula Solenóide 2

V3 – Válvula Solenóide 3

V4 – Válvula Solenóide 4

V5 – Válvula Solenóide 5

V6 – Válvula Solenóide 6

D – Descarte

CR – Câmara Reacional

R_{H2O} – Recipiente da Água

R_{Am} – Recipiente da Amostra

F_{Cal} – Valor Calculado para o Teste F

F_{Crit} – Valor Crítico para o Teste F

t – tempo de acionamento das válvulas

PARAFAC – Análises de Fatores Paralelos (do inglês: *Parallel Factor analysis – PARAFAC*)

APS – Algoritmo das Projeções Sucessivas (do inglês: *Successive Projections algorithm – SPA*)

RESUMO

Neste trabalho, é proposta uma metodologia para *screening analysis* de sucos cítricos industrializados utilizando a espectrometria UV-VIS, métodos quimiométricos e um analisador automático em fluxo-batelada (do inglês: *Flow-Batch Analyser - FBA*) que emprega bomba de aquário para propulsão dos fluídos. Cento e vinte e quatro amostras de sucos cítricos industrializados de cinco diferentes marcas e vinte amostras de sucos não industrializados foram analisadas. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados da grande João Pessoa e cada uma destas pertenciam a um lote de fabricação diferente. Os espectros na região ultravioleta de 220 a 340 nm foram pré-processados usando técnicas de normalização e de suavização pelo método de Savitzky-Golay. Foram empregadas as técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrões não-supervisionada – a análise de componentes principais (do inglês: *Principal Component Analysis-PCA*) e de análise hierárquica de classes (do inglês: *Hierarchical Cluster Analysis-HCA*) – e supervisionada – a modelagem independente flexível por analogia de classe (do inglês: *Soft Independent Modelling of Class Analogy-SIMCA*). Os resultados de HCA e de PCA revelaram a formação de dez classes distintas de sucos cítricos, sendo cinco classes dos sucos industrializados e cinco dos sucos não industrializados. Com base nos modelos de PCA, foram construídos modelos SIMCA para cada uma das cinco classes dos sucos industrializados. Estes modelos foram utilizados na classificação de sucos industrializados e não industrializados, verificando-se que todas as amostras foram corretamente classificadas a um nível de confiança de 95%. Conclui-se, então, que a metodologia proposta pode ser usada como uma ferramenta útil e eficiente para fins de *screening analysis* de amostras de sucos industrializados que eventualmente se enquadrem em uma das cinco classes modeladas. A metodologia é simples e o sistema é fisicamente robusto, versátil, proporciona alta frequência analítica, baixo custo de manutenção e operação além de apresentar o caráter de multi-propósito.

Palavras-chave: *screening analysis*, espectrometria UV-VIS, analisadores fluxo-batelada, HCA, PCA, SIMCA, análise de sucos cítricos.

ABSTRACT

A methodology for screening analysis of manufactured citric juices, based on UV-VIS spectrometry, chemometric methods and an automatized flow-batch analyser (FBA) and using an aquarium pump to fluids propulsion, is proposed. A hundred twenty four samples of manufactured citric juices of different brands and twenty samples of fresh juices were analysed. All manufactured samples were acquired from several supermarkets of João Pessoa city and each one of them was taken from a different portion of production. The spectra in ultraviolet region from 220 to 340 nm were pre-processed by normalization techniques and by the Savitzky-Golay smoothing method. Unsupervised (Soft Independent Modelling of Class Analogy – SIMCA) and supervised (PCA and HCA) chemometric techniques of pattern recognition were applied. The results of HCA and PCA indicated ten distinct clusters of citric juices from which, five of them were made of the manufactured fruit juices and the others were made of fresh ones. Based on PCA models SIMCA models were built for each one of those five classes of manufactured juices. These models were used for the classification of manufactured or fresh juices. All samples were correctly classified with 95% confidence level. Then, one concludes that the proposed methodology can be used as a useful and efficient tool in order to screening analysis of manufactured citric juices, since they can be included in one of the five modeled classes. This methodology presents simplicity and the system is physically robust and versatile. It allows to attain high analytical efficiency and, in addition, have low cost of maintenance and operation and presents the characteristic of multi-purpose.

Keywords: *screening analysis, UV-VIS spectrometry, flow-batch analyser, HCA, PCA, SIMCA, citric juice analysis.*

CAPÍTULO 1

***“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”
(Sócrates)***

1. INTRODUÇÃO

Os sucos de frutas são caracterizados por serem misturas aquosas de vários componentes orgânicos voláteis e instáveis, responsáveis pelo sabor e aroma do produto, além de açúcares, ácidos, sais minerais, vitaminas e corantes. Eles podem ser divididos em dois grupos: os cítricos que são obtidos da mistura da laranja, limão e tangerina e os de frutas tropicais (maracujá, caju, abacaxi, goiaba e manga)^[1].

A busca atual por maior praticidade na vida, o crescimento das populações e a urbanização vêm fazendo com que o homem cada vez mais dê importância a alimentos industrializados, o que leva as indústrias a investirem na produção de sucos com sabores diversificados. Por possuírem sabor agradável, e serem fontes de minerais e vitaminas, os sucos tornam-se uns dos produtos que mais crescem no setor industrial em todo o mundo, tendo como destaque o suco da laranja.

A laranjeira é a árvore frutífera mais conhecida, cultivada e estudada em todo o mundo. Historiadores afirmam que descrições dessa planta cítrica aparecem na literatura chinesa, por volta do ano 2000 a.C, com o seu surgimento no leste asiático^[2]. Na década de 80, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de laranjas, por possuir mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território. Atualmente ocupa a posição de líder na produção e nas exportações mundiais de sucos cítricos^[2].

No processo industrial para a produção de sucos cítricos, ao suco concentrado e congelado que apresenta 65° Brix, são adicionadas essências de frutas cítricas e água potável de modo a obter um suco com padronização final de 11,5° Brix^[3]. Este valor permite ao suco um paladar ideal para o consumidor em termos de porcentagem de açúcar, pois o brix é considerado uma medida de sólidos solúveis totais (sacarose, frutose e glucose) no suco da fruta. Este processo é finalizado com a pasteurização, onde o suco é levado a uma temperatura acima de

60° C, evitando a sua deterioração, bem como, reduzindo a população de microorganismos presentes^[4].

O controle de qualidade no processo industrial de alimentos é um problema global e se torna cada vez mais importante, seja por razões econômicas, ou por razões de saúde pública. A presença de corantes artificiais em sucos industrializados, embora seja muito pequena, cerca de 0,001%, é um ponto preocupante para saúde do consumidor, pois o consumo diário excessivo nos mais variados alimentos e bebidas, pode causar reações de natureza alérgica, entre as quais, asma brônquica e urticária, bem como insônia em crianças. Muitas indústrias vêm fazendo uso de corantes naturais em substituição aos corantes artificiais, com o intuito de diminuir riscos a saúde de adultos e crianças.

Diante destas problemáticas, tem-se observado grande interesse em análises químicas para o controle de qualidade nos processos industriais das produções de sucos, bem como na fiscalização dos produtos comercializados pelos órgãos governamentais (por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA)^[5].

1.1. Análises de Sucos

Parâmetros microbiológicos e físico-químicos como: teste de incubação, coliformes totais e termotolerantes, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, pH, graus brix e etc têm sido utilizados para a caracterização e classificação de sucos industrializados.

LIMA et al^[6] (2000) analisaram 60 amostras de 3 marcas comerciais de sucos de laranja, adquiridas em supermercados da cidade de Recife. Com base em parâmetros físico-químicos (vitamina “C”, acidez total titulável, sólidos totais e pH) e microbiológicos (teste de incubação a 35° C por um período de 10 dias) determinados nestas amostras, estes autores avaliaram a qualidade do suco pasteurizado exposto à comercialização. Foi verificado que apenas uma marca não atendeu ao padrão de qualidade estabelecido pelo ministério da agricultura^[7], evidenciando falhas no seu processamento.

RODRIGUEZ-SAONA et al^[8] (2001) utilizaram a espectroscopia na região do infravermelho próximo com transformada de *Fourier* e técnicas quimiométricas de calibração como a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês: *Partial*

Least-Square Regression-PLS), para a determinação de açúcar em sucos de fruta. Os resultados mostraram que os modelos gerados permitem uma quantificação com baixos valores de RMSEP (do inglês: *Root Mean Square Error of Prediction*)^[9], cerca de 0,10%, e com bom coeficiente de correlação, cerca de 0,999.

FERREIRA et al^[10] (2002) determinaram os teores de Ca, Cu, K, Mg, Na, P e S em sucos e refrigerantes de uva, utilizando a espectrometria de emissão ótica em plasma de argônio induzido (do inglês: *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*, ICP-OES). Eles aplicaram análise de componentes principais (do inglês: *Principal Component Analysis-PCA*) e análise hierárquica de classes (do inglês: *Hierarchical Cluster Analysis-HCA*) a esses dados e mostraram que o elemento principal para discriminar as amostras de sucos e refrigerantes foi o sódio. Foi observado também que à adição de conservantes e o teor de sais minerais foram relevantes para discriminar os grupos.

SOARES et al^[11] (2004) determinaram oito elementos minerais (K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e Mn) presentes em sucos de frutas concentrados de 07 fabricantes diferentes. A técnica analítica utilizada para a determinação dos elementos foi a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama. Os resultados mostraram que sucos de frutas são boas fontes de potássio para adultos e crianças.

TOPUZ et al^[12] (2005) realizaram a determinação simultânea de quatro tipos de pesticidas em sucos de frutas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography-HPLC*) com detecção espectrométrica por arranjos de fotodiodos na região ultravioleta de 220 a 260 nm. As curvas de calibração obtidas apresentaram uma boa linearidade, com coeficiente de correlação de cerca de 0,9988. Os limites de detecção para os pesticidas ficaram na faixa de 0,5 a 1,0 µg/kg. Os resultados mostraram que as amostras de sucos analisadas não continham nenhum resíduo de pesticida detectável.

IBARZ et al^[13] (2005) utilizaram a incidência de radiação na região UV-VIS em sucos de maçã, pêsego e limão para decompor constituintes poliméricos (por exemplo: melaninas). Foi observada perda de cor nos sucos com o tempo de exposição à radiação, sendo esta descrita por um modelo de cinética de primeira ordem.

DEL CAMPO et al^[14] (2006) utilizaram a espectroscopia de ressonância magnética nuclear para determinar quantitativamente o teor dos ácidos cítrico e málico presentes em sucos de abacaxi, morango, laranja, kiwi, pêra e maçã. Foi observada uma boa concordância entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelos métodos de referência.

AL-HOLY et al^[15] (2006) estudaram a presença de microorganismos patogênicos (*Escherichia Coli* O157:H7) mais significantes em sucos de fruta. A espectrometria de infravermelho médio com transformada de *Fourier* e técnicas quimiométricas foram utilizadas para distinguir esse tipo de bactéria de outras que possam estar presentes nos sucos. Os resultados da análise PCA mostrou evidência de separações entre a *Escherichia Coli* O157:H7 e outros microorganismos. Um modelo SIMCA da *Escherichia Coli* O157:H7 conseguiu classificar corretamente, a um nível de confiança de 77%, todas as amostras de sucos de frutas com este microorganismo.

BURDURLU et al^[16] (2006) estudaram a cinética de degradação do ácido ascórbico e a formação do HMF(Hidroximetilfurfural) em sucos cítricos concentrados. Um modelo cinético de primeira ordem foi utilizado para determinar a perda do ácido ascórbico, enquanto a formação do HMF foi estudado por um modelo de ordem zero. Amostras de sucos cítricos concentrados de laranja, limão e tangerina foram analisadas por um período de armazenamento de oito semanas a temperaturas de 28,37e 45°C. Os resultados mostraram significativa correlação entre a formação de HMF e a perda de ácido ascórbico a todas as temperaturas de armazenamento estudadas.

1.2. Métodos de Análises Químicas de Sucos

Dentre as várias técnicas analíticas para análise de sucos pode-se afirmar que a cromatografia líquida de alta eficiência é uma das mais utilizadas^[17]. Apesar desse método apresentar boas figuras de mérito analítico, ele tem como desvantagem o alto custo de aquisição da instrumentação, da operação e da manutenção, tornando-os pouco acessíveis à maioria dos laboratórios de controle de qualidade de sucos. Além disso, estes métodos exigem uma constante manutenção, são destrutivos, invasivos, lentos e produzem resíduos químicos perigosos à saúde e/ou ao meio ambiente. Uma boa alternativa para superar estes inconvenientes é o

desenvolvimento de métodos analíticos que combinam o uso da espectrometria de absorção molecular UV-VIS, analisadores automáticos em fluxo e quimiometria.

1.3. Espectrometria UV-VIS

Quando um feixe de luz branca incide sobre uma superfície contendo uma espécie molecular que absorve luz, a radiação resultante emergente será detectável pelos olhos como uma cor complementar da radiação absorvida^[18], conforme ilustrado na **Figura 1**.

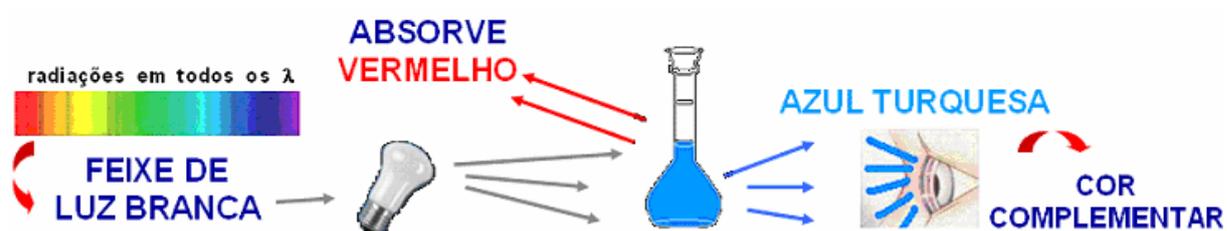


Figura 1. Radiação absorvente e a cor complementar.

As cores e seus complementos, bem como, seus respectivos intervalos de comprimento de onda são mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Os intervalos de comprimentos de onda (λ), radiações absorvidas e cores complementares.

INTERVALO APROXIMADO DE λ (nm)	COR ABSORVIDA	COR COMPLEMENTAR
400 – 465	Violeta	Verde-amarelado
465 – 482	Azul	Amarelo
482 – 487	Azul-esverdeado	Alaranjado
487 – 493	Azul turquesa	Vermelho-alaranjado
493 – 498	Verde-azulado	Vermelho
498 – 530	Verde	Vermelho-púrpura
530 – 559	Verde-amarelado	Púrpura-avermelhado
559 – 571	amarelo-verde	Púrpura
571 – 576	Amarelo-esverdeado	Violeta
576 – 580	Amarelo	Azul
580 – 587	Laranja-amarelado	Azul
587 – 597	Alaranjado	Azul-esverdeado
597 – 617	Laranja-avermelhado	Azul-turquesa
617 - 780	vermelho	Azul-turquesa

A espectrometria molecular na região ultravioleta-visível (UV-VIS) é uma técnica analítica que vem sendo há mais de 50 anos empregada para a identificação e determinação quantitativa de muitas espécies moleculares inorgânicas, orgânicas e bioquímicas em diferentes tipos de materiais^[18].

Esta técnica é baseada no fenômeno produzido pelas medidas de absorção moleculares em solução que sofrem transições eletrônicas por ocasião de absorção de energia quantizada na região UV-VIS. Uma relação quantitativa entre o fenômeno de absorção e o número de espécies moleculares que sofre absorção é dada pela lei de Lambert-Beer descrita na próxima seção^[19].

1.3.1. Lei de Lambert-Beer

Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução que contém uma espécie absorvente, uma parte da energia radiante é absorvida e a outra é transmitida^[20]. A razão da potência radiante (energia do feixe/segundo) do feixe transmitido, P , pela potência radiante do feixe incidente, P_0 , é conhecida como **Transmitância, T** (Figura 2).

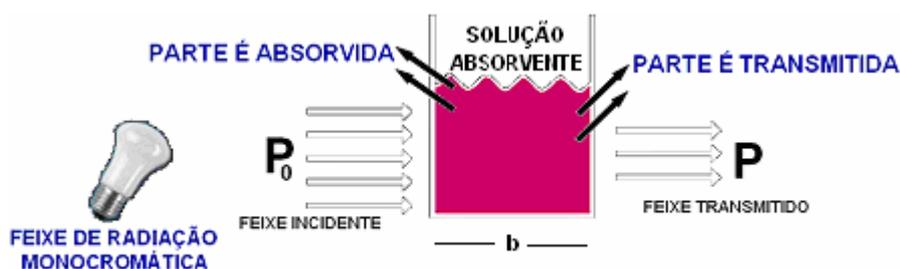


Figura 2. Potência da radiação emergente (P_0) e transmitida (P) após passar por uma cubeta contendo uma solução absorvente.

Assim, a transmitância é dada pela **Equação 1**, abaixo:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

O logaritmo decimal do inverso da transmitância é denominado de absorbância e é calculado pela **Equação 2**.

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad (2)$$

A lei que estabelece uma relação entre a absorbância ou transmitância com a concentração de uma espécie absorvente quando um feixe de radiação monocromática atravessa um recipiente (não absorvente) contendo a espécie

absorvente é conhecida como **Lei de Lambert - Beer** ou simplesmente **Lei de Beer**^[19], cuja expressão matemática desta lei é dada pela **Equação 3**:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = abc \quad (3)$$

onde **a** é uma constante denominada de **absortividade** (quando a concentração **c** é expressa em gramas por litro) e **b** é o comprimento do caminho óptico que a radiação monocromática atravessa a solução contendo a espécie absorvente (**Figura 2**).

Quando a concentração da espécie absorvente for expressa em moles por litro, a absortividade é denominada de **absortividade molar**, **ϵ** , e a lei de Beer é escrita pela **Equação 4** abaixo.

$$A = \epsilon bc \quad (4)$$

A absortividade molar expressa em unidades **litro mol⁻¹ cm⁻¹**, é uma constante característica de uma espécie absorvente em um meio, a um determinado λ . A sensibilidade de um método espectrométrico é governada pela absortividade molar da espécie absorvente.

Denomina-se, em geral, de espectro de absorção a curva obtida quando a absorbância de uma espécie absorvente é traçada em função do comprimento de onda da espécie absorvente (**Figura 3**)

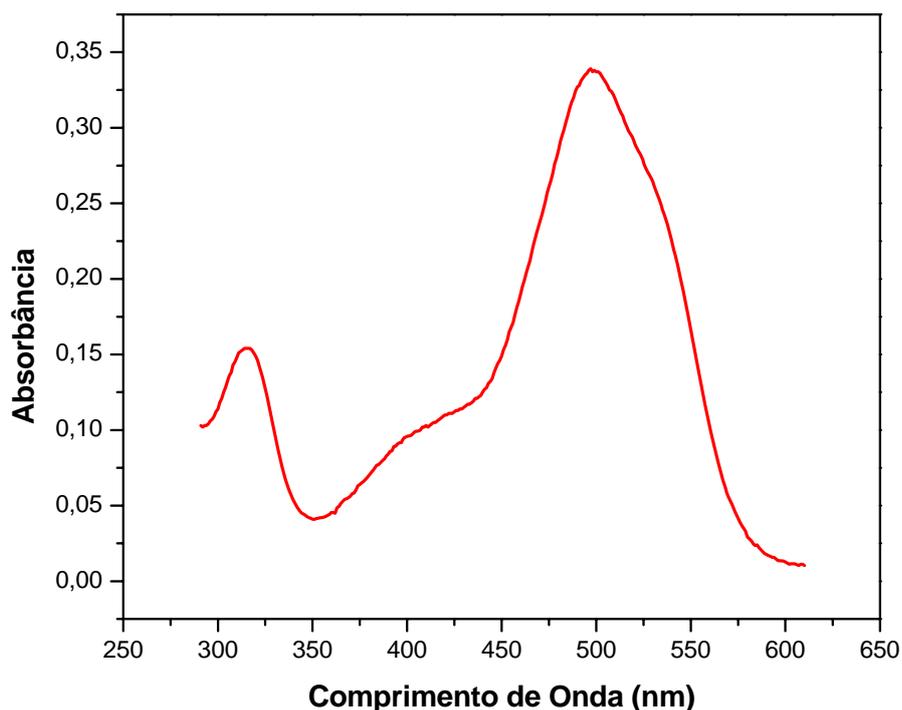


Figura 3 – Espectro de absorção UV-VIS do corante orgânico-sintético vermelho N° 40.

Tipicamente os espectros de absorção na região UV-VIS caracterizam-se por apresentar curvas do tipo gaussianas distorcidas e alargadas, que são denominadas de bandas de absorção. A posição das bandas ao longo dos espectros é característica das substâncias absorventes^[21]. Porém, por serem muito alargadas e carentes de detalhes, a relação entre as espécies absorventes e as bandas de absorção que aparecem em um espectro UV-VIS de uma mistura de substâncias absorventes é muito complexa e de difícil interpretação para uma análise qualitativa da amostra. Apesar disso, têm sido desenvolvidos vários métodos para determinação quantitativa de várias espécies químicas presentes em diferentes tipos de amostras. Entretanto, para garantir que estes métodos tenham sucesso é necessário recorrer ao emprego de reagentes específicos, ou seja, reagentes que só reagem com a espécie absorvente cuja determinação quantitativa é desejada^[22]. O emprego de reagentes específicos para uma completa caracterização de uma amostra, ou seja, a determinação qualitativa e quantitativa de cada constituinte de uma amostra é uma tarefa muito laboriosa ao se usar a espectrometria UV-VIS.

Algumas vezes pode não ser necessário o uso de vários procedimentos analíticos para uma completa caracterização de uma amostra. Pode ser que o analista esteja interessado apenas em fazer uma *screening analysis*^[23] para uma tomada de decisão *a posteriori*.

1.4. Screening Analysis

Uma nova modalidade que pode ser incluída dentro de um contexto de uma análise prévia de uma amostra, denominada de *screening analysis*^[24-26] vem ganhando grande destaque na Química Analítica atual. Caracterizando-se como um método que envolve a interação do analista em uma ou mais etapas de um processo analítico completo (qualitativo e/ou quantitativo) para tomada de decisão (sim ou não, presente ou ausente, positivo ou negativo, continue ou pare, etc)^[27-29]. O termo *screening analysis* incorpora um conjunto de interesses analíticos, não sendo possível encontrar na literatura uma definição inequívoca. Contudo, esse termo pode ser genericamente entendido como um processo preliminar de análise condicionante da escolha e aplicação de rotas ou decisões posteriores^[26-31].

A *screening analysis* é conhecida há poucos anos, e ganhou importância com o aumento da demanda por análises e a necessidade de redução dos custos operacionais e do descarte de reagentes, que contaminam significativamente o meio ambiente. Isto torna inadiável a implementação de métodos que forneçam resultados rápidos e que evitem procedimentos analíticos desnecessários e reduzam ao mínimo o número de determinações qualitativas e quantitativas.

Em termos de fornecimento de resultados rápidos, a *screening analysis* torna-se ainda mais interessante se realizada usando analisadores automáticos.

1.5. Analisadores Automáticos

As análises químicas quando realizadas por procedimentos manuais apresentam alguns inconvenientes, tais como: são trabalhosas, lentas, imprecisas, consomem grande quantidade de amostras e reagentes. Além disso, esses procedimentos manuais requerem muitas vidrarias e muita manipulação analítica, tornando-os mais susceptíveis a erros humanos. Esses inconvenientes têm sido superados quando a análise é realizada empregando analisadores automáticos, que possibilitassem um menor consumo de reagentes e amostras, minimizam dificuldades operacionais associadas às análises com reagentes instáveis, tem uma maior velocidade analítica, não expõem o analista a operações de risco, apresentam menor contato ambiente/analito e erros inerentes ao processamento das amostras, baixo custo da análise com boa exatidão e precisão.

Os analisadores automáticos podem ser classificados em três grandes grupos:

1. *Analisadores automáticos em batelada (batch);*
2. *Analisadores automáticos robotizados;*
3. *Analisadores automáticos em fluxo.*

Nos analisadores automáticos em batelada, as amostras e reagentes são processados em recipientes separados e transportados por esteiras até o detector. Os analisadores automáticos robotizados caracterizam-se por usar um robô para a execução das operações de um processo analítico, enquanto que nos analisadores automáticos em fluxo estas operações são realizadas em fluxo. Pode-se afirmar que os analisadores automáticos em fluxo são, em geral, sistemas mais simples, versáteis e flexíveis do que os analisadores em batelada e robotizados.

Dependendo de como as amostras são introduzidas e transportadas até a unidade de detecção, os analisadores automáticos em fluxo podem ser classificados [32,33] em:

- Analisadores em fluxo segmentado (do inglês: *Segmented Flow Analyser – SFA*)^[32,33];
- Analisadores por injeção em fluxo (do inglês: *Flow Injection Analyser – FIA*)^[34,35];
- Analisadores em fluxo monosegmentado (do inglês: *MonoSegmented Flow Analyser – MSFA*)^[36];
- Analisadores por injeção seqüencial (do inglês: *Sequential Injection Analyser – SIA*)^[37];
- Analisadores em fluxo multicomutado (do inglês: *Multicommutation in flow Analyser – MFA*)^[38];

Recentemente, foi proposto um novo sistema para a automatização de processos analíticos, denominado de analisador automático fluxo-batelada (do inglês: *Flow-Batch Analyser - FBA*). Este analisador alia as características favoráveis dos analisadores automáticos em fluxo com as dos em batelada como descrito em mais detalhe na seção a seguir.

1.5.1. Analisadores Automáticos em Fluxo-Batelada

Os analisadores automáticos em fluxo-batelada foi proposto em 1999 por HONORATO et al^[39]. Nestes analisadores a aspiração, bombeamento, transporte dos reagentes e amostra, bem como o monitoramento do sinal ocorre em fluxo, enquanto o processamento da amostra (reação, diluição, ajuste de pH, etc) é realizado como em um sistema em batelada clássico ou automático. Os analisadores fluxo-batelada têm sido utilizados para implementar diferentes procedimentos analíticos tais como: titulações^[39-41], pré-tratamento da amostra para ajustá-la ao pH^[42,43] ou à salinidade^[44] adequada do meio de análise, adições de analito^[45,46], preparação de soluções multicomponentes para calibração multivariada^[47] e *screening analysis*^[48,49]. Em geral, os analisadores em fluxo-batelada apresentam as seguintes características:

1. *Usam bombas peristálticas para impulsionar os fluidos e uma câmara aberta para o processamento das amostras (mistura, reação, ajuste de pH e força iônica, preparação de soluções de calibração, adições de padrão, exploração de gradientes de concentração, etc);*
2. *Os fluidos são direcionados para câmara e para o detector mediante comutação utilizando válvulas solenóides de três vias;*
3. *As quantidades de fluidos são adicionadas à câmara com precisão, controlando o tempo de acionamento das válvulas solenóides por meio do microcomputador;*
4. *A adição de fluidos (amostra, reagentes, soluções padrão, tampão, diluentes, indicadores, etc) são realizadas usando processos de multicomutação simultânea e/ou comutação seqüencial dos fluidos;*
5. *Como nos analisadores em batelada clássico ou automático, as medidas podem ser realizadas com a máxima sensibilidade, isto é, equilíbrio físico e químico estabelecido;*
6. *Dependendo do método analítico, a dispersão ou diluição da amostra pode ser explorada como em outros analisadores em fluxo citados acima;*
7. *O sinal analítico é medido em fluxo, mas pode ser medido na câmara aberta;*
8. *Métodos analíticos bem estabelecidos são mais facilmente automatizados do que nos outros analisadores em fluxo;*
9. *São analisadores muito flexíveis, pois mudando apenas os parâmetros operacionais em seus softwares de controle, é possível adaptar facilmente a metodologia a outras condições de processamento da amostra (por exemplo, ajustar o meio analítico a diferentes pHs ou forças iônicas, fazer pequenas ou grandes diluições da amostra de forma a enquadrá-la na faixa de concentração de trabalho, etc);*

10. São analisadores de caráter multipropósito, ou seja, são extremamente versáteis, pois sem alterar as configurações físicas do sistema, isto é usando o mesmo sistema em fluxo-batelada, e mudando apenas os parâmetros do software de controle é facilmente possível implementar diferentes processos analíticos (titulação, adições de analito, preparação de soluções de calibração, screening analysis, explorar gradiente de concentração das amostras e/ou dos reagentes, etc);
11. Metodologias analíticas envolvendo reações de cinética muito lenta podem ser implementadas sem comprometer a velocidade analítica, tal como é feito nos analisadores automáticos em fluxo monosegmentado;

Em síntese, pode se afirmar que os analisadores fluxo-batelada são simples, robustos, versáteis, flexíveis, de baixo custo de operação e manutenção e apresentam caráter multipropósito. Uma das desvantagens dos analisadores em fluxo-batelada proposto até então é que eles usam bombas peristálticas para impulsionar os fluidos. Estes dispositivos podem ser considerados de custo de aquisição relativamente elevado (\approx US\$ 1.500 para uma bomba simples de 4 canais)^[50], necessitam de tubos flexíveis de bombeamento que são susceptíveis a problemas de fadiga e ataque químico pelo fluido carregador e geram fluxo pulsado que pode comprometer a precisão da adição de pequenas quantidades de fluido na câmara do analisador em fluxo-batelada. Uma boa alternativa para contornar estes problemas é usar, para impulsionar os fluidos, os sistemas que utilizam a força da gravidade^[51-55], bombas de pistão ou de seringa^[56-58], sistemas pneumáticos acionados por bombas de diafragma^[50,59,60] ou a gás comprimido^[61].

Alguns trabalhos foram realizados, utilizando um mini-compressor de ar do tipo bomba de diafragma, que originalmente se destina ao borbulhamento de ar em aquários domésticos. Através dos resultados obtidos, pode-se comprovar que esse mini-compressor trata-se de uma alternativa versátil e de baixo custo, (cerca de R\$ 10,00) para impulsionar e aspirar soluções em sistemas de análise em fluxo^[59].

1.5.1.1. Automação da screening analysis

Alguns sistemas para realização da *screening analysis* automática vêm sendo propostos na literatura de Química Analítica^[49,62-68]. Entretanto, não têm sido encontrados analisadores automáticos para a realização da *screening analysis* com intuito de identificar se uma amostra pertence ou não a uma determinada classe de

suco, empregando espectrometria UV-VIS e analisadores automáticos em fluxo batelada com bomba de aquário. No entanto, os dados associados aos espectros UV-VIS apresentam características pouco informativas, por apresentarem, por exemplo, bandas alargadas dificultando sua interpretação. Sendo então necessário à utilização do uso da quimiometria para o tratamento dos dados.

1.6. Quimiometria

A quimiometria faz uso de um grupo de ferramentas que utiliza técnicas matemáticas e estatísticas para analisar dados químicos de natureza multivariada. A organização do conjunto de dados em análises multivariada são geralmente apresentados em uma matriz X ($n \times m$), onde as linhas desta matriz representam o conjunto das amostras e as colunas, das variáveis medidas. A matriz pode ser representada graficamente por n pontos num espaço m -dimensional, ou seja, cada variável medida corresponde a uma dimensão do espaço e cada amostra um ponto no espaço^[69-71]. Dentre as técnicas quimiométricas mais utilizadas pode-se citar: as de planejamento e otimização de experimentos^[72], as de reconhecimento de padrões e classificação^[73] e as de calibração multivariada^[74].

Dependendo da natureza dos dados, um pré-processamento pode ser aplicado às variáveis e/ou às amostras, antes de realizar o seu processamento. Nas variáveis, tipicamente são aplicados três tipos de pré-processamento: centralização dos dados na média, escalonamento e auto-escalonamento. A centralização dos dados na média consiste em subtrair o valor de cada elemento da coluna pelo seu respectivo valor médio, resultando numa matriz, onde todas as colunas possuem média zero, esta operação geralmente reduz a dimensão do modelo. No escalonamento, cada elemento da variável é dividido pelo desvio padrão global da variável, de modo que a variância se torne unitária e as variáveis passem a ser expressas em unidades de desvio padrão. O auto-escalonamento consiste em centralizar os dados na média e em seguida o escalonamento, de modo que cada variável apresente média zero e variância igual a um. Quando se pretende atribuir pesos iguais às variáveis do sistema, o escalonamento e o auto-escalonamento são comumente utilizados, mas devido à possibilidade de aumentar a presença de informações irrelevantes (ruídos), esses métodos são pouco aplicados em dados espectroscópicos^[69].

Com o intuito de reduzir fontes de variação irrelevantes ou não informativas e obter uma melhor eficiência na construção dos modelos multivariados, são aplicados três tipos de pré-processamento de dados nas amostras: normalização, suavização e derivação. A normalização dos dados é aplicada para remover variações sistemáticas da amostra, sendo efetuada dividindo cada variável por uma constante. A suavização (do inglês: *smoothing*) ou a filtragem de ruídos aleatórios, reduz matematicamente o ruído aleatório e aumenta a relação sinal/ruído, pois os sinais instrumentais são compostos de sinal verdadeiro e ruídos aleatórios. Existem vários tipos de suavização, porém o de polinômio móvel (método de Savitzky – Golay) é o mais utilizado. Ele ajusta um polinômio de baixa ordem aos pontos de uma janela pelos mínimos quadrados. Deve-se escolher um número adequado de pontos, pois um número elevado pode acarretar em perda de informação, enquanto que um número pequeno resulta na permanência de ruídos. Os métodos derivativos são aplicados quando se deseja corrigir no conjunto de dados variações sistemáticas, denominadas de feições da linha de base (do inglês: *baseline features*)^[69-71], que não estão relacionadas com a investigação química.

1.6.1. Métodos de Reconhecimento de Padrões e Classificação

Os métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões e classificação utilizam-se de modelos multivariados permitindo identificar similaridades e diferenças nas propriedades físicas ou químicas das amostras e/ou variáveis, podendo também identificar a presença de amostras anômalas. Faz-se necessário representar os dados em duas dimensões ou no máximo em três dimensões devido à incapacidade do homem de reconhecer padrões em planos com mais que três dimensões. Portanto, esses métodos quimiométricos são utilizados com o intuito de reduzir um conjunto de dados complexos em outro mais simples (com menos dimensões), levando a uma visualização mais fácil pelo ser humano do comportamento dos dados.

Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser não supervisionados e supervisionados. Os métodos não supervisionados, denominados também de métodos de análise exploratória, são aqueles usados apenas para examinar similaridades ou diferenças entre amostras, bem como para identificar a formação de padrões no espaço multidimensional. Os métodos de análise

exploratória mais utilizados são: HCA e PCA. Os métodos supervisionados são aqueles usados para prever se uma amostra futura pertence a uma classe; são eles: o método do k vizinho mais próximo (do inglês: *K-Nearest Neighbor-KNN*) e o método de modelagem independente e flexível por analogia de classes (do inglês: *Soft Independent Modelling of Class Analogy-SIMCA*) ^[69-71,73].

1.6.1.1. Análise Hierárquica de Classes – HCA

A análise hierárquica de classes é uma boa ferramenta para análise preliminar dos dados. Em HCA, as amostras são representadas como um ponto no espaço de “m” variáveis e toda informação de natureza multivariada de um conjunto de dados é representada em um gráfico bidimensional muito simples chamado de dendrograma.

A construção dos dendrogramas é feita medindo-se, inicialmente, as distâncias entre as amostras no espaço multidimensional. Os tipos de medidas de distância mais utilizadas são a distância Euclidiana e a distância de Mahalanobis^[69]. Uma vez feitas às medidas de distâncias entres todas as amostras, em seguida é escolhido o método para a estruturação dos agrupamentos usando uma determinada técnica que define como as amostras e/ou agrupamentos de amostras serão ligadas entre si. As técnicas mais utilizadas para a estruturação dos agrupamentos são^[69]: a ligação pelo vizinho mais próximo (processo *single-link*), e a ligação dos clusters utilizando a distância entre os centróides mais próximos (processo *centroid-link*).

Um exemplo de um dendrograma de um conjunto de dados de bebidas alcoólicas é mostrado na **Figura 4**.

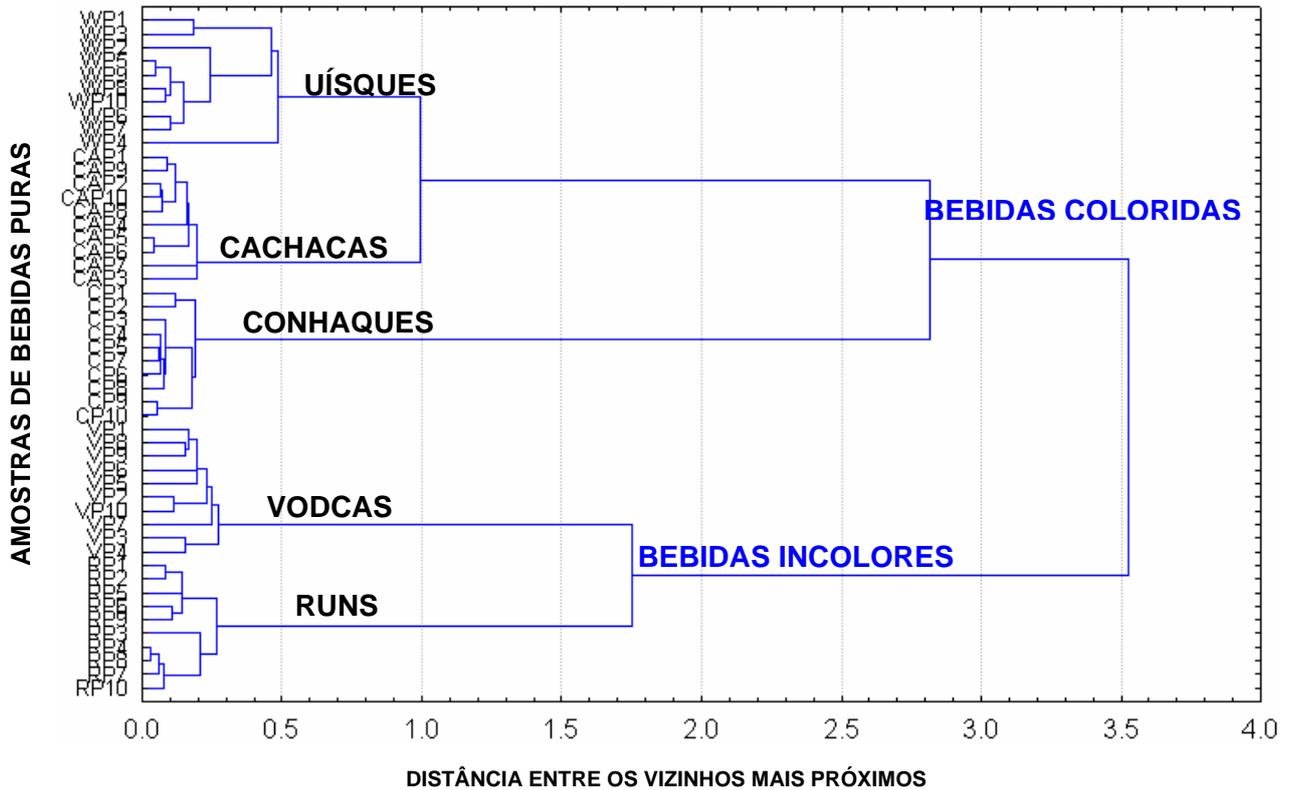


Figura 4. HCA de amostras de bebidas alcoólicas destiladas.

Em HCA, recomenda-se sempre utilizar os diferentes tipos de medidas de distância e as diferentes técnicas para estruturação dos agrupamentos e escolher aquele que der melhor resultado quanto a interpretação do comportamento dos dados^[69, 70, 71, 73, 75].

1.6.1.2. Análise de Componentes Principais – PCA

Muitos experimentos químicos envolvem análises de um grande número de variáveis e a extração de informações úteis muitas vezes se torna difícil na prática. Isto faz com que seja necessário que as informações presentes em muitas variáveis sejam reduzidas a um número bem menor de variáveis transformadas, resultantes de um tratamento matemático e estatístico dos dados originais. Uma maneira de se fazer essa transformação, que tem obtido grande sucesso, é aquela usada pela PCA.

A PCA é baseada em operações matriciais para se obter novas coordenadas das amostras em um outro sistema de eixos, denominados de fatores ou componentes principais (PCs)^[69-71,76,77], que seja mais conveniente para a análise de dados. A construção dos novos eixos ortogonais entre si, as PCs (PC1, PC2,

PC3,...., PCn), é feita a partir da combinação linear do conjunto de variáveis originais. Estes novos eixos representam as direções com máxima variabilidade, na ordem da maior para menor variância de PC1 para PCn. Durante a realização de uma PCA, uma truncagem é sempre realizada de modo a diminuir significativamente a dimensionalidade da matriz de dados, preservando a maior parte de sua variância associada à informação, geralmente, nas primeiras PCs.

O cosseno do ângulo entre o eixo da variável e o eixo da PC é a contribuição de cada variável nas PC's (**Figura 5**). Este é conhecido como pesos (do inglês: *loadings*) e varia entre os valores de -1 a 1. A variável que tem a maior contribuição para PC é a que apresenta o maior valor de peso (em módulo). As coordenadas das amostras com relação as PC's são denominadas de escores (do inglês: *scores*) e são obtidas pelo produto da matriz de dados pela matriz dos pesos.

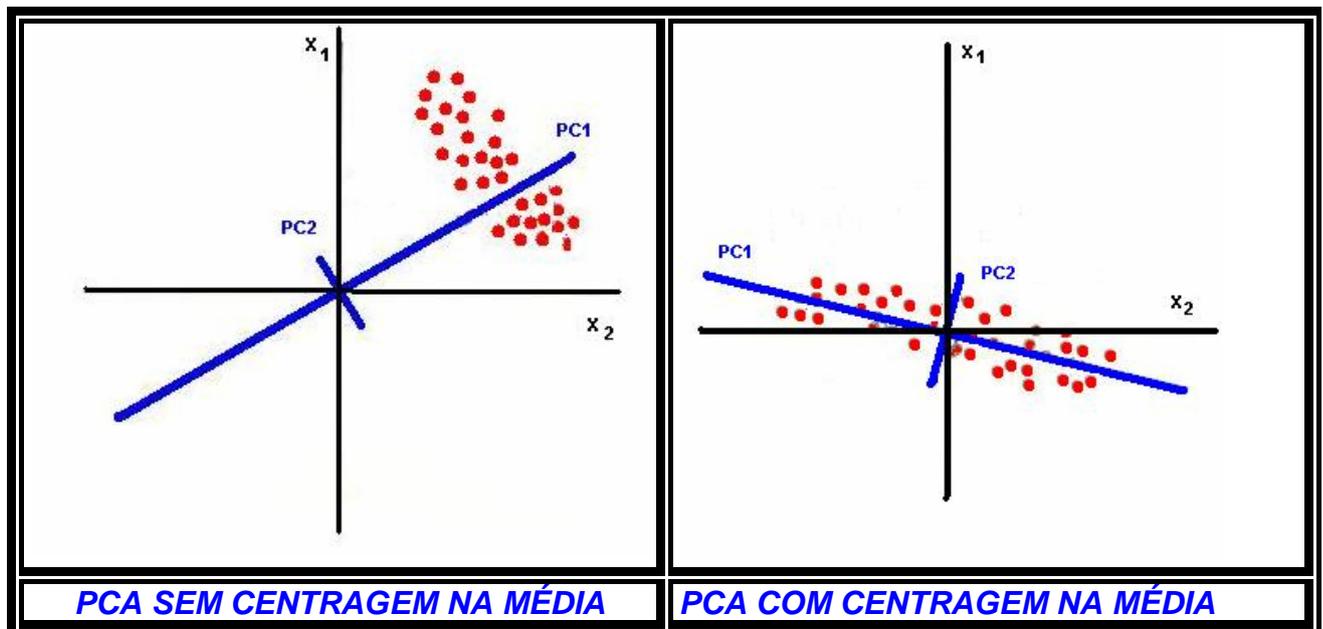


Figura 5. Exemplo da PCA sem os dados centrados na média e com os dados centrados na média^[69]

Vale a pena chamar a atenção da importância de se utilizar o processo de centragem na média antes da realização de uma PCA. Neste processo, calcula-se o valor médio para cada variável e subtrai-se este valor para cada elemento de uma variável. Com isso, cada variável passa a ter média zero e as coordenadas dos eixos PCs são movidas para o centro de distribuição espacial dos dados.

Como PC1 deve descrever a direção a partir da origem até a nuvem dos dados e PC2 é restringido ser perpendicular e também passar pela origem, verifica-se na **Figura 5** que sem centragem na média as 2 PCs varrem o espaço, mas não

estão orientadas com a nuvem de distribuição espacial dos dados. Entretanto, com centragem na média, as PCs descrevem efetivamente a direção da nuvem de pontos, ou seja, PC1 descreve principal fonte de variação (o comprimento) e PC2 a largura.

1.6.1.3. Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classes – SIMCA

O SIMCA é um método de reconhecimento de padrão supervisionado, utilizado para classificação de amostras futuras. As classes de amostras localizadas no espaço multidimensional são modeladas através do uso de componentes principais. Para cada agrupamento ou classe é criado um modelo PCA, no qual as PCs definidas para cada modelo PCA delimitam a região do espaço multidimensional (a caixa ou a embalagem) na qual encontra-se distribuídas as amostras.

Para modelar ou delimitar as embalagens onde estão localizadas as amostras, é utilizado um conjunto de treinamento contendo amostras de todas as classes e cuja identidade de cada amostra deste conjunto é conhecido a priori. A embalagem de cada classe é modelada ou delimitada usando apenas as amostras daquela classe conhecida no conjunto de treinamento.

Na **Figura 6** é mostrada 3 diferentes embalagens de classes. A embalagem ou a região do espaço multidimensional onde estão contidas as amostras da classe A é definida por uma linha reta, ou pela PC1 dessa classe. Assim, o modelo SIMCA da classe A é descrita pelos parâmetros da PC1. Usando o mesmo raciocínio, pode se dizer que as PC1 e PC2 da classe B definem o plano no espaço multidimensional onde estão contidas as amostras dessa classe e o modelo SIMCA dessa classe, enquanto os modelos SIMCA da classe C são descritos por outras diferentes 3 PCs (PC1, PC2 e PC3) que formam um cubo no espaço multidimensional.

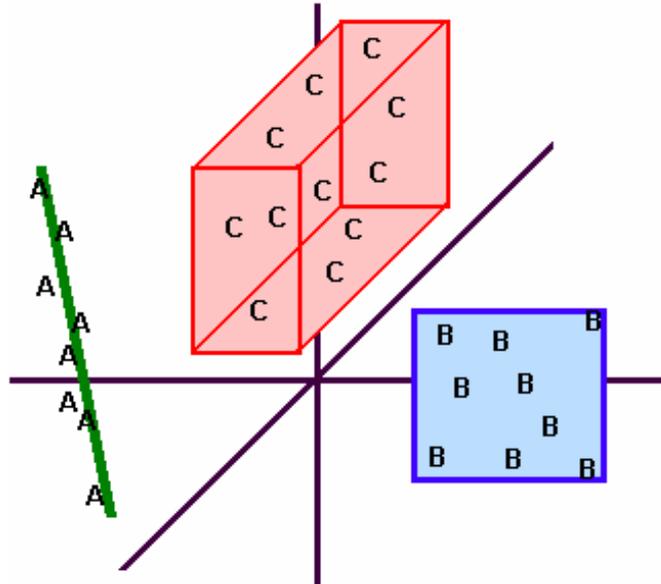


Figura 6. Representação tridimensional das embalagens (linha, plano e cubo, respectivamente) de três diferentes agrupamentos ou classes de amostras (A, B e C, respectivamente).

Vale salientar que as extremidades das PCs de cada classe definem as fronteiras das embalagens dessas classes.

1.6.1.3.1. Previsão por um Modelo SIMCA.

O cálculo das distâncias a , b e c determina se uma amostra desconhecida X pertence à classe definida pelo seu modelo SIMCA, conforme é ilustrado na **Figura 7**.

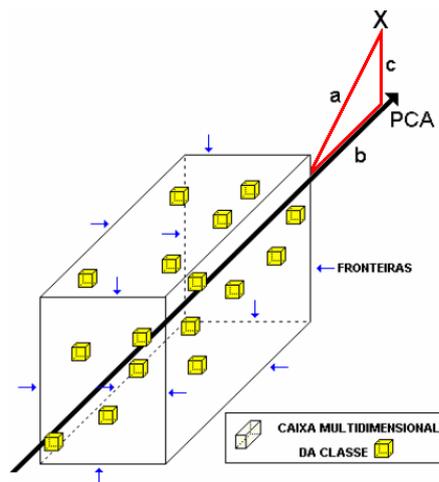


Figura 7. Ilustração Previsão de um modelo SIMCA.

A amostra é classificada como pertencente à classe se apresentar variância dentro de um valor crítico determinado pelo modelo. Este valor crítico é função do valor de " a ", que corresponde à proximidade de X em relação à fronteira da caixa tridimensional, e pode ser obtido pela **Equação 5**.

$$a^2 = b^2 + c^2 \quad (5)$$

Onde “a” corresponde à proximidade de X em relação à fronteira da caixa tridimensional, “b” é a distância entre a fronteira e a projeção de X na PCA e “c” o resíduo da PCA.

Calculado o valor de “a”, este é dividido pela variância da classe para formar um valor calculado, F_{cal} . Utiliza-se, então, o teste F onde um valor crítico, F_{crit} , é escolhido empiricamente ou a partir de uma tabela do teste F. Se o F_{cal} for menor do que o valor crítico adotado, a amostra desconhecida pode ser classificada como pertencente à classe [69-71,78].

1.7. Objetivo

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de uma metodologia de *screening analysis* de sucos cítricos usando um sistema em fluxo-batelada impulsionado por bomba de aquário, espectrometria UV-VIS e métodos quimiométricos de reconhecimento de padrão não supervisionado (HCA e PCA) e supervisionado (SIMCA).

O sistema em fluxo-batelada foi desenvolvido com intuito de diluir apenas as amostras de sucos cítricos de modo que a absorvância dos espectros UV-VIS dessas amostras não ultrapasse um limiar indesejado (em geral, absorvância > 2.0). Espera-se que com uso do sistema em fluxo-batelada, as diluições sejam realizadas de forma pouco laboriosa e com baixos erros operacionais e altas frequência analítica.

Os espectros UV-VIS das amostras foram tratados por ferramentas quimiométricas de pré-processamento de dados, e a partir desses espectros pré-tratados foram construídos os modelos SIMCA para cada classe de suco do conjunto de treinamento. Estes modelos SIMCA foram, então, utilizados para a realização da *screening analysis* de amostras desconhecidas, ou seja, para prever se uma determinada amostra pertencia ou não a uma classe de suco previamente modelada.

CAPÍTULO 2

“Quando não se sabe para onde se vai, nunca se vai muito longe”.
(Goethe)

2. EXPERIMENTAL

2.1. Amostras e Diluentes

A análise multivariada envolveu 144 amostras: 124 amostras de sucos cítricos industrializados de cinco diferentes marcas representadas pelas letras: **T**, **M**, **S**, **C** e **B** (Tabela 2), todas essas amostras foi do tipo citros, que corresponde à mistura da laranja, tangerina e limão em determinadas proporções. E 20 amostras de sucos não industrializados (suco da fruta pura) como a polpa de tangerina e o suco da laranja, tangerina e limão (Tabela 3) que foram preparadas no laboratório a partir do seu respectivo mosto. As amostras de sucos industrializados foram adquiridas em supermercados da grande João Pessoa e escolhidas de modo que pertencessem a lotes diferentes, enquanto as frutas dos sucos não industrializados foram obtidas em mercado livre.

Tabela 2. – Marcas e quantidades de amostras de sucos cítricos industrializados usados nas análises.

Marcas dos Sucos Industrializados	Quantidade de Amostras Puras
T	24
M	26
S	25
C	26
B	23
TOTAL AMOSTRA	124 AMOSTRAS

Tabela 3. – Tipos e quantidades de amostras de sucos não industrializados usados nas análises.

Tipos de Sucos Não Industrializados	Quantidade de Amostras Puras
LARANJA	02
TANGERINA	03
LIMÃO	05
POLPA DE TANGERINA	04
CITRUS*	06
TOTAL AMOSTRA	20 AMOSTRAS

*mistura de laranja (60%v/v), tangerina (30%v/v) e limão (10%v/v).

Para a realização das análises as amostras de sucos cítricos industrializados foram coletadas diretamente de suas embalagens originais. No caso das amostras de sucos não industrializados, estas foram espremidas e depois peneiradas e então coletadas.

Devido à forte absorção das amostras de sucos cítricos industrializados e não industrializados na região espectral utilizada, antes de registrar seus espectros UV-VIS estas foram diluídas automaticamente na proporção de 71 vezes (1:70) com água, usando o sistema em fluxo-batelada. Nas diluições foi sempre empregada água recém destilada e deionizada em um sistema *Milli-Q Plus (MILLIPORE 18 M Ω cm)*.

As soluções dos corantes utilizados para o estudo da região espectral de trabalho **Seção 3.1** foi preparada em uma concentração de 100 mg/L em uma solução tampão de ácido cítrico e fosfato de potássio dibásico em um pH igual a 7,0.

2.2. Materiais e Equipamentos

2.2.1. Sistema Automático em Fluxo Batelada com Bomba de Aquario

Um diagrama esquemático do sistema em fluxo-batelada usado na diluição e nas medidas dos espectros UV-VIS das amostras dos sucos cítricos, é mostrado na **Figura 8** com o intuito de descrever a disposição dos materiais empregados na montagem deste sistema. Nas seções subseqüentes é descrito, em detalhes, cada um dos componentes deste sistema.

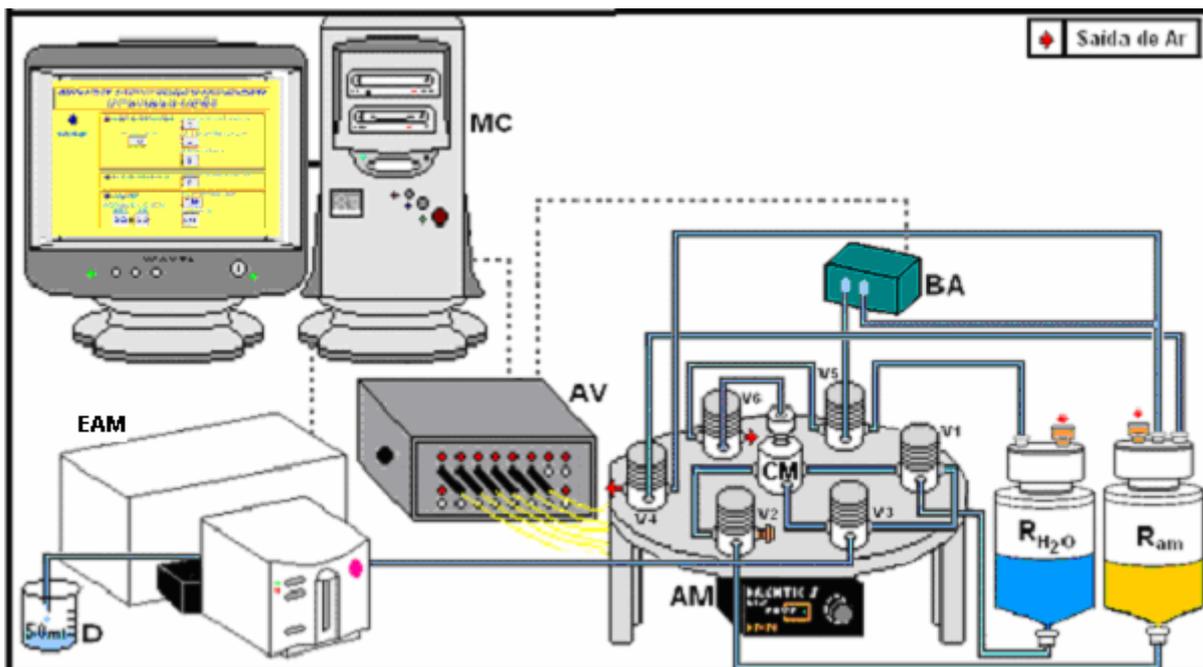


Figura 8. Diagrama Esquemático do Sistema Automático Fluxo-Batelada usado na diluição e nas medidas dos espectros UV-VIS de amostras dos sucos cítricos. **MC** = Microcomputador; **BA** = Bomba de Aquário; **EAM** = Espectrômetro de Absorção Molecular UV-VIS; **AV** = Acionador de válvulas; **AM** = Agitador Magnético; **R_{H₂O}** = Recipiente da Água; **R_{am}** = Recipiente da Amostra; **CM** = Câmara de Mistura; **V1, V2, V3, V4, V5 e V6** = Válvulas Solenóides “three way” e **D** = Descarte.

2.2.1.1. Microcomputador

Para controle, aquisição e tratamento dos dados foi utilizado um microcomputador *Intel 233 MHz*.

2.2.1.2. Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-VIS

Um Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV-VIS com arranjo de fotodiodos de marca *Hewlett Packard*, modelo 8453, foi utilizado para fazer o registro dos espectros das amostras na região de 190 a 1100 nm. A aquisição dos dados desse instrumento é feita através de uma interface acoplada ao microcomputador por um *software* do próprio fabricante do instrumento.

2.2.1.3. Bomba de Aquário

Um compressor de ar do tipo bomba de diafragma de duplo canal de saída de ar, originalmente destinados ao borbulhamento de ar em aquários e conhecido simplesmente como bomba de aquário, foi utilizado com a finalidade de impulsionar os fluídos do sistema fluxo-batelada. Para o controle desta bomba via

microcomputador foi adaptada uma chave solenóide que é ativada ou desativada empregando o acionador de válvulas *lab-made* descrito na [Seção 2.2.1.6](#).

2.2.1.4. Recipientes para Amostra e Diluente

Os recipientes da amostra (suco) e do diluente (água deionizada) foram elaborados de forma que fossem totalmente isolados para garantir a pressão interna necessária para a propulsão dos fluídos no sistema. Para o enchimento desses recipientes com seus respectivos materiais foi necessário ter um adaptador (tampa isolante) para entrada dos mesmos. Também foi necessário o uso de uma seringa para coletar e inserir no recipiente da amostra sempre um volume de 10mL.

2.2.1.5. Válvulas Solenóides

Válvulas solenóides “*three-way*”, da marca *Cole-Parmer*, foram utilizadas para a comutação dos fluídos no sistema em fluxo-batelada. Estas válvulas foram controladas pelo microcomputador através de um acionador de válvulas *lab-made*, descrito a seguir.

2.2.1.6. Acionador de Válvulas

Um acionador de válvulas *lab-made*, cujo circuito eletrônico é mostrado na [Figura 9](#) foi desenvolvido para controlar a abertura das válvulas solenóides, bem como para ativar e desativar a bomba de aquário.

2.2.1.7. Câmara de Mistura

A câmara de mistura com um volume de 0,950 mL, é constituída por um cilindro de PTFE (*teflon*) com uma barra magnética no seu interior, onde a rotação é proporcionada por um agitador magnético, que se localiza abaixo da câmara. A finalidade da câmara de mistura é promover uma melhor homogeneização entre a amostra de suco e a água deionizada, utilizada no processo de diluição. Na **Figura 10** é apresentado um diagrama esquemático da câmara de mistura e suas dimensões.

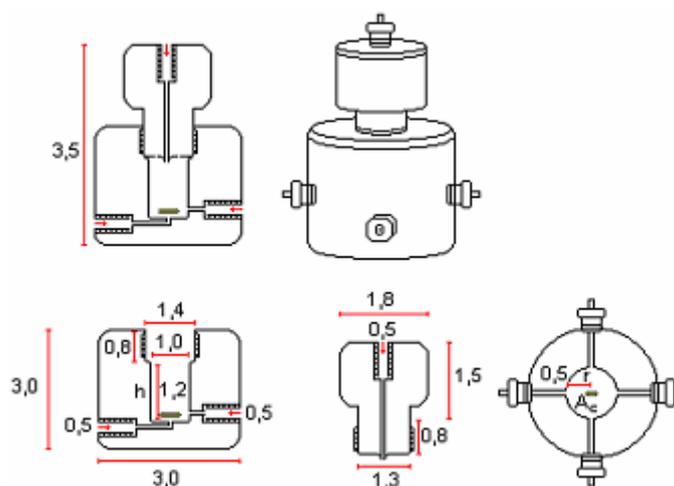


Figura 10. Câmara de Mistura.

2.2.1.8. Agitador Magnético

Para a homogeneização do fluido na câmara de mistura, um agitador magnético, da marca *Hanna Instruments*, modelo *HI 190M* foi utilizado.

2.2.1.9. Cella de Fluxo

Neste sistema foi utilizada uma cela de fluxo de quartzo comercial, da marca *HELLMA* com um caminho ótico de 1,0 cm e um volume morto de 90 microlitros.

2.2.1.10. Softwares

2.2.1.10.1. Software do Sistema Automático Fluxo-Batelada

Para controle do sistema automático em fluxo e aquisição dos dados um *software* apropriado foi desenvolvido. O *software* escrito em linguagem visual *LabView 5.1* possui um painel interativo e sub-pacotes internos prontos que através de uma tela contendo um código fonte facilmente é desenvolvido um programa para qualquer fim. Neste caso, o *software* foi escrito de modo a controlar as etapas operacionais do sistema em fluxo-batelada, tais como: acionamento e desativação das válvulas solenóides por controle de tempo, ativar ou desativar a bomba de aquário através de uma chave solenóide e acionar aquisição dos dados. A **Figura 11** mostra a tela do menu principal do programa.



Figura 11. Tela do menu principal do *Software* de controle e aquisição de dados do sistema fluxo-batelada com bomba de aquário.

Ao acessar a tela principal do *software* (**Figura 11**), o analista escolhe as válvulas solenóides e o tempo de abertura para cada uma delas. Como os tempos de abertura das válvulas são diretamente proporcionais aos volumes adicionados na câmara de mistura, e estes volumes variam de acordo com a vazão utilizada em cada canal, todo o procedimento do sistema em fluxo-batelada com bomba de aquário será descrito usando sempre o termo tempo em vez de volume.

Através da tela do menu principal o analista recebe orientações e acompanha todo o processo da análise através de caixas de diálogo.

2.2.1.10.2. Softwares do Tratamento dos Dados

Para o tratamento dos dados espectrais e para a construção dos modelos foram utilizadas técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrões (HCA e PCA) e de classificação (SIMCA), através dos *softwares* *Statistica 7.0* e *The Unscrambler® 9.1* da *Camo S.A.*

2.3. Procedimento Analítico do Sistema em Fluxo-Batelada

O procedimento analítico para diluição e aquisição dos espectros das amostras diluídas envolve a realização das seguintes etapas:

1. *Etapa de Enchimento dos Recipientes da Amostra e Diluente;*
2. *Etapa de Enchimento dos Canais;*
3. *Etapa de Drenagem–Limpeza da Câmara;*
4. *Etapa de Registro dos Espectros do branco e das Amostras;*
5. *Etapa da Drenagem–Limpeza do Sistema em Fluxo–Batelada.*

Para a realização dessas etapas as válvulas solenóides e a bomba de aquário são acionadas de acordo com os tempos previamente planejados e definidos via o *software* do sistema automático em fluxo-batelada.

Antes de iniciar qualquer uma dessas etapas e no instante em que se vai registrar os espectros do branco e das amostras diluídas a bomba de aquário encontra-se sempre desligada.

Para facilitar o entendimento de todo o procedimento analítico um diagrama simplificado do sistema automático em fluxo-batelada com bomba de aquário é mostrado na **Figura 12** e as etapas do procedimento analítico são descritas nas seções a seguir.

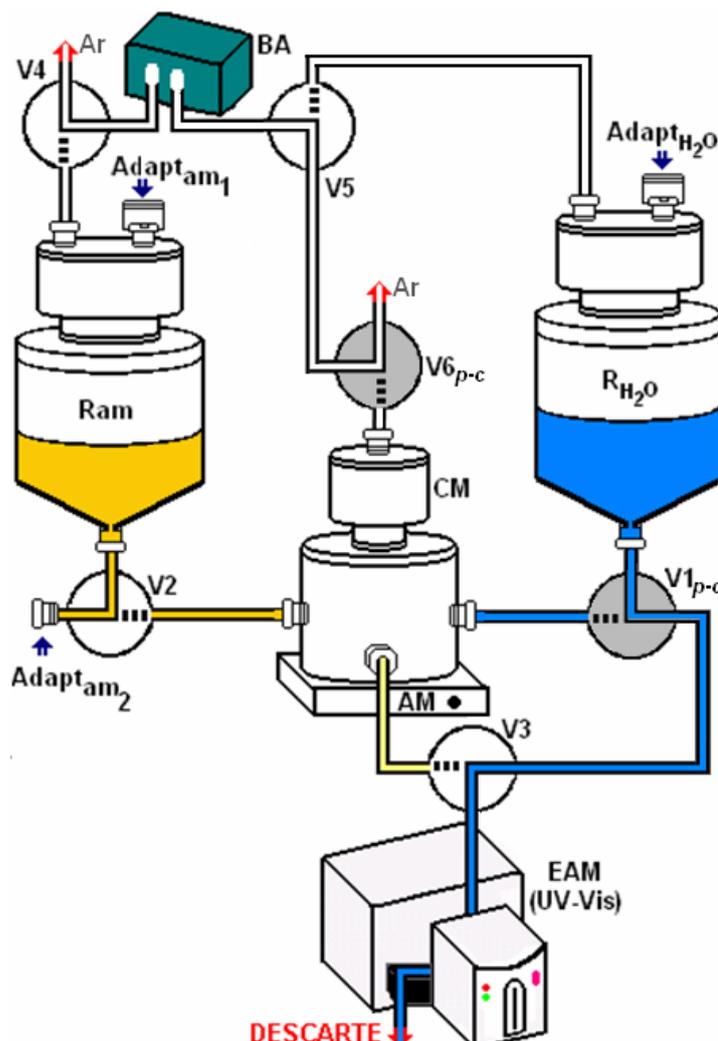


Figura 12. Diagrama Simplificado do Sistema Fluxo-Batelada com Bomba de Aquário para Análise de Sucos Cítricos. R_{H_2O} = Recipiente da água; R_{am} = Recipiente da amostra; BA = Bomba de aquário; CM = Câmara de Mistura; AM = agitador magnético; V1, V2, V3, V4, V5 e V6 = Válvulas Solenóides “three way”; p-c = Válvulas Solenóides de ponta cabeça (invertida); EAM = espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS e D = descarte.

2.3.1. Etapa de Enchimento dos Recipientes da Amostra e da Água

Inicialmente, lava-se o recipiente da amostra (R_{am}) três vezes com a amostra cuja diluição e espectro UV-VIS desejava-se medir. Para isso, insere-se, usando uma seringa, cerca de 10 mL da amostra de suco pela entrada do adaptador adp_{am1} , mantendo aberto o adaptador adp_{am2} . Esta lavagem foi sempre realizada em triplicata. Fecha-se o adaptador adp_{am2} , coloca-se 10 ml de amostra e fecha-se, hermeticamente, o recipiente da amostra com o adp_{am1} .

A água era inserida em seu recipiente (R_{H_2O}) através da entrada do seu adaptador (adp_{H_2O}) usando uma pisseta. Após encher o recipiente R_{H_2O} , este era fechado hermeticamente com o adp_{H_2O} .

Vale salientar que os fluidos da amostra sem diluição (no frasco R_{am}) e após a diluição (na câmara de mistura), e da água (no frasco R_{H_2O}) eram sempre impulsionados para câmara, e depois para o espectrômetro ou para o descarte empregando a ação produzida pela pressão interna gerada pelo ar proveniente da bomba de aquário.

2.3.2. Etapa de Enchimento dos Canais

As válvulas **V1**, **V2**, **V4** e **V5** (**Figura 12**) foram acionadas simultaneamente durante 5 s para bombear a amostra e água, de modo a encher os canais entre as válvulas **V1** e **V2** e a câmara de mistura. Logo após o enchimento dos canais, todas as 4 válvulas eram desativadas e uma nova etapa podia ser processada.

Vale ressaltar que as válvulas quando desativadas, se encontravam na sua posição de repouso, com sua saída para a direita.

A etapa de enchimento dos canais foi realizada toda vez que uma nova amostra era diluída e seu espectro UV-VIS era registrado.

2.3.3. Etapa de Drenagem-Limpeza da Câmara

Esta etapa é necessária porque durante a etapa de enchimento dos canais um pequeno excesso de amostra e água foi inserido na câmara de mistura.

Para drenagem deste conteúdo da câmara de mistura, as válvulas **V3** e **V6** foram acionadas simultaneamente por um período de 10 s, de modo que pressão de ar proveniente da bomba de aquário transporte este conteúdo para o descarte.

Para a limpeza da câmara de mistura, a válvula **V1** e **V5** foram acionadas durante 5 s de modo a se introduzir água na câmara. Logo em seguida realizava-se a etapa de drenagem descrita no parágrafo anterior.

Para garantir uma melhor limpeza da câmara, a etapa de drenagem-limpeza da câmara de mistura foi sempre realizada em triplicata.

2.3.4. Etapa do Registro dos Espectros do branco e das Amostras

Antes de iniciar essa etapa, media-se o espectro do branco, bombeando-se durante 10 segundos água para encher a cela de fluxo do espectrômetro UV-VIS.

A diluição da amostra de suco foi realizada acionando-se simultaneamente as válvulas **V1**, **V2**, **V4** e **V5** durante os tempos de 6,90 segundos para a válvula da água, 0,1 segundos para a válvula da amostra e 6,90 segundos para as demais válvulas. As quantidades de amostra e água adicionada nestes intervalos de tempo produzia uma diluição da amostra na proporção de 1:70 (0,1:7,0 segundos). Logo após essa adição, foi feita a homogeneização do conteúdo da câmara durante 5 s e, em seguida, a amostra diluída presente na câmara foi bombeada para a cela de fluxo do espectrômetro UV-VIS, acionando-se as válvulas **V3**, e **V6** durante 10 segundos. Após esse intervalo, desligava-se a bomba de aquário, registrava-se o espectro da amostra diluída e arquivava-se este espectro no microcomputador para posterior tratamento quimiométrico.

O espectro de cada amostra de suco diluída foi, neste trabalho, sempre registrado em triplicata. Após essas medidas, foi sempre executada a etapa de drenagem-limpeza da câmara de mistura, usando o procedimento descrito na **Seção 2.3.3**.

2.3.5. Etapa da Drenagem – Limpeza do Sistema em Fluxo-Batelada

Antes de iniciar o processamento de uma nova amostra e ao término da aquisição de todos os espectros era feita a drenagem-limpeza de todo o sistema em fluxo-batelada. Nesta etapa, retiravam-se, inicialmente, os adaptadores **adp_{am1}** e **adp_{am2}** e o recipiente da amostra, **R_{am}**, era esvaziado e lavado três vezes com água. Em seguida foi feita a drenagem-limpeza do canal existente entre o recipiente **R_{am}** e a câmara de mistura. Isto era feito, colocando-se o adaptador **adp_{am2}** e enchendo-se, usando uma seringa, o recipiente da amostra com água pela a entrada do adaptador **adp_{am1}**. Colocava-se o adaptador **adp_{am1}**, ligava-se a bomba de aquário e acionavam-se simultaneamente as válvulas **V2**, **V3**, **V4**, e **V6** para empurrar o conteúdo do canal para a câmara e depois para o descarte, até esvaziar a água contida no recipiente da amostra. Isto durava cerca de 10 s.

CAPÍTULO 3

“O que é facilmente adquirido é facilmente desprezado”.
(Isaac Newton)

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Escolha da Região Espectral de Trabalho

Para a escolha da região espectral de trabalho são apresentados a seguir os espectros puros (**Figura 13**) dos principais corantes presentes nos sucos cítricos industrializados em estudo (corantes: amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina e carmim de cochonilha), cujos cromóforos apresentam bandas espectrais características na região UV-VIS (200 a 650 nm) investigada, com os espectros típicos (**Figura 14**) de cada tipo de suco cítrico analisado.

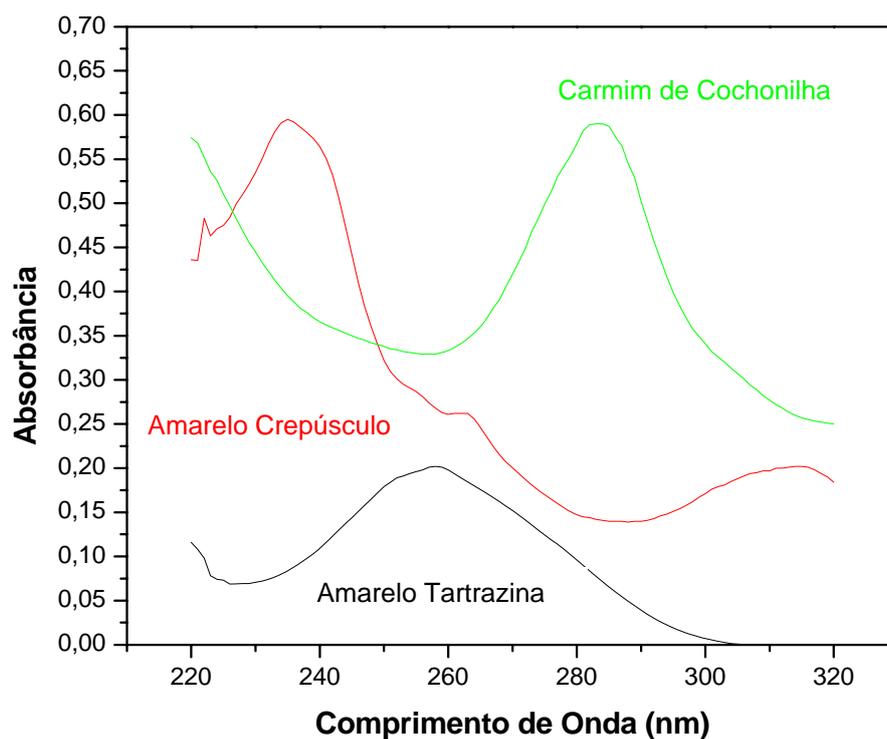


Figura 13. Espectro puro dos principais corantes dos sucos cítricos na região de 220 a 320 nm.

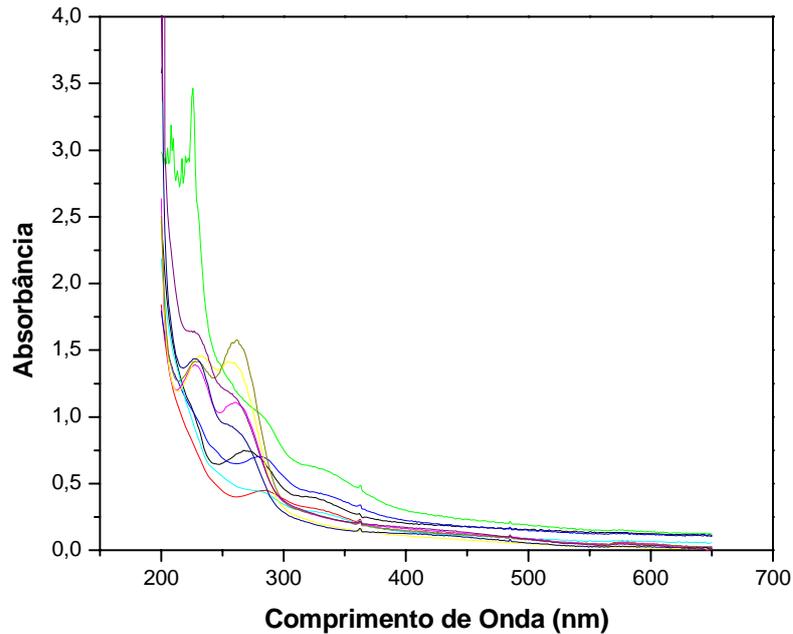


Figura 14. Espectros típicos de cada tipo de suco cítrico analisado na região de 200 a 650 nm.

Analisando as **Figura 13** e **14**, verifica-se a ausência de bandas espectrais acima de 340 nm e a presença de ruído instrumental associado aos sinais de absorbância com valores acima de 2 unidades na região entre 200 a 220 nm. Com base nisso, a região de trabalho escolhida para o tratamento quimiométrico a ser aplicado aos espectros de todas as amostras de sucos cítricos analisados foi aquela entre 220 a 340 nm, conforme mostrado na **Figura 15**.

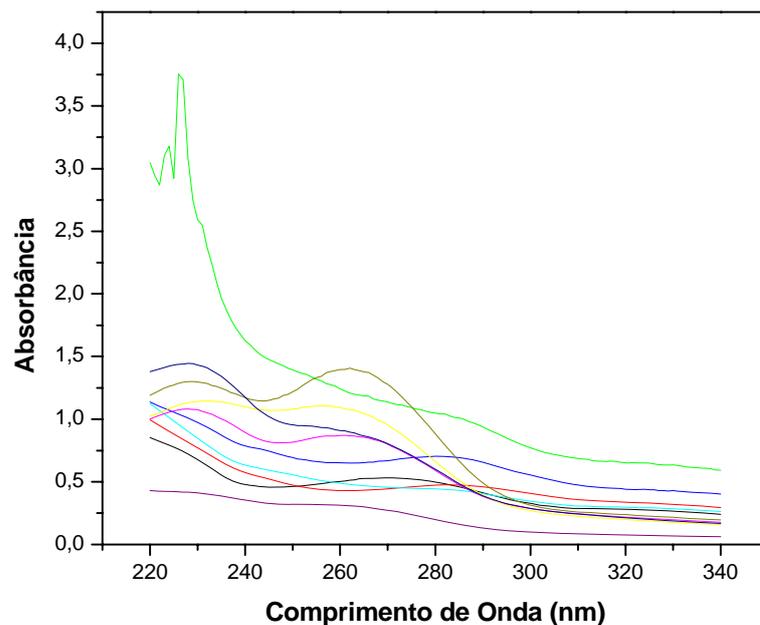


Figura 15. Espectros típicos de cada tipo de suco cítrico analisado na região espectral trabalho escolhida (220 a 340 nm).

3.3. Pré-Processamento dos Espectros das Amostras

Na **Figura 16** são apresentados os espectros de todas amostras de sucos cítricos analisados.

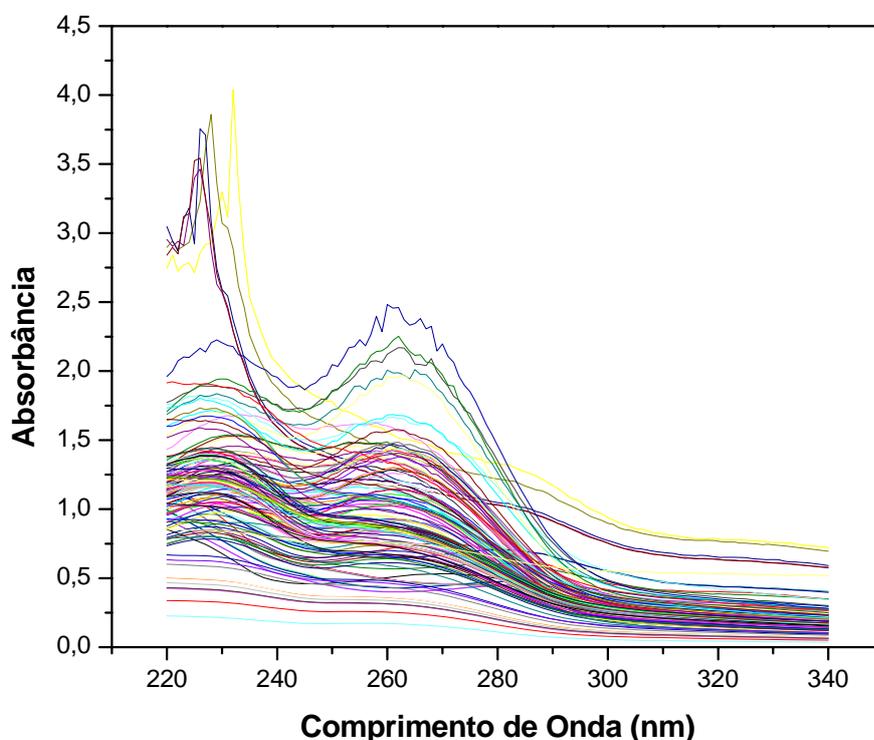


Figura 16. Espectros de todas as amostras de sucos cítricos analisados na região espectral de trabalho escolhida (220 a 340 nm).

Observa-se na **Figura 16** a presença de perfis ruidosos, o que indica a necessidade da aplicação de um pré-processamento para minimizar este problema. Optou-se, então, em se aplicar o método de Savitzky-Golay para a suavização do ruído. Durante a aplicação deste é muito importante a escolha adequada do grau do polinômio e do tamanho da janela móvel a ser utilizada^[69]. Por exemplo, uma janela muito larga pode tanto remover ruído, como também picos informativos nos espectros.

Vários testes com diferentes janelas e polinômios foram feitos e analisados e, de acordo com este estudo, foi escolhido para o pré-processamento dos espectros das amostras pelo método Savitzky-Golay uma janela de sete pontos e o polinômio de segunda ordem. Os espectros pré-processados por este método, usando estas condições são mostrados na **Figura 17**.

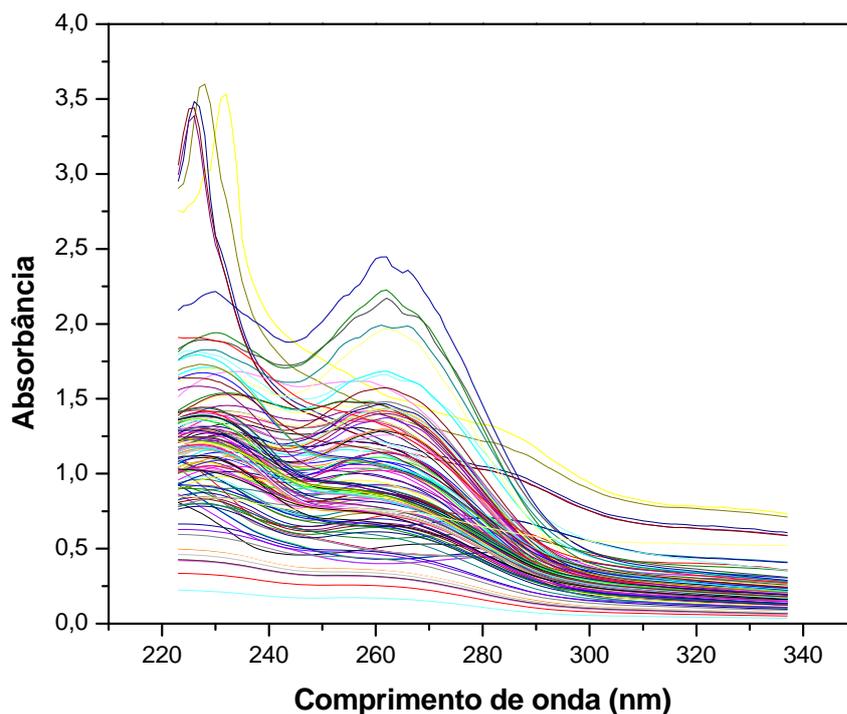


Figura 17. Espectros de todas as amostras de sucos cítricos analisados na região espectral de trabalho escolhida (220 a 340 nm), pré-processados usando o método Savitzky-Golay com uma janela de sete pontos e o polinômio de segunda ordem.

Para aumentar a separação entre os espectros de amostras de marcas diferentes e aproximar os espectros de amostras da mesma marca foi aplicado a todos os espectros o método de normalização dos espectros pela média das suas absorvâncias. Os espectros resultantes deste pré-processamento são mostrados na **Figura 18**. Esse procedimento de normalização tende a agrupar espectros com perfil espectral semelhante, mas que sejam diferentes em suas intensidades, já que nesse caso as médias das absorvâncias, que são os fatores de normalização, manterão ao longo das amostras o mesmo fator de escala que os próprios espectros. Dessa forma, os espectros normalizados apresentarão as mesmas intensidades e linha de base. Já espectros de perfis diferentes, mesmo que variando na mesma amplitude de absorvância e partindo da mesma linha de base, apresentarão médias distintas e, por isso, os espectros normalizados terão diferentes intensidades e linha de base.

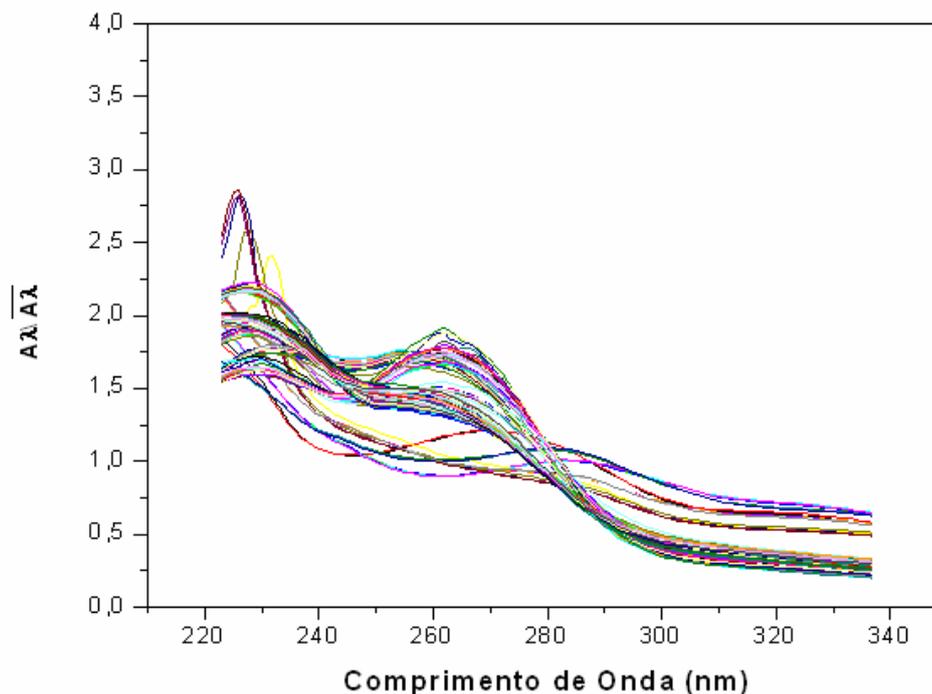


Figura 18. Espectros de todas as amostras de sucos cítricos analisados na região espectral de trabalho escolhida (220 a 340 nm), pré-processados usando o método Savitzky-Golay com uma janela de sete pontos e o polinômio de segunda ordem e o método de normalização dos espectros pela média das suas absorvâncias.

3.4. Construção dos Modelos Quimiométricos

Inicialmente, utilizando todas as amostras foi realizada uma análise exploratória dos dados utilizando o gráfico bidimensional (dendrograma) obtido pela HCA e o gráfico dos escores obtido pela PCA. Após a análise exploratória, as amostras (**Tabela 2 e 3**) foram divididas em conjunto de treinamento e previsão, conforme mostrado nas **Tabela 4 e 5**. Onde estas, foram escolhidas de forma aleatória.

Tabela 4. Amostras de sucos cítricos do conjunto de treinamento.

Sucos cítricos	Nº de Amostras	Legendas
T	19	T1, T2, T3, T4, T5, T7, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, T24
M	19	M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M10, M14, M15, M17, M18, M20, M21, M23, M24, M25, M26
S	19	S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S11, S12, S14, S15, S16, S17, S19, S20, S21, S22, S24, S25
C	19	C1, C4, C6, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C17, C18, C19, C21, C22, C23, C24, C26
B	18	B1, B2, B3, B4, B5, B8, B10, B11, B12, B14, B15, B16, B17, B19, B20, B21, B22, B23
Total	94	CONJUNTO DE TREINAMENTO

Tabela 5. Amostras de sucos cítricos do conjunto de previsão.

Sucos	Nº de Amostras	Legendas
T	05	T6, T8, T21, T22, T23
M	07	M9, M11, M12, M13, M16, M19, M22
S	06	S1, S2, S8, S13, S18, S23
C	07	C2, C3, C5, C7, C16, C20, C25
B	05	B6, B7, B9, B13, B18
Laranja	02	L1, L2
Tangerina	03	Tg1, Tg2, Tg3
Limão	05	LI1, LI2, LI3, LI4, LI5
Polpa de Tangerina	04	PT1, PT2, PT3, PT4
Citrus puro	06	CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6

Usando as amostras dos conjuntos de treinamento de cada marca de suco cítrico industrializado (**T**, **M**, **S**, **C** e **B**) foram construídos os modelos PCA's, empregando o processo de validação cruzada full *cross-validation*^[69]. O gráfico da variância explicada *versus* o número de componentes principal foi, então, utilizado como ferramenta de diagnóstico para determinar o número ideal de componentes principais a ser usado em cada um desses modelos.

Os modelos PCAs gerados para cada marca de suco foram então utilizados para *screening analysis* de todas as amostras de sucos cítricos do conjunto de treinamento e previsão. Para o propósito de *screening analysis* foi empregado o processo de classificação, usando como ferramenta o método SIMCA. Nesta classificação foi sempre adotado o nível de confiança de 95%.

Vale salientar que antes da construção dos modelos HCA, PCA e SIMCA, discutidas nas próximas seções, os espectros pré-processados usando o método Savitzky-Golay e o método de normalização foram também centrados na média.

3.4.1. HCA

O dendrograma resultante da HCA de todas as amostras de sucos cítricos é apresentado na **Figura 19**. Na construção deste dendrograma foi utilizada a distância Euclidiana, como medida de distância, e para a estruturação dos agrupamentos foi aplicado o processo de ligação pelo vizinho mais próximo (processo *single-link*)^[69].

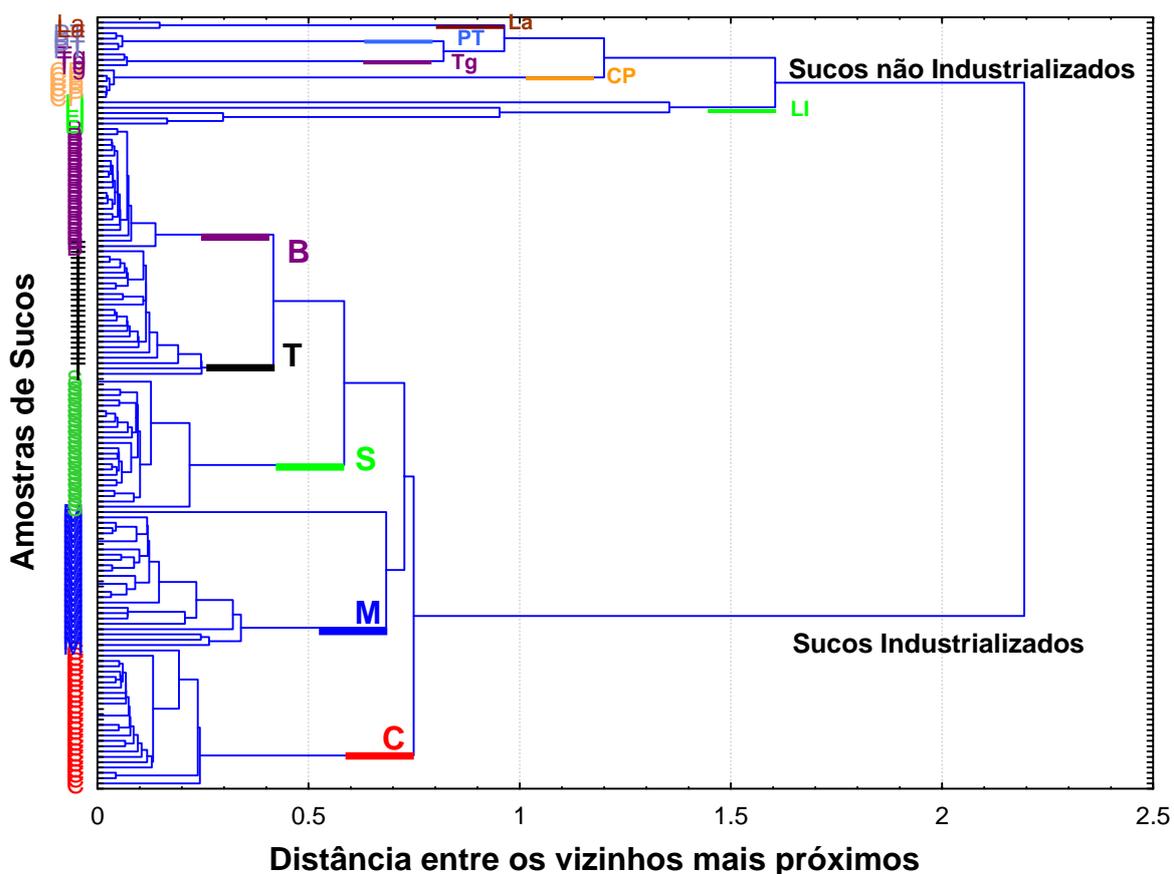


Figura 19. Dendrograma resultante do HCA das amostras dos sucos cítricos.

Observa-se na **Figura 19** a formação natural de 2 grandes agrupamentos: sucos cítricos industrializados e sucos não industrializados, a uma distância de aproximadamente 2,2. A formação deste 2 grandes agrupamentos pode ser explicada pela presença (sucos industrializados) ou ausência (sucos não industrializados) de corantes na composição dos sucos.

Como a HCA baseia-se em similaridade entre objetos, então amostras mais semelhantes são aquelas que se ligam a uma menor distância. Este fato é também observado no dendrograma (**Figura 19**) do HCA dos sucos cítricos, o qual apresenta 5 agrupamentos bem discriminados das 5 marcas de sucos cítricos industrializados (**T, M, B, C, S**) formados a uma distância de aproximadamente 0,4. Uma explicação para este fato é que as 5 marcas de sucos cítricos diferem entre si quanto a sua composição: quantidades e tipos de corantes artificiais ou naturais, bem como as quantidades de mosto de frutas cítricas (limão, laranja e tangerina) utilizadas na fabricação. Na **Tabela 6** é apresentada a composição dos sucos cítricos industrializados usados neste trabalho.

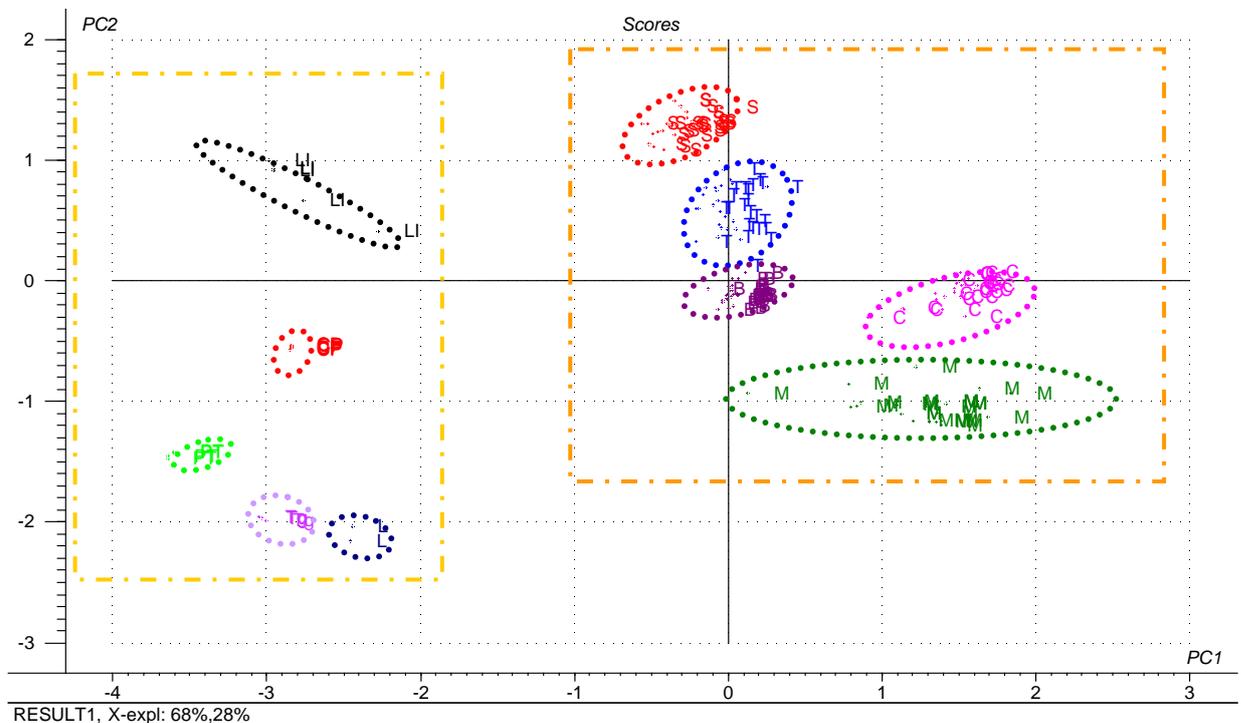
Tabela 6. Composição dos sucos cítricos industrializados que foram usados neste trabalho.

Marca do Suco Industrializado	Principais Constituintes
T	Acidulante: ácido cítrico, Vitamina C: ácido ascórbico, Corantes artificiais: amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo.
M	Acidulante: ácido cítrico, Vitamina C: ácido ascórbico, Corantes naturais: carmim de cochonilha e betacaroteno.
S	Acidulante: ácido cítrico, Vitamina C: ácido ascórbico, Corante artificial: amarelo tartrazina.
C	Acidulante: ácido cítrico, Vitamina C: ácido ascórbico, Corantes artificiais: amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo.
B	Acidulante: ácido cítrico, Vitamina C: ácido ascórbico, Corantes artificiais: amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo.

3.4.2. PCA

3.4.2.1. Modelo PCA de Todas as Classes dos Sucos

Uma maneira de visualizar similaridade e diferença entre amostras pode ser obtida usando o gráfico dos escores de PCA. O gráfico dos escores de PC1 versus PC2, resultante da PCA de todas as amostras de sucos cítricos é mostrado na **Figura 20**. Vale salientar que estas duas primeiras PC's explicam um total de 95,89 % da variância dos dados.

**Figura 20.** Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 de todas amostras de sucos cítricos.

Observa-se na **Figuras 20** que a primeira componente principal (PC1) responde pela separação de dois grandes agrupamentos: o grupo dos sucos não industrializados, que possuem *escores* mais negativos nessa componente (menor que -2) e o grupo dos sucos industrializados, com *escores* negativos próximo a zero ou positivos. Esta separação entre estes 2 grupos de sucos cítricos também foi nitidamente observada no dendrograma obtido pela HCA (**Figura 19**).

Verifica-se também no gráfico da **Figura 20** que todas as classes de sucos encontram-se bem separadas, ou seja, que praticamente não existe sobreposição entre as diferentes classes de sucos. Sendo assim, modelos PCA de cada suco podem ser construídos e depois utilizados para *screening analysis* dos sucos, usando classificação *SIMCA*.

3.4.2.2. Construção dos Modelos PCA de cada Classe do Suco

O gráfico da variância explicada *versus* o número de PCs obtido pelo modelo PCA para a classe do suco T foi construído com intuito de se escolher a dimensionalidade inerente adequada para esta classe. Este gráfico é mostrado na **Figura 21**.

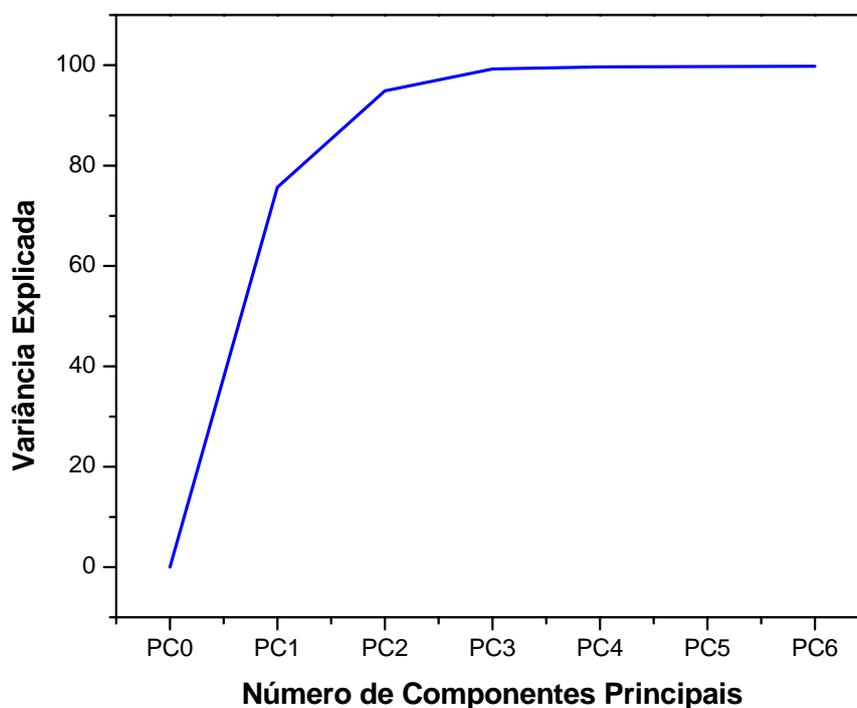


Figura 21. Gráfico da variância explicada *versus* número de PC's para a classe do suco cítrico industrializado de marca T.

Pode-se observar que, três PC's são suficientes para modelar esta classe, uma vez que elas explicam cumulativamente 99,2% da variância explicada dos dados. A PC1 é responsável por explicar 75,7% da variância dos dados, enquanto que PC2 e PC3 explicam respectivamente 19,2% e 4,3%. Vale salientar que a adição de mais PC's a este modelo pode resultar em um modelo não satisfatório para classificação SIMCA, uma vez que a inclusão indevida de componentes principais em um modelo PCA pode adicionar ruído ao modelo, além de ampliar as fronteiras da caixa multidimensional. Portanto, adotou-se como modelo ideal para classe do suco cítrico industrializado de marca **T**, aquele que utiliza as três primeiras componentes principais (PC1, PC2 e PC3).

O gráfico da variância explicada *versus* o número de PCs foi também utilizado para as demais classes dos sucos cítricos industrializados e, de maneira análoga, foi determinado o número de componentes principais mais adequado a ser utilizada para cada modelo PCA das demais classes. Na **Tabela 7** são apresentados o número de PCs adotados para os modelos PCA de cada classe de suco industrializado (**M**, **C**, **B** e **S**) bem como as variâncias cumulativas e individuais explicadas pelas PCs.

Tabela 7. Número de PCs adotados para os modelos PCA de cada classe de suco industrializado, bem como as variâncias cumulativas e individuais explicadas pelas PCs.

Modelo PCA	Nº PC's	Variância Explicada Individual (%)	Variância Explicada Cumulativa (%)
M	03	PC1→ 86,9 PC2→ 10,5 PC3→ 1,40	98,8
C	03	PC1→ 77,9 PC2→ 18,5 PC3→ 2,43	98,8
B	03	PC1→ 74,6 PC2→ 21,2 PC3→ 2,17	98,0
S	03	PC1→ 74,3 PC2→ 22,5 PC3→ 2,10	98,9

3.4.3. Screening Analysis dos Sucos Cítricos Industrializados

Na **Tabela 8** são apresentados os resultados da *screening analysis* (classificação SIMCA) das 94 amostras do conjunto de treinamento (**Tabela 4**). Nessa análise, cada modelo PCA de uma determinada classe de suco cítrico foi aplicada tanto para classificar as amostras de sua classe, como as amostras das demais classes.

Tabela 8. *Screening analysis* de todas as 144 amostras de sucos cítricos do conjunto de treinamento.

Sucos cítricos	T	M	S	C	B	Sucos cítricos	T	M	S	C	B	Sucos cítricos	T	M	S	C	B	Sucos cítricos	T	M	S	C	B						
T1	*					M1	*					S3			*				C1				*		B1				*
T2	*					M2	*					S4			*				C4				*		B2				*
T3	*					M3	*					S5			*				C6				*		B3				*
T4	*					M4	*					S6			*				C8				*		B4				*
T5	*					M5	*					S7			*				C9				*		B5				*
T7	*					M6	*					S9			*				C10				*		B8				*
T9	*					M7	*					S10			*				C11				*		B10				*
T10	*					M8	*					S11			*				C12				*		B11				*
T11	*					M10	*					S12			*				C13				*		B12				*
T12	*					M14	*					S14			*				C14				*		B14				*
T13	*					M15	*					S15			*				C15				*		B15				*
T14	*					M17	*					S16			*				C17				*		B16				*
T15	*					M18	*					S17			*				C18				*		B17				*
T16	*					M20	*					S19			*				C19				*		B19				*
T17	*					M21	*					S20			*				C21				*		B20				*
T18	*					M23	*					S21			*				C22				*		B21				*
T19	*					M24	*					S22			*				C23				*		B22				*
T20	*					M25	*					S24			*				C24				*		B23				*
T24	*					M26	*					S25			*				C26				*		-				-

• O asterisco (“*”) na tabela indica que a amostra foi classificada como pertencente a classe.

Verifica-se na **Tabela 8** que todas as amostras foram classificadas corretamente (100% de acerto) com um nível de confiança de 95%, quando os modelos PCA de T, M, C, B e S foram aplicados individualmente para classificar todas as amostras do conjunto de treinamento. Esses bons resultados são corroborados pela ótima separação obtida no gráfico dos escores de PC1 *versus* PC2 (**Figura 22**), quando o modelo PCA foi construído usando apenas as amostras do conjunto de treinamento. Neste modelo PC1 mais PC2 explicam cumulativamente 97,03 % da variância dos dados, sendo PC1 responsável por 81,99 % e PC2 por 15,04 %.

Verifica-se na **Tabela 9** que todas as amostras do conjunto de previsão foram classificadas corretamente (100% de acerto) com um nível de confiança de 95%, quando os modelos PCA de T, M, C, B e S foram aplicados para todas as amostras de sucos cítricos.

Para avaliar a previsão obtida na **Tabela 9**, resolveu-se, então, construir um modelo PCA usando as amostras de treinamento e previsão da classe T (amostras **Tc** e **Tp** da **Tabela 4** e **5**) e todas as demais amostras do conjunto de previsão. O gráfico dos escores de PC1 versus PC2 dessa PCA é mostrado na **Figura 23**.

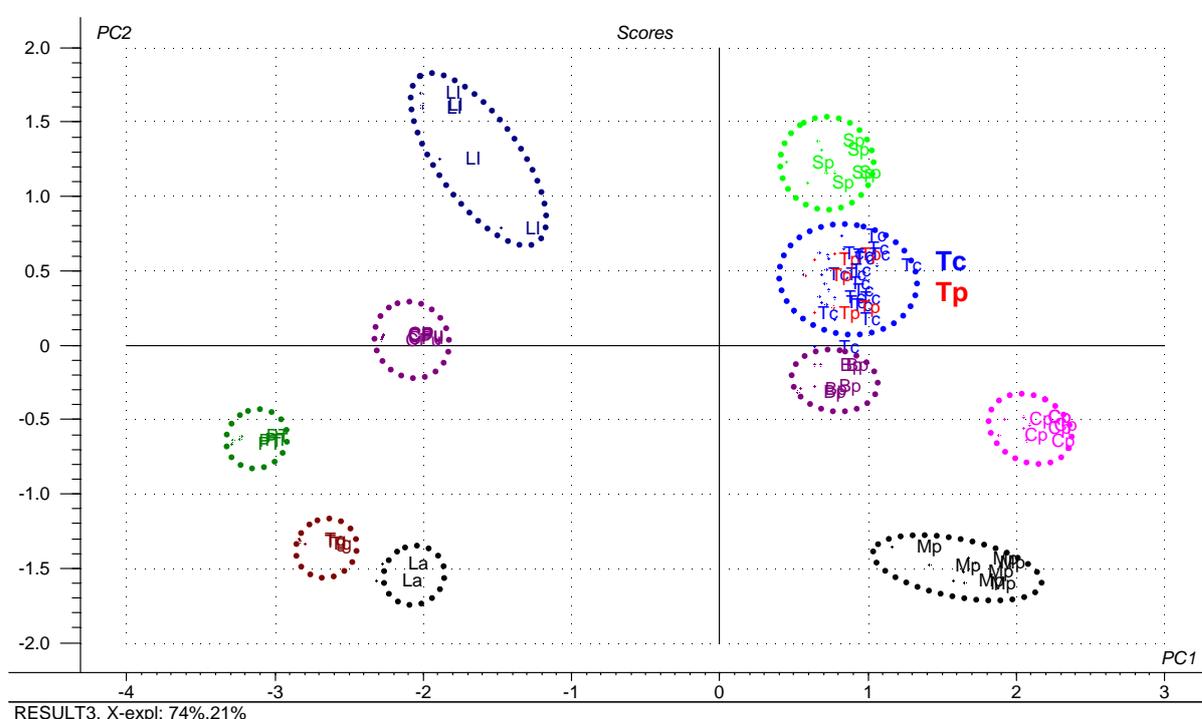


Figura 23. Gráfico dos escores da PCA construída usando as amostras de treinamento e previsão da classe T (amostras **Tc** e **Tp**) e todas as demais amostras do conjunto de previsão.

Observa-se na **Figura 23** que as amostras dos sucos cítricos da marca T, se encontram agrupadas (**Tc** e **Tp**) e bem separadas das outras amostras de sucos cítricos. Isto vem validar a *screening analysis* realizada nestas amostras de previsão externa, confirmando, como esperado, que as amostras **Tp** pertencem realmente a classe T, como as amostras **Tc** do conjunto de treinamento.

Usando esta mesma metodologia para as demais classes (**Bc** e **Bp**, **Mc** e **Mp**, **Cc** e **Cp** e **Sc** e **Sp**) idêntica validação foi também obtida, como pode ser verificado na **Figura 24a** a **24d**.

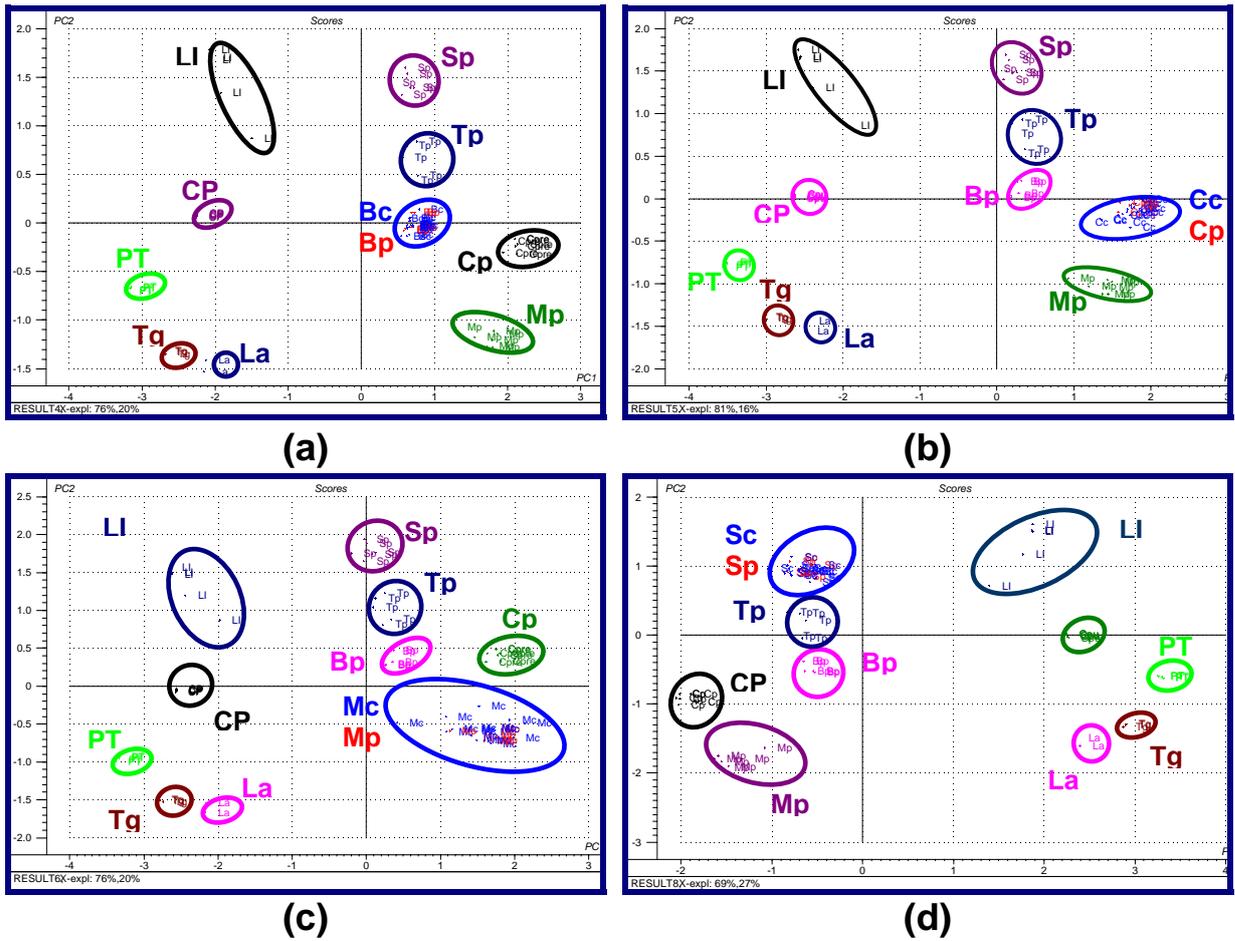


Figura 24. Gráfico dos escores da PCA construída usando as amostras de treinamento e previsão da (a) classe **B** (amostras **Bc** e **Bp**); (b) classe **C** (amostras **Cc** e **Cp**); (c) classe **M** (amostras **Mc** e **Mp**); (d) classe **S** (amostras **Sc** e **Sp**) e todas as demais amostras do conjunto de previsão.

CAPÍTULO 4

“Uma caminhada de mil quilômetros começa com o primeiro passo”.
(Provérbio Chinês)

4. CONCLUSÃO

O uso do analisador em fluxo-batelada, da espectrometria UV-VIS e de métodos quimiométricos mostrou-se bastante satisfatório para *screening analysis* de sucos cítricos industrializados.

O analisador em fluxo-batelada com bomba de aquário desenvolvido se mostrou bastante satisfatório para *screening analysis* automática de sucos cítricos. Os custos inerentes ao desenvolvimento dos outros analisadores em fluxo-batelada encontrados na literatura^[39-49] foram agora minimizados, uma vez que as bombas de aquário são muito mais acessíveis e baratas (cerca de \approx R\$ 5.00 a 10.00) do que as bombas peristálticas (custam \sim US\$ 1.500), geralmente empregadas para impulsionar os fluidos, tanto nos analisadores em fluxo-batelada, como nos demais analisadores em fluxo.

Uma análise exploratória utilizando HCA e PCA com todas as amostras de sucos industrializados e não industrializados foram realizadas, e com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que tanto o dendograma (obtido pela HCA), como o gráfico dos escores (obtido pela PCA) mostraram boa discriminação entre as classes de sucos, industrializados e não industrializados.

Na elaboração dos modelos de classificação usando um conjunto de treinamento com 94 amostras de sucos cítricos, pode-se comprovar a capacidade do método de classificar corretamente 100% das amostras de sucos cítricos em um nível de confiança de 95%. Além do mais, no espaço PCA de todas as amostras foi possível verificar que não houve nenhuma sobreposição entre as classes.

Conclui-se, então, que a metodologia proposta pode ser usada como uma ferramenta útil e eficiente para fins de *screening analysis* de amostras de sucos industrializados que eventualmente se enquadrem em uma das cinco classes modeladas. A metodologia é simples e o sistema é fisicamente robusto, versátil, proporciona alta frequência analítica, baixo custo de manutenção e operação além de apresentar o caráter de multi-propósito.

4.1. Propostas Futuras

Pretende-se, como continuidade deste trabalho, realizar, por exemplo, as seguintes propostas:

1. *Otimização do analisador em fluxo-batelada com bomba de aquário, controlando parâmetros como vazão e a pressão interna.*
2. *Estudo cinético da fotodegradação de corantes presentes em sucos cítricos industrializados e aplicação de técnicas quimiométricas de ordem superior (PARAFAC)^[79] para sua quantificação.*
3. *Melhorar a robustez do modelo empregando técnicas de seleção de variáveis (APS)^[80]*
4. *Desenvolvimento de um fotômetro com LED's com baixo valor instrumental para "Screening Analysis" de sucos cítricos industrializados.*
5. *Aplicação desta metodologia a outros tipos de amostras e/ou outros tipos de instrumentação analítica e a extensão dessas análises para o reconhecimento e identificação de possíveis adulterantes.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**“Não é força e sim a perseverança que realiza grandes coisas”
(S. Johnson)**

1. <http://www.abecitrus.com.br> (acessado no dia 28/03/2006)
2. Latado, R.R., Neto, A.T., Ando, A., .lemma, A.F., Junior, J.P., Figueiredo, J.O., Pio, R.M., Machado, M.A.; Namekata, T., Ceravolo, L., Rossi, A.C. *Mutantes de Laranja – Pêra com número reduzido de sementes, obtidos através de mutações induzidas*. Rev. Bras. Frutic 23 (2001) 339-344.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 544, de 16 de Novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Preparado Sólido para Refresco. Disponível em: http://www.engetecno.com.br/legislacao/beb_rtfiq_prep_solid_refresco.htm
Acesso em: 04/09/2006.
4. Eagerman, B.A., Rouse, A.H. *Heat inactivation temperature-time relationships for pectinesterase inactivation in citrus juices*. Journal of Food Science. 41 (1976) 1396-1397.
5. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm (acessado em Setembro de 2006)
6. Lima, V.L.A.G., Melo, E.A., Lima, L.S. Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) B. Ceppa 18 (2000) 95.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 371 de 19 de setembro de 1974. Complementa padrões de identidade e qualidade para suco de laranja. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19 de setembro de 1974.
8. Rodriguez-Saona, L.E., Fry, F.S., McLaughlin, M.A., Calvey, E.M. *Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy*. Carbohydrate Research, 336 (2001) 63-74.
9. Braga, J.W., B. Poppi, R.J. *Comparison of variance sources and confidence limits in two PLSR models for determination of the polymorphic purity of*

- carbamazepine*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 80 (2006) 50 – 56.
10. Ferreira, E.C., Rodrigues, S.H.B.G., Ferreira, M.M.C., Nóbrega, J.A., Nogueira, A.R. *A Exploratory analysis of inorganic constitution contents in grape juices and soft drinks*. *Eclética Quím.*, 27 nº especial (2002).
 11. Soares, L.M.V., Shishido, K., Moraes, A.M.M., Moreira, V.A. *Composição Mineral de Sucos concentrados de Frutas Brasileiras*. *Ci. Tecnol. Aliment.* 24 (2004) 202 – 206.
 12. Topuz, S., Ozahan, G., Alpertunga, B. *Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD*. *Food Control*, 16 (2005) 87-92.
 13. Ibarz, A., Pagán, J., Panadés, R., Garza, S. *Photochemical destruction of color compounds in fruit juices*. *Journal of Food Engineering* 69 (2005) 155-160.
 14. del Campo, G., Berregi, I., Caracena, R., Santos, J.I. *Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 462-468.
 15. Al-holy, M.A., Lin, M., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. *The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate Escherichia coli O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice*. *Food Microbiology* 23 (2006) 162-168.
 16. Burdurlu, H.S., Koca, N., Karadeniz, F. *Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage*. *Journal of Food Engineering* 74 (2006) 211-216.
 17. Gómez-Ariza, J.L., Villegas-Portero, M.J., Bernal-Daza, V. *Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC-MS/MS for authenticity assessment*. *Analytica Chimica Acta* 540 (2005) 221–230.
 18. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª edição, editora Bookman, 2002.
 19. Harris, D.C., Bonapace, J.A.P., Barcia, O.E. *Análise Química Quantitativa*. 6ª edição, editora LTC, 2005.
 20. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª edição, editora Thomson Learning, 2005.

21. Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C., *Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos*. 5ª edição Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.
22. Rodriguez, A.M.G., Torres, A.G., Cano Pavon, J.M., Bosch Ojeda, C. *Simultaneous determination of iron, cobalt, nickel and copper by UV-visible spectrophotometry with multivariate calibration*. *Talanta* 47 (1998) 463-470.
23. Kellner, R., Mermet, J. M., Otto. M., Widner, H. M. (Eds), *Analytical chemistry*, New York: *John Wiley-VCH*, 1998.
24. Valcárcel, M. - *Principios de química analítica*, Madrid: *Springer-Verlag Iberica*, 1999.
25. Medeiros, V.M., Araújo, M.C.U., Galvão, R.K.H., Silva, E.C., Saldanha, T.C.B., Toscano, I.A.S., Oliveira, M.S.R., Freitas, S.K.B., Neto, M.M. *Screening analysis of river seston downstream of an effluent discharge point using near-infrared reflectance spectrometry and wavelet-based spectral region selection*. *Water Research* 39 (2005) 3089-3097.
26. Pulido, A., Ruisánchez, I., Bóque, R., Rius, F.X. *Uncertainty of Results in routine qualitative analysis*. *Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 647-654.
27. Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, F.X. *Valisation in Qualitative Analytical Methods*. *Trends in Analytical Chemistry* 24 (2004) 137-145.
28. Valcarcel, M., Cáardenas, S., Gallego, M. *Sample Screening in Analytical Chemistry*. *Trends in Analytical Chemistry* 18 (1999) 685-694.
29. Song, R., Schelcht, P.C., Ashley, K. *Field screening test Methods: Performance criteria and performance characteristics*. *Journal of Hazardous Materials* 83 (2001) 29-39.
30. Pulido, A., Ruisánchez, I., Bóque, R., Rius, F.X. *Estimating the Uncertainty of binary test results to assess their compliance with regulatory limits*. *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 267-275.
31. Rios, A., Barcelo, D., Buydens, L., Cardenas, S., Heydorn, K., Karlber, B., Klemm, K., Lendl, B., Milman, B., Neidhart, B., Stephany, R.W., Townshend, A., Zschunke, A., Valcárcel, M. *Quality assurance of qualitative analysis in the*

- framework of the European Project "MEQUALAN". Accreditation and Quality Assurance 8 (2003) 68-77.*
32. Inden, W.E.V. *Classification and Definition of Analytical Methods Based on Flowing Media*, International Union of Pure and Applied Chemistry, 66 (1994) 2493..
33. Zagatto, E.A.G., Standen, J.F.V., Miniasso, N., Stefan, R.I., Marshall, G.D. Information essential for characterizing a flow-based analytical system, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 74(2002) 585.
34. Ruzicka, J., Hansen, E.H. *Flow injection analysis. part I. a new concept of fast continuous flow analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 781 (1975) 145.
35. Ruzicka, J., Hansen, E.H. *Flow injection analysis*. 2^a.ed. New York: John Wiley, 1988.
36. Pasquini, C., Oliveira, W.A. *Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia and phosphorus*. *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 2575.
37. Ruzicka, J., Marshall, G. D. *Sequential injection - A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*, *Analytica Chimica Acta*, 237 (1990) 329.
38. Reis, B. F., Giné, M. F., Zagatto, E. A. G., Lima, J. L. F. C., Lapa, R. A. *Multicommutation in flow analysis. Part1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digests*, *Analytica Chimica Acta*, 293 (1994) 29.
39. Honorato, R.S., Araújo, M.C.U., Lima, R.A.C., Zagatto, E.A.G., Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C. *A flow-batch titrator exploiting an one-dimensional optimisation algorithm for end point search*. *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 91-97.
40. Honorato, R.S., Zagatto, E.A.G., Lima, R.A.C., Araujo, M.C.U. *Prior assay as an approach to flow titrations. Spectrophotometric determination of iron in alloys and ores*, *Analytica Chimica Acta*, 416 (2000) 231.
41. Medeiros, E.P., Nascimento, E.C.L., Medeiros, A.C.D., Neto, J.G.V., Silva, E.C., Araújo, M.C.U. *Multicommutated generation of concentration gradients in*

- a Flow- Batch system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs*, *Analytica Chimica Acta*, 511(2004)113.
42. Honorato, R.S., Carneiro, J.M.T., Zagatto, E.A.G. *Spectrophotometric Flow-Batch determination of aluminum in plant tissues exploiting a feedback mechanism*, *Analytica Chimica Acta*, 441(2001) 309.
43. Carneiro, J.M.T., Honorato, R.S., Zagatto, E.A.G. *Individual sample conditioning in flow analysis. Determination of N-total in plant materials*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368 (2000) 496.
44. Carneiro, J.M.T., Dias, A.C.B., Zagatto, E.A.G., Honorato, R.S. *Spectrophotometric catalytic determination of Fe(III) in estuarine waters using a Flow- Batch system*, *Analytica Chimica Acta*, 455(2002) 327.
45. Almeida, L.F., Martins, V.L., Silva, E. C., Moreira, P. N. T., Araujo, M.C.U. *An automatic Flow- Batch standard-addition method for sodium determination in alcohol fuel by flame photometry*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2003) 249.
46. Almeida, L.F., Martins, V.L., Silva, E.C., Moreira, P.N.T., Araujo, M.C.U. *Implementation of an automatic standard addition method in a Flow- Batch system: application to copper determination in an alcoholic beverage by atomic absorption spectrometry*, *Analytica Chimica Acta*, 486 (2003)143.
47. Visani, V. *Um sistema automático Flow-Batch para determinação espectrométrica simultânea de metais em polivitamínicos usando calibração multivariada*. João Pessoa, Programa de Pós-graduação em Química, UFPB, 2002, Dissertação de Mestrado.
48. Formiga, F.M., Medeiros, E.P., Neto, J.G.V., Gaião, E.N., Silva, E.C., Araújo, M.C.U. *Um turbidímetro/nefelômetro de fluxo acoplado a um sistema Fluxo Batelada para "Screening Analysis" automática de cátions em medicamentos*, *Controle & Instrumentação*, 83 (2003) 65.
49. Lima, R.A.C., Santos, S.R.B., Costa, R.S., Marcone, G.P.S., Honorato, R.S., Nascimento, V.B., Araújo, M.C.U. *Hardness screening of water using a flow-batch photometric system*. *Anal. Chim. Acta*, 518 (2004) 25.

50. Grudpan, K., Taylor, C., Sitter, H., Keller, C. *Flow injection analysis using an aquarium air pump*. Fresenius J. Anal. Chem. 346 (1993) 882-884.
51. Augelli, M.A., Nascimento, V.B., Pedrotti, J.J., Gutz, I.G.R., Angnes, L. *Flow-through Cell Based on an Array of Gold Microelectrodes Obtained From Modified Integrated Circuit Chips*. Analyst, 122 (1997) 843-847.
52. Matos, R.C., Augelli, M.A., Pedrotti, J.J., Lago, C.L., Angnes, L. *Amperometric Differential Determination of Ascorbic Acid in Beverages and Vitamin C Tablets Using a Flow Cell Containing an Array of Gold Microelectrodes Modified with Palladium*. Electroanalysis 10 (1998) 1.
53. Matos, R.C., Augelli, M.A., Pedrotti, J.J., Lago, C.L., Angnes, L. *Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium*. Anal. Chim. Acta 404 (2000) 151-157.
54. Richter, E.M., Kume, G.H., Augelli, M.A., Angnes, L., Mercury as a Global Pollutant, 5th Intern. Conf., May 23-28, 1999, Rio de Janeiro, Brazil. Book of abstracts - pag 6.
55. Richter, E.M., Augelli, M.A., Kume, G.H., Mioshi, R., Angnes, L. *Gold electrodes from recordable CDs for mercury quantification by flow injection analysis*. Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 444-448.
56. Christian, G.D. *Novel flow injection analysis systems for drug analysis*. J. Pharm. Biom. Anal. 10 (1992) 769-773.
57. Chaniotakis, N.A., Tsagatakis, J.K., Moschou, E.A., West, S.J., Wen, X.W. *Magnesium ion-selective electrode: optimization and flow injection analysis application*. Anal. Chim. Acta 356 (1997) 105-111.
58. Albertus, F., Horstkotte, B., Cladera, A., Cerda, V. *A robust multisyringe system for process flow analysis. Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes*. Analyst 124 (1999) 1373.
59. Matos, R.C., Gutz, I.G.R., Angnes, L., Fontenele, R.S., Pedrotti, J.J. *Propulsor Pneumático Versátil E Isento De Pulsação Para Sistemas De Análise Em Fluxo*. Quím. Nova 24 (2001) 795-798.

60. Weeks, D.A., Johnson, K.S. *Solenoid Pumps for Flow Injection Analysis*. Anal. Chem. 68 (2000) 2717-2719.
61. Wang, R.Y., Jarrat, J.A., Keay, P.J., Hawkes, J.J., Coakley, W.T. *Development of an automated on-line analysis system using flow injection, ultrasound filtration and CCD detection*. Talanta 52 (2000) 129-139.
62. Manganiello, L., Rios, A., Valcarcel, M.A. *Method for Screening Total mercury in water using a flow injection system with piezoelectric detection*. Analytical Chemistry 74 (2002) 921-925.
63. Gonzalez, M., Gallego, M., Valcarcel, M. *Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods*. Anal. Chim. Acta 464 (2002) 237-247.
64. Valcarcel, M., Cardenas, S., Gallego, M. *Continuous flow systems for rapid sample Screening*. Trends in analytical chemistry 21 (2002).
65. Valcarcel, M., Cardenas, S., Gallego, M. *Fast urinary screening for paracetamol using on-line microwave assisted hydrolysis and spectrophotometric detection*. Analyst, 125 (2002) 1179-1183.
66. Gambart, D., Cardenas, S., Gallego, M., Valcarcel, M. *An automated screening system for benzodiazepines in human urine*. Anal. Chim. Acta, 366 (1998) 93-102.
67. Nascentes, C.C., Cardenas, S., Gallego, M., Valcarcel, M. *Continuous photometric method for the screening of human urines for phenothiazines*. Anal. Chim. Acta 462 (2002) 275-281.
68. Romberg, B., Muller, H. *Photometric screening-test for heavy metals under flow injection conditions using extractive determination with dithizone*. Anal. Chim. Acta, 353 (1997) 165-172.
69. Beeb, K.R., Pell, R.J., Seasholtz, M.B., *Chemometrics A Practical Guide*. John Wiley & Sons, New York, 1998.
70. Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, S.J., Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Parte B*, Elsevier, Amsterdam, 1997.

71. Brereton, R.G. Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant. Ed. Wiley. University of Bristol, UK, 2003.
72. Capella-Peiró, M.E., Bossi, A., Esteve-Romero, J. *Optimization by factorial design of a capillary zone electrophoresis method for the simultaneous separation of antihistamines*. Analytical Biochemistry 352 (2006) 41-49.
73. Urabano, M., Luque de Castro, M.D., Pérez, P.M., García-Olmo, J., Gómez-Nieto, M.A. *Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines*. Food Chemistry 97 (2006) 166-175.
74. Ni, Y., Qi, Z., Kokot, S. *Simultaneous ultraviolet-spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 82 (2006) 241-247.
75. Hair, Jr., et al. *Análise Multivariada de Dados*, tradução da 5ª edição, Porto Alegre, editora Bookman, 2005, 593p.
76. Wold, S. *Principal Component Analysis*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2 (1987) 37.
77. Morgano, M.A., Queiroz, S.C.N., Ferreira, M.M.C. *Application of Exploratory Analysis to the Differentiation of Vegetables*. Brazilian Journal of food technology 2 (1999) 73-79.
78. Branden, K.V., Hubert, M. *Robust classification in high dimensions based on the SIMCA Method*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 79 (2005) 10-21.
79. Sena, M.M., Trevisan, M.G., Poppi, R.J.. *PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados Multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma Humano por espectrofluorimetria*. Quim. Nova 28 (2005) 910-920.
80. Filho, H.A.D., Galvão, R.K.H., Araújo, M.C.U., Silva, E.C., Saldanha, T.C.B., José, G.E., Pasquini, C., Júnior, I.M.R., Rohwedder, J.J. R. *A strategy for selecting calibration samples for multivariate modelling*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 72 (2004) 83– 91.

