Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Escola de Química e Alimentos

Engenharia Agroindustrial

ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA DETECÇÃO E MONITORAMENTO DE CAROTENOIDES EM POLPA DE *Bunchosia glandulifera*

Débora Gonçalves Carvalho

2018

ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA DETECÇÃO E MONITORAMENTO DE CAROTENOIDES EM POLPA DE *Bunchosia glandulifera*

Débora Gonçalves Carvalho

Projeto de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como parte dos requisitos necessários à Graduação em Engenharia Agroindustrial – Agroquímica

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Juliana da Silveira Espindola - FURG
Co-orientador: Me. Juliano Antônio Sebben - UFRGS

Santo Antônio da Patrulha
2018

RESUMO

A detecção e monitoramento do conteúdo de carotenoides em alimentos se torna cada vez mais importante visto que estes compostos apresentam potencial bioativo. As técnicas geralmente utilizadas para a quantificação dos carotenoides são técnicas destrutivas, que utilizam solventes, e demandam tempo de análise. Na busca por técnicas que tenham resposta rápida, sem a necessidade de um preparo da amostra e a redução da utilização de solventes, tem sido investigada a Espectroscopia Raman. Assim, este trabalho tem como objetivo o estudo da viabilidade de aplicação da Espectroscopia Raman, aliada a ferramentas quimiométricas para a análise de dados, para detecção de carotenoides em amostras de polpa da *Bunchosia glandulifera.* Afim de monitorar o comportamento dos carotenoides totais, as amostras de polpa foram submetidas à uma secagem, de modo a provocar a alteração do teor de carotenoides totais pelo processo de degradação térmica desses compostos. Inicialmente a polpa foi seca nas temperaturas de 65ºC e 85ºC nos tempos 10, 20, 30, 100, 220, 280 e 400 min; e analisada através de metodologia convencional para determinação do teor de carotenoides presente em cada amostra; após essa mesma amostra foi analisada através da Espectroscopia Raman e os dados espectrais foram analisados através da Análise por Componentes Principais (PCA). Através da PCA foi possível visualizar a formação de agrupamentos separando as amostras de acordo com o tempo de secagem, verificando a aplicabilidade da técnica Raman para determinação da concentração de carotenoides totais. Por fim, foi realizada a análise de correlação entre as metodologias, através das informações obtidas os melhores coeficientes de determinação encontrados foram 0,96 no número de onda 1000 cm^{-1} para a amostra seca a 85ºC, para as amostras homogeneizadas com o padrão interno as melhores correlações encontradas foram 0,95 e 0,99 no número de onda 1510cm^{-1} para amostras secas a 85ºC e 65ºC respectivamente. Verificou-se que a espetroscopia Raman apresenta potencialidade para detecção e monitoramentos do conteúdo de carotenoides em *Bunchosia glandulifera.*

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

ABSTRACT

The detection and monitoring of carotenoids content becomes increasingly important as these compounds present bioactive potential. The techniques generally used for the quantification of carotenoids are destructive, since they comprise a series of sample manipulation, involving the use of solvents for sample preparation and require long time for analysis. Raman Spectroscopy has been investigated for carotenoid characterization and quantification, since it is a fast technique that does not require sample preparation, which reduces the use of solvents. In this work, the viability of application of Raman Spectroscopy, together with chemometric tools for data analysis, is evaluated for detection of carotenoids in pulp samples of *Bunchosia glandulifera*. In order to measure the behavior of the total carotenoids, the pulp samples were submitted to drying to cause a change in the total carotenoid content trough the process of thermal degradation of carotenoids. Initially, the pulp was dried at temperatures of 65 °C and 85 °C at 10, 20, 30, 100, 220, 280 and 400 min; and analyzed by conventional methodology to determine the content of carotenoids present in each sample; After that, each sample was analyzed by Ramana Spectroscopy and the obtained spectrum were analyzed through Principal Component Analysis (PCA). Through the PCA it was possible to identify the formation of segregating clusters according to the drying time, verifying an application of the Raman technique to determine the total carotenoid concentration. Finally, data analysis was performed to check the existence of correlation between the methodologies. The results show the coefficient of determination of 0.96 at the wave number of 1000 cm^{-1} for the data obtained from the 85°C dried samples. The samples homogenized with the internal standard (TiO_2) presented best correlations at 1510cm^{-1}, for both, 85ºC and 65ºC dried samples. The R^2 was 0.95 and 0.99, respectively. The results show that Raman spectroscopy presents potential for the detection and monitoring of carotenoid content in *Bunchosia glandulifera*.

Keywords: Carotenoids, Raman Spectroscopy, *Bunchosia glandulifera*, chemometrics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 5
2. OBJETIVO 7
2.1 Objetivo geral 7
2.2 Objetivos específicos 7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 8
3.1 Carotenoides 8
3.2 *Bunchosia glandulifera* 9
3.3 Métodos de análise 10
3.3.1 Espectroscopia Raman 10
3.3.2 Instrumentação 11
3.4 Quimiometria 12
3.4.1 Análise por componentes principais (PCA) 12
3.5 Aplicação de Raman na caracterização de alimentos 13
4. METODOLOGIA 15
4.1 Amostra 15
4.2 Quantificação de carotenoides 15
4.3 Caracterização através da Espectroscopia Raman 16
4.3.1 Preparo da amostra 16
4.3.2 Espectroscopia Raman 16
4.3.3 Análise por componente Principal (PCA) 17
4.3.4 Correlação dos dados obtidos através dos espectros Raman e as informações determinadas pelo método convencional. 17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 18
5.1 Preparo da amostra e quantificação de carotenoides por metodologia convencional 18
5.2 Análise no Espectrômetro Raman 19
5.3 Análise de componentes principais 22
5.4 Correlação entre a Espectroscopia Raman e metodologia convencional 25
6. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS 30
REFERÊNCIAS 31
APÊNDICE A 34

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumidor tem buscado alimentos saudáveis que proporcionem uma melhor qualidade de vida. Com essa procura, a demanda por alimentos funcionais vem aumentando, como é o caso do consumo de produtos que contenham compostos bioativos, entre eles os carotenoides. Os carotenoides são pigmentos encontrados na natureza, responsáveis pela coloração de diversas frutas e vegetais. Apresentam também grande importância na dieta humana devido a sua ação antioxidante e por serem precursores da vitamina A. Estudos revelam que o β-caroteno é o carotenoide mais encontrado em alimentos de origem vegetal e o licopeno é o que apresenta maior potencial antioxidante, reduzindo o risco de doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiovasculares (RODRIGUEZ, 1993; AGARWAL; RAO, 2000).

Com a demanda por alimentos funcionais, surge a necessidade de determinar e quantificar os carotenoides. As técnicas convencionais utilizadas para quantificação de carotenoides são de natureza destrutiva, pois a amostra sofre alterações físicas e químicas, não podendo ser reutilizada. O processo envolve amostragem e pré-tratamento de amostras, extração e partição utilizando solventes orgânicos (RODRIGUEZ; KIMURA, 2004). Resultando na geração de resíduos, causando impactos para o ambiente, além de demandarem tempo de análise (ALMEIDA, 2015).

Diante do exposto, vem-se buscando metodologias alternativas para quantificação de carotenoides, que não sejam destrutivas e que agreguem a redução do uso de solventes, sendo econômica e ambientalmente viáveis, com uma resposta rápida para o processo. Nesse contexto, a Espectroscopia Raman vem sendo investigada para aplicações em análises qualitativas e quantitativas em sistemas inorgânicos, orgânicos e biológicos (SGOOK; HOLLER; CROUCH, 2009). Esta técnica se baseia na radiação espalhada, tendo como vantagens a utilização de uma quantidade mínima de amostra, a não necessidade de preparo da amostra, além de não ser destrutiva, possibilitando obter informações químicas e estruturais da amostra. No que tange à quantificação de compostos, a Espectroscopia Raman pode ser aliada a ferramentas quimiométricas para a obtenção de resultados confiáveis (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012).

Neste trabalho a amostra utilizada para a análise será a polpa da *Bunchosia glandulifera.* A *Bunchosia glandulifera* ou falso guaraná, como é comumente conhecida, é um arbusto originário da América do Sul que apresenta polpa vermelha e é consumida na

cidade de Santo Antônio da Patrulha. Segundo Silva et al. (2016) a polpa possui carotenoides em abundância, apresentando potencial bioativo. Assim, o trabalho tem por finalidade identificar a viabilidade de detecção e monitoramento de carotenoides pela Espectroscopia Raman na polpa da *Bunchosia glandulifera*.

Este trabalho está dividido em seções. Na seção 2 será apresentado o objetivo geral e específico do trabalho, em seguida, na seção 3, será apresentado a revisão teórica abrangendo definições e informações sobre métodos, ferramentas e amostra utilizada. Na seção 4 será dissertado sobre as metodologias empregadas no trabalho e, por fim, serão apresentados os resultados e sugestões para trabalhos futuros nas seções 5 e 6, respectivamente.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo verificar a viabilidade da aplicação da Espectroscopia Raman para a detecção e monitoramento de carotenoides da *Bunchosia glandulifera*.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificação de carotenoides da polpa da *Bunchosia glandulifera* através de metodologia convencional (Amaya-Rodriguez (2001): extração-partição; espectrofotometria visível);
- Caracterização da *Bunchosia glandulifera* através da espectroscopia Raman;
- Análise de dados do Raman utilizando ferramenta quimiométrica - Análise por Componentes Principais (PCA);
- Correlação dos dados obtidos através dos espectros Raman e pelo método convencional.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

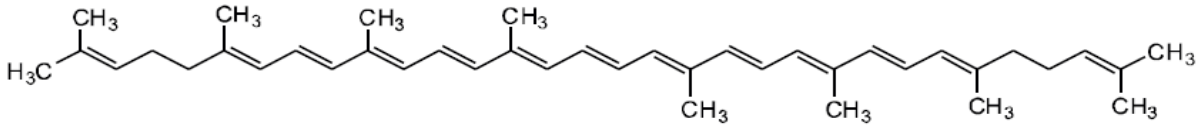
3.1 Carotenoides

Os carotenoides são tetraterpenoides compostos por 40 carbonos, que apresentam de 3 a 15 ligações duplas conjugadas, constituindo o cromóforo que fornece o espectro de absorção da cor (RODRIGUEZ, 2001). São pigmentos encontrados na natureza, com mais de 600 carotenoides já detectados. Eles são responsáveis pela coloração de diversas frutas e vegetais abrangendo a coloração do amarelo ao vermelho, são compostos que apresentam potencial bioativo, sendo associado a alimentos funcionais por apresentarem atividade antioxidante e também serem precursor da vitamina A (retinol), podendo assim reduzir o risco de doenças crônicas (COSTA et al., 2010).

São classificados em dois grupos: os hidrocarbonetos, chamados de carotenos; e as xantofilas que possuem na sua estrutura o oxigênio, além de carbono e hidrogênio. Esses compostos são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como acetona, hexano, éter, entre outros solventes. Os carotenoides sofrem isomerização quando expostos ao calor e a luz, ocorrendo uma transformação da estrutura *trans* para *cis*, o que resulta na perda da cor e de atividades biológicas (RODRIGUEZ, 2001).

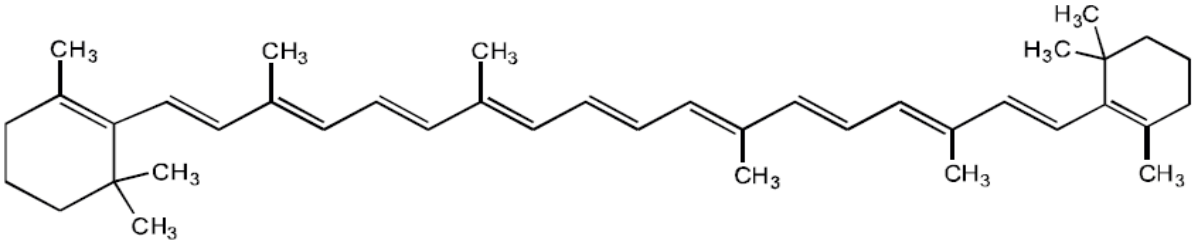
O licopeno (Figura 1) é um carotenoide de cor avermelhada, que vem sendo apontado em estudos como preventivo da carcinogênese, por proteger moléculas como lipídios e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) de radicais livres, já o β-caroteno (Figura 2), está relacionado à capacidade de formar vitamina A dentro do corpo humano (AGARWAL; RAO, 2000).

Figura 1. Estrutura química do licopeno.



Fonte: CORRÊA et al., 2015.

Figura 2. Estrutura química do β-caroteno.



Fonte: CORRÊA et al., 2015.

3.2 *Bunchosia glandulifera*

A espécie *Bunchosia glandulifera* (Figura 3), popularmente conhecida como “Falso Guaraná” ou “Cafezinho”, é nativa da América do Sul e pertence à família *Malpighiaceae*, é um arbusto, com casca acastanhada e estrias verticais, folhas simples, possui frutos elipsoides com 2 cm de comprimento com mesocarpo carnoso e comestível (ANDERSON, 2002; SOUZA; PEIXOTO; TOLEDO, 1995). *Malpighiaceae* é uma família de árvores, arbustos, subarbustos e cipós com aproximadamente 75 gêneros e cerca de 1300 espécies (ANDERSON; ANDERSON; DAVIS, 2006).

Figura 3. Frutos da *Bunchosia glandulifera*

Fonte: Próprio autor, 2017.

O fruto da *Bunchosia glandulifera* apresenta polpa com coloração vermelha quando madura e possui semente. A polpa é consumida por habitantes na cidade de Santo Antônio da Patrulha na forma de suco ou *in natura*. A semente também é consumida após ser torrada, de forma semelhante ao consumo de guaraná em pó. Segundo Silva et al. (2016) a polpa da *Bunchosia glandulifera* apresenta altos teores de compostos fenólicos, carotenoides e cafeína; alguns flavonoides já foram identificados na polpa como a vitexina, rutina e quercetina sendo a rutina representante de 56,3 % dos flavonoides presentes na espécie.

3.3 Métodos de análise

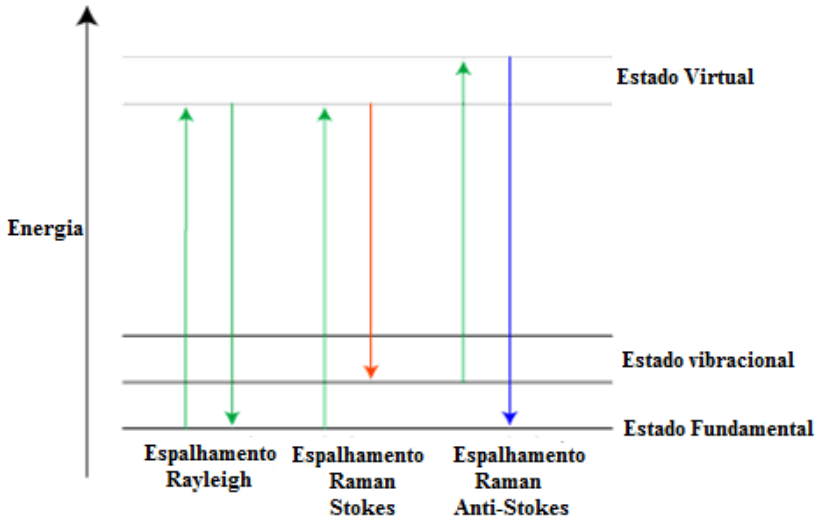
As técnicas geralmente utilizadas para determinação e quantificação de diversos compostos são realizadas através da extração com solventes, utilizando procedimentos volumétricos, sendo métodos que requerem tempo de análise. No inicio do século XX, começou a exploração de métodos alternativos para a quantificação de compostos, assim passou-se a investigar técnicas que utilizam condutividade da amostra, potencial de eletrodo, absorção; emissão ou espalhamento de radiação, surgindo os métodos instrumentais de análise que tem como objetivo principal a resposta rápida de análise (SGOOK; HOLLER; CROUCH, 2009). As técnicas espectroscópicas analisam a interação da radiação eletromagnética com a amostra, são técnicas não destrutivas, com nenhum ou mínimo preparo da amostra, permitem a obtenção de uma ampla gama de informações da amostra em um curto período de tempo (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012).

3.3.1 Espectroscopia Raman

O efeito Raman foi descoberto em 1928, pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman. O físico Raman descobriu que ao incidir uma fonte monocromática em uma molécula, a radiação espalhada tem comprimento de onda diferente do feixe incidente. A diferença observada entre a radiação incidente e espalhada resulta da interação da luz com as moléculas da amostra, onde as estruturas químicas das moléculas determinam o espalhamento através da vibração das ligações moleculares (SGOOK; HOLLER; CROUCH, 2009).

O espalhamento pode ocorrer de forma elástica e inelástica. Na Figura 4 é possível observar os tipos de espalhamentos, o espalhamento elástico é chamado de Rayleigh, neste caso a radiação espalhada e o feixe incidente têm a mesma frequência. Uma pequena parte da radiação é espalhada inelasticamente, quando uma molécula é excitada do seu estado fundamental para um estado virtual, podendo absorver um fóton e emitir um fóton de energia, neste caso a radiação espalhada é de freqüência inferior que a incidente e é chamada de espalhamento Stokes. A molécula também pode estar em um nível vibracional mais elevado, neste caso a radiação espalhada com freqüência maior que a fonte de excitação é chamada de espalhamento anti-stokes (SGOOK; HOLLER; CROUCH, 2009; LI et al., 2014).

Figura 4. Origens do Espalhamento Rayleigh e Raman.



Fonte: SANDEMAN et al., 2015

O espalhamento anti-stokes apresenta picos menos intensos que os picos correspondentes no espalhamento Stokes, por este motivo os equipamentos Raman consideram somente a região Stokes do espectro. Os espectros Raman são geralmente apresentados com a abcissa definida pelo deslocamento do número de onda (cm^{-1}) que é proporcional a diferença de energia entre a radiação espalhada e a da fonte (Figura 4), a ordenada é representada pela intensidade do sinal. (SGOOK; HOLLER; CROUCH, 2009).

Para ocorrer o espalhamento Raman, é necessário que ocorra uma variação na polarizabilidade da molécula durante a vibração da mesma, a polarizabilidade é definida como o grau de deformação de uma ligação, assim quando a molécula vibra ocorre a deformação na nuvem de elétrons da ligação e quando a ligação retorna ao estado original ela reemite radiação (ALMEIDA, 2015).

3.3.2 Instrumentação

O aparelho Raman é composto por uma fonte de laser, um sistema de iluminação da amostra, uma unidade seletora de comprimento de onda e o detector.

Até 1950 eram utilizadas lâmpadas de mercúrio como fonte de excitação para gerar espetros Raman, no entanto algumas substâncias absorviam essa radiação tornando um problema para a técnica. Foi em 1962 que os lasers começaram a ser utilizados como fonte de excitação. Os lasers utilizados hoje são de radiação monocromática ou na região do infravermelho (IR) - próximo, nessas regiões do espectro existem detectores mais sensíveis o

que torna a técnica viável. Um dos problemas enfrentados na utilização de lasers de radiação monocromática é o efeito da fluorescência, a mesma é causada por impurezas presentes na amostra ou até mesmo por características intrínsecas à amostra, a emissão de florescência ocorre devido à incidência de um fóton sobre uma molécula, este fóton é absorvido e a molécula passa para um estado eletrônico excitado. Na região do IR-próximo é possível obter espectros sem a produção de florescência, pois não é uma fonte suficientemente energética (FERNANDES, 2011; SALA, 2008).

O microscópio acoplado ao espectro Raman permite a confocalidade da amostra, permitindo que as informações obtidas através do detector sejam somente da região onde o laser é focalizado, com isso também é possível rejeitar a florescência da amostra (ALMEIDA, 2015).

Para separar as linhas do espalhamento Raman da radiação Rayleigh, que é mais intensa, é necessário o uso de seletores de comprimento de onda. Antigamente eram utilizados monocromadores com duas ou três redes de difração. Com o surgimento de filtros de linha e a evolução das redes holográficas, hoje são utilizados uma combinação entre os filtros de linha e monocromadores com apenas uma rede de difração (SGOOK; HOLLER; CROUCH, 2009).

Muitos aparelhos Raman modernos estão utilizando um arranjo de detectores no lugar dos monocromadores, esses detectores precisam ser de alta sensibilidade para conseguir detectar o sinal Raman. Os dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês *charge-coupled devices*) vêm sendo aplicados para este fim. O CCD é formado por um diodo de metal óxido semi condutor sobre um substrato de silício. Esses detectores multicanais permitem a detecção de vários comprimentos de onda simultaneamente (LI et al., 2014).

3.4 Quimiometria

A quimiometria utiliza métodos matemáticos e estatísticos com o objetivo de selecionar e otimizar procedimentos experimentais, possibilitando a análise de dados de maior complexidade. Dentro da quimiometria, se destaca a Análise de Componentes Principais (PCA) (ALMEIDA, 2015; BOVOLINI, 2010).

3.4.1 Análise por componentes principais (PCA)

A análise por componente principal é uma técnica utilizada para análise multivariada. A técnica é classificada como um método não supervisionado, ou seja, que não necessita de uma suposição inicial sobre os dados para identificar amostras (ALMEIDA, 2015).

A PCA tem como objetivo a redução da dimensionalidade dos dados (SOUZA; MADARI; GUIMARÃES, 2012), extraindo destes as informações mais significativas e de maior influência para a compreensão de um determinado conjunto de amostras. Através deste método é possível agrupar as amostras que possuem alguma característica similar, sendo a componente principal o arranjo que melhor retrata a distribuição dos dados, e a componente secundária, perpendicular à componente principal (ZIMMERMANN; GUIMARÃES; PERALTA-ZAMORA, 2008).

Nesta análise a matriz de dados é decomposta em um produto de duas matrizes nomeadas como escore e peso, mais uma matriz de erro. Os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais (PC), representando o quanto cada variável original contribui para a componente principal. Os escores retratam as relações de semelhança entre as amostras. Assim os dados podem ser agrupados através de combinações lineares, construindo um novo conjunto de eixos que são representados pelas componentes principais (SOUZA; POPPI, 2012).

3.5 Aplicação de Raman na caracterização de alimentos

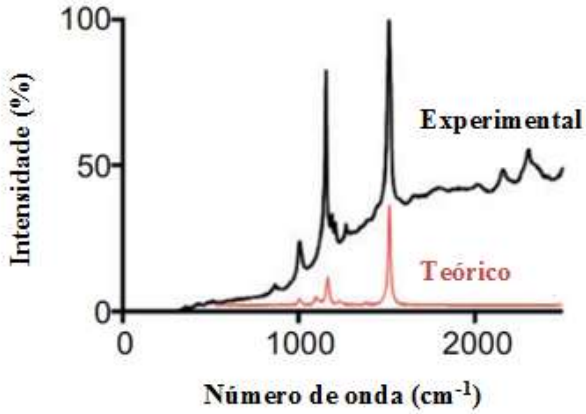
As análises químicas de compostos fenólicos, carotenoides, entre outras, são normalmente demoradas e consomem uma grande quantidade de reagentes. Nesse contexto, algumas técnicas espectrométricas como o Infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR) e a espectroscopia Raman estão sendo investigadas para a caracterização de alimentos, com os mais diversos objetivos. O principal apelo dessas técnicas é o fato de serem não destrutivas, o que é de grande interesse no setor de alimentos, pois podem ser utilizadas em linha de produção monitorando a composição do produto, e garantindo a qualidade do produto final (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012). Dentre as principais aplicações investigadas, estão análise qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários, lipídios e propriedades físico-químicas em frutos, grãos, carnes, óleos vegetais, bebidas e derivados do leite (CHEN et al., 2006; MCGOVERIN et al., 2010); determinação de origem dos alimentos e processos de controle e qualidade de alimentos (CLÉMENT; DORAIS; VERNON, 2008).

A espectroscopia Raman tem sido aplicada em análises qualitativas e quantitativas de sistemas inorgânicos, orgânicos e biológicos. Dentre as principais aplicações na área de alimentos está a caracterização de óleos vegetais, identificação de tipo e origem; bem como a caracterização de açúcares e alguns compostos bioativos como os carotenoides. Marquardt e Wold (2004) observaram através de técnicas de PCA que a espectroscopia Raman apresenta

informação espectral e dados relativos de concentração para carotenoides e colágeno. As amostras analisadas foram de músculo de peixe, contudo, o estudo faz projeções quanto à importância da aplicação da técnica para outras amostras ricas nesses compostos.

Baranska, Schutze e Schulz (2006) analisaram os carotenoides presentes no tomate e derivados processados através da espectroscopia Raman, identificando sinais de Licopeno e β-caroteno na região de 1600 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} respectivamente. Análises de cenoura foram feitas por Killeen e colaboradores (2013), que elaboraram um modelo quimiométrico para a predição do conteúdo de carotenoides através do Raman, sendo a técnica bastante interessante para identificação e quantificação de fitonutrientes e carotenoides, na Figura 5 é apresentado o espectro teórico e experimental do β-caroteno.

Figura 5. Espectro Raman teórico e experimental do β-caroteno



Fonte: HSIUNG; BLACKLEDGE; SHAWKEY, 2015

4. METODOLOGIA

4.1 Amostra

Para a realização deste trabalho foi utilizada a polpa da *Bunchosia glandulifera* coletada na cidade de Santo Antônio da Patrulha. A exsicata da *Bunchosia glandulifera* está depositada no Herbário ICN da UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Número 167276 com a identificação *Bunchosia glandufliera* (Jacq.) Kunth (Malphiguiaceae).

Inicialmente foi realizado o preparo da amostra, que consistiu no despolpamento do fruto da *Bunchosia glandulifera,* armazenamento da polpa sob condições de congelamento para preservação até processamento e análise das amostras. Diferentes amostras foram preparadas a partir do processo de secagem em estufa com circulação de ar. A secagem foi realizada nas temperaturas de 65ºC e 85ºC nos tempos 10, 20, 30, 100, 220, 280 e 400 min, e teve a finalidade de provocar a degradação térmica dos carotenoides presentes na polpa de *Bunchosia glandulifera,* produzindo um perfil de concentração de carotenoides necessário para avaliação da viabilidade de uso da técnica de Espectroscopia Raman.

4.2 Quantificação de carotenoides

Para a determinação dos carotenoides foi utilizada a metodologia de Amaya Rodriguez (2001). A análise consiste na preparação da amostra utilizando celite que facilita a homogeneização e desintegração dos tecidos, a amostra foi macerada com auxílio do almofariz e pistilo (RODRIGUEZ; KIMURA, 2004). Em seguida foi realizada a extração dos carotenoides utilizando como solvente extrator a acetona, essa extração foi feita até a exaustão observada pelo desaparecimento da coloração. O sobrenadante foi transferido para o funil de separação onde ocorreu o particionamento do extrato cetônico, com a adição do éter de petróleo. Nessa etapa foi adicionada água destilada pelas paredes do funil para evitar a formação de emulsão, formando duas fases. Após, a fase éter de petróleo foi filtrada com sulfato de sódio anidro para a remoção de água, essa fase foi transferida para o balão volumétrico, e foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 450 nm e 470 nm para determinar a concentração de β-caroteno e licopeno respectivamente. Para quantificar os carotenoides foi utilizada a equação (1), apresentada a seguir:

$$Teor\ de\ carotenoides\ \ (mg/100g) = \frac{A \times Volume\ (ml) \times 10^3}{A^{1\%} \times peso\ da\ amostra\ (g)} \qquad (1)$$

onde :

A: absorbância

Volume: volume total do extrato;

$A^{1\%}$: coeficiente de absorção em éter de petróleo (β-caroteno 2592 e licopeno 3450)

As análises foram feitas em triplicata e os desvios na concentração de carotenoides avaliados estatisticamente através do Teste de Tukey com nível de confiança 95%. Para esta análise foi utilizando *software* Statistica 8.

4.3 Caracterização através da Espectroscopia Raman

A polpa da *Bunchosia glandulifera* foi analisada através do Raman para a identificação de carotenoides. O β-caroteno e licopeno são simultaneamente detectados pela técnica de Raman e seus picos característicos são intensos e encontram-se na região entre 1160 e 1525 cm^{-1} (DARVIN et al. 2005).

4.3.1 Preparo da amostra

Foram testadas duas formas distintas de análise, sendo elas: amostra pura, sem qualquer tratamento; e amostra homogeneizada com um padrão interno, como técnica alternativa na detecção dos carotenos. O dióxido de titânio na sua forma rutilo foi utilizado como padrão interno para as análises, por apresentar picos característicos bem definidos, não apresentar sobreposição na região espectral de caracterização de carotenos e por ter comportamento inerte, não provocando, portanto, qualquer interferência na detecção de carotenos (CASTREJÓN-SÁNCHEZ et al. 2014).

4.3.2 Espectroscopia Raman

As análises das amostras foram realizadas num espectrômetro iHR550 Raman (Horiba Jobin Yvon S.A.S., França) acoplado com um detector de dispositivo acoplado a carga arrefecido (CCD) e uma fonte laser de 532 nm. A potência de saída do laser foi ajustada para 50 mW, e o feixe de laser foi suavizado com um filtro de densidade neutra com 50% de transmitância. Depois disso, o feixe foi refletido por espelhos para um filtro de borda dielétrico. O feixe foi dirigido para o microscópio equipado com um objetivo 50X. O feixe Raman transmitido foi refletido por espelhos de prisma para uma rede de difração de 1800

sulcos / mm e, finalmente, para a câmera CCD. Os dados espectrais foram registados com uma resolução espectral de 0,80 cm^{-1} entre 250 e 2000 cm^{-1} com parâmetros de medição constantes. Foram utilizadas três acumulações de um tempo de contagem de 10 s. O pacote de software LabSpec 5 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., França) foi utilizado para aquisição de dados espectrais. Os espectros foram registados cinco vezes para cada amostra.

O equipamento descrito acima, o qual foi utilizado nesse trabalho, encontra-se instalado na Central Analítica 4 do Departamento de Engenharia Química da UFRGS.

4.3.3 Análise por componente Principal (PCA)

Foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), essa técnica teve como objetivo facilitar a interpretação de dados, sendo possível observar as variáveis que se correlacionam e agrupar essas amostras (ALMEIDA, 2015). Buscou-se através dessa análise verificar o potencial de agrupar as amostras de acordo com o tempo e temperatura de secagem.

Para a realização dessas análises foi utilizado o *software Unscrambler* e o *Python* 2.7 através do pacote *open-source scikit-learn*.

4.3.4 Correlação dos dados obtidos através dos espectros Raman e as informações determinadas pelo método convencional.

Através das informações obtidas com a técnica convencional de quantificação de carotenoides foi realizada a identificação da existência de correlação entre os dados obtidos para perfil de secagem e os espectros Raman. Para avaliar essa correlação, foram verificadas as áreas dos picos característicos dos carotenos. Nessa etapa dos estudos, foi analisada qual das informações do espectro Raman (qual pico característico, ou conjunto de picos) fornece melhor correlação com os dados de concentração conhecida. Buscando identificar a potencialidade de correlacionar os dados sem o uso de um padrão interno. Após, foi feita a verificação dos resultados, buscando identificar o conjunto de dados que apresenta melhor correlação, através da tendência dos dados e do coeficiente de determinação (R^2) da reta.

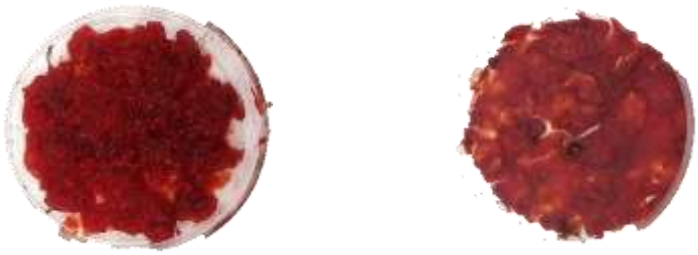
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo da amostra e quantificação de carotenoides por metodologia convencional

Para a realização das análises inicialmente foi realizado a preparação da amostra onde a mesma foi submetida ao processo de secagem em estufa de circulação de ar. A polpa foi seca nas temperaturas de 65 ºC e 85 ºC nos tempos 10, 20, 30, 100, 220, 280 e 400 min, na Figura 6 são apresentadas imagens da polpa *in natura* e após o processamento de secagem. A quantificação dos carotenoides foi realizada através da metodologia proposta e a concentração de carotenoides presentes na polpa é apresentada na Tabela 1.

Figura 6. Polpa in natura e após o processamento de secagem

a) Polpa *in natura* b) Polpa seca por 400 min



Fonte: Próprio autor, 2017.

Durante o processo de secagem ocorreu a redução do teor de carotenoides de forma gradativa, a polpa *in natura* apresentou 155,17 mg de carotenoides por 100 g de polpa, em base seca. Comparado com o teor apresentado nos primeiros 10 min do processo de secagem houve a redução de 40,96% e 45,56% do conteúdo inicial de carotenoides, nas temperaturas de 65 ºC e 85 ºC, respectivamente. Segundo Nóbrega et al. (2014) os tratamentos térmicos podem ocasionar perdas no teor de carotenoides sendo o tempo de processamento e a temperatura os fatores responsáveis por essa redução. De acordo com Ramos et al. (2008) o aquecimento provoca reações de escurecimento não enzimático, ocasionando perdas de carotenoides, açúcares e aminoácidos e formação de produtos da reação de Maillard.

Tabela 1. Concentração de carotenoides presentes na polpa da *Bunchosia glandulifera* nas temperaturas de 65ºC e 85ºC em tempos distintos de secagem, (valores médios, ± desvio padrão).

Tempo (min)	Umidade[a] (% b.u)	Teor de Carotenoides[b] (mg/100g)
Temperatura de secagem 65ºC		
10	57,83[a] ±0,87	91,61[a] ±2,91
20	53,00[d] ±0,56	81,66[b] ±3,22
30	50,88[d] ±3,50	76,32[b] ±0,43
100	28,87[b] ±1,23	52,85[c] ±0,31
220	17,12[c] ±0,96	46,40[cd] ±0,17
280	10,00[e] ±0,54	43,72[cd] ±0,19
400	9,40[e] ±0,37	39,74[d] ±0,25
Temperatura de secagem 85ºC		
10	52,79[c] ±2,15	84,47[b] ±0,84
20	50,57[c] ±1,70	80,30[b] ±0,28
30	46,24[a] ±1,34	70,27[a] ±0,26
100	19,36[b] ±1,58	44,24[c] ±0,30
220	7,32[d] ±0,92	43,09[cd] ±3,11
280	4,36[de] ±0,48	37,43[de] ±0,04
400	2,47[f] ±0,13	31,69[e] ±0,07

[a]Umidade percentual determinada através de secagem até peso constante da amostra em uma mufla a 110°C. [b]Teor de carotenoides totais determinado pelo método de Amaya Rodriguez (2001), indicado em mg/100g de amostra em base seca. Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna são consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Tukey (p>0,05). Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05)

Fonte: Próprio autor, 2017.

5.2 Análise no Espectrômetro Raman

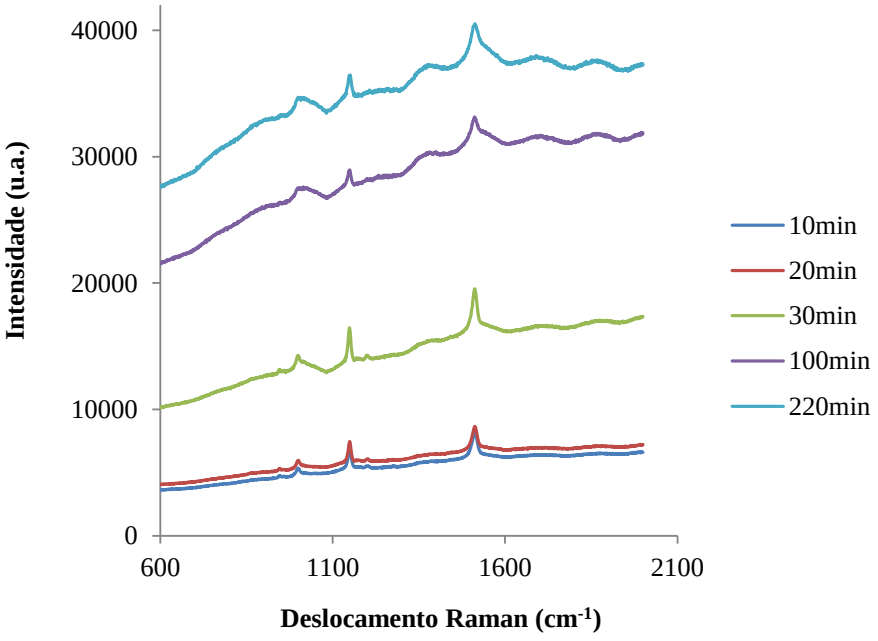
As amostras de polpa de *Bunchosia glandulifera* seca foram analisadas no Espectro Raman, conforme metodologia apresentada na seção 4.3. A amostra seca a 85ºC foi analisada pura e com a adição do padrão interno (TiO_2) e os espectros médios são apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. A amostra seca a 65ºC foi analisada somente com o padrão interno e o espectro médio é apresentado na Figura 9. Os dados espectrais apresentados nas figuras não passaram por qualquer pré-tratamento.

Para cada tempo de secagem foram obtidos de quatro a seis espectros e através destes foi calculado um espectro médio para cada tempo. A Figura 7 apresenta o espectro da polpa seca 85ºC com faixa espectral de 600 - 2000 cm^{-1}. A partir da análise da figura é possível observar os três picos caraterísticos dos carotenoides que de acordo com Tschirner

(2012) encontram-se entre 1005 e 1524 cm^{-1} no espectro Raman obtido com o laser de 532 nm. Segundo Killeen et al. (2013) e Withnall et al. (2003), as bandas dos carotenoides se encontram em 1520 e 1156 cm^{-1} e são atribuídas ao alongamento simétrico –C = C– e –C–C– da cadeia de polieno dos carotenoides, respectivamente, já a banda em 1006 cm^{-1} é devido ao balanço do plano do lado do grupo metil na cadeia de polieno de carotenoides, as bandas encontradas nas Figuras 7, 8 e 9 estão próximas ao descritos pelos autores citados acima.

Para a amostra seca a 85ºC, sem a utilização do padrão interno, nos tempos 280 e 400 min não foram obtidos espectros pois a amostra encontrava-se com umidade muito baixa dificultando a obtenção de informações espectrais. Já com o auxilio do padrão interno foi possivel obter o espectro da amotra seca a 280 min nas temperaturas 65 ºC e 85 ºC.

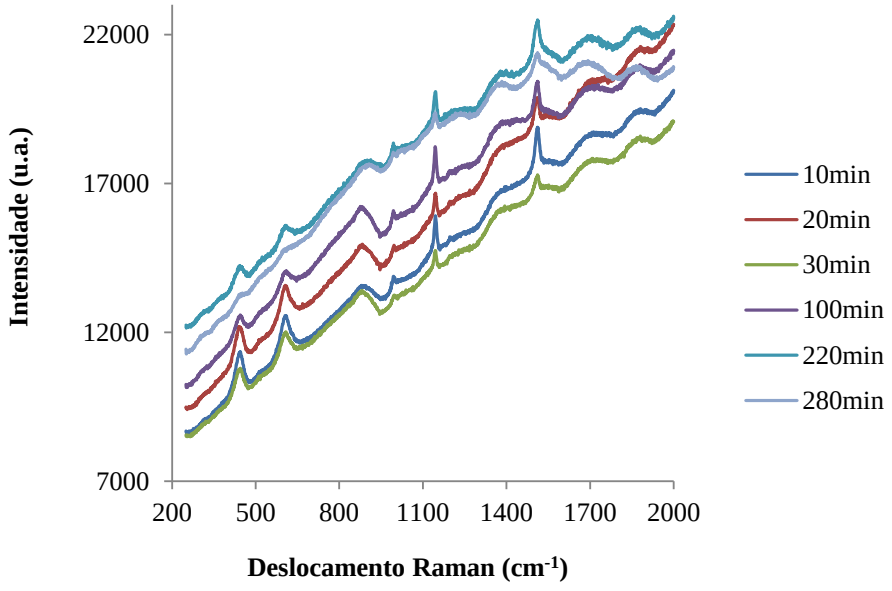
Figura7 . Espectro médio da polpa seca a 85ºC nos tempos 10, 20, 30, 100 e 220 min.



Fonte: Próprio autor, 2017.

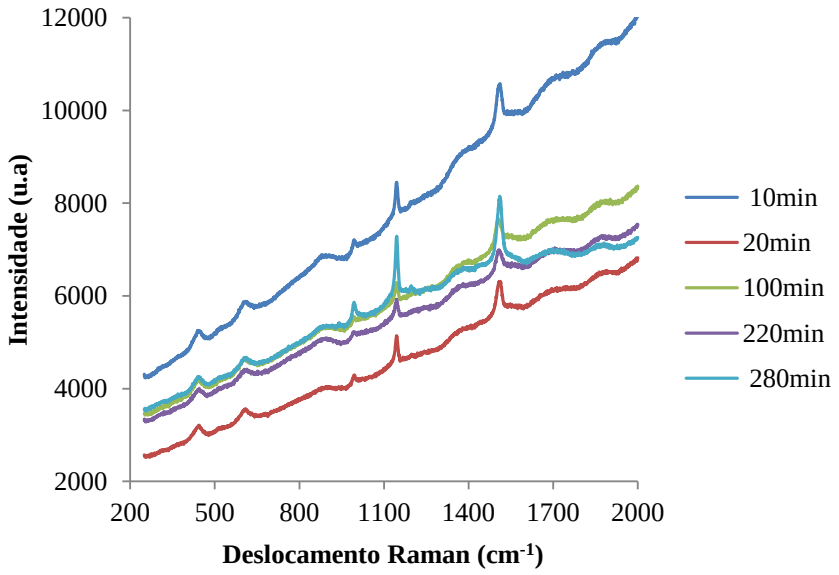
As Figuras 8 e 9 representam as amostras homogeneizadas com padrão interno, onde é possível observar os picos característicos do dióxido de titânio (TiO_2) que, segundo Castrejón-Sánchez et al. (2014), apresenta quatro picos característicos de grande intensidade em 143, 236, 447 e 613 cm^{-1}, para a fase rutilo do TiO_2. Devido à faixa espectral adotada para análise das amostras no espectrômetro Raman, as Figuras 8 e 9 apenas apresentam os dois últimos picos referentes ao padrão interno (447 e 613 cm^{-1}), sendo os outros três picos relacionados à presença de carotenoides na amostra (1000, 1150, 1510 cm^{-1}).

Figura 8. Espectro médio da polpa seca a 85ºC, nos tempos 10, 20, 30, 100, 220 e 280 min, homogeneizada com padrão interno dióxido de titânio.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Figura 9. Espectro médio da polpa seca a 65ºC, nos tempos 10, 20,100, 220 e 280 min, homogeneizada com padrão interno dióxido de titânio.



Fonte: Próprio autor, 2017.

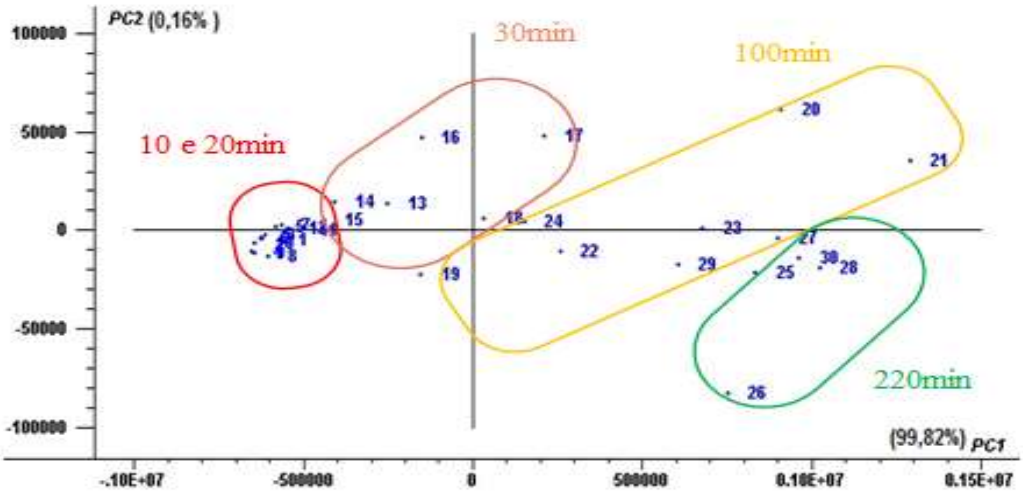
5.3 Análise de componentes principais

Foi realizada a análise por componentes principais (PCA) nas matrizes de dados espectrais através do *software Unscrambler* e *Python.* Os dois softwares apresentaram resultados similares para as análises apresentando desvios de 0,58 para componente principal (PC1) e 0,04 para componente secundária (PC2) para amostra seca a 85ºC. Assim, os resultados apresentados nas Figuras 10, 11 e 12 foram obtidos através do *Unscrambler*. Para fins de comparação o PCA da amostra seca a 85ºC, sem homogeneização com TiO_2, obtido através do *Python* é apresentado no Apêndice A. Conforme apresentado na Figura 10 as duas primeiras componentes principais PC1 e PC2 representam 99,82% e 0,16% da variabilidade dos dados, respectivamente, somando 99,98% da variabilidade explicada dos dados das amostras secas a 85ºC. As amostras representadas pela numeração 1 a 6 são repetições de leitura espectral da amostra seca por 10 min e as amostras numeradas de 7 a 12 são as repetições da amostra seca por 20 min. No gráfico dos escores é possível observar que essas amostras encontram-se na mesma região formando agrupamentos (*clusters*). Esse fato já era esperado visto que estas amostras apresentam concentrações de carotenoides mais elevadas ou menor perda desse composto, decorrente da secagem. Já as repetições numeradas de 25 a 30 estão bem separadas das demais, uma vez que representam a amostra seca a 220 min, a qual apresenta o maior tempo de secagem e maior perda no teor de carotenoides. Através desta análise é possível verificar que é possível classificar as amostras através da técnica Raman, observando que as amostras se agrupam de acordo com o tempo de secagem e, consequentemente, de acordo com conteúdo de carotenoides

Assim, o PC1 é o componente que melhor explica a variabilidade dos dados e, conforme se pode observar, o teor de carotenos guarda uma relação com essa variável, com uma tendência de deslocamento para maiores valores de PC1, com a redução do teor de carotenoides.

A análise de componentes principais foi aplicada na matriz de dados das amostras secas a 85 ºC e 65 ºC homogeneizadas com dióxido de titânio, as Figuras 11 e 12 representam o gráfico de escores. Para a amostra 85ºC as duas primeiras componentes principais representaram 99,86% da variabilidade explicada dos dados. Já para a amostra 65 ºC , as duas primeiras componentes representaram 98,93% da variabilidade dos dados. Para as duas temperaturas analisadas foi possível explicar a variabilidade dos dados com apenas as duas primeiras componentes principais.

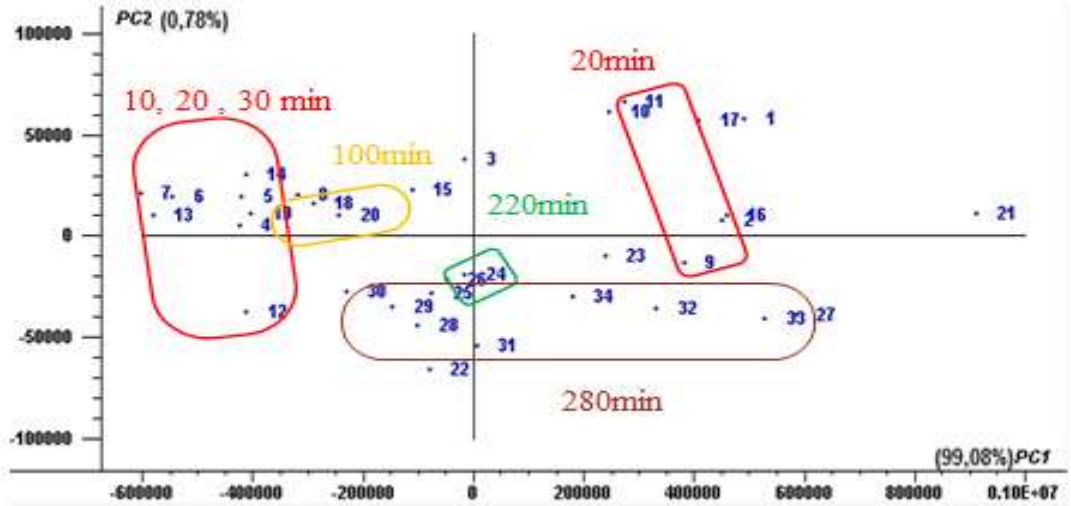
Figura 10. Análise de componentes principais dos dados espectrais amostras secas 85ºC, gráficos dos escores.



Repetições das amostras secas a 85ºC. Sendo 1- 6 amostra seca por 10min, 7-12 amostra seca por 20min, 13-18 amostra seca por 30min, 19-24 amostra seca por 100min, 25-30 amostra seca por 220min. Fonte: Próprio autor, 2017.

Comparado os resultados obtidos na análise de componente principal para a amostra seca a 85ºC, com (Figura 11) e sem padrão interno (Figura 10), verificamos um melhor agrupamento dos dados para a segunda, o que indica a potencialidade da técnica Raman para análise da amostra sem qualquer tipo de preparação. A adição de partículas de dióxido de titânio resultou em um maior espalhamento da luz, conforme se pode observar nas Figuras 8 e 9, o que provocou uma perturbação do espectro, principalmente para números de onda elevados (comportamento ascendente do sinal no espectro), indicando que a incorporação de padrão interno não é adequada para essa análise.

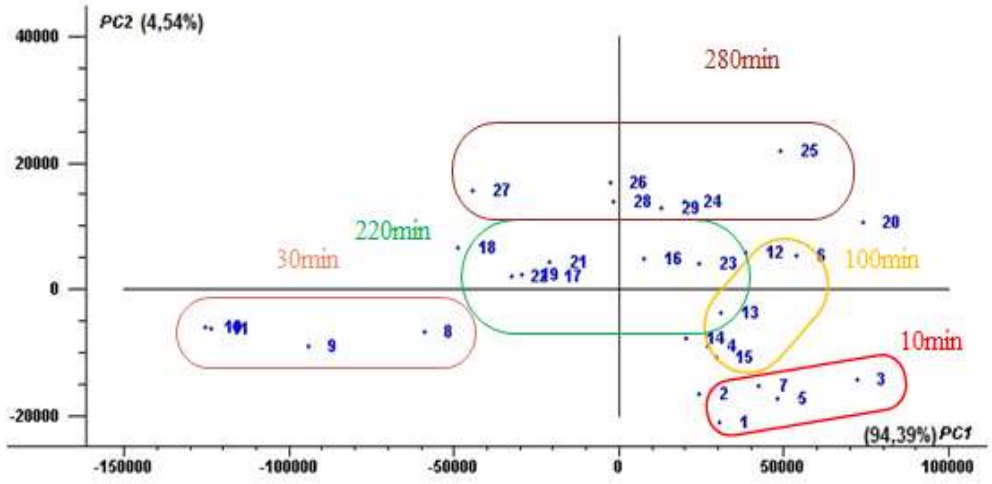
Figura 11. Análise de componentes principais dos dados espectrais amostras secas 85ºC homogeneizadas com dióxido de titânio, gráficos dos escores.



Repetições amostras secas a 85ºC homogeneizadas com TiO_2 .Sendo 1-6 amostra seca por 10min, 7-11 amostra seca por 20min, 12-17 amostra seca por 30min, 18-23 amostra seca por 100min, 24-27 amostra seca por 220min e 28-34 amostras seca por 280min.

Fonte: Próprio autor, 2017.

Figura 12. Análise de componentes principais dos dados espectrais amostras secas 65ºC homogeneizadas com dióxido de titânio, gráficos dos escores.



Repetições amostras secas 65ºC homogeneizadas com TiO_2 .Sendo 1- 5 amostra seca por 10min, 6-11 amostra seca por 20min, 12-17 amostra seca por 100min, 18-23 amostra seca por 220min, 24-29 amostra seca por 280min.

Fonte: Próprio autor, 2017.

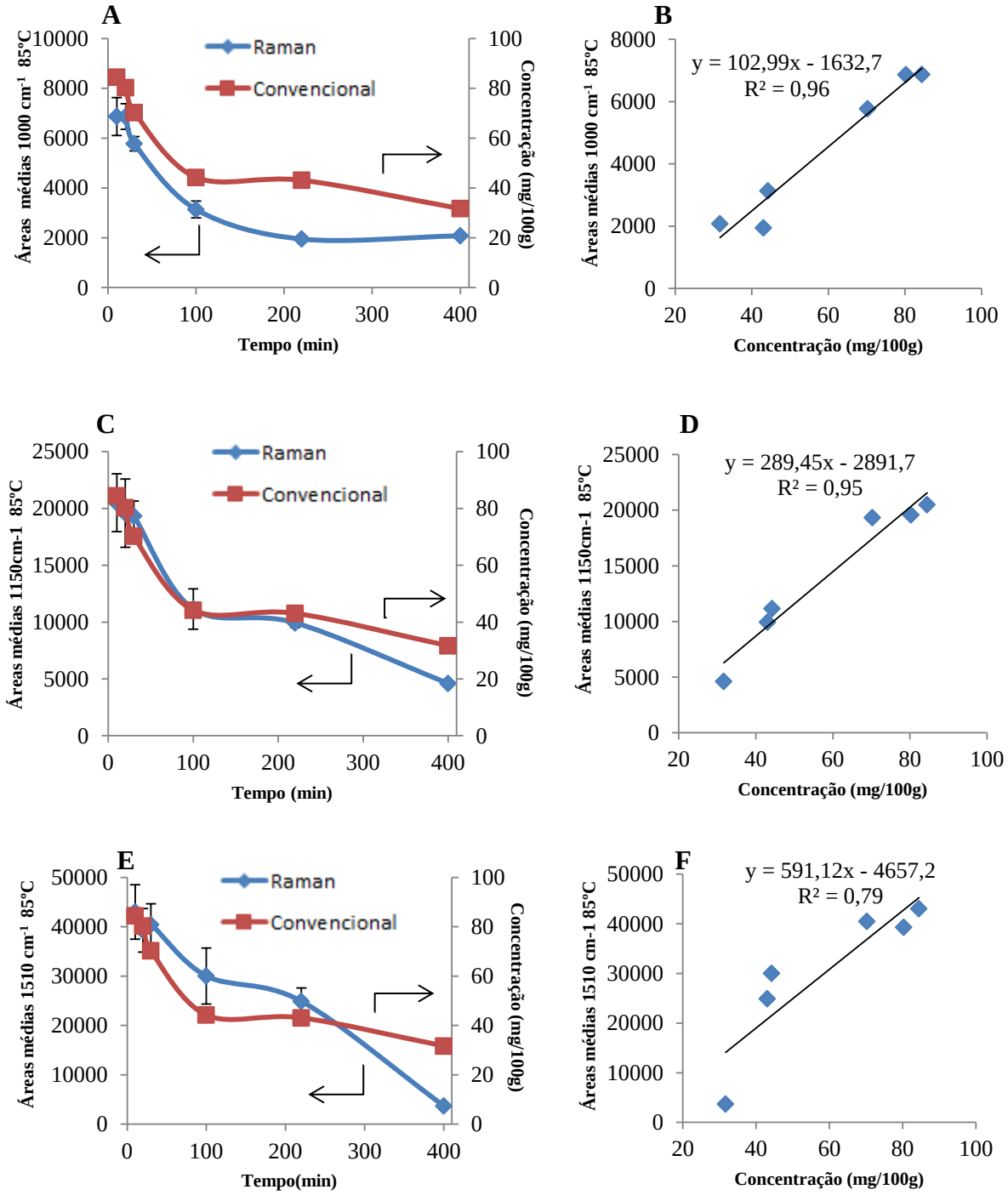
5.4 Correlação entre a Espectroscopia Raman e metodologia convencional

Após analisar os dados através da quimiometria e verificar a existência de um padrão de concentração de carotenos, foram analisadas as áreas dos picos dos carotenos de cada espectro obtido através do Raman. Com essas áreas foi construído um gráfico para cada banda características dos carotenos nos diferentes tempos de secagem, relacionando com a concentração de carotenoides presente em cada amostra obtida através da metodologia convencional. Esses gráficos são apresentados na Figura 13 A, C e E.

Na Figura 13 (A, C, E) é possível observar o perfil de degradação dos carotenoides através da metodologia convencional e também através da Espectroscopia Raman que demonstra o mesmo comportamento. Na Figura 13 (B, D, F) são apresentados os gráficos de correlação entre as áreas médias dos picos e a concentração de carotenoides, a melhor correlação obtida foi na frequência de excitação de 1000 cm^{-1} com um coeficiente de determinação de 0,96. Para as frequências de 1150 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} também foram obtidos coeficientes altos, com R^2 igual a 0,95 e 0,79 respectivamente. Também é possível observar através das barras de erro presentes nos gráficos que os desvios das analises no Raman são altos isso pode ter ocorrido devido à heterogeneidade da amostra sólida. Para obtenção de desvios menores nos resultados obtidos a partir do espectro Raman e, portanto, maior precisão na determinação das áreas, seria interessante o uso de um maior número de espectros na análise, o que diluiria o erro na determinação da área média. Contudo, os resultados são satisfatórios e indicam a possibilidade da técnica para monitoramento da concentração de carotenos.

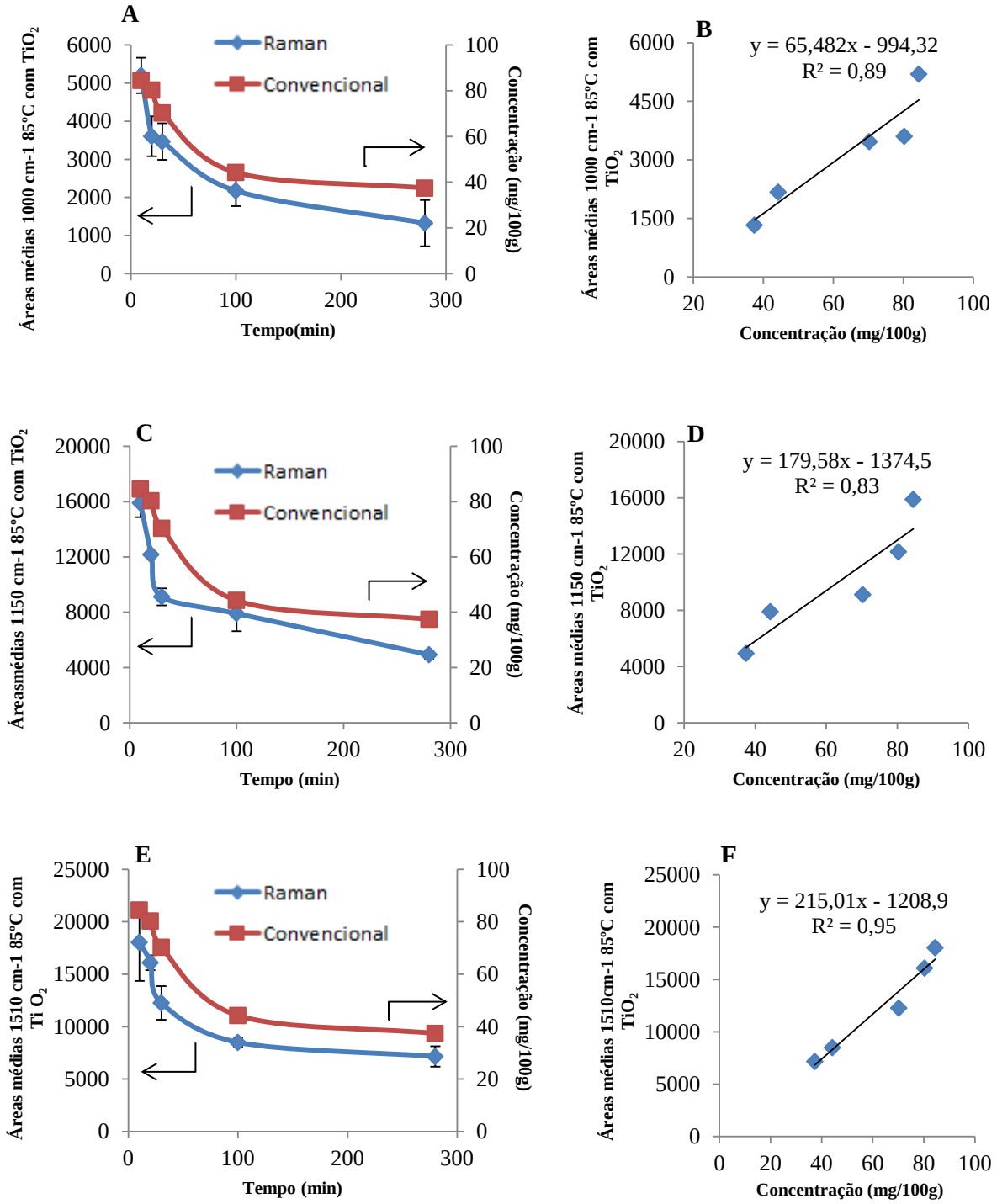
Nas Figuras 14 e 15 foram seguidos os mesmos passos utilizados com a amostra seca a 85ºC, a diferença é que a amostra da Figura 14 foi seca a 85ºC e analisada homogeneizada com padrão interno. Inicialmente foram feitos testes utilizando a área dos picos do padrão interno com a área dos picos dos carotenos, no entanto não foram obtidas correlações e então foram analisados somente os picos dos carotenos. Para as amostras secas a 85ºC os coeficientes de determinação obtidos foram R^2 0,89 a 1000 cm^{-1}, R^2 0,83 a 1150 cm^{-1} e R^2 0,95 a 1510 cm^{-1}, observando que esta amostra passou por um processo de homogeneização antes da análise Raman. Verifica-se que a espectroscopia Raman é uma técnica viável para analisar amostras sem nenhum preparo, visto que foram obtidas melhores correlações quando a amostra foi analisada pura.

Figura 13. A, C, E - Determinação de carotenos em tempos distintos de secagem análise convencional e Espectroscopia Raman secagem a 85ºC em 1000cm^{-1} , 1150 cm $^{-1}$ e 1510 cm^{-1} respectivamente. **B, D, F -** Correlação entre os métodos convencional e Raman secagem da polpa a 85ºC em 1000cm^{-1} , 1150 cm $^{-1}$ e 1510 cm^{-1} respectivamente.



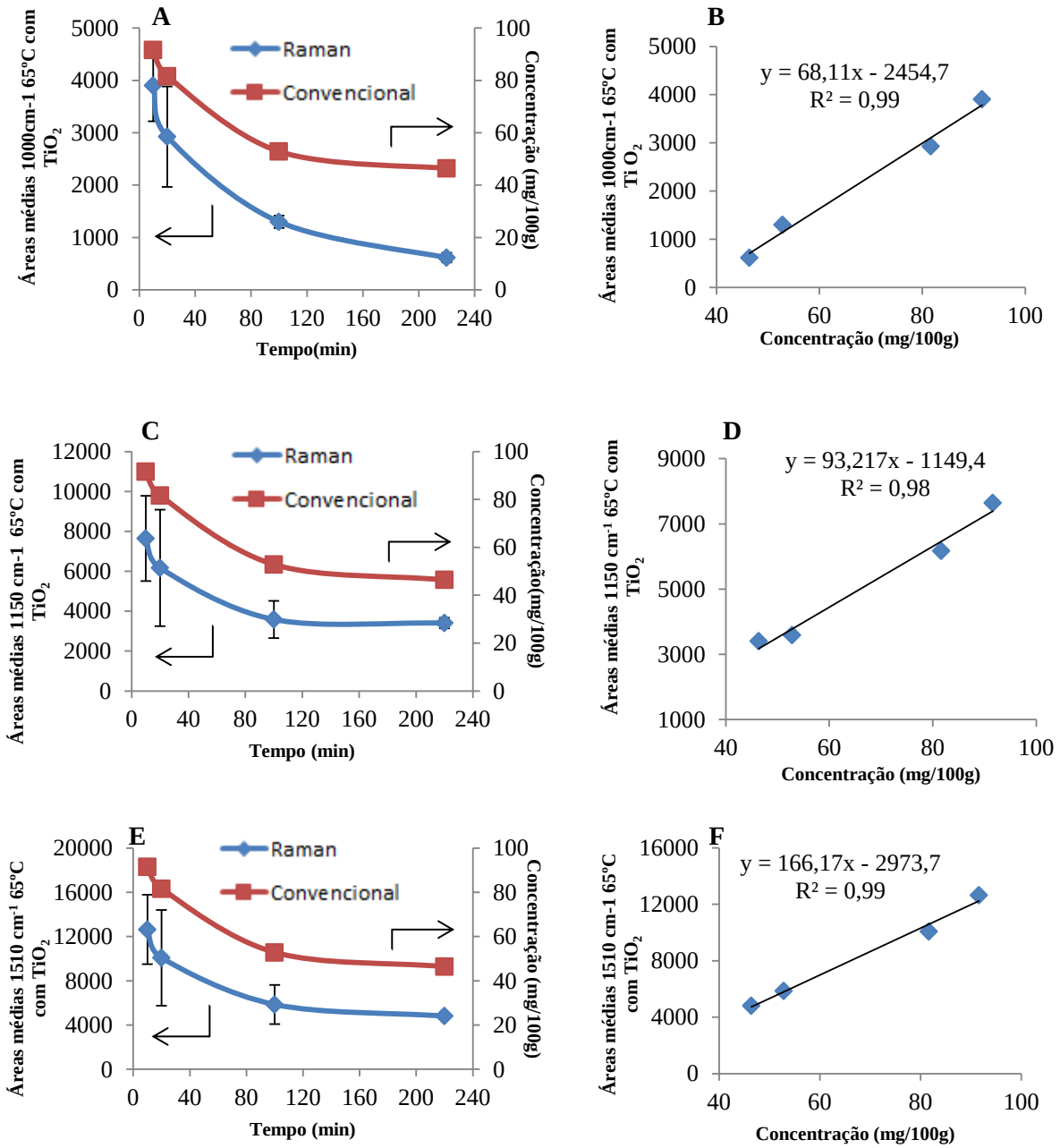
Fonte: Próprio autor, 2017

Figura 14. A, C, E - Determinação de carotenos em tempos distintos de secagem análise convencional e Espectroscopia Raman secagem a 85 ºC homogeneizada com TiO_2 em 1000 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} respectivamente. **B, D, F -** Correlação entre os métodos convencional e Raman secagem da polpa a 85 ºC em 1000 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} respectivamente.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Figura 15. A,C, E - Determinação de carotenos em tempos distintos de secagem análise convencional e Espectroscopia Raman secagem a 65ºC homogeneizada com TiO_2 em 1000cm^{-1}, 1150 cm $^{-1}$ e 1510 cm^{-1} respectivamente. **B, D, F** - Correlação entre os métodos convencional e Raman secagem da polpa a 65ºC em 1000cm^{-1} , 1150 cm $^{-1}$ e 1510 cm^{-1} respectivamente.



Fonte: Próprio autor, 2017.

A amostra seca a 65 ºC foi somente analisada homogeneizada com TiO_2, como pode ser observado na Figura 15 (B, D, F) essa amostra apresentou melhor correlação entre a metodologia convencional e a técnica Raman comparada com a amostra seca a 85ºC, obtendo

coeficientes de determinação próximos a 1. Para as duas temperaturas de secagem foram observadas tendência nos comportamentos dos dados verificando que o Raman consegue detectar e monitorar a degradação de carotenoides durante o processo de secagem.

6. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Através deste estudo foi comprovada a potencialidade da técnica de Raman para detecção e monitoramento do conteúdo de carotenos em amostras de *Bunchosia glandulifera*. Demonstrou-se que a técnica pode ser utilizada para a determinação de carotenos sem que haja a necessidade de preparação da amostra ou uso de padrão interno, existindo uma correlação entre o teor de caroteno e a área dos três picos característicos de carotenos no espectro Raman. O tratamento do sinal espectral, também não foi necessário, para a determinação de carotenos, uma vez que os picos desses compostos são bastante intensos e sem sobreposição e, portanto, pouco afetados pela presença de ruído e desvios no sinal.

A análise de PCA indica uma forte correlação da variância dos dados com o componente principal PC1, variável que apresenta correlação com a variação no teor de carotenos na amostra. A formação de clusters separando as amostras por tempos de secagem (e, portanto, por concentração de carotenos) é um indicativo do potencial da técnica para monitoramento desses compostos. Além disso, foram encontrados altos coeficientes de determinação na comparação entre as áreas médias dos picos de carotenos e a concentração de caroteno nas amostras (determinada por técnica convencional), evidenciando a existência de correlação entre as metodologias. A melhor correlação encontrada para a amostra seca a 85 ºC e analisada sem nenhum tratamento foi de 0,96 no número de onda 1000 cm^{-1}, já para as amostras homogeneizadas com o padrão interno as melhores correlações encontradas foram 0,95 e 0,99 na frequência de onda 1510cm^{-1} para amostras secas a 85ºC e 65ºC, respectivamente.

Esse foi um estudo inicial para acompanhar o perfil de degradação dos carotenoides de uma determina matriz vegetal, que demonstra ter potencial para aperfeiçoamento. Para melhores resultados seria interessante investigar a influência da umidade para a espectroscopia Raman assim como outras variáveis como a influência da intensidade do laser e da sua frequência sobre a amostra; o estado físico estrutural da amostra e a interação com a luz e também os efeitos de isomeria.

REFERÊNCIAS

ABBAS, O.; DARDENNE, P.; BAETEN, V. **Near-Infrared, Mid-Infrared, and Raman Spectroscopy**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2012.

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **CMAJ : Canadian Medical Association Journal**, Canadá, v. 163, n. 6, p. 739–44, 2000.

ALEXANDRA, C.; FERREIRA, D. R. **Controlo de Qualidade em Tintas e Vernizes por Espetroscopia de Infravermelho Próximo.** 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciência Universidade do Porto, Porto, 2014.

ALMEIDA, M. R. **Espectroscopia Raman e quimiometria como ferramentas analiticas para química forense e paleontologia**. 2015.148f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

ANDERSON, W. Malpighiaceae (Malpighia Family), **In: Memoirs of The New York Botanical Garden**, v. 76(2), New York, The New York Botanical Garden, 2002, 410p.

ANDERSON, W. R.; ANDERSON, C; DAVIS, C. 2006–. **Malpighiaceae.** Disponível em : <http://herbarium.lsa.umich.edu/malpigh/index.html> [20 de junho].

BARANSKA, M.; SCHUTZE, W; SCHULZ, H. Determination of Lycopene and β -Carotene Content in Tomato Fruits and Related Products : Comparison of FT-Raman , ATR-IR , and NIR Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 78, n.24, p. 8456–8461, 2006.

BOVOLINI, M. S. **Análise exploratória de espectros no infravermelho de formulações comerciais contendo glibenclamida compactados por transformadas wavelets.** 2010, 153f. Dissertação (Mestrado em Sistemas e Processos Industriais), Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul. 2010.

CASTREJÓN-SÁNCHEZ, V. H.; CAMPS, E.; CAMACHO-LÓPEZ, M. Quantification of phase content in TiO_2 thin films by Raman spectroscopy. **Superficies y Vacio**, 27(3), 88–92, 2014.

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

CLÉMENT, A.; DORAIS, M.; VERNON, M. Nondestructive Measurement of Fresh Tomato Lycopene Content and Other Physicochemical Characteristics Using Visible−NIR Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9813–9818, 2008.

CORRÊA, L. C. et al. Determinação de Betacaroteno e Licopeno em Frutas e Hortaliças por Cromatografia Liquida de Alta eficiência (CLAE). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2015.

COSTA, T. et al. Composição de Carotenoides em Canistel (Pouteria campechiana (Kunth) Baehni). **Comunicação Cientifica**. p. 3–6, 2010.

DARVIN, M. E., GERSONDE, I., MEINKE, M., STERRY, W., & LADEMANN, J. Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. **Journal of Physics D: Applied Physics**, 38(15), 2696–2700, 2005.

FERNANDES, A. **Análise de Pigmentos por técnicas de Espectroscopia e Difracção de raios X**. 2011.30f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Física) - Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2011.

HONORATO, F. A. et al. Transferência de calibração em métodos multivariados. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1301–1312, 2007.

HSIUNG, B.K.; BLACKLEDGE, T. A.; SHAWKEY, M. D. Spiders have melanin after all. **The Journal of experimental biology**, p. 3632-3635, 2015.

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

LI, Z. et al. Raman spectroscopy for in-line water quality monitoring - Instrumentation and potential. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 9, p. 17275–17303, 2014.

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

MCGOVERIN, C. M. et al. Review: The application of near infrared spectroscopy to the measurement of bioactive compounds in food commodities. **Journal Near Infrared Spectrosc**, v. 18, n. 2, p. 87–111, 2010

NÓBREGA, E. M. et. al. The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (Malphigia emarginata) residue. Journal of Food Processing and Preservation,v.39, n. 2, p.131-141, 2014.

RAMOS, A. M. et al. Efeito do tipo de embalagem e do tempo de armazenamento nas qualidades físico-química e microbiológica de abacaxi desidratado. **Alimentos & Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 259-269, Setembro, 2008.

RODRIGUEZ, A. D. B. **Nature and distribution of carotenoids in foods**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993.

RODRIGUEZ, A. D. B. **Guide to Carotenoid Analysis in Foods**.United States of America: OMNI Research, 2001.

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

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2º ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008.

SANDEMAN, K. et al. **Raman Spectroscopy**. University of Cambridge. Cambridge, 2015.

SANTANA, F. B. **Uso de espectroscopia no infravermelho médio e analise discriminante por quadrados mínimos parciais na determinação de adulterações em óleo de Andiroba, Prímula e Rosa Mosqueta.** 2015.78p. Dissertação (Mestrado em Quimica). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2015.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principios de Análise Instrumental**. 6.ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SILVA, S. F. et al. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Bunchosia glandulifera. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 2, p. 467–473, 2016.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: UM tutorial, parte I. **Quimica Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SOUZA, D. M.; MADARI, B. E.; GUIMARÃES, F. F. Aplicaçãoo de técnicas multivariadas e inteligência artificial na análise de espectros de infravermelho para determinação de matéria orgânica em amostras de solos. **Quimica Nova**, v. 35, n. 9, p. 1738–1745, 2012.

SOUZA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; TOLEDO, F. F. Enciclopédia agrícola brasileira: C-D. São Paulo: 1995, 608p

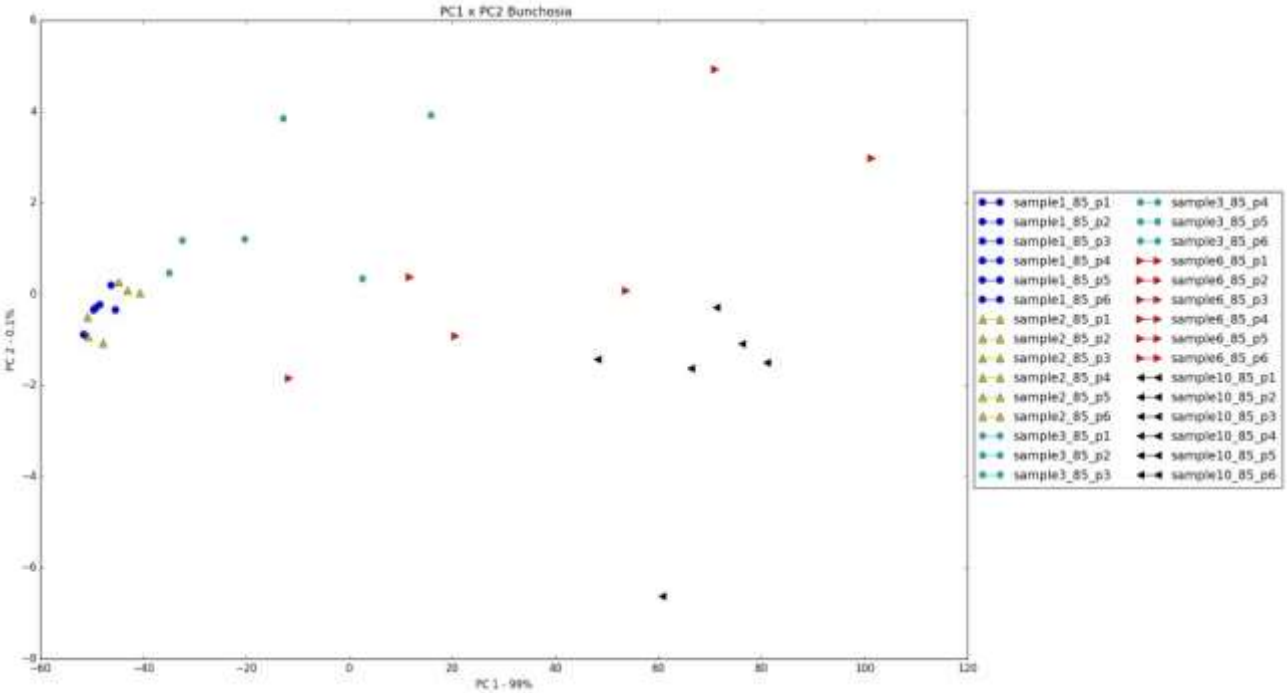
TSCHIRNER, N. Raman spectroscopy of b-carotene and CdSe-based nanocrystals. **Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften**, n.2, p. 109, 2012.

WISE, Barry M et al.**PLS_Toolbox Version 4.0 for use with MATLAB TM**. [S.l: s.n.], 2006. Disponível em: <http://mitr.p.lodz.pl/raman/jsurmacki/pliki/zajecia/LMDiT/cw4i5/LMDiT_PLS_Manual_4.pdf>.

Withnall, R.et al. Raman spectra of carotenoids in natural products. Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2003, 59, 2207−2212.

ZIMMERMANN, C. M.; GUIMARÃES, O. M.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Avaliação da qualidade do corpo hídrico do Rio Tibagi na região de Ponta Grossa utilizando análise de componentes principais (PCA). **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1727–1732, 2008.

APÊNDICE A- Análise por componente Principal (PCA) da amostra seca a 85ºC, sem homogeneização com TiO_2, obtido através do *Software Python*



Fonte: Próprio autor, 2017