

Desenvolvimento de metodologias de análise rápidas em alimentos por espectroscopia de infravermelho (NIR, FTIR, RAMAN)

Ofélia Anjos

Instituto Politécnico de Castelo Branco, 6001-909 Castelo Branco. Portugal
Centro de Estudos Florestais, ISA, Universidade de Lisboa, 1349-017 Lisboa. Portugal
ofelia@ipcb.pt



Abstract

The spectroscopy is a technique that provides information about the molecular structure of a substance. This technique is presently widely used in pharmaceuticals, food, medical, textile applications, among others due to the use of samples without manipulation.

Spectroscopy studies interaction between electromagnetic radiation with matter, by determining the energy levels of atoms and molecules. The total energy of a molecule is the sum of the electronic, vibrational and rotational energy.

The infrared spectroscopy and Raman spectroscopy are two techniques used for faster identification, they are easy to use, requiring a little amount of samples as well as providing information about the sample composition.

Two case studies related to application of these methodologies in food industry were also presented.

Resumo

O controlo de qualidade em indústria alimentar é realizado durante a receção da matérias-primas, no decorrer do processo de fabrico, no produto acabado e na estabilidade do produto ao longo da sua vida útil.

Os métodos analíticos clássicos em alguns casos são dispendiosas e requerem preparação de amostras ou compostos para análise que podem apresentar alguma toxicidade. Por outro lado, estas metodologias podem ser morosos não garantindo os resultados com a brevidade necessário para um processo industrial. Neste contexto, a espectroscopia de infravermelho tem sido uma ferramenta analítica amplamente utilizada em várias áreas, devido à rapidez com que as amostras podem ser caracterizadas quase sem manipulação (Blanco e Villarroya, 2002).

A espectroscopia de infravermelho é um método não invasivo que se baseia na análise das vibrações moleculares resultantes da excitação provocada por um feixe de radiação na zona do infravermelho (Cordella *et al.* 2002). Em espectroscopia estuda-se a interação de radiações electromagnéticas com as moléculas que constituem uma substância. A ligação de dois átomos em moléculas envolve diferentes tipos de energia: translacional, vibracional e electrónica.

A região do infravermelho no espectro electromagnético situa-se entre as gamas do visível e as microondas, e subdivide-se em infravermelhos próximos ($4000 - 12500 \text{ cm}^{-1}$), médios ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) e longínquos ($10 - 400 \text{ cm}^{-1}$) (Reich, 2005).

Para a obtenção de um espectro de infravermelho de uma amostra mede-se a quantidade de energia absorvida pela amostra a cada comprimento de onda quando sobre esta se aplica um feixe de luz infravermelha. O espectro resultante (espectro de transmissão ou absorção) identifica os comprimentos de onda do Infravermelho a qua a amostra absorve radiação e através do qual se pode identificar que tipos de ligações químicas estão presentes na amostra analisada.

Os espectros são mais complexos e mais difíceis de interpretar em função do número de ligações ativas no infravermelho que se encontrem na matriz analisada. Por outro lado quanto mais complexa for a molécula a analisar, maior o número de bandas de absorção e conseqüentemente é necessário um maior cuidado na análise e interpretação de resultados.

As técnicas mais utilizadas são:

- NIR: Espectroscopia de Infravermelho Próximo. Esta técnica baseia-se na interpretação da informação espectral resultante da absorção de energia por parte das ligações existentes nas moléculas de uma dada amostra

que podem ser causada por sobreposições de vibrações fundamentais, combinações de vibrações fundamentais e absorções eletrônicas. Região de aquisição de espectros (12000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1});

- FTIR-ATR: Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) com reflectância total atenuada (ATR). Nesta técnica semelhante à anterior, é utilizado um cristal com índice de refração muito elevado (superior ao da matriz a analisar) e baixa absorção no infravermelho. Região de aquisição de espectros (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1});
- RAMAN: É uma técnica que usa um feixe de luz monocromática que ao atingir a amostra, é espalhada por ele, gerando luz de mesma energia ou de energia diferente da incidente. Esta técnica permite identificar as ligações presentes nas moléculas constituintes de um material, seja ele sólido, líquido ou gasoso, transparente ou opaco, cristalino ou amorfo. Por outro lado dado que nesta técnica é possível analisar vibrações a comprimentos de onda muito inferiores permite determinar o tipo e a quantidade de ligações presentes nas estruturas moleculares de materiais orgânicos ou inorgânicos a partir dos seus estados de vibrações fundamentais. Região de aquisição de espectros (4000 cm^{-1} a 50 cm^{-1}).

As vibrações moleculares passíveis de serem medidas em espectrometria de infravermelho podem ser classificadas em vibração de deformação angular (*bending*) e vibração de deformação axial (*stretching*).

Os espectros adquiridos por estes tipos de equipamento são complexos devido a ocorrerem sobreposições e combinações das ligações dos vários grupos funcionais presentes numa mesma amostra. Para se proceder à interpretação da informação espectral é necessário recorrer a vários métodos de quimiometria, nomeadamente calibração multivariada, que utiliza vários comprimentos de onda específicos para cada determinação de uma dada característica de uma amostra (Shurvell, 2001). Na maioria dos casos utilizando a mesma informação espectral em regiões diferentes e com diferentes pré processamentos é possível retirar informação de vários componentes de uma mesma amostra (Anjos *et al*, 2016; Shurvell, 2001).

Devido à complexidade dos espectros, estes são geralmente transformados antes da análise multivariada. No processo de otimização dos modelos, pode ser utilizado como pré-processamento dos espectros as seguintes metodologias: correção multiplicativa de dispersão; correção da linha de base; normalização pelo mínimo e máximo; normalização vetorial; primeira derivada; primeira derivada + correção multiplicativa de dispersão; primeira derivada + correção da linha de base; primeira derivada + normalização vetorial; segunda derivada.

Na calibração e validação dos modelos obtidos por espectroscopia de infravermelho a robustez dos mesmos é avaliada por uma série de parâmetros estatísticos, nomeadamente: R_k – número de componentes principais; r^2 – coeficiente de determinação; RMSECV - erro quadrático médio da validação cruzada; RMSEP - que traduz a diferença entre os valores previstos da amostra e os valores de referência da amostra na validação do modelo; RPD - desvio residual de previsão.

Conzen (2006) sugere para o caso da Indústria alimentar que modelos com $RPD > 3$ permitem a quantificação de determinado analito, $RPD > 5$ podem ser usados em controlo de qualidade e $RPD > 8$ representam modelos excelentes.

A técnica de FTIR-ATR é uma técnica muito utilizada para a obtenção dos espectros pela sua robustez, tipo de informação passível de ser retirada e pelo facto de o equipamento ser o mais acessível economicamente.

O método de FTIR-ATR provou ser muito robusto em estudos de controlo de qualidade e composição de alimentos (Anjos *et al.*, 2015; Gouvíñas *et al.*, 2015) bebidas alcoólicas (Anjos *et al.* 2016; Lachenmeier, 2007; Palma, 2002) e na deteção de adulterações dos mesmos (Versari *et al.* 2014), entre uma vasta game de outras aplicações.

Pelo exposto e em função da diferente composição das matrizes passíveis de serem analisadas, os espectros resultantes são muito diferentes. Como exemplo na Figura 1 estão representados os espectros adquiridos em FTIR-ATR para amostras de mel, aguardente, azeite e polpa de morango.

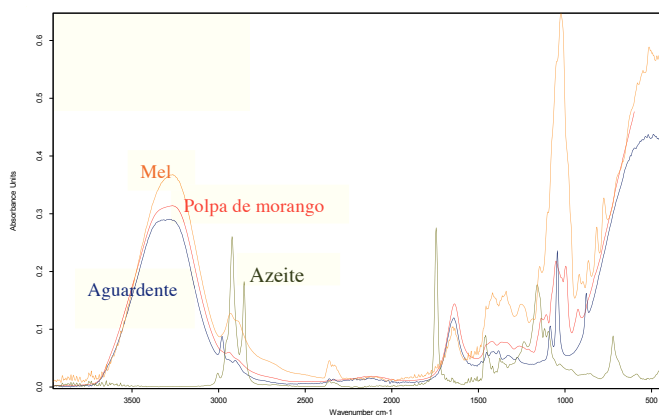


Figura 1 - Espectros adquiridos em FTIR-ATR em amostras de mel (cor de laranja), aguardente (azul), azeite (Verde escuro) e polpa de morango (vermelho).

Do mesmo modo os espectros adquiridos de um mesmo produto, mas em equipamentos distintos apresenta formas diferentes. Na Figura 2 estão representados os espectros adquiridos em FTIR-ATR, NIR e RAMAN para uma amostra de mel.

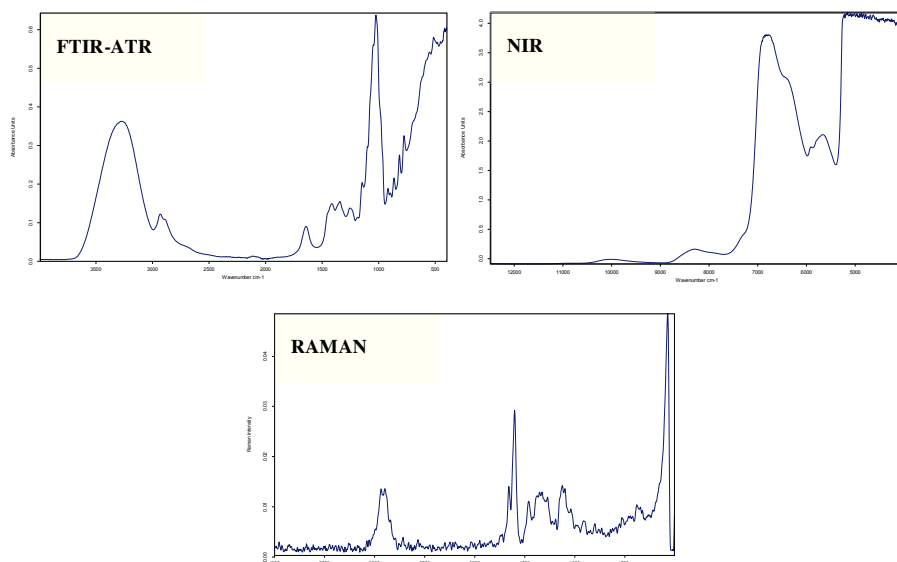


Figura 2 - Espectros adquiridos em FTIR-ATR, NIR e RAMAN de uma amostra de mel.

Como exemplo de aplicação desta técnica apresenta-se o estudo efetuado por Anjos *et al.* (2016) onde se demonstrou a eficácia da aplicação da técnica de FTIR-ATR para determinação rápida do teor alcoólico, teor de metanol, acetaldeído e álcoois superiores em aguardentes víquicas e bagaceiras, com e sem envelhecimento.

A quantificação da componente volátil foi realizada por cromatografia gás-líquido de alta resolução (CGLAR), de acordo com a NP 3263 (CT83, 1990). A determinação do teor alcoólico foi efetuada por destilação e densimetria eletrónica de acordo com o método padrão proposto por OIV (2014).

Os espectros das amostras foram adquiridos com um espectrómetro FTIR Bruker (alfa) com uma resolução de 4 cm^{-1} na região do infravermelho no comprimento de onda de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, utilizando um diamante como dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). A aquisição dos espectros foi efetuada com 32 scans por amostra.

A medição dos parâmetros referidos por FTIR-ATR demonstrou ajustar-se bem para a quantificação destes compostos, tendo sido encontrados valores de desvio residual de previsão (RPD) a variar entre 12,8 para o teor de metanol (em g/hL P.A.) e 4,1 para o teor de 2+3-metil-1-butanol (em g/hL P.A.). Os valores do coeficiente de determinação (r^2) variaram entre 99,4 % e 94,1 % respetivamente para os compostos anteriormente referidos.

Os resultados mostram que é possível aplicar esta técnica como análise rápida para a determinação e controlo de qualidade do teor alcoólico, do metanol, acetaldeído e alguns álcoois superiores (os que apresentaram

RPD>5) em aguardentes víquicas e bagaceira, com e sem envelhecimento.

Noutro estudo realizado por Anjos *et al.* (2015) aplicou-se a técnica de FTIR-ATR para a caracterização dos teores de açúcares (frutose, glucose, melesitose e turanose) em mel de diversas proveniências. Neste estudo, como método clássico de determinação de açúcares foi utilizado um cromatógrafo iónico Dionex 3000, equipado com uma coluna CarboPac™ PA20 3x150 mm e pré coluna CarboPac™ PA20 3x30 mm e detector electroquímico no modo Integrated Pulsed amperometric Detection (IPAD). A aquisição dos espectros foi efetuada de modo semelhante ao descrito anteriormente. Apesar do nº de amostras não ser suficiente para construir um modelo de calibração com robustez suficiente para a utilização em controlo de qualidade, ficou provado que esta técnica é promissora para a análise de açúcares em mel.

Referências bibliográficas

- Anjos, O.; Campos, M. G.; Ruiz, P. C.; Antunes, P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169: 218–223.
- Anjos, O.; Santos, A.J.A.; Estevinho, M.L.; Caldeira, I. (2016). FTIR-ATR spectroscopy applied to quality control of grape-derived spirits. *Food Chemistry*, 205C:28-35
- Blanco, M.; Villaroya, I. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*. 21: 240-250.
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical plant*, Wiley & Sons. Chichester.
- Conzen, J. P. (2006). *Multivariate Calibration. A Practical Guide for the Method development in the Analytical Chemistry*. Bruker Optick GmbH. 2nd edition.
- Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A.-C.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Gouvinhas, I.E.; De Almeida, J.M.M.M.; Carvalho, T.; Machado, N.; Lachenmeier, D.W. (2007). Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 101(2): 825–832.
- Gouvinhas, I.; de Almeida J.M.M.M.; Carvalho, T.; Machado, N.; Barros, A.I.R.N.A. (2015). Discrimination and characterization of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Food Chemistry*, 174(1):226-232.
- Lachenmeier, D. W. (2007). Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 101(2): 825–832.
- OIV (2014). *Compendium of International Methods of Spirituous Beverages of Vitivicultural Origin*. OIV, Paris.
- Palma, M. (2002). Application of FT-IR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and other distilled drinks. *Talanta*, 58(2): 265–271.
- Reich, G. (2005). Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:1109-1143.
- Shurvell, H. F. (2001). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. (JohnWiley & Sons, Ed.). New York, NY, USA.
- Versari, A.; Laurie, V. F.; Ricci, A.; Laghi, L.; Parpinello, G.P. (2014). Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International*, 60:2-18.