

QUANTIFICAÇÃO MAIS LIMPA DE FIBRAS EM BISCOITOS SALGADOS TIPO CRACKER ATRAVÉS DE FTIR E QUIMIOMETRIA

DIEHL, H¹; CORBELLINI, V.A.^{2,3,4}; ROHLFES^{2,5}, A.L.B.; BACCAR, N.M.².

PALAVRAS-CHAVE: FTIR, quimiometria; fibras; biscoitos tipo cracker

RESUMO

Neste trabalho apresentamos a implantação e a otimização de um novo método mais limpo baseado em Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e quimiometria para a quantificação de fibras em biscoitos salgados tipo *cracker*. Para tanto, 60 amostras de biscoitos salgados tipo *cracker* oriundos do comércio local de Santa Cruz do Sul (RS, Brasil) foram trituradas e submetidas à análise de fibras por digestão ácida e alcalina segundo o método de referência. As amostras foram também analisadas pela técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) na faixa de 4000-650 cm⁻¹. O conjunto de espectros foi modelado via regressão por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS) com os dados do método de referência em diferentes faixas espectrais e pré-processamentos. Um modelo ATR/OPLS otimizado foi obtido na faixa de 4000-650 cm⁻¹ com 2 variáveis latentes e dados sem pré-processamento, transformados pela 1^a derivada e por 1 componente de correção de sinal ortogonal. A validação cruzada retornou um coeficiente de determinação de 0,9999 e um erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) de 0,0115%, comprovando assim a validade do método FTIR com quimiometria para esta finalidade

CLEANER QUANTIFICATION OF DIETARY FIBRE IN CRACKER BISCUITS THROUGH FTIR AND CHEMOMETRICS

KEYWORDS: FTIR, chemometrics; dietary fibers; cracker biscuits

ABSTRACT

In this work we present the optimization and implementation of a new cleaner method based on Fourier transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and chemometrics for the quantification of fibers in cracker biscuits. For this purpose, 60 samples of cracker biscuits from the local market in Santa Cruz do Sul (RS, Brazil) were crushed and subjected to fiber analysis by acid and alkaline digestion according to the reference method. The samples were also analyzed by the technique of Attenuated Total Reflectance (ATR) in the range of 4000-650 cm⁻¹. The spectral data set was modeled via orthogonal partial least squares regression (OPLS) with data from the reference method in different spectral bands and pre-processing. An optimized ATR/OPLS model was obtained in the range of 4000-650 cm⁻¹ with 2 latent variables and data without pre-processing, transformed by the 1st derivative and by 1 component of orthogonal signal correction. The cross-validation returned a coefficient of determination of 0.9999 and a mean squared error of cross-validation (RMSECV) of 0.0115 %, thus proving the validity of the FTIR method with chemometrics for this purpose.

¹ Acadêmico do curso de Engenharia Química na Universidade de Santa Cruz do Sul.

² Doutor e Docente do Departamento de Ciências, Humanidades e Educação na Universidade de Santa Cruz do Sul <valer@unisc.br>

³ Docente do Programa de Pós-graduação em Promoção da Saúde na Universidade de Santa Cruz do Sul;

⁴ Docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental na Universidade de Santa Cruz do Sul;

⁵ Docente do Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos Industriais na Universidade de Santa Cruz do Sul;

1 INTRODUÇÃO

Biscoitos *cream crackers* e biscoitos água e sal, ou simplesmente biscoitos salgados tipo *cracker*, são amplamente consumidos pelo seu baixo custo, facilidade de ingestão, e alta oferta em diferentes preços e marcas. Estes alimentos também são uma ótima fonte rápida de carboidratos e nutrientes. Em função do consumo elevado e da grande escala de produção, análises que garantam a qualidade do produto, devem ser feitas com mais precisão e frequência para que os consumidores e os produtores dos biscoitos não sofram nenhum mal decorrente de alguma falha que possa ter acontecido durante a produção.

Um parâmetro importante para caracterizar a qualidade de um alimento é a quantidade de fibras vegetais presentes. A fibra não consegue ser digerida após a sua ingestão e não contribui como reserva energética, porém ela ajuda no bom funcionamento do intestino. Logo, a quantificação de fibras contribui para a determinação da qualidade destes biscoitos. Entretanto, estas análises são onerosas, consomem tempo e extensa quantidade de reagentes e geram resíduos.

Por outro lado, a Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma tecnologia analítica rápida, consome pouquíssimos ou nenhum produtos químicos para seu manuseio, como também uma pequena quantidade de amostra para cada análise. A associação da FTIR com algoritmos quimiométricos já tem sido usada na determinação de parâmetros centesimais em diversos tipos de alimentos, porém ainda não foi aplicada em biscoitos tipo *cracker* sendo este o objetivo de investigação deste trabalho.

Devido à escassez de estudos desta natureza em biscoitos e devido ao elevado consumo de alimentos desta natureza principalmente pelo público adulto torna-se imperativo que estas sejam ofertadas com garantias de segurança e qualidade alimentar, visando atender às exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Neste sentido, o desenvolvimento de análise baseadas em FTIR trariam informações mais rápidas, baratas e de menor impacto ambiental, justificando este projeto.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Segundo a ABIMAPI (Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados), a produção de biscoitos *cream cracker* e biscoitos água e sal no ano de 2020, foi de 324 mil toneladas, o que corresponde a aproximadamente 21% da produção de biscoitos (ABIMAPI, 2020). Entre todos os tipos de biscoitos, sua produção é inferior apenas aos biscoitos recheados doces.

Os biscoitos estão presentes em cerca de 99,7% dos lares brasileiros e respondem por um consumo *per capita* de 8,52 a 8,2 kg nos últimos cinco anos sendo que, em 2016, os biscoitos salgados tipo *cracker* atingiram 21,3% do consumo total de biscoitos no país (ABIMAPI, 2017). Estes alimentos se apresentam como alternativas de acesso rápido a alguns nutrientes oriundos da farinha de trigo (GUTKOSKI et al., 2003). Este elevado consumo não é isento de danos à saúde. Se por um lado há um apelo afetivo no seu consumo, por outro lado há exigências dos órgãos de regulamentação quanto à qualidade e segurança destes produtos. As fibras estão os componentes que estão presentes neste tipo de alimento e que contribuem para um impacto nutricional (DHINGRA et al., 2012).

As fibras da dieta estão associadas com benefícios importantes para a saúde: a) ajudam na manutenção da microbiota intestinal; b) estimulam a motilidade intestinal (trânsito intestinal); c) contribuem com a consistência normal das fezes, prevenindo assim a diarreia e a constipação intestinal por alterarem a microbiota colônica por uma microbiota saudável. Entretanto, se em excesso, as fibras passam a ocupar volume de

substâncias que tem grandes benefícios para o organismo, como proteínas, carboidratos, entre outros, justificando a necessidade de estabelecer-se o teor deste componente nos alimentos. Nesse sentido, a edição mais recente da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos preconiza uma concentração de 2,5% de fibras alimentares em biscoitos salgados tipo cracker (TACO, 2011).

O termo fibras inclui um conjunto de biopolímeros com comportamento diferenciado em relação à sua solubilidade. As fibras solúveis compreendem a celulose, as hemiceluloses e derivados da lignina. As fibras solúveis compreendem as pectinas, gomas e mucilagens (ANITTA and ABRAHAM, 1997).

A análise de fibras pode ser realizada por diversos métodos cada um com suas especificidades e limitações (MERTENS, 2003; DHINGRA et al., 2012). Estes métodos incluem tratamentos químicos ou enzimáticos seguidos de análises gravimétricas ou cromatográficas e consomem tempo e reagentes, gerando considerável carga de resíduos a serem tratados até sua disposição final.

Neste contexto, surge a necessidade de inovação tecnológica no setor de controle de qualidade de alimentos com o desenvolvimento de plataformas analíticas mais rápidas, baratas, e limpas (com baixo consumo de reagentes), mas com o mesmo desempenho (robustez) dos métodos oficiais. Este é o caso da Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) associada à quimiometria (CEN, HE, 2007, KAROUI et al., 2010).

A radiação infravermelha se situa entre a luz visível e a região de micro-ondas no espectro eletromagnético. As regiões mais utilizadas para fins analíticos compreendem o infravermelho próximo (NIR) situado entre 750 e 2.500 nm (13.400 a 4.000 cm^{-1}), e o infravermelho médio (MIR), abrangendo a região espectral de 2.500 a 25.000 nm (4.000 a 400 cm^{-1}) (SUBRAMANIAN & RODRIGEZ-SAONA, 2009). Amostras gasosas, líquidas ou sólidas presentes em alimentos podem absorver em diferentes regiões destas faixas espectrais conforme o padrão de ligação e de movimento envolvido gerando um espectro (assinatura espectral) de transmissão ou de absorção (COZZOLINO, 2011; SUBRAMANIAN & RODRIGEZ-SAONA, 2009).

Os espectros MIR se formam a partir de movimentos fundamentais caracterizados como vibrações de estiramento (deformação axial), angular e rotacional das moléculas presentes na amostra. O espectro NIR se forma a partir de bandas de combinação ou harmônicos (*overtones*) de bandas oriundas do MIR. Análise na região do MIR geram espectros com picos mais resolvidos que no NIR e com maior riqueza de informação espectral. Por outro lado, a ampla sobreposição de bandas na região do NIR pode diminuir a necessidade de utilização de maior quantidade de variáveis (comprimentos de onda) em análises de rotina (COZZOLINO, 2011; SMYTH & COZZOLINO, 2013; SUBRAMANIAN & RODRIGEZ-SAONA, 2009).

A FTIR é considerada uma tecnologia limpa, rápida, com mínima preparação de amostra e de baixo custo com capacidade para a implementação de métodos analíticos na indústria frente às técnicas convencionais de análise de alimentos. Entretanto, a quantidade de variáveis geradas durante a obtenção de espectros devido à complexidade dos alimentos dificulta a interpretação de dados, necessitando de algoritmos multivariados para sua interpretação. Para tanto, métodos quimiométricos de análise exploratória (PCA), de classificação (SIMCA, PLS-DA) ou de calibração (PLS, PCR) multivariados e baseados na compressão de dados oferecem o suporte necessário para a correta discriminação de produtos alimentícios adulterados ou para a quantificação de componentes alimentares específicos relacionados com a determinação da composição centesimal. A combinação de métodos quimiométricos com a FTIR aumenta a qualidade e a quantidade de informação gerada

a partir da amostra analisada possibilitando uma maior amplitude de aplicações incluindo avaliação da composição, autenticidade e rastreio de amostras alimentícias (BRERETON, 2003; McCLURE, 2003; COZZOLINO, 2009; KAROUI et al., 2010). Nestas condições, os métodos quimiométricos combinados com a FTIR possibilitam desenvolver modelos matemáticos para determinação de mais que um componente ao mesmo tempo e podem agir como suporte para estabelecer padrões entre amostras de diferentes locais, fornecedores, ou entre lotes sequenciais de um mesmo processo industrial (BRERETON, 2003; McCLURE, 2003; COZZOLINO, 2009; KAROUI et al., 2010; COZZOLINO et al., 2012; COZZOLINO, 2014; GRANATO et al., 2018).

A FTIR associada à quimiometria tem sido aplicada na caracterização de fibras extraídas de alimentos (CHILYNSKA, M. et al., 2016; GUO et al., 2021; RUIZ et al., 2021) bem como de produtos alimentícios derivados de cereais com ênfase na caracterização de farinha de trigo e derivados como fibra de trigo (DELWICHE, GRAYBOSCH, PETERSON, 1998; FERRÃO et al., 2004; MIRALBÉS, 2004; MUTTLU et al., 2011; SINELLI et al., 2011, RANZAN et al., 2015; HELL et al., 2016) e em blendas (ARMANINO, FESTA, 1996; COCHI et al., 2005; COCHI et al., 2006; DOWELL et al., 2006; FOCA et al., 2009; ALBANELL, MIÑARRO, & CARRASCO, 2012; CHEN, ZHU, ZHAO, 2016). Os estudos de caracterização nutricional com biscoitos são escassos. Entretanto, aplicações na determinação da composição centesimal parcial tem sido focada em outros tipos de alimentos objetivando a quantificação de gorduras (VONGSVIVUT, J. et al., 2012;), carboidratos (CERNÁ et al., 2003; CHILYNSKA et al., 2016) e proteínas (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e processamento das amostras

Amostras de biscoitos água e sal e *cream cracker* de 5 diferentes fornecedores foram adquiridas em comércio de Santa Cruz do Sul (RS, Brasil) em seis momentos diferentes no período de 2020 a 2021 totalizando 60 amostras. As amostras foram trituradas em multiprocessador e armazenados em embalagens plásticas hermeticamente fechadas.

3.2 Determinação de Fibras

As determinações de fibras foram realizadas pelo método de Weende conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e realizada em triplicata para cada amostra.

O método de Weende, utilizado na determinação de fibras, baseia-se na digestão ácida da amostra, seguida da digestão alcalina (BRASIL, 1991). O que restar de amostra após a realização do processo são as fibras. Para tanto, cerca de 0,8 g de amostra é transferido para o balão de fundo redondo, e em seguida são adicionados 50 mL da solução de ácido sulfúrico 0,15 mol L⁻¹, que são mantidos em ebulição, sob refluxo, por 30 min. Decorrido esse tempo, são adicionados 25 mL da solução de hidróxido de sódio 1,5 mol L⁻¹, igualmente mantidos em ebulição, sob refluxo, por 30 min. O conteúdo do balão é filtrado a vácuo, em papel filtro previamente tarado, seco em estufa por 1 h e resfriado em dessecador. Posteriormente, o papel filtro é pesado, sendo obtidas as fibras.

3.3 Análises espectroscópicas

A aquisição espectral de cada amostra foi conduzida por Reflexão Total Atenuada em espectrômetro Spectrum 400 FTIR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer®) com laser de HeNe de 633nm com 4 pulsos de

varredura, 4 cm⁻¹ de resolução e na faixa de 4000-600 cm⁻¹, gerando espectros em absorbância em acessório UATR (Perkin-Elmer, Código L1250050).

3.4 Análise e processamento dos dados

Análises multivariadas foram conduzidas em software Pirouette versão 4.0. Amostras foram categorizadas em dois grupos conforme o valor de fibras fosse menor ou igual à média dos valores quantificados (grupo I) ou maior que a respectiva média (grupo II).

Os espectros coletados foram organizados em planilha Excel, normalizados pela amplitude e os espectros médios calculados e pré-processados por 1^a ou 2^a derivadas (Savitzky-Golay, janela de 5 pontos espectrais contíguos) por amostra e 1 componente de correção de sinal ortogonal (OSC).

Espectros médios dos grupos I e II de amostras foram obtidos e submetidos à análise de teste t bicaudado homoscedástico considerando significativas as diferenças com $p < 0.05$.

A análise de regressão multivariada via Mínimos Quadrados Parciais foi aplicada ao conjunto de espectros médios das amostras usando diferentes faixas espectrais. As faixas parciais foram definidas com base nas absorções predominantes de carboidratos (1200-901 cm⁻¹), proteínas (1720-1481 cm⁻¹), e lipídios (3200-2801 cm⁻¹). Faixas complementares de 1480-1201 cm⁻¹, 2800-1721 cm⁻¹ e 4000-3201 cm⁻¹, foram incluídas para completar o rastreamento de mais de 90 % do conjunto de variáveis originalmente utilizado para aquisição espectral.

Inicialmente, validação cruzada com mútua exclusão de um por vez baseada no algoritmo NIPALS foi aplicada ao conjunto de espectros médios em cada faixa espectral e o valor de raiz quadrada de erro médio de validação cruzada (RMSECV) determinado para cada etapa de inclusão por vez de uma variável latente (VL). A faixa espectral com menor valor de RMSECV foi selecionada para validação externa a qual foi conduzida separando o conjunto de amostras em conjunto de calibração (CC) e de previsão (CP). CC e CP foram obtidos por segregação sistemática 1:1 do conjunto total de amostras em ordem crescente dos valores de fibra quantificados, cuidando-se para que os extremos da faixa de quantificação fossem alocados em CC. O número máximo de variáveis latentes (NVL) da modelagem ATR/OPLS de CC e de CP foi definido com base na equação (ASTM, 2017)

$$NVL = (N-6)/6$$

onde N é o número de amostras de CC. Este número é respeitado para evitar superajuste.

Os valores de CP foram estimados por inclusão sistemática de um espectro (amostra) por vez no modelo de calibração de CC seguindo com pré-processamento similar ao aplicado ao conjunto total de amostras.

Ajuste linear entre valores preditos por ATR/OPLS e calculados pelo método de referência em CC foi avaliado pelo RMSECV e o coeficiente de determinação (R²). Discriminação de valor quantificado entre amostras foi avaliada pela sensibilidade. A presença de erro sistemático foi avaliada pelo $t_{viés}$. As figuras de mérito para etapa de validação externa em CP foram quase todas as mesmas, porém substituindo RMSECV pelo erro quadrático médio de predição (RMSEP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação de fibras

Os resultados obtidos pelo método convencional para fibras estão representados na Figura 1. Pode-se perceber, em geral, um padrão entre os dados recolhidos, como o fato de biscoitos da mesma empresa (A01 e A02, A03 e A04, A05 e A06 e assim consequentemente) costumam ser próximos.

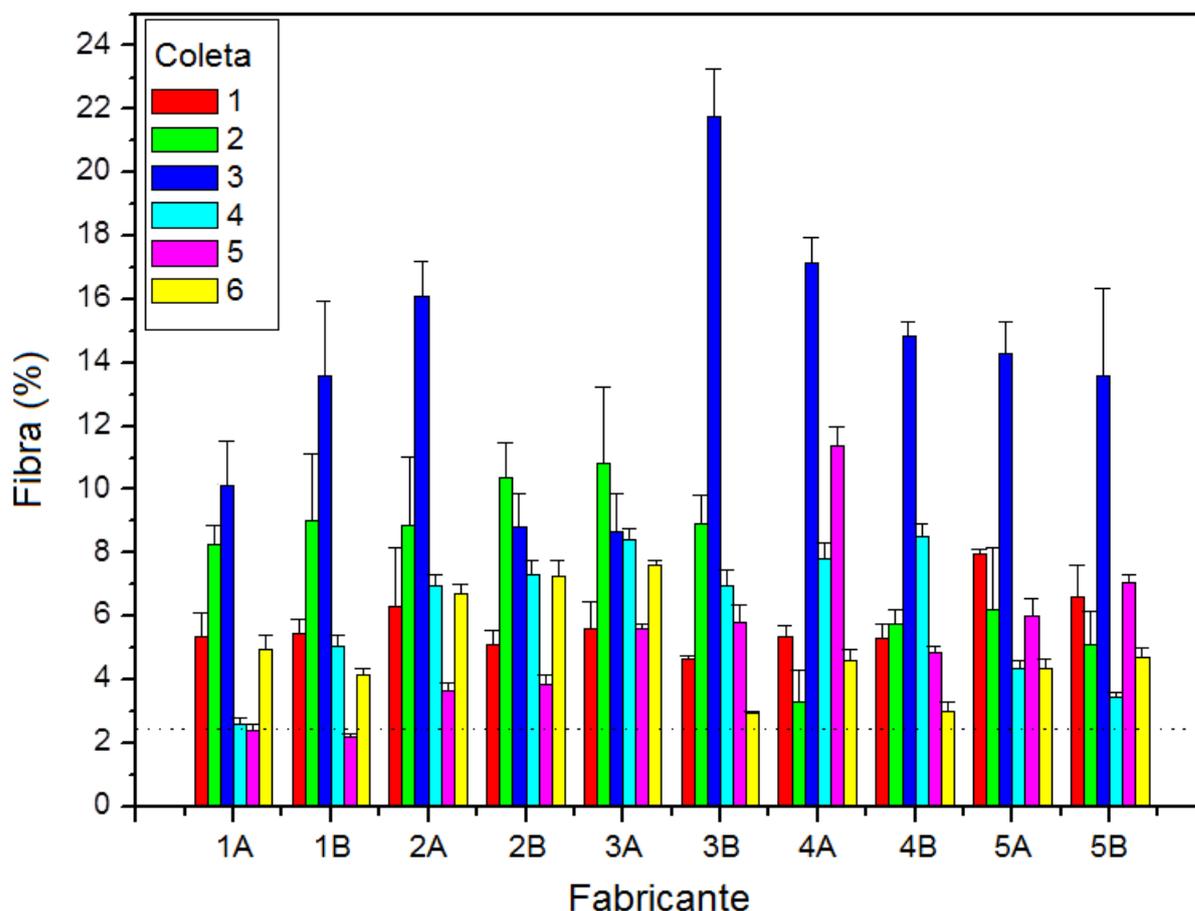


Figura 1: Porcentagem de fibras em amostras de biscoitos salgados água e sal (A) e *cream cracker* (B) de diferentes fabricantes e adquiridas no comércio de Santa Cruz do Sul em 2019-2020. Linha pontilhada representa o valor estipulado pela Legislação (TACO, 2011).

A faixa de fibras quantificada variou de 2,20 a 21,79% sendo que a maioria (96,7% das amostras) encontrava-se com valores acima de 2,5% de fibras. Houve variação nos valores entre as coletas com valores mais elevados ocorrendo na 3ª coleta (2º semestre de 2019) e valores mais baixos na sexta coleta (2º semestre de 2020). Esta variação entre as coletas pode estar refletindo variações sazonais na qualidade da farinha utilizada na elaboração dos biscoitos.

4.2 Análises por FTIR

O conjunto total de espectros médios (n=60) mostra um perfil de bandas preservado entre as amostras (Figura 2).

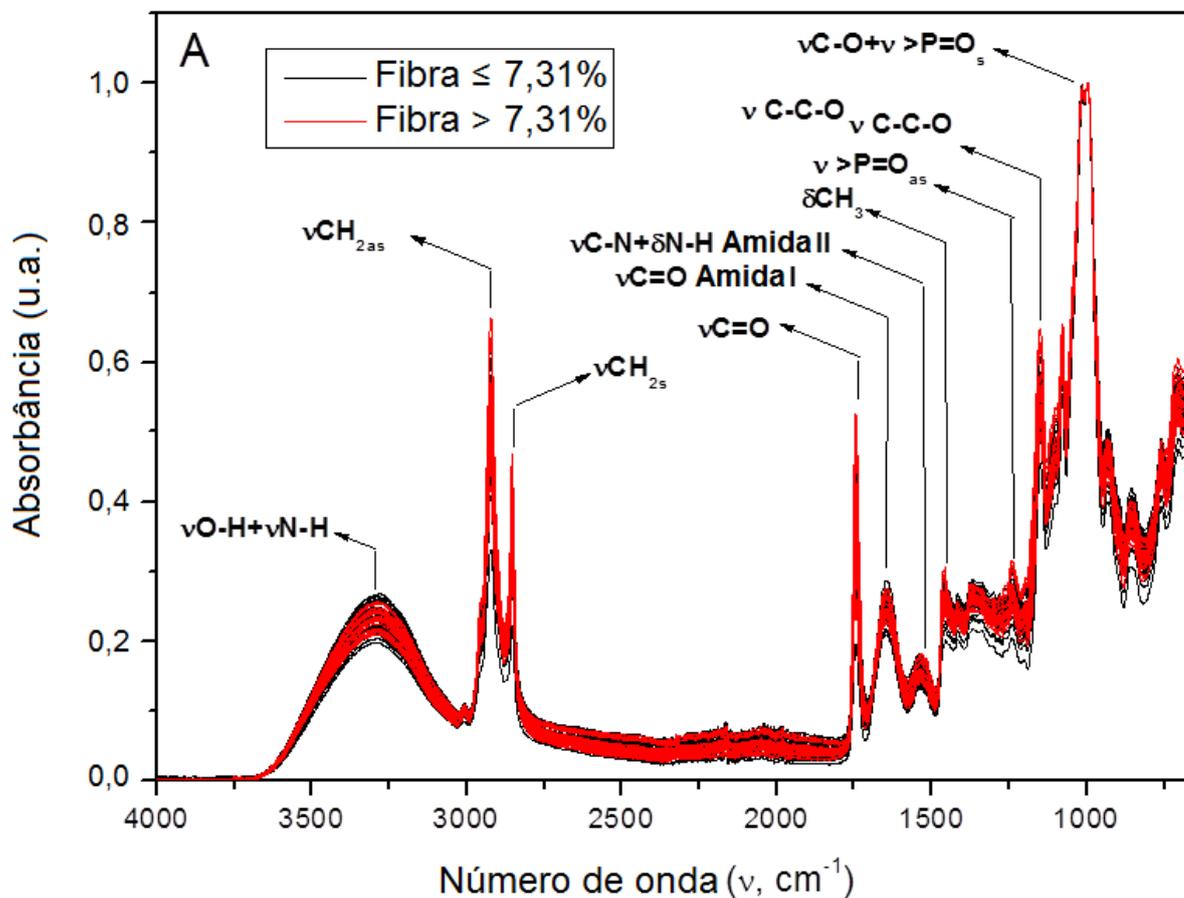


Figura 2 - Espectros totais médios ATR das triplicatas normalizadas de amostras de biscoitos tipo *cracker* com atribuições das principais bandas.

Variações na intensidade de absorção entre diferentes amostras foram observadas em algumas bandas, como em 3700-3150 cm^{-1} , associada predominantemente aos polissacarídeos ($\nu\text{O-H}$) e proteínas ($\nu\text{N-H}$) presentes na amostra (FERRÃO et al., 2004; RANZAN et al., 2015; HELL et al., 2016). As bandas $\nu\text{CH}_{2\text{as}}$ e $\nu\text{CH}_{2\text{s}}$ e $\nu\text{C=O}$ reforçam a presença de triacilglicerol da gordura vegetal hidrogenada. A presença de proteínas está associada à faixa correspondente aos números de onda de 3300, 1650 e 1550 cm^{-1} , atribuídos às bandas de Amida A, Amida I e Amida II, respectivamente. Amido e fibras de polissacarídeos têm relação com as bandas ($\nu\text{O-H}$) e ($\nu\text{C-O}$) na faixa de 1200 cm^{-1} a 900 cm^{-1} . A banda de 1240 cm^{-1} está associada à presença de fosfatos e contribui para a determinação de cinzas nas amostras. Os componentes descritos concordam com os ingredientes majoritários preconizados pela legislação para elaboração de alimentos desta natureza (BRASIL, 1978).

Discriminação dos espectros médios de GI e GII com dados sem pré-processamento (Figura 3A) indicam a faixa de 1000 a 978 cm^{-1} e alguns harmônicos e bandas de combinação ente 4000-3600 cm^{-1} . A primeira faixa

indica forte associação de valores de fibras com movimentos do tipo (vC-O) de polissacarídeos (CHILYNSKA, M. et al., 2016; GUO et al., 2021; RUIZ et al., 2021).

A introdução de tratamento dos dados com a 1ª derivada aumentou a discriminação para 731 números de onda com $p < 0$, distribuídos pela faixa espectral investigada, porém em maior concentração na faixa de 2800-1700 cm^{-1} , seguido pela faixa entre 4000-3000 cm^{-1} . Estas duas faixas envolvem números de onda de baixa intensidade de absorção. As variáveis com maior poder discriminatório se localizaram fora da região de *fingerprint*, sendo dez com $p < 1,0\text{E-}5$ (1887, 1891, 1892, 2258, 2272, 2451, 2452, 2754, 3982, 3983 cm^{-1}) das quais duas com $p < 1,0\text{E-}6$ (1887, 2258 cm^{-1}) destacadas na Figura 3A. Absorções nestas regiões estão relacionadas a movimentos de anéis aromáticos substituídos que estão presentes em fibras de lignina e que podem estar relacionada ao uso de farinhas de qualidade inferior e que contribuem para maiores valores de fibras a serem quantificados pela digestão sequencial ácida e básica.

O tratamento com 2ª derivada trouxe um valor similar de comprimentos de onda com $p < 0,05$ para discriminação entre GI e GII sendo nove variáveis (1442, 1443, 1885, 1889, 1890, 2449, 2450, 2453, 2491 cm^{-1}) com $p < 1,0\text{E-}5$ e três (1889, 2449 e 2450 cm^{-1}) com $p < 1,0\text{E-}6$ (Figura 3C). Observa-se a importância de aplicação de transformação dos dados pela 1ª ou 2ª para salientar diferenças quali- e quantitativas que os espectros médios com dados não transformados não revelam ou o fazem de forma limitada. Este recurso já é bem documentado (WHITBECK, 1981) e explorado em situações envolvendo matrizes biológicas complexas (KONG & YU, 2007; RIEPPO et al., 2012; PARK et al., 2019).

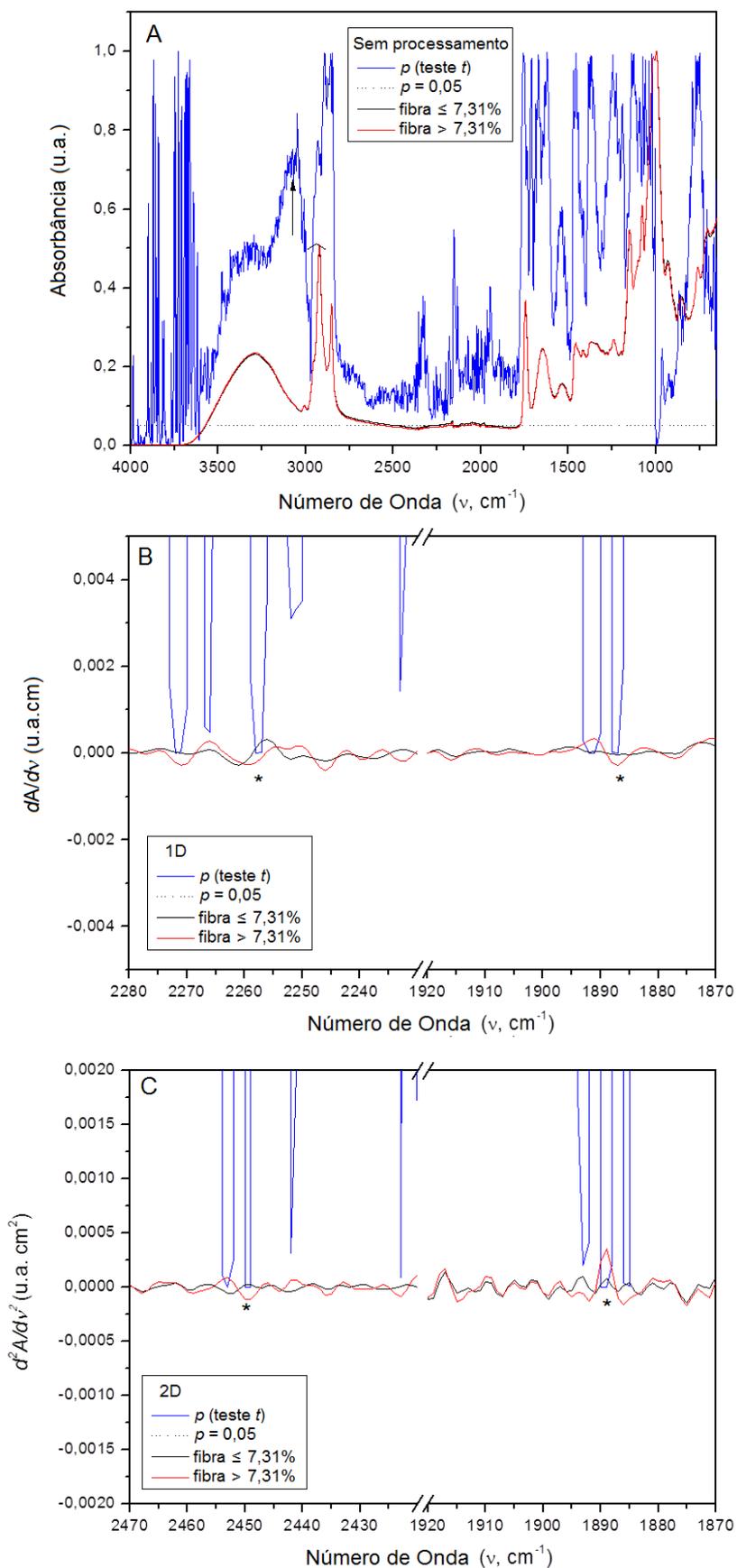


Figura 3 – A) Variação do teste t em função do comprimento de onda para os dados brutos (espectros de absorvância). B) e C) representam comprimentos de onda com $p < 1,0E-6$. (*) entre os grupos GI (fibras $\leq 7,31\%$) ou GII (fibras $> 7,31\%$) para tratamento dos dados com 1ª (1D) ou 2ª (2D) derivadas, respectivamente.

A parte B da figura mostra a introdução da 1ª derivada nos espectros colhidos, ela mostra com mais nitidez a diferença e a distância das amostras com a média aritmética dos espectros.

4.3 Análise de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Todos os modelos necessitaram de aplicação de 1 componente OSC para melhorar a qualidade preditiva. Similarmente, a introdução do pré-processamento por centragem na média ou autoescalamamento prejudicou o desempenho dos modelos. Os modelos obtidos com dados espectrais transformados pela 1ª ou 2ª derivadas apresentaram qualidade preditiva superior aos respectivos modelos com dados não transformados. As faixas espectrais de 1200-851 e 3200-2801 cm^{-1} com dados espectrais tratados por 1ª derivada geraram modelos com comportamento anômalo, com valores de RMSECV crescentes com a introdução de variáveis latentes na modelagem (Figura 4A) e foram descartados.

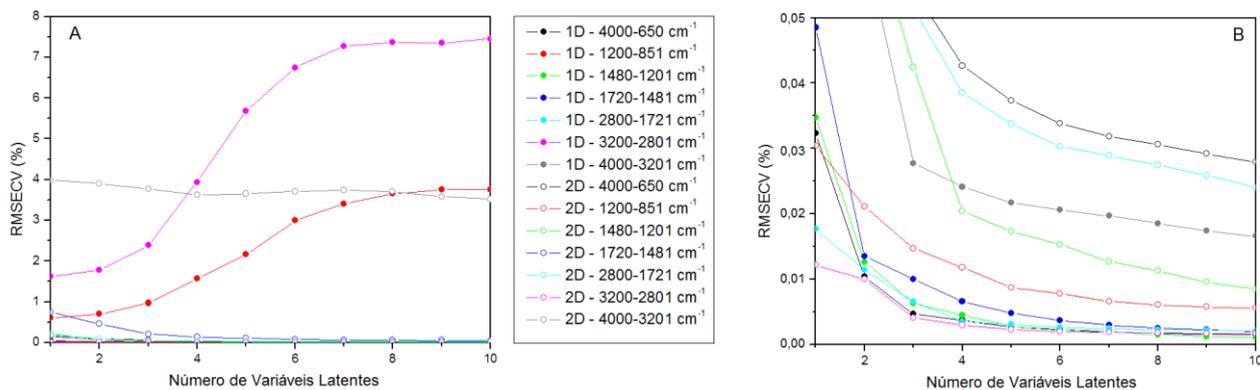


Figura 4 - A = variação de RMSECV em função do número de variáveis latentes (VL) para modelos ATR/OPLS de quantificação de fibras em amostras de biscoitos tipo *cracker* em diferentes faixas espectrais e após transformação por 1ª (1D) e 2ª (2D) derivadas. B) amplificação das curvas de A para perfis de RMSECV iniciais menores que 0,05%.

Valores de RMSECV decrescentes, porém elevados (acima de 3,5 %) ocorreram com o tratamento pela 2ª derivada sendo também descartado. As demais faixas apresentaram o comportamento esperado, com RMSECV inicial baixo (menor que 0,1% com 1 VL) rapidamente decrescente nas duas primeiras VLs com pouca variação, porém decrescente, a partir da 3ª VL. Uma visualização destacada do perfil de evolução de RMSECV destas faixas (Figura 4B) mostra que a partir da 4ª VL há pouca diferença na qualidade preditiva entre estas faixas (RMSECV próximo a 0,005%). Modelos ATR/OPLS 1D-4000-650 e 2D-3200-2801 geram os menores valores de RMSECV e diferindo apenas na 1ª VL.

Esta etapa da investigação mostra a importância de explorar diferentes faixas espectrais, métodos de transformação de variável e métodos de pré-processamento para chegar a um modelo otimizado.

O modelo com a faixa completa foi selecionado para validação externa e o modelo ATR/OPLS 1D otimizado foi obtido com 2 VLs e dados sem pré-processamento transformados pela 1ª derivada e 1 componente OSC. A escolha da faixa espectral completa em detrimento da faixa de 3200-2801 cm^{-1} é meramente ilustrativa, mas pode ser interpretada como um critério de facilidade na implementação do modelo em rotina de análises na indústria ao estabelecer a interface entre o espectrômetro e o software de análise multivariada.

CC e CP preservaram o perfil de evolução decrescente de RMSECV com o aumento do número de VL inseridas na modelagem (Figura 5A). Houve uma diminuição na qualidade preditiva com 1 VL mas esta diferença diminuiu a partir da 2ª VL incluída na modelagem. A aplicação da Equação 1 sobre o número de amostras de CC (N = 30) revela que um valor de 4 para NVL sendo a modelagem avaliada até a inclusão desta última para evitar superajuste.

Figuras de mérito do modelo ATR/OPLS 1D-4000-650 (Figuras 5B e 5C; Tabela 1) revelaram uma excelente qualidade preditiva com RMSECV de 0,01% (para CC e CP); coeficiente de determinação (R^2) > 0,9999 (para CC e CP) e $t_{\text{viés}}$ de 1,39.

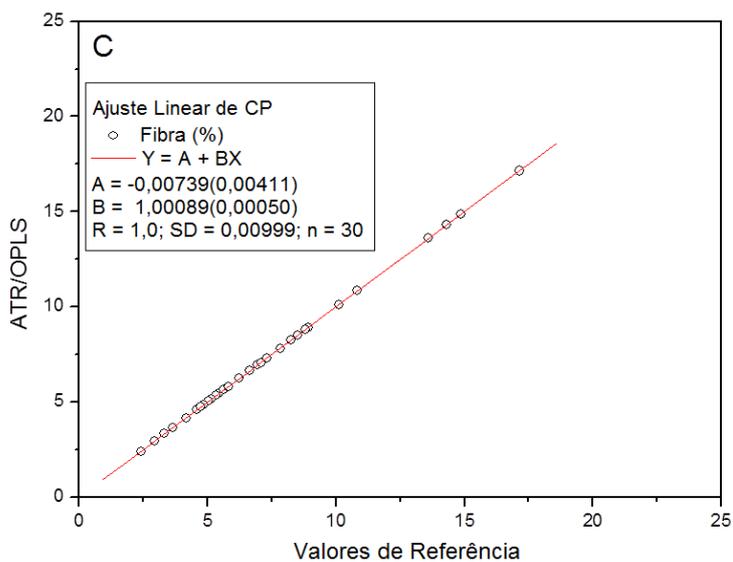
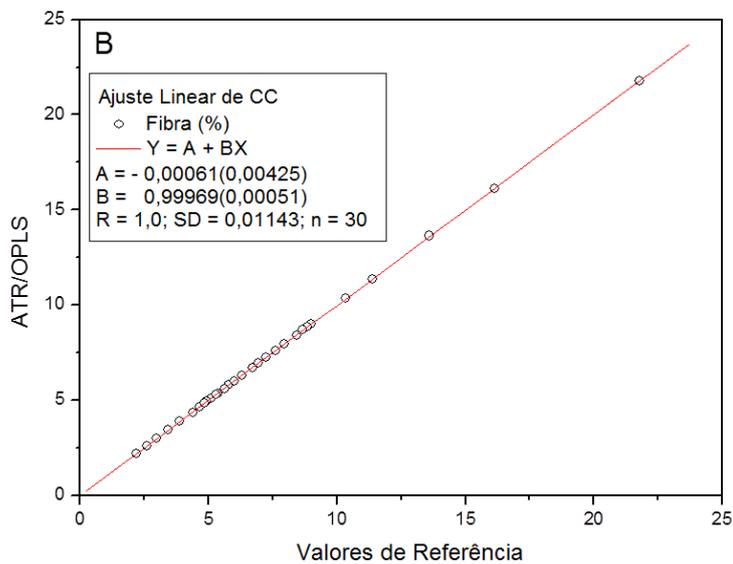
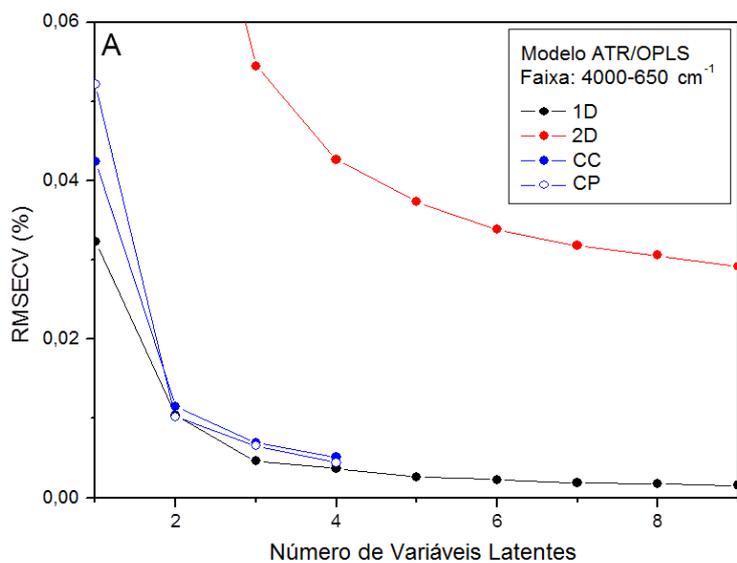


Figura 5 - A = variação de RMSECV em função do número de variáveis latentes (VL) para o modelo ATR/OPLS de quantificação de fibras em amostras de biscoitos tipo *cracker* usando a faixa de 4000-650 cm^{-1} e a transformação dos dados pela 1ª derivada e 1 componente OSC. A mesma evolução é representada para os Conjuntos de Calibração (CC) e de Previsão (CP) truncados após a 4ª VL. B e C = Ajuste linear da modelagem para CC e CP para modelo com 2 VL e 1 OSC.

Tabela 1 - Figuras de mérito do modelo ATR/OPLS de quantificação de fibras em biscoitos tipo *cracker* na faixa de 4000-650 cm^{-1}

Amostra	RMSECV	RMSEP	R ²	VRA (%)	t _{viés}	sen
CC	0,0115	-	0,999997	98,95	1,369	0,022
CP	-	0,0102	0,999993	98,75	0,4431	-

CC = conjunto de Calibração; CP = Conjunto de Previsão; RMSECV = raiz quadrada do erro médio de validação cruzada; RMSEP = raiz quadrada do erro médio de previsão; R² = coeficiente de determinação; VRA = variância relativa acumulada; t_{viés} = tamanho do efeito do viés; sen = sensibilidade. Modelo obtido com 1ª derivada, 2 VL e 1 componente OSC. Faixa de quantificação: 2,20-21-79%; t_{viés} = 2,04 para 30 amostras e nível de significância de 95%.

As figuras de mérito de CC e CP demonstram um excelente ajuste linear aos dados de supervisão (Figuras 5b e 5c) com discriminação mínima (sensibilidade) de 0,02% entre amostras. Valores de t_{viés}, estão abaixo do valor mínimo estabelecido para 30 graus de liberdade (30 amostras) e nível de significância de 95%, indicando pouca contribuição de erro sistemático nas previsões. A qualidade da modelagem é superior ao de outros estudos de quantificação de fibras em cascas de frutas na faixa do MIR (CHILYNSKA et al., 2016) ou usando NIR (ARCHIBALD & KAYS, 2000) e ressalva a importância de combinar a transformação da 1ª e da 2ª derivada com o uso da correção de sinal ortogonal.

O método proposto traz como vantagens a aplicação de uma técnica baseada em tecnologias limpas para a quantificação de fibras em biscoitos e agiliza as análises de rotina em alimentos desta natureza. Além disso, a faixa de quantificação das amostras reforça a sua robustez e permite reintroduzir mais amostras caso seja necessária ampliar a faixa de quantificação. Neste caso, reavaliação da modelagem deve ser investigada com reelaboração de CC para aceitar as novas amostras externas. O modelo se limita à aplicação em amostras com padrão similar aos biscoitos utilizados. A extensão da modelagem para amostras com variações na composição deverão ser reavaliadas.

5 CONCLUSÃO

O método de análise de fibras em biscoitos tipo *cracker* por FTIR pela técnica de ATR combinada com algoritmo OPLS pode ser aplicado como uma alternativa viável, mais limpa e com desempenho similar ao método de referência impactando na diminuição de geração de resíduos de análise.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação pela bolsa ao acadêmico Henrique Diehl no período de 08/2020 a 07/2021.

REFERÊNCIAS

ABIMAPI 2017/2018. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e pães e Bolos Industrializados. Disponível em https://www.abimapi.com.br/anuario/02.html#your_book_name/6-7. Acesso em 21/07/2017.

ABIMAPI 2019/2020 – Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e pães e Bolos Industrializados. Disponível em: <<https://abimapi.com.br>> Acesso em: 20 de fevereiro de 2021.

ALBANELL, E.; MIÑARRO, B.; CARRASCO, N. *Detection of low-level gluten content in flour and batter by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)*. Journal of Cereal Science, v. 56, n. 2, p. 490-495, 2012.

ANITTA, F.P; ABRAHAM, P. *Clinical dietetics and nutrition*. Calcutta: Delhi Oxford University Press; 1997. pp. 73–77.

ARCHIBALD, D.D.; KAYS, S.E. *Determination of total dietary fiber of intact cereal food products by Near-Infrared Reflectance*. Journal of Agricultural Food Chemistry, v. 48, n. 10, p. 4477-4486, 2000.

ARMANINO, C.; FESTA, M.R. *Characterization of wheat by four analytical parameters. A chemometric study*. Analytica Chimica Acta, v. 331, n. 1-2, p. 43-51, 1996.

ASTM E1655-17, A. *Standard practices for infrared multivariate quantitative analysis*. ASTM International, West Conshohocken, PA, pp., 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução CNNPA nº 12, de março de 1978. Aprova o regulamento técnico para biscoitos e bolachas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 1

BRASIL, portaria, n.108, 4 set. 1991. Normas gerais de amostragem para análise de rotina. Método número 11 – Fibra Bruta. Diário Oficial [República Federal do Brasil], Brasília, p. 19813, 17 set. 1991. Seção 1.

BRERETON, R.G. *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. UK: John Wiley & Sons, Ltd. 2003.

CEN, H.; HE, Y. *Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality*. Trends in Food Science & Technology, v. 18, p. 72-83, 2007.

CERNÁ, M. et al. *Use of FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives*. Carbohydrate Polymers, v. 54, n. 4, p. 383-389, 2003.

CHEN. J.; ZHU, S.; ZHAO, G. *Rapid determination of total protein and wet gluten in commercial wheat flour using siSVR-NIR*. Food Chemistry, v. 221, p. 1939-1046, 2016.

CHILINSKA, M. et al. *Study on dietary fibre by Fourier transform-infrared spectroscopy and chemometric methods*. Food Chemistry, v. 109, n. 1, p.114-122, 2016.

COCCHI, M. et al. *Classification of bread wheat flours in different quality categories by a wavelet-based feature selection/classification algorithm on NIR spectra*. Analytica Chimica Acta, v. 544, p. 100-107, 2005.

COCCHI, M. et al. *A. Durum wheat adulteration detection by NIR spectroscopy multivariate calibration*. Talanta, v. 68, p. 1505-1511, 2006.

COZZOLINO, D. *Near infrared spectroscopy in natural products analysis*. Planta Medica, v. 75, p. 746-757, 2009.

COZZOLINO, D. *Infrared methods for high throughput screening of metabolites: food and medical applications*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, v. 14, p. 125-131, 2011.

COZZOLINO, D. *Recent trends on the use of infrared spectroscopy to trace and authenticate natural and agricultural food products*. Applied Spectroscopy Reviews, v. 47, p. 518-530, 2012.

COZZOLINO, D. *An overview of the use of infrared spectroscopy and chemometrics in authenticity and traceability of cereals*. Food Research International, v. 60, p. 262-265, 2014.

DELWICHE, S. R.; GRAYBOSCH, R. A.; PETERSON, C. J. *Predicting protein composition, biochemical properties, and dough-handling properties of hard red 19 winter wheat flour by near-infrared reflectance*. Cereal Chemistry, v. 75, n. 4, p. 412-416, 1998.

DHINGRA et al. *Dietary fibre in food: a review*. Journal of Food Science and Technology, v. 49, n. 3, p. 255-266, 2012.

DOWELL, F.E.. et al. *Predicting wheat quality characteristics and functionality using near-infrared spectroscopy*. Cereal Chemistry Journal, v. 83, n. 5, p. 529-536, 2006.

FERRÃO, M. F. et al. *Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS*. Food Science and Technology, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.

FOCA, G. et al. *Different feature selection strategies in the wavelet domain applied to NIR-based quality classification models of bread wheat flours*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 99, p. 91-100, 2009.

GRANATO, D. et al. *Trends in chemometrics: Food authentication, microbiology, and effects of processing*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 17, n. 3, p. 663-677, 2018.

GUO, Y. et al. *Extraction, purification, and characterization of insoluble dietary fiber from oat bran*, *Transactions of Tianjin University*, v. 27, p. 385-393, 2021.

GUTKOSKI, L.C.; NODARI, M.L.; JACOBSEN NETO, R. *Avaliação de farinhas de trigos cultivados no Rio Grande do Sul na produção de biscoitos*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 91-97, 2003.

HELL, J. et al. *A comparison between near-infrared (NIR) and mid-infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for the multivariate determination of compositional properties in wheat bran samples*. *Food Control*, v. 60, p. 365-369, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos*. 4a (1a Edição digital), 2008. 1020p.

JESPERSON, B. M.; MUNCK, L. *Cereals and cereal products. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. 2009. p. 275-319.

KAROUI, R.; DOWNEY, G.; BLECKER, Ch. *Mid-Infrared spectroscopy coupled with chemometrics: A tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships - A Review*. *Chemical Reviews*, v. 110, p. 6144–6168, 2010.

KONG, J.; YU, S. *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 39, n. 8, p. 549–559, 2007.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, M. et al. *Prediction of total fat, fatty acid composition and nutritional parameters in fish fillets using MID-FTIR spectroscopy and chemometrics*. *LWT – Food Science and Technology*, v. 52, n. 1, p. 12-20, 2013.

McCLURE, F.W. *204 years of near infrared technology: 1800 - 2003*. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 11, p. 487-498, 2004.

- MERTENS, D.R. *Challenges in measuring insoluble dietary fibre*. Animal Sciences Journal, v. 81, p. 3233–3249, 2003.
- MIRALBÉS, C. *Quality control in the milling industry using near infrared transmittance spectroscopy*. Food Chemistry, v. 88, n. 4, p. 621-628, 2004.
- MUTLU, A. et al. *Prediction of wheat quality parameters using near-infrared spectroscopy and artificial neural networks*. European Food Research Technology, v. 233, n. 2, p. 267-274, 2011.
- PARK, S.M. et al., *A Second derivative Fourier-transform infrared spectroscopy method to discriminate perilla oil authenticity*. Journal of Oleo Science, v. 8, n. 5, p. 389-398, 2019.
- RANZAN, C. et al. *NIR pre-selection data using modified changeable size moving window partial least squares and pure spectral chemometrical modeling with ant colony optimization for wheat flour characterization*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 142, 78-86. 2015.
- RIEPPPO, L. et al. *Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of Fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 20, n. 5, p. 451-459, 2012.
- RUIZ, Q. et al., *Characterization of soluble and insoluble fibers in artichoke by-products by ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometrics*, International Journal of Food Properties, v. 24, n. 1, p. 1693-1704, 2021.
- SINELLI, N. et al. *Prediction of semolina technological quality by FT-NIR spectroscopy*. Journal of Cereal Science, v. 54, n. 2, p. 218-223, 2011.
- SMYTH, H.E.; COZZOLINO, D. *Applications of infrared spectroscopy for quantitative analysis of volatile and secondary metabolites in plant materials*. Current Bioactive Compounds, v. 7, p. 66-74, 2011.
- SUBRAMANAN, A.; RODRIGUEZ-SAONA, L. *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. In: Da Wen Sun (pp 146-174), Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. UK: Academic Press. 2009.
- VONGSVIVUT, J. et al. *Quantitative determination of fatty acid compositions in micro-encapsulated fish-oil supplements using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. Food Chemistry, v. 135, n. 2, p. 603-609, 2012.
- WHITBECK, M.R. *Second Derivative Infrared Spectroscopy*, Applied Spectroscopy, v. 35, p. 93 -95, 1981.